

TEMA 6

Polimorfismos genéticos humanos.

Su importancia en farmacología y toxicología.

Asociación con cáncer.

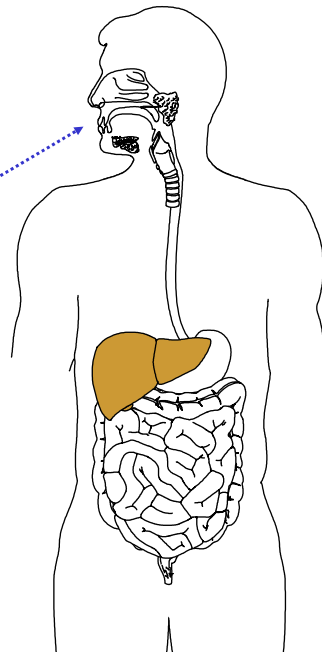
Bases Bioquímicas de la Toxicología Clínica

Ramiro Jover

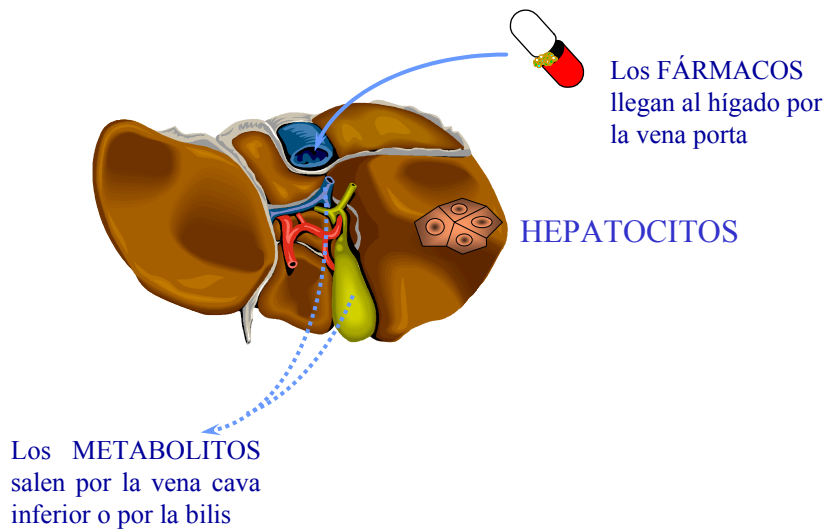
*Los medicamentos
son metabolizados
(biotransformados)
en nuestro organismo*



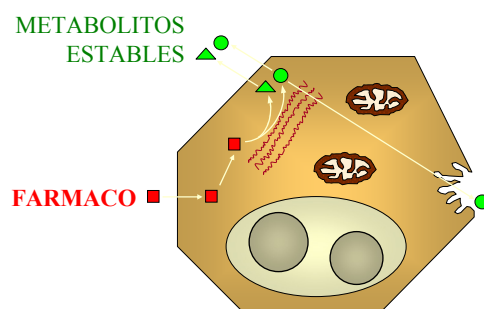
El hígado es el
órgano más
importante en la
metabolización

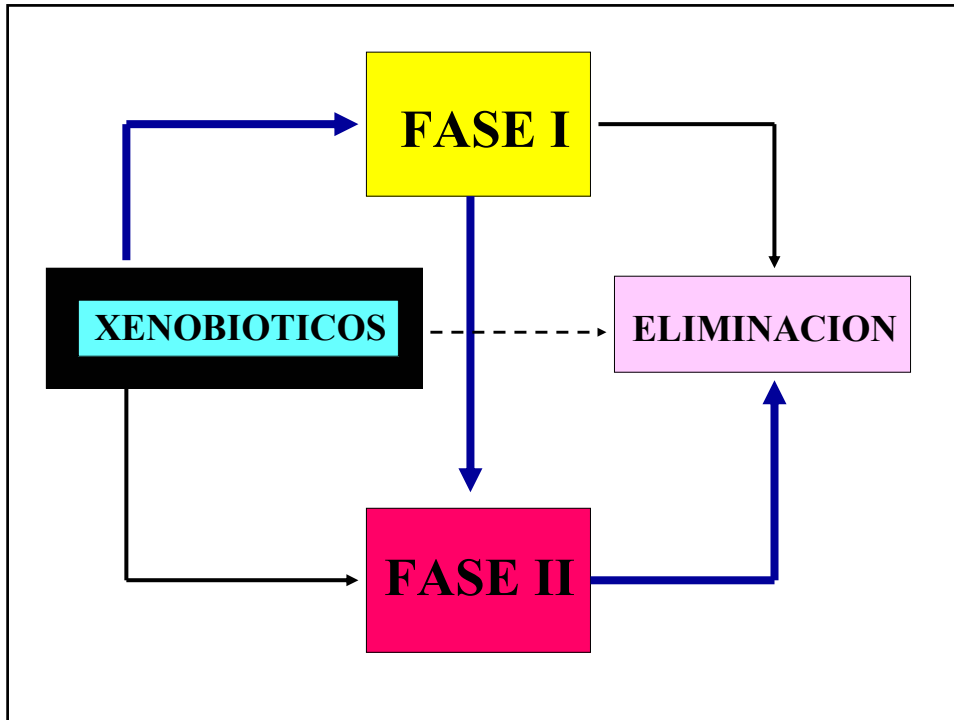


Metabolismo de medicamentos en el hígado

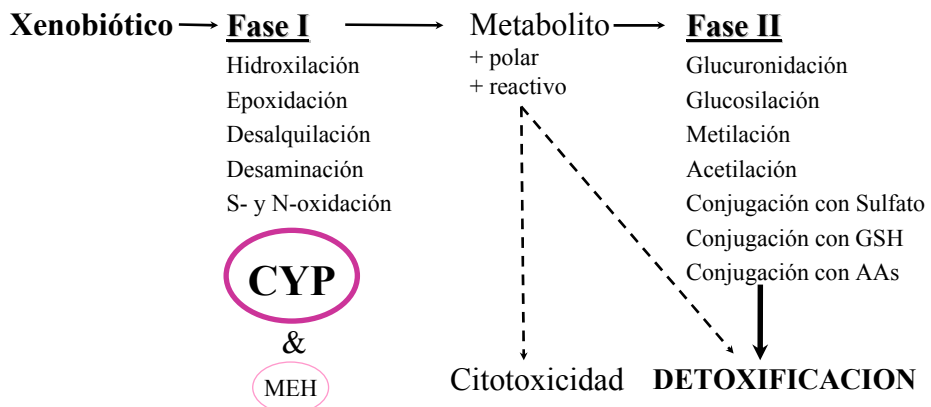


Los medicamentos se metabolizan en los hepatocitos

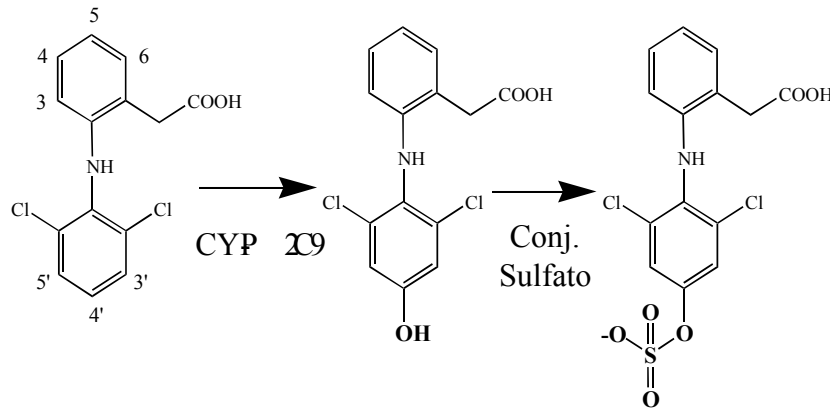




Metabolismo de Fármacos - Fase I y Fase II



Metabolismo de fármacos - Fase I y Fase II

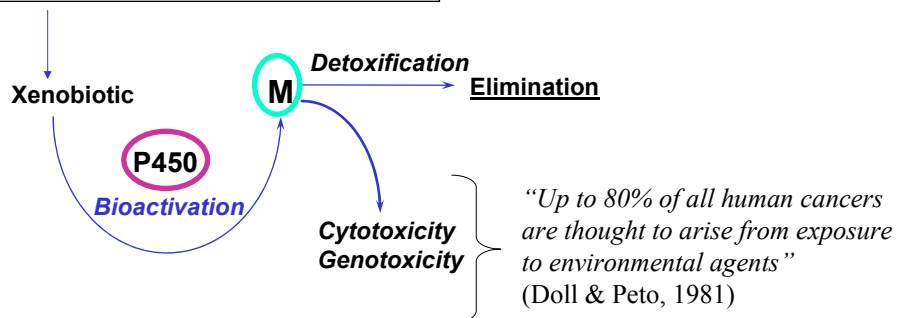


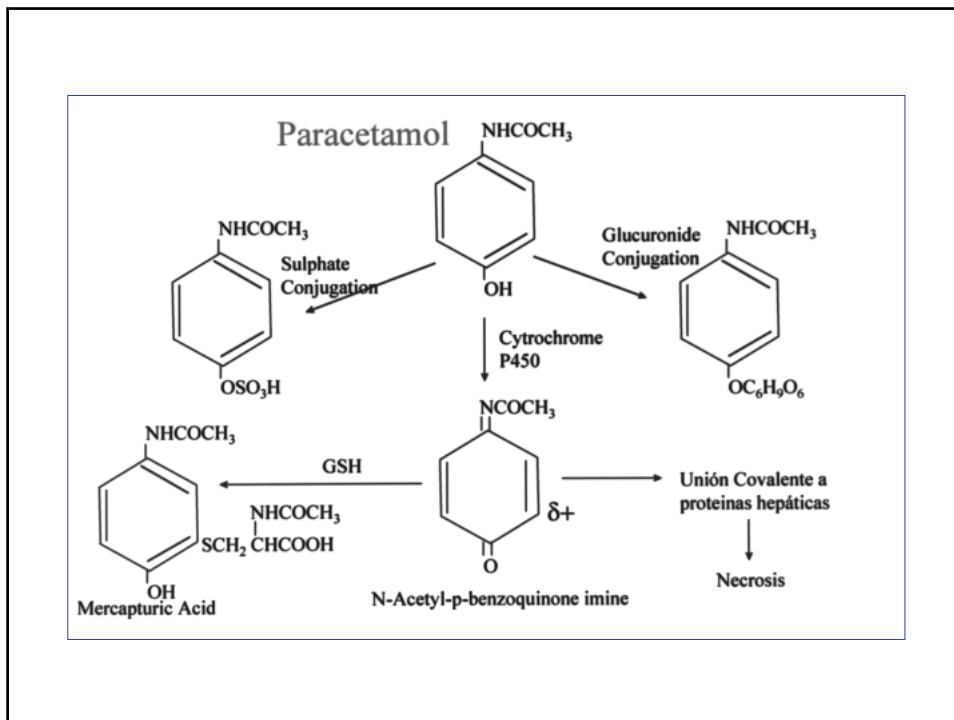
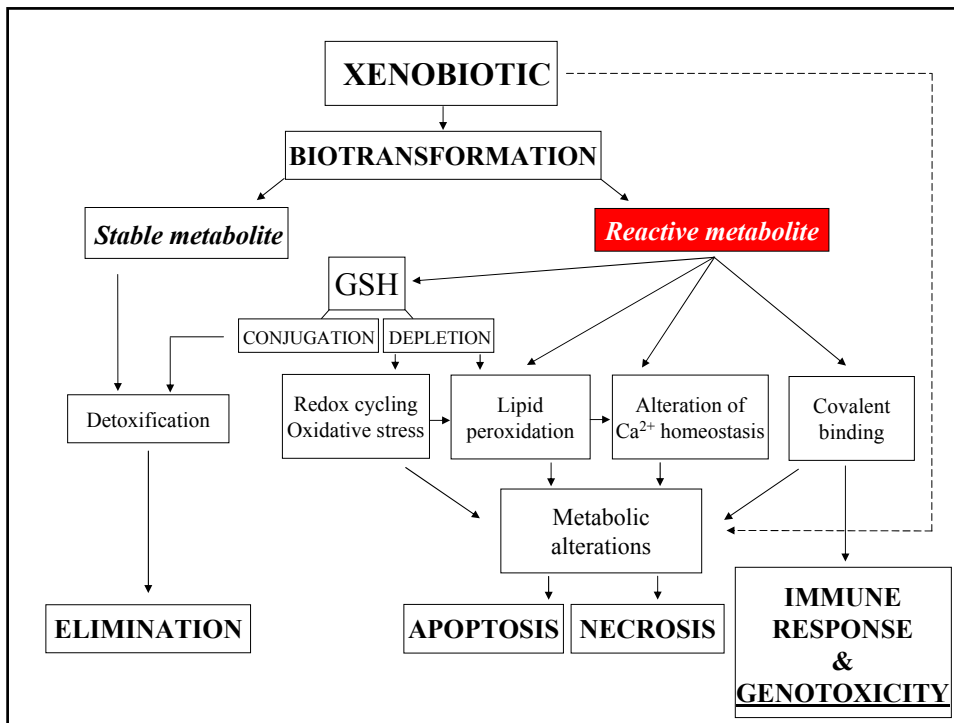
Metabolización del diclofenac (ruta principal)

Metabolismo de xenobióticos - bioactivación

Estimación del número de xenobióticos

• Pesticidas	1500
• Medicamentos	6000
• Aditivos de alimentos	
- con valor nutricional	2500
- conservantes	3000
• Productos industriales	50000

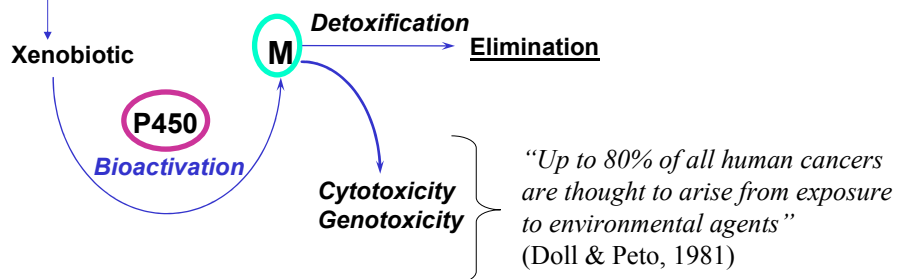




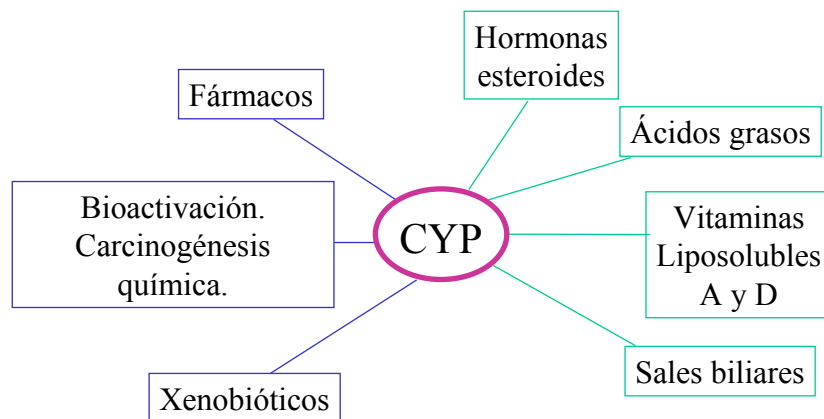
Metabolismo de xenobióticos - bioactivación

Estimación del número de xenobióticos

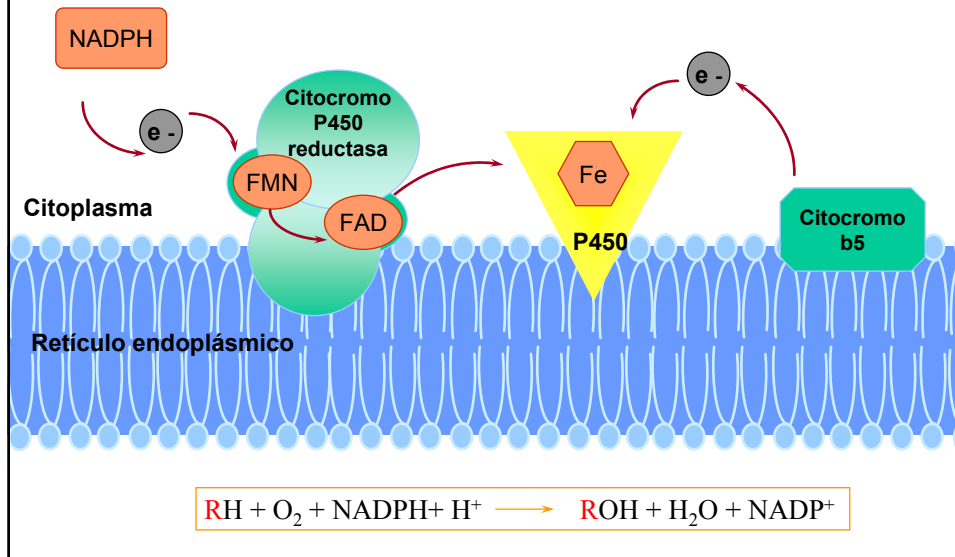
• Pesticidas	1500
• Medicamentos	6000
• Aditivos de alimentos	
- con valor nutricional	2500
- conservantes	3000
• Productos industriales	50000



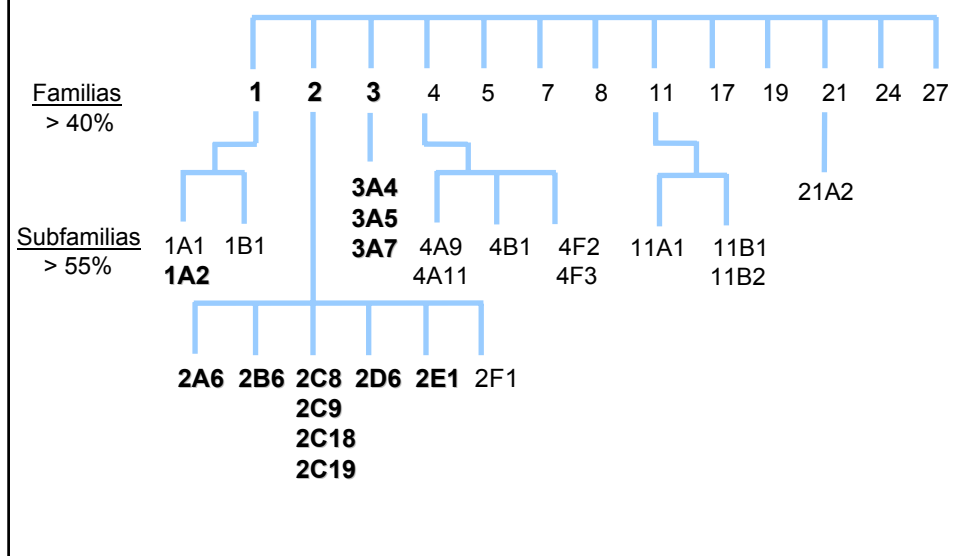
Funciones del citocromo P450 (CYP) en el metabolismo



Citocromo P450 (CYP) - Componentes del sistema

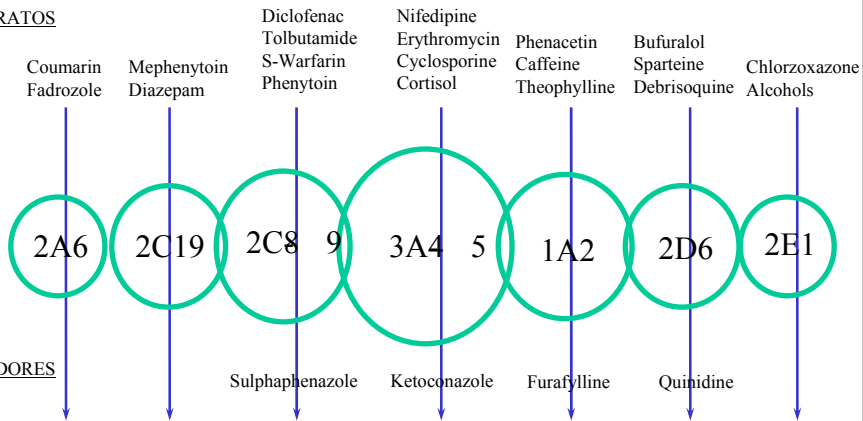


CYPs - Isoenzimas y nomenclatura



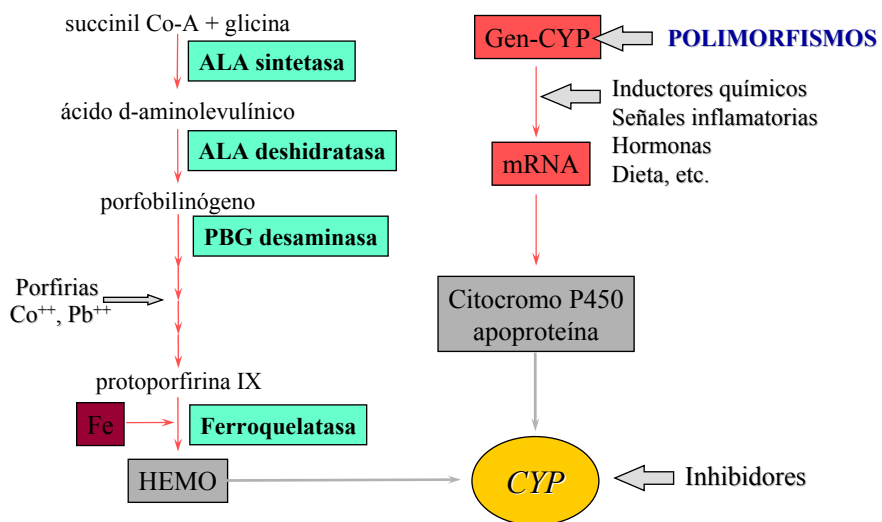
CYPs - Abundancia relativa y especificidad

SUBSTRATOS



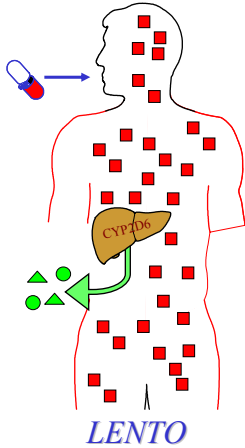
¿Tenemos todos el mismo patrón isoenzimático de CYPs?

Variabilidad interindividual : Causas

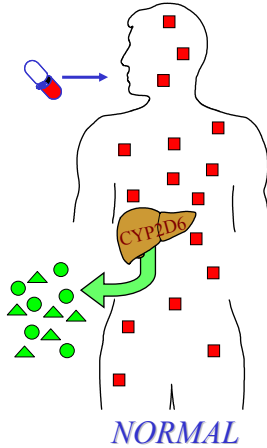


Variabilidad interindividual: consecuencias

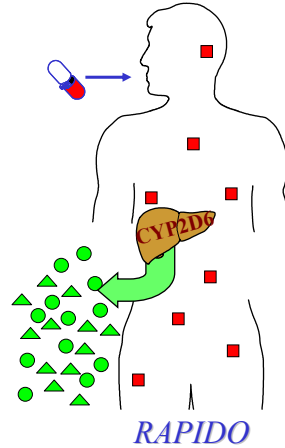
Efecto tóxico



Efecto terapéutico



Fallo terapéutico



4 de julio de 2001/ España

Sanidad retira todo el aceite de orujo de oliva

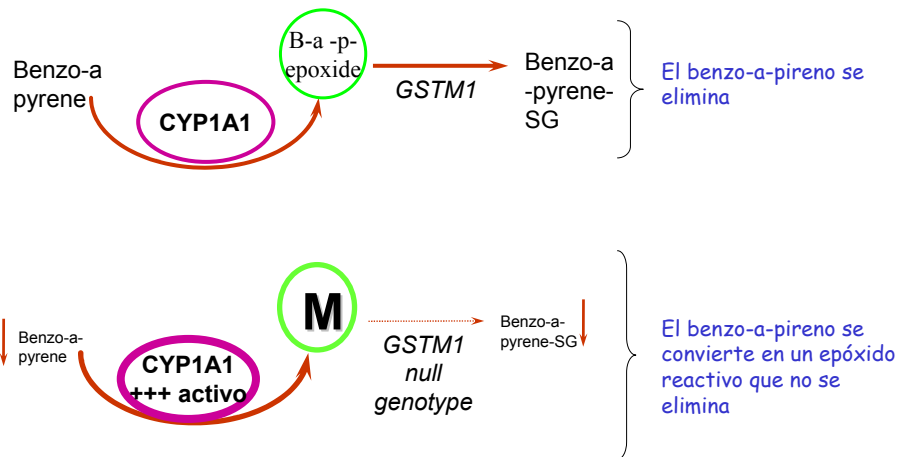


El Ministerio de Sanidad y Consumo ha decidido retirar de todos los establecimientos españoles las partidas de aceite de orujo de oliva y aceite refinado de orujo de oliva (55 millones de litros en total). El motivo que ha llevado a la retirada de este producto ha sido la detección de cantidades preocupantes de benzopireno en este tipo de aceite.

El benzopireno es una sustancia que se convierte en cancerígena al metabolizarse con el cuerpo humano, por lo que su consumo puede resultar muy peligroso, para nuestra salud, según confirmó la directora general de Salud Pública del Ministerio de Sanidad, Dolores Flores.

Se baraja la posibilidad de que el actual sistema de producción y elaboración del aceite de orujo haya propiciado la acumulación de benzopireno en el aceite, por lo que se está pensando en modificar la forma de fabricación de este producto, para evitar riesgos.

Variabilidad interindividual : Consecuencias



POLIMORFISMO

Genetic variations (**difference in DNA sequence**) occurring in more than 1% of a population.

The term defines monogenetic traits that exist in the normal population in at least two phenotypes, for example the ABO blood groups.

In the context of pharmacology, genetic polymorphism of drug metabolising enzymes gives rise to distinct subgroups in the population that differ in their ability to perform a certain drug biotransformation.

POLIMORFISMO → Variación genética → Cambio en la secuencia del DNA → Mutaciones

Las mutaciones, o variaciones en la expresión de los genes, pueden ocurrir con relativa facilidad en las distintas fases del *flujo de información genética* (replicación-transcripción-traducción)

Causas

Factores endógenos: Errores en la maquinaria molecular.

Factores ambientales: Radiaciones ultravioleta, alteraciones químicas producidas por sustancias tóxicas, etc.

Tipos de mutaciones puntuales :

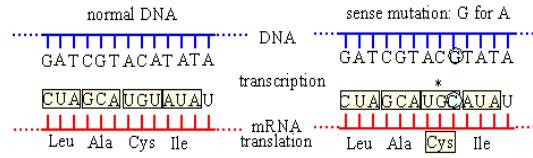
- Sustitución: }
 - Silenciosas
 - De cambio de sentido
 - Sin sentido
- Adición (Inserción) }
 - Desplazamiento de la pauta de lectura
- Delección }

El código genético

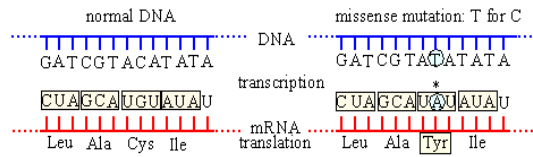
	U	C	A	G	
U	UUU = Phe UUC = Phe UUA = Leu UUG = Leu	UCU = Ser UCC = Ser UCA = Ser UCG = Ser	UAU = Tyr UAC = Tyr UAA = Stop UAG = Stop	UGU = Cys UGC = Cys UGA = Stop UGG = Trp	U C A G
C	CUU = Leu CUC = Leu CUA = Leu CUG = Leu	CCU = Pro CCC = Pro CCA = Pro CCG = Pro	CAU = His CAC = His CAA = Gln CAG = Gln	CGU = Arg CGC = Arg CGA = Arg CGG = Arg	U C A G
A	AUU = Ile AUC = Ile AUA = Ile AUG = Met	ACU = Thr ACC = Thr ACA = Thr ACG = Thr	AAU = Asn AAC = Asn AAA = Lys AAG = Lys	AGU = Ser AGC = Ser AGA = Arg AGG = Arg	U C A G
G	GUU = Val GUC = Val GUA = Val GUG = Val	GCU = Ala GCC = Ala GCA = Ala GCG = Ala	GAU = Asp GAC = Asp GAA = Glu GAG = Glu	GGU = Gly GGC = Gly GGA = Gly GGG = Gly	U C A G

Mutaciones del DNA. Puntuales

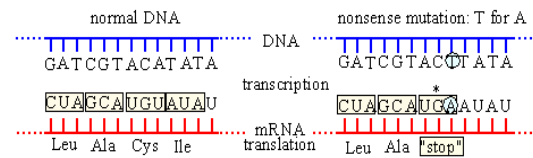
Silenciosas



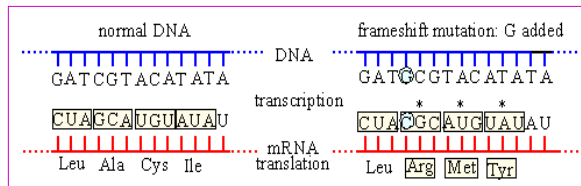
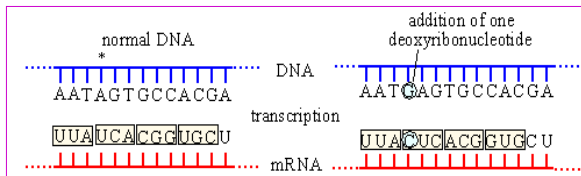
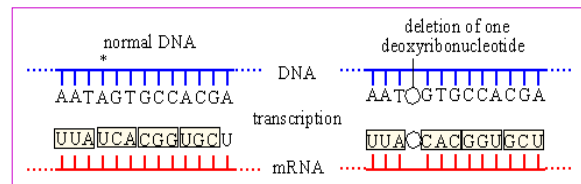
De cambio de sentido



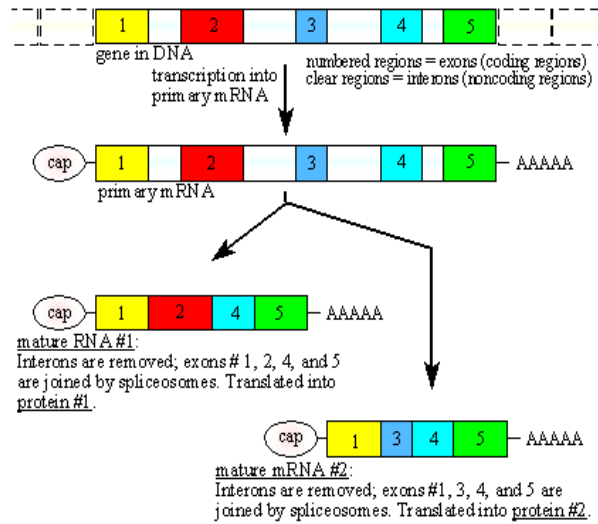
Sin sentido



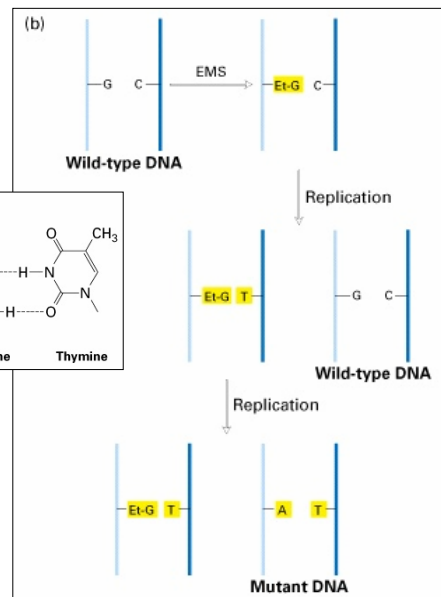
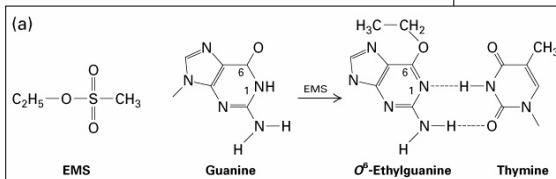
Mutaciones del DNA. Delección, adición y cambio en la pauta de lectura



Mutaciones del DNA. Alteración en corte y empalme (splicing)



Introducción de mutaciones puntuales por acción de sulfonato de etilmetano (EMS), un agente mutagénico de uso común.



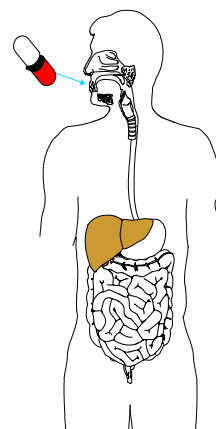
Sustitución G → A

POLIMORFISMOS

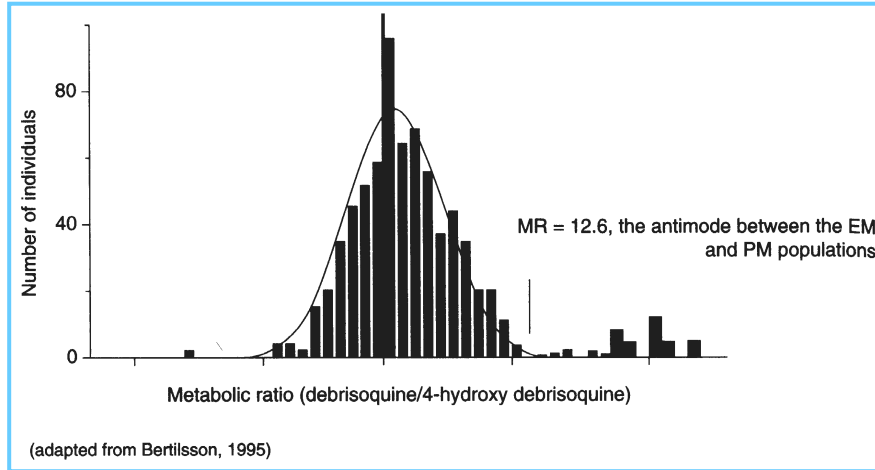
FENOTIPACIÓN Y GENOTIPACIÓN

MÉTODOS de FENOTIPACIÓN

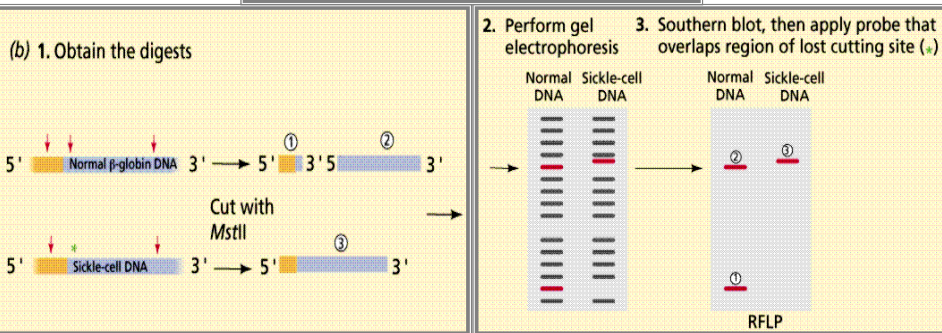
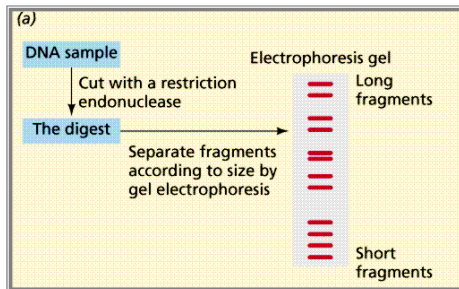
- Medida directa de la actividad en tejido (biopsia hepática).
- Métodos *ex vivo*. Medida de actividad en cultivo de linfocitos.
- Métodos *in vivo*. Medida de un metabolito, relación metabólica (Sustrato / Producto), o velocidad de eliminación, de un fármaco modelo:
 - CYP1A2 → Cafeína (?)
 - CYP2C9 → Tolbutamida, warfarina
 - CYP2C19 → S-mefenitoina, omeprazol
 - CYP2D6 → Dextrometorfan
 - CYP2E1 → Cloroxazona



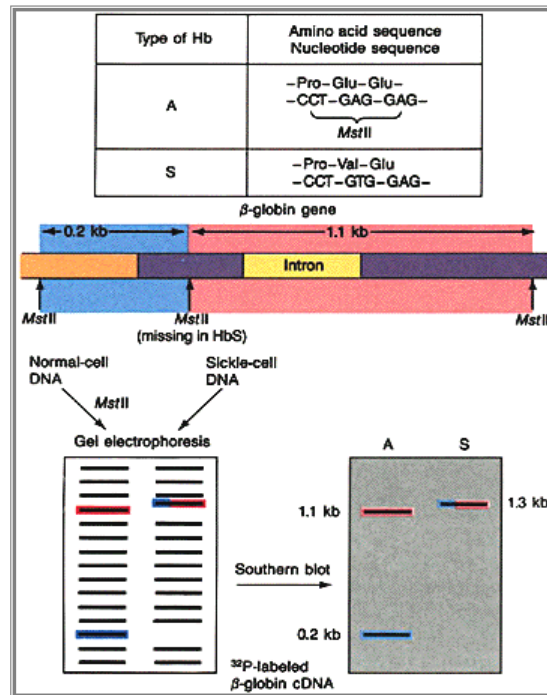
Fenotipo polimórfico: Hidroxilación de debrisoquina



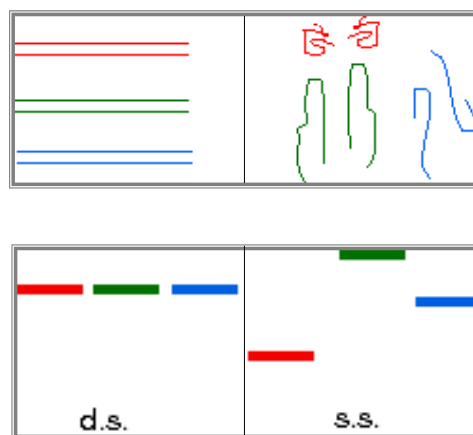
Genotipación. Detección de mutaciones puntuales. RFLP



RFLP (Southern blot analysis)



Genotipación. Single-strand conformation polymorphism (SSCP)



Citocromos P450 polimórficos con relevancia en el metabolismo de xenobióticos

Enzyme	Substrates	Polymorphism		
		Frequency	Functional effects	Most important polymorphic variants
CYP1A1	Carcinogens	Relatively high	Unproven	
CYP1A2	Drugs, carcinogens	High	Some	CYP1A2*1F, CYP1A2*1K
CYP1B1	Carcinogens, oestrogens	Rare null alleles, frequent missense mutations	At least seven haplotypes with similar activity	CYP1B1*7
CYP2A6	Nicotine, drugs, carcinogens	High in orientals, less frequent in Caucasians	Important for nicotine metabolism	CYP2A6*1B, CYP2A6*4, CYP2A6*9, CYP2A6*12
CYP2B6	Drugs	High	Reduced drug metabolism	CYP2B6*5, CYP2B6*6, CYP2B6*16
CYP2C8	Some drugs	High	Reduced drug metabolism	CYP2C8*3
CYP2C9	Drugs	Relatively low	Very significant	CYP2C9*2, CYP2C9*3
CYP2C19	Drugs	High	Very significant	CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17
CYP2D6	Drugs	High	Very significant	CYP2D6*2xm, CYP2D6*4, CYP2D6*5, CYP2D6*10, CYP2D6*17
CYP2E1	Carcinogens, solvents, few drugs	Low	No	
CYP3A4	Drugs, carcinogens	Low	No or small	CYP3A4*1B
CYP3A5	Drugs, carcinogens	High	Significant	CYP3A5*3, CYP3A5*6, CYP3A5*7
CYP3A7	Drugs, carcinogens	Low	Some	

CYPs humanos implicados en el metabolismo de carcinógenos

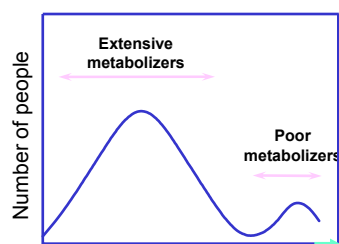
Enzyme	Activation of carcinogens
CYP1A1	Polycyclic aromatic hydrocarbons: benzo(a)pyrene, dimethylbenz[a]anthracene, PhIP*
CYP1A2	Activation of aryl and heterocyclic amines in industrial settings and food mutagens: <i>N</i> -nitrosodimethylamine, 4-aminobiphenyl, 2-acetyl-aminofluorene, <i>N</i> -nitrosodiethylamine, PhIP, IQ, aflatoxin B1
CYP1B1	Polycyclic aromatic hydrocarbons: benzo(a)pyrene, dimethylbenz[a]anthracene, benz[a]anthracene, 3-methylcholanthrene, DMBA, oestradiol
CYP2A6	Activation of tobacco-related <i>N</i> -nitrosamines: NNK, NNAL, NDEA, NNN, NATB, Aflatoxin B1, 1,3-butadiene, 2,6-dichlorobenzonitrile
CYP2B6	Aflatoxin B1 and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
CYP2E1	Low-molecular-weight toxicants and cancer suspect agents: benzene, carbon tetrachloride, chloroform, styrene, vinyl chloride, vinyl bromide, <i>N</i> -nitrosodimethylamine, NNK
CYP3A4/5/7	Diverse carcinogens: aflatoxin B1, aflatoxin G1, benzo(a)pyrene, naphthalene, NNN, 1-nitropyrene, 6-amino-chrysene, oestradiol, senecionine, stergmatocystine

CYPs humanos implicados en el metabolismo de carcinógenos

CYP1A1	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (benzo(a)pireno & dimetilbenzantraceno)
CYP1A2	Nitrosaminas, aminas heterocíclicas
CYP2A6	Nitrosaminas, aflatoxina B1
CYP2D6	NNK (nitrosamina derivado en humo tabaco)
CYP2E1	Benzeno, tetracloruro de carbono, cloruro de vinilo
CYP3A4/5	Aflatoxina B1, benzo(a)pireno, 6-aminocriseno

Polimorfismo del CYP2D6

Polimorfismo de la debrisoquina / esparteina
El 7% de la población presenta un metabolismo deficiente
Herencia autosomal recesiva
Influye en la metabolización de mas de 25 fármacos de uso común:
β-bloqueantes, antiarrítmicos, antidepresivos tricíclicos, antipsicóticos, analgésicos, antihistamínicos, etc

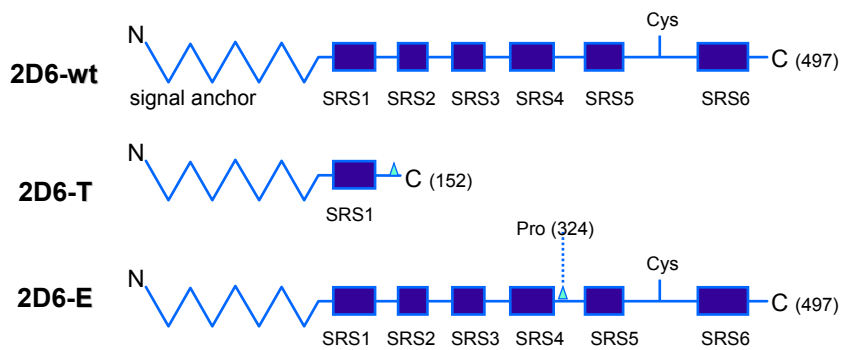


Debrisoquine / 4-hydroxydebrisoquine

Polimorfismo del CYP2D6

<i>CYP2D6</i> allele	<i>Detrimental mutation</i>	<i>Consequence</i>	<i>Frequency in Caucasian</i>
2D6-A	A2637 deleted	Reading frame disruption	5-10
2D6-B	G1934 → A	Defect splicing	70-80
2D6-D	Gene deletion	No-enzyme	10-15
2D6-E	A3023 → C	His324 → Pro nonfunctional prot.	1-5
2D6-T	T1795 deleted	Reading frame disruption	5-10

Polimorfismo del CYP2D6



Polimorfismo del CYP2D6 y cáncer de pulmón

NNK (4 (metilnitrosamina) 1 (β piridil) 1 butanona)

Nitrosamina identificada en el humo del tabaco (*Crespi et al. 1991*)

Es activada (bioactivada) por CYP2D6

Menos aductos DNA nitrosamina en metabolizadores pobres 2D6

Metabolizador pobre → fenotipo protector

Nicotina

es sustrato del CYP2D6. Nicotina → cotinina

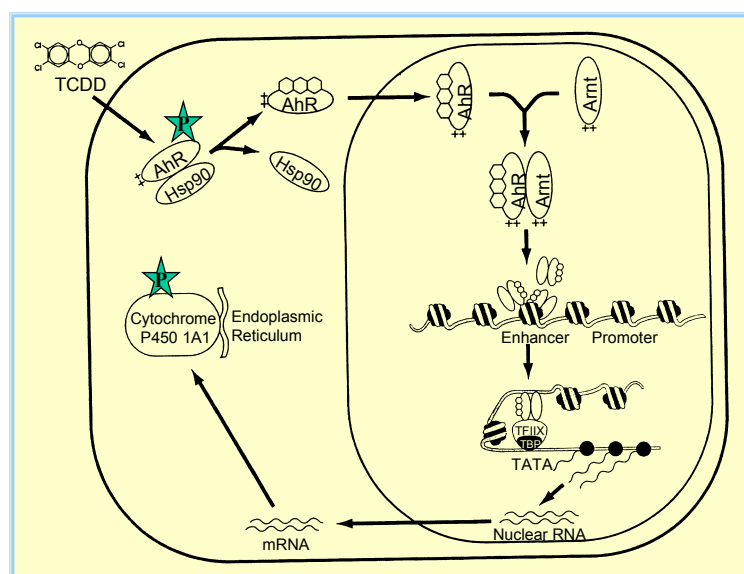
Más nicotina en el plasma de metabolizadores pobres 2D6

Menos necesidad (mayor duración efecto) → menos cigarrillos

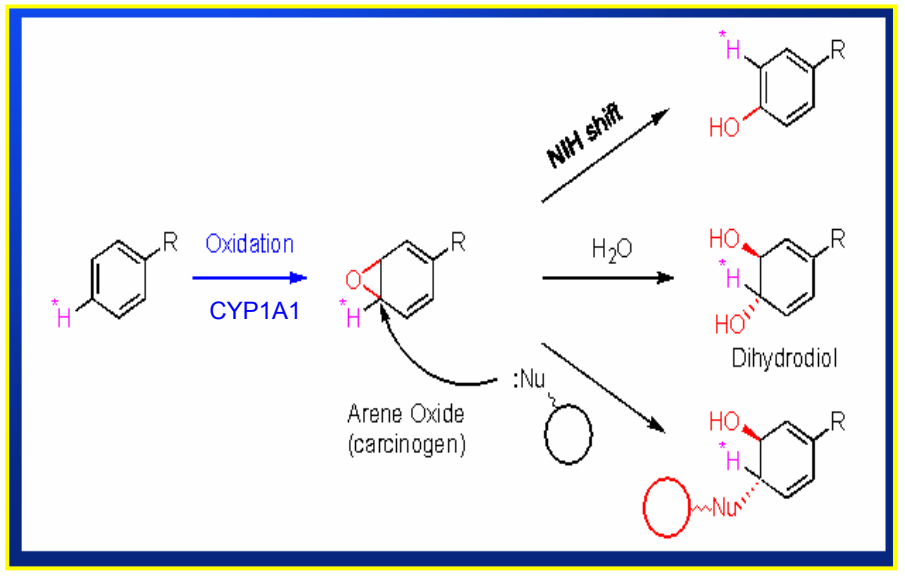
→ Menos riesgo de cáncer

Metabolizador pobre → fenotipo protector

Polimorfismos del CYP1A1 y del receptor AhR



Polimorfismo del CYP1A1



Polimorfismo del CYP1A1: *Estudios fenotípicos*

Actividad: hidroxilación de hidrocarburos aromáticos
(benzo(a)pireno → 3-hidroxi-benzo(a)pireno)

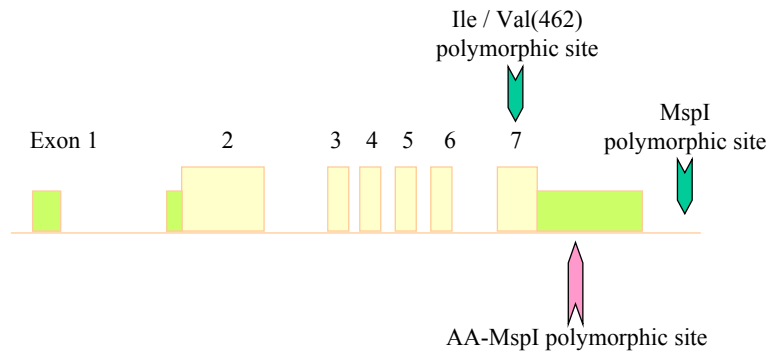
Tejido: linfocitos periféricos inducidos con 3 μ M TCDD

En estudios poblacionales la actividad CYP1A1 muestra una distribución trimodal → Fenotipos: Baja, media y alta actividad / inducibilidad

Asociación fenotipos 1A1 con carcinoma bronquial →

	Alta actividad	Baja actividad
% Controles:	10.9	42.2
% Pacientes:	30.6	5.0

Polimorfismo del CYP1A1: *Estudios genotípicos*



Alelos	Genotipo	Fenotipo	Controles	Cáncer pulmón
m2 MspI +	m2/m2	Alta Inducción	10.6	22.9
Val ⁴⁶²	Val/Val	Alta Actividad	4.7	12.5

Enzimas de Fase II implicadas en carcinógenesis

GSTs

NATs

Sulfotransferasas

Otras enzimas implicadas en el metabolismo de carcinógenos

Alcohol deshidrogenasa

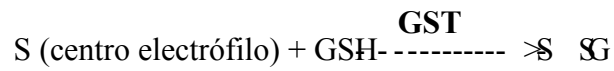
Aldehido deshidrogenasa

Microsomal epoxido hidrolasa

Mieloperoxidasa

NAD(P)H:quinona oxidoreductasa

Glutathione S-transferases

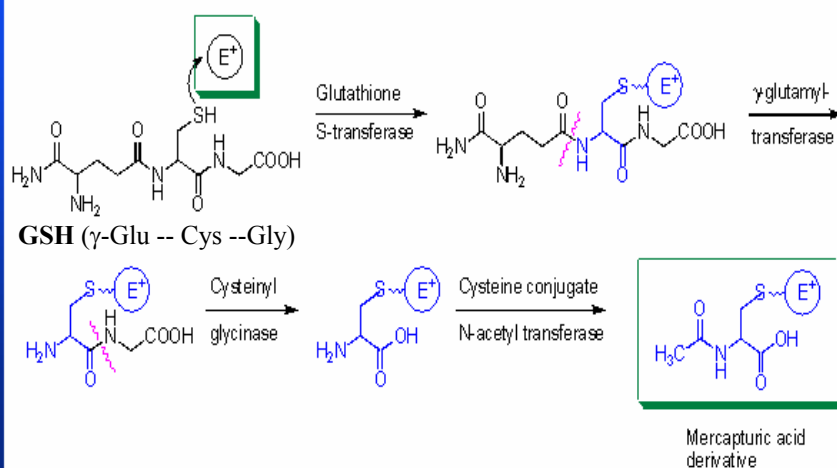


- Multifamilia de enzimas citosólicas mayoritariamente hepáticas.
- Presente en la mayoría de seres vivos.
- Protección contra compuestos nocivos.

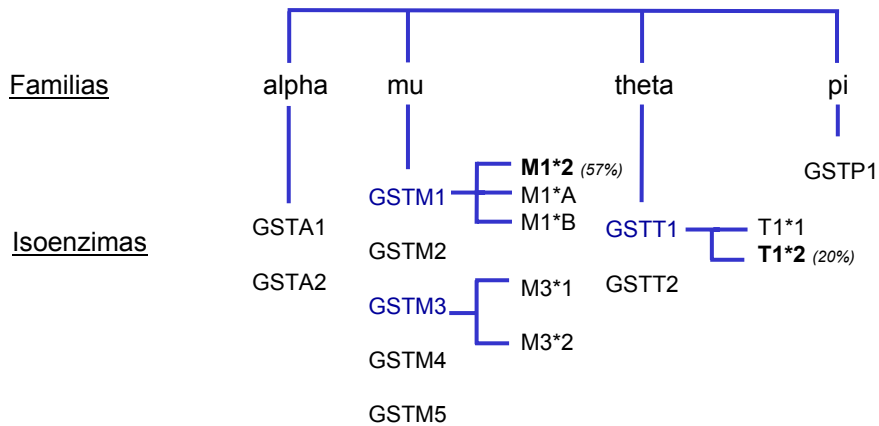
SUSTRATOS:

- **Endógenos:** *Productos del estrés oxidativo*
 - Peroxidación lipídica → cumene hydroperoxide, 4-hidroxinonenal
 - Oxidación del DNA → Propenales básicos de timina y uracilo
- **Exógenos:** *Carcinógenos ambientales*
 - HAP bioactivados por P450 (epóxidos, trans-4-fenil-3-buten-2-ona, benzo(a)pireno-diol-epoxido) acroleína (humo tabaco), agentes metilantes (cloruro de metilo) pesticidas, disolventes industriales (oxido de etileno).

Conjugación con glutathione y su metabolismo



Glutation-S-transferasas humanas



Glutation S-transferasas humanas : Polimorfismos y cáncer

Cutaneous basal cell carcinoma (BCC):

UV → ROS → mutations

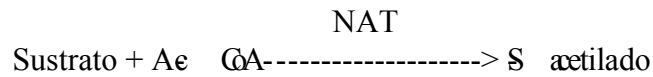
GSTM1, GSTM3 y GSTT1 conjugan compuestos resultantes del estrés oxidativo inducido por UV.

GST se expresa en la epidermis y en la lamina basal de la piel (que incluye las stem cells)

Número promedio de BBCs

	SI	NO
Skin type 1	2.99	2.12
+GSTM1*2 (null)	4.57	2.00
+GSTM3*1 (AA)	3.57	2.08

N-acetil transferasas (NATs)



SUSTRATOS:

Endógenos: Aminas aromáticas endógenas como serotonina. Transferencia de grupos acetilo entre arilaminas endógenas (sin Ac-CoA). Son denominadas: *Arilamina N-acetiltransferasas*

Exógenos: Carcinógenos ambientales (Procesos industriales y combustión tabaco o alimentos). Aminas e hidrazinas aromáticas y heterocíclicas.

N-acetil transferasas humanas: variantes alélicas

Genes

NAT1 (7 alelos)	1*4	wt	
	1*10	Alternat polyA	(↑ level) rapid
	1*14	Arg187Gln	(↓ affinity) slow
	1*11	Val149Ile	(↑ Vmax) rapid
	1*15	Arg187Stop	(no NAT1) slow
NAT2 (15 alelos)	2*4	wt	
	2*5A	Ile114Thr	(↓ NAT2) slow
	2*6A	Arg197Gln	(↓ stability) slow
	2*7A	Gly286Glu	(↓ stability) slow
	2*14A	Arg64Gln	(↓ stability) slow

N acetil transferasas humanas y cáncer

Cáncer	Genotipo	NAT1		NAT2	
		%	(n) OR	%	(n) OR
Colon: Bell et al. (1995)	Rápido				
Controles		29	(112) 1.0		
Enfermos		44	(202) 1.9		
Pulmón: Bouchardy et al. (1998)	Lento				
Controles		56	(170) 1.0		
Enfermos		66	(148) 1.9		
Hígado: Agúndez et al. (1996)	Lento				
Controles				54	(258) 1.0
Enfermos				68	(100) 1.8

ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS. Medidas de asociación.

ODDS de que nazca un niño:

n° niños 51 / n° niñas 49 = 1.04

RISK de que nazca un niño:

n° niños 51 / (tot 100) = 0.51

ODDS RATIO:

ODDS_{control} = 1.04

ODDS_{india} = 1.70 (63/37)

OR= 1.70 / 1.04 =1.63

RELATIVE RISK

RISK_{control} = 0.51

RISK_{india} = 0.63 (63/100)

RR= 0.63 / 0.51 =1.24