



Tesis de maestría en Ciencias Biológicas

Sub-Área Genética

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

# **Caracterización del gen CYP2D6 y sus asociaciones clínicas en pacientes con cáncer de mama tratados con Tamoxifeno**

**Lic. Gabriel Ramírez Menza**

Orientadora: Dra. Patricia Esperón

Laboratorio de Biología Molecular

Facultad de Química

Universidad de la República (UdelaR)

Montevideo, Uruguay

**2024**

## AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradecerle a mi tutora Dra. Patricia Esperón por haberme abierto las puertas al Laboratorio de Biología Molecular y por guiarme en la realización de esta tesis.

Agradezco a PEDECIBA y CAP, por el apoyo económico que me permitió realizar esta tesis.

A los miembros del tribunal Dra. Leda Roche, Dr. Víctor Raggio y Dr. Julio Da Luz por aceptar evaluar esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio Marcelo y Andrea, por el constante apoyo técnico, personal y académico a lo largo de mi estadía en la Facultad y en la realización de la tesis.

Agradezco a todo el personal docente y no docente de la Facultad de Química que me han hecho sentir que la facultad era mi casa.

Al banco de tumores del Hospital Central de las Fuerzas Armadas del Uruguay por brindarme parte de las muestras utilizadas en esta tesis y por recolectar los datos de las historias clínicas.

Agradezco al Laboratorio de Virología Molecular del Centro de Investigaciones Nucleares (Facultad de Ciencias) por brindarme asistencia en el equipo de StepOnePlus Real-time PCR.

Agradezco a mis compañeros de generación de la Facultad de Ciencias y a todos mis compañeros de maestría por el constante apoyo académico.

A mis amigos y familiares, por el constante apoyo emocional que me permitieron mantener los brazos en alto en los momentos más difíciles.

A mi hermano, por su apoyo sentimental y por sostener a la familia en los momentos complicados, mi formación también te la debo a vos.

A mis hermanas peludas, Yuma, Gina y Juana.

A Carolina, no hay palabras para agradecer el apoyo que me diste para poder sostenerme en este proceso. Muchas gracias weia por estar siempre y por tu amor incondicional.

**Mamá y Papá:** Esta tesis, mi carrera y mi posgrado no hubieran sido posibles sin su ayuda. Gracias por apoyarme en este camino y en permitirme estudiar lo que me gusta. No me dan los renglones para seguirles agradeciendo y expresarles lo mucho que los quiero.

# Índice

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
2.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER DE MAMA.....	3
2.1.1 Epidemiología del CM.....	3
2.1.2 Factores de riesgo .....	4
2.2 PRINCIPIOS GENERALES DE LA FARMACOGENÉTICA .....	5
2.2.1 Definición y objetivos de la farmacogenética .....	5
2.2.2 Características generales de los procesos farmacológicos .....	6
2.2.3 Profármacos y fármacos de acción directa.....	7
2.2.4 Fenotipos metabolizadores de fármacos .....	7
2.3 HORMONOTERAPIA PARA CÁNCER DE MAMA.....	8
2.3.1 Tamoxifeno .....	9
2.3.2 Farmacocinética del Tamoxifeno .....	11
2.3.3 Factores que afectan los niveles de endoxifeno.....	12
2.4. SUPERFAMILIA DE LOS CITOCROMOS P450.....	14
2.4.1 Citocromo P450 2D6 (CYP2D6).....	14
2.4.2 Genética molecular y polimorfismos de CYP2D6 .....	15
2.4.3 Variantes de números de copias (CNV) en CYP2D6 .....	16
2.4.4 Epigenética y los citocromos P450.....	16
2.4.5 Relación genotipo-fenotipo en CYP2D6 .....	17
2.4.6 Recomendaciones Terapéuticas para TMX.....	18
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
4.1 PACIENTES Y MUESTRAS .....	21
4.2 ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE CYP2D6.....	21
4.2.1 Extracción de ADN genómico .....	21

4.2.2	Análisis por Real-Time PCR.....	21
4.2.3	Amplificación por PCR a tiempo final .....	22
4.2.4	Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	24
4.2.5	Purificación y secuenciación.....	24
4.3	ANÁLISIS DE LAS VARIANTES DE NÚMERO DE COPIAS (CNVs) DE CYP2D6.....	24
4.3.1	Análisis de CNVs por StepOnePlus™ Real-Time PCR .....	24
4.3.2	Análisis de CNVs por Long-PCR a tiempo final .....	25
4.4	PREDICCIÓN DEL FENOTIPO METABOLIZADOR CYP2D6.....	26
4.5	ANÁLISIS DE LA METILACIÓN EN CYP2D6 .....	26
4.5.1	Predicción CGI y diseño de <i>primers</i> .....	26
4.5.2	Modificación del ADN con bisulfito de sodio .....	27
4.5.3	Amplificación por PCR del ADN modificado .....	27
4.5.4	Análisis del estado de metilación de la región amplificada .....	28
4.6	VARIABLES UTILIZADAS EN LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN .....	29
4.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	30
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
5.1	CARACTERÍSTICAS Y DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES .....	31
5.2	GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN CYP2D6.....	31
5.2.1	Cálculo del tamaño de la muestra.....	31
5.2.2	Determinación de los polimorfismos de CYP2D6 .....	31
5.2.3	Determinación de las CNVs de CYP2D6 .....	34
5.2.4	Comparación de frecuencias de las variantes de CYP2D6 en Latinoamérica y otras poblaciones .....	36
5.2.5	Frecuencias genotípicas y sus fenotipos metabolizadores asociados.....	37
5.3	METILACIÓN DE CYP2D6.....	38
5.3	ASOCIACIÓN CON LOS DATOS CLÍNICOS .....	40
5.3.1	Asociación de los polimorfismos genéticos de CYP2D6 con los resultados del tratamiento con TMX .....	40
5.3.2	Asociación entre los fenotipos metabolizadores CYP2D6 y los resultados del tratamiento con TMX .....	41

5.3.3 Asociación entre los fenotipos metabolizadores CYP2D6 y los resultados del tratamiento con TMX con el estado menopáusico .....	42
5.3.4 Asociación entre los fenotipos metabolizadores CYP2D6 y los resultados del tratamiento con TMX en pacientes con uso Anticonceptivos orales.....	42
5.3.5 Asociación entre los fenotipos metabolizadores CYP2D6 y los resultados del tratamiento con TMX en pacientes fumadoras .....	42
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
6.1 Evaluación de las frecuencias alélicas de los polimorfismos CYP2D6.....	43
6.2 Evaluación de los sus fenotipos metabolizadores de CYP2D6 inferidos .....	44
6.3 Evaluación de los estudios de metilación en CYP2D6.....	46
6.4 Análisis de asociación en las pacientes .....	47
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>50</b>
<b>9. ANEXO .....</b>	<b>51</b>
9.1 Estadios tumoral del cáncer de mama .....	51
9.2 Artículo publicado.....	52
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>59</b>

## 1. RESUMEN

El tamoxifeno (TMX) es un fármaco utilizado ampliamente como terapia adyuvante para el cáncer de mama (CM) con receptor de estrógeno positivo (ER+). La respuesta interindividual al TMX es variable, en parte debido a factores genéticos, principalmente a variaciones en el gen CYP2D6. Este gen se encuentra involucrado en la metabolización del TMX generando su metabolito activo, el endoxifeno, por lo que su funcionalidad se relaciona con la biotransformación y efectividad del TMX en los pacientes.

Según la actividad de la enzima CYP2D6, las personas pueden ser clasificadas en cuatro fenotipos metabolizadores distintivos: metabolizadores ultrarrápidos (UM), metabolizadores normales (NM), metabolizadores intermedios (IM) y metabolizadores pobres (PM).

El objetivo general de este trabajo fue conocer el estado genético y epigenético de CYP2D6 en la población uruguaya. Además, realizar un estudio de la farmacogenética del TMX en un grupo de pacientes con CM a partir estos datos. Los objetivos específicos fueron determinar en la población uruguaya las frecuencias alélicas de los polimorfismos \*3, \*4, \*6, \*9, \*17 y \*41 de CYP2D6, y las frecuencias de las variaciones en el número de copias (CNV), incluyendo las duplicaciones (CYP2D6xN) y deleciones (CYP2D6\*5) génicas. Adicionalmente, se estudió el estado de metilación del gen CYP2D6. Además, se investigó la correlación entre el genotipo de CYP2D6 de los pacientes con CM tratados con TMX, con los datos clínicos y su respuesta al tratamiento.

Se encontró que los polimorfismos del gen CYP2D6 que otorgan una función nula o decrecida en la enzima están presentes en la población uruguaya, siendo el polimorfismo \*4 el de mayor frecuencia (17.8%) y similar a lo reportado en poblaciones europeas. Por otra parte, se encontró que las CNV son poco frecuentes (1%) en comparación con el resto de las poblaciones de la región y otras poblaciones caucásicas. Finalmente, en todas las muestras analizadas, la isla CpG estudiada se encontraba metilada.

La mayoría de los individuos analizados en este trabajo mostraron un fenotipo NM (65%), los individuos IM representan un 30%, y los individuos PM un 5%, siendo estos dos últimos los que no podrían verse beneficiados por la dosis estándar de TMX.

El análisis estadístico en las pacientes con CM bajo tratamiento con TMX, no mostró asociación significativa entre la presencia de un genotipo CYP2D6, con respecto a su resultado clínico. Tampoco se encontró ninguna asociación con otras variables analizadas como el tabaquismo, el uso de anticonceptivos orales y el estado menopáusico.

La escasa información sobre CYP2D6 en las poblaciones de América Latina, impide la extrapolación de conclusiones desde estudios clínicos realizados en otros grupos étnicos. La realización de estudios que incluyan la comparación étnica de perfiles farmacogenómicos entre poblaciones son un aporte para resolver esta dificultad.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER DE MAMA

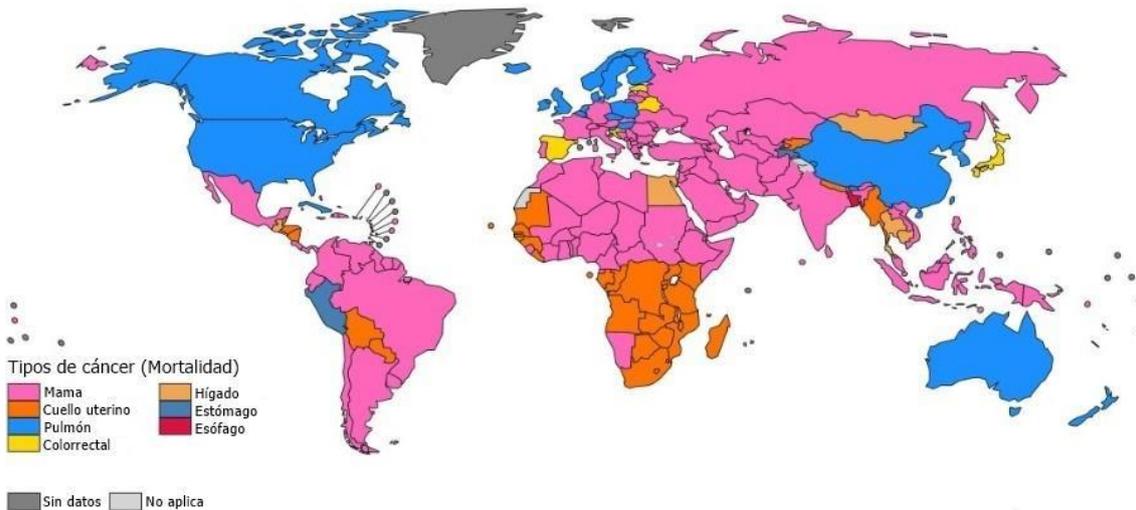
#### 2.1.1 Epidemiología del CM

El cáncer es un problema epidemiológico importante en Uruguay. Considerando ambos sexos, el cáncer es la segunda causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares, representando una quinta parte (20,1%) de todas las muertes registradas en el año 2021 en el país, superando inclusive a las defunciones causadas por la COVID-19 (13,2%). Se registran más de 16.000 casos nuevos por año y aproximadamente 8.000 uruguayos mueren a causa de la enfermedad<sup>1</sup>.

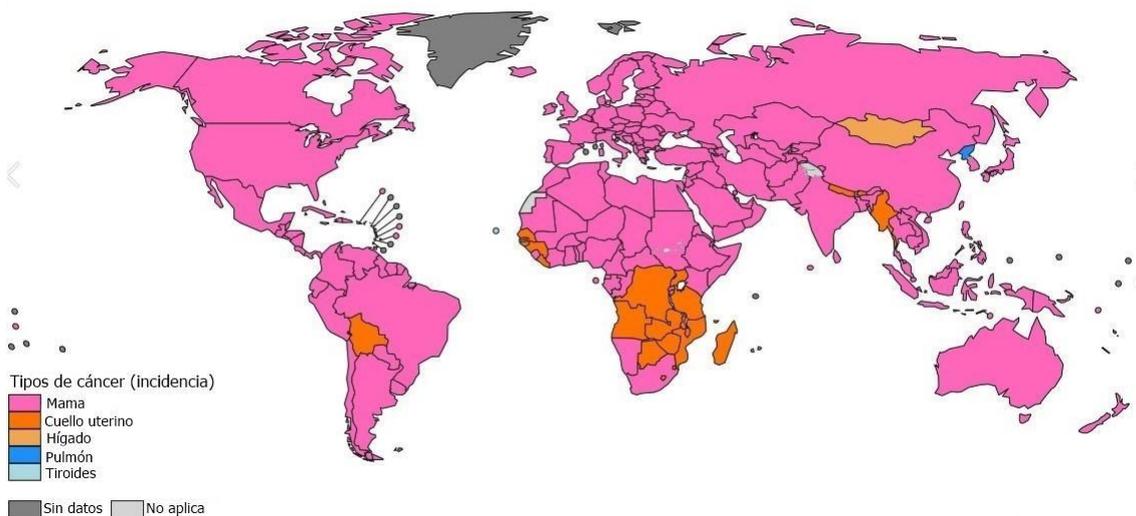
En particular, el CM es una enfermedad de creciente preocupación para la salud pública a nivel mundial (Figura 1). En 2020 fue la neoplasia de mayor incidencia, con 2.26 millones de casos en el año, provocando la muerte de aproximadamente 685.000 personas en el mundo. En la mujer, es la neoplasia que presenta la mayor mortalidad, representando el 15% de las muertes por cáncer<sup>2</sup> (Figura 2). Para 2040, la OMS estima que la incidencia mundial del CM aumentará en un 89.7% y la mortalidad en un 104%, respecto a la actualidad<sup>3</sup>.

La mortalidad por cáncer en Montevideo, es mayor en comparación al resto de Uruguay. En conjunto, los datos sugieren que la urbanización acompaña el aumento de personas afectadas por habitante. Las zonas costera y central de Montevideo aparecen asociadas a una alta incidencia de CM, próstata, colon y recto, tumores que son los más frecuentes en países desarrollados<sup>4</sup>.

En Uruguay, el CM es el cáncer más frecuente en mujeres, registrándose casi 2000 casos anuales. También es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, dando cuenta de casi 690 muertes anuales<sup>5</sup>. Se estima que al menos 1 de cada 11 mujeres uruguayas presentará CM a lo largo de su vida<sup>6</sup>.



**Figura 1.** Tipos de cánceres por país con mayor incidencia entre las mujeres. Modificado de GLOBOCAN<sup>2</sup>.



**Figura 2.** Tipos de cánceres por país con mayor mortalidad entre las mujeres. Modificado de GLOBOCAN<sup>3</sup>.

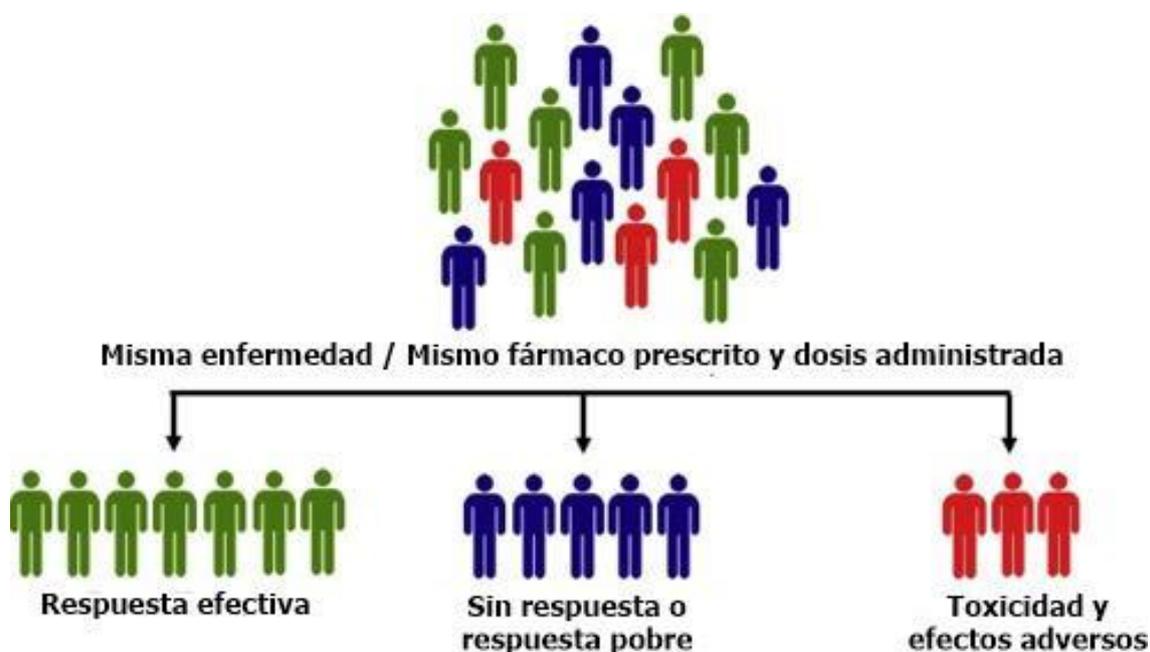
### 2.1.2 Factores de riesgo ambientales

Los principales factores de riesgo asociados al CM son la edad, la obesidad, el uso de anticonceptivos orales, el estado menopáusico, el tabaquismo, el consumo de alcohol, y los factores genéticos<sup>7</sup>. Otro tipo de factores de riesgo como los socioeconómicos<sup>8,9</sup> y el trabajo nocturno<sup>10</sup> se han visto relacionados con una predisposición a contraer CM. Contrariamente, la lactancia materna y la actividad física son factores protectores frente la enfermedad<sup>11,12</sup>.

## 2.2 PRINCIPIOS GENERALES DE LA FARMACOGENÉTICA

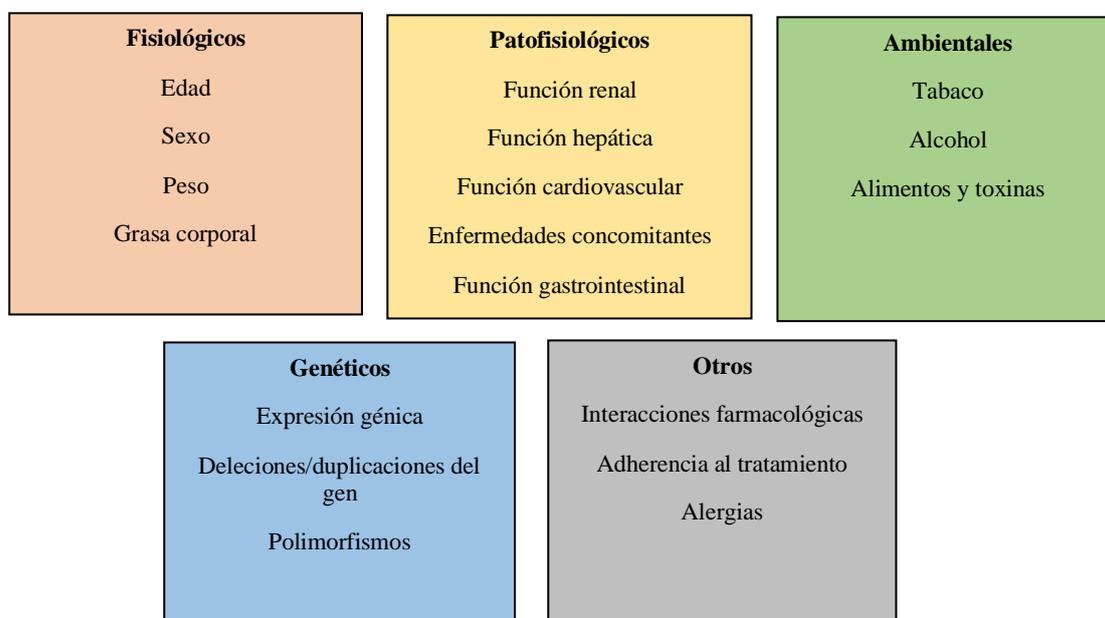
### 2.2.1 Definición y objetivos de la farmacogenética

El término «farmacogenética» fue definido por Friedrich Vogel en 1959 como el estudio de la variabilidad heredada en la respuesta a los fármacos (Figura 3). Esta disciplina se ha convertido en un área de gran importancia en la práctica clínica, con peculiar énfasis en aquellas especialidades médicas que necesitan conocer la variabilidad interindividual existente en la respuesta a un mismo fármaco. La farmacogenética se encarga de estudiar a los genes involucrados en los procesos de absorción, metabolismo, distribución, y excreción de los fármacos. Abarca, no solo el estudio de las variaciones en todas las características del ADN, sino también cambios en los diferentes niveles de expresión génica, que afecten la respuesta farmacológica. El objetivo de estudio son los genes involucrados en la respuesta a un fármaco, desde los que codifican sus receptores, transportadores y blancos de acción, hasta los que codifican las enzimas metabolizadoras de fármacos<sup>13,14</sup>.



**Figura 3.** Esquema del principio de farmacogenómica. En un grupo de pacientes con la misma enfermedad y a los que se les indica una misma prescripción del fármaco (mismo régimen, misma dosis), un grupo de pacientes responderá bien al tratamiento (representado en verde), otros fracasarán parcial o totalmente al tratamiento (representado en azul), mientras que otros desarrollarán reacciones adversas al medicamento leves o incluso letales (representadas en rojo). Extraído de Patrinos *et al*<sup>15</sup>.

A comienzos del siglo XX, la variabilidad interindividual en la respuesta a los fármacos se le atribuía a la propia variabilidad biológica relacionada con la absorción, distribución, metabolización y excreción de los fármacos, y era la farmacología la disciplina encargada de dar una explicación a esta variabilidad. Sin embargo, no siempre podía explicar porque a una misma dosis un paciente presentaba una respuesta terapéutica buena al fármaco administrado, mientras otro paciente con la misma enfermedad presentaba un tratamiento sub-óptimo, reacciones adversas o incluso alcanzaba la muerte. En 1959, las variaciones genéticas se empezaron a considerar como un factor que puede explicar la diversidad en la respuesta a los fármacos y la farmacogenética se estableció como la disciplina responsable de su estudio<sup>16</sup>. Los diferentes factores que pueden determinar las diferencias interindividuales en los fármacos se muestran en la Figura 4.



**Figura 4.** Factores que influyen en variabilidad interindividual en la respuesta a los fármacos.

### 2.2.2 Características generales de los procesos farmacológicos

Los fármacos, tras ingresar al organismo sufrirán procesos de adsorción, distribución, metabolización y excreción (ADME). En estos procesos se va a determinar su llegada a la biofase, lugar donde se da la interacción con la diana farmacológica para desencadenar la respuesta farmacológica deseada y su eliminación, para evitar efectos tóxicos por acumulación. En los procesos ADME intervienen una serie de uniones a transportadores específicos, enzimas responsables de la biotransformación y receptores, cuyos genes difieren de unos individuos a otros, lo que puede explicar en parte las diferencias en la respuesta a los medicamentos<sup>17</sup>. Por ello,

es razonable pensar que se puede predecir la respuesta a los fármacos a partir de sus características genéticas.

Las enzimas encargadas de metabolizar y realizar la transformación de los fármacos se encuentran fundamentalmente en el hígado. Las reacciones involucradas en el proceso de metabolización tienen lugar en dos fases, las reacciones de fase I, consisten en reacciones de oxidación y reducción, así como en reacciones de hidrólisis que producen un aumento en la polaridad de la molécula. Estas modificaciones son necesarias para producir el metabolito activo y/o aumentar la solubilidad de la molécula en el agua para permitir su excreción. Por otra parte, las reacciones de fase II son reacciones de conjugación, en las cuales el fármaco o el metabolito procedente de la fase I se acopla a un sustrato endógeno, lo cual casi siempre inactiva al fármaco y facilita su excreción.<sup>17</sup>

### **2.2.3 Profármacos y fármacos de acción directa**

Existen fármacos que no necesitan ser transformados para actuar en su diana terapéutica, los cuales se denominan fármacos activos. Por otra parte, hay fármacos que son inactivos y necesitan metabolizarse en el organismo para generar su metabolito activo y se los denomina profármacos. En otros casos, la acción farmacológica del metabolito se suma a la del fármaco original. La importancia clínica de los metabolitos activos depende de su actividad intrínseca y de la concentración plasmática que alcanzan en relación con el fármaco original. La farmacocinética de los metabolitos puede ser más variable que la del fármaco original ya que depende de la variabilidad en su formación (es decir, de los factores que alteran el metabolismo del fármaco original) y de la variabilidad en su propia eliminación<sup>17</sup>.

En el caso de fármacos activos de acción directa, los procesos de metabolización disminuyen la concentración de éstos en el plasma y la biofase, disminuyendo su acción terapéutica. En cambio, en los profármacos si bien los procesos de metabolización tienden a reducir su concentración en el plasma y en la biofase, también tienden a aumentar la concentración de sus metabolitos activos, aumentando su acción terapéutica. La concentración de los metabolitos activos, dependerán de la dotación enzimática de cada individuo<sup>17</sup>.

### **2.2.4 Fenotipos metabolizadores de fármacos**

El término *fenotipo metabolizador* describe la respuesta de una persona al procesamiento de ciertos fármacos. El mismo puede ser determinado cuantificando la metabolización de una enzima involucrada en el metabolismo de un fármaco. La determinación del genotipo en un individuo permite inferir en parte su fenotipo metabolizador, pero no lo determina, ya que existen otros factores involucrados.

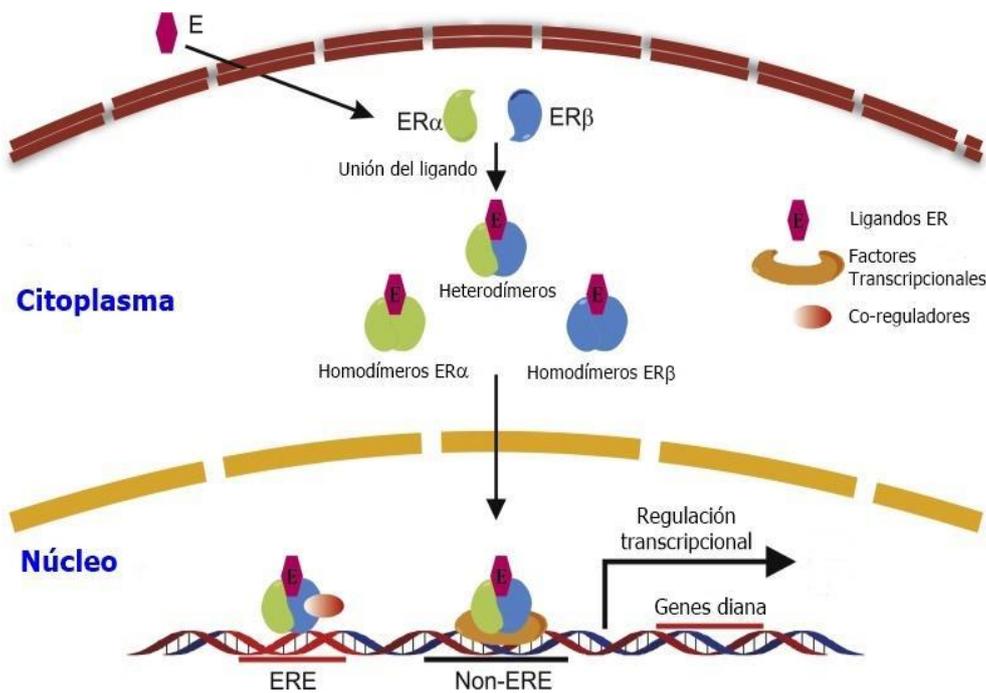
Existen cuatro fenotipos metabolizadores relacionados con la respuesta de un paciente frente a las distintas terapias farmacológicas<sup>18</sup>.

- Metabolizadores normales (NM): Metabolizan los fármacos logrando alcanzar el beneficio terapéutico en una dosis estándar.
- Metabolizadores intermedios (IM): Metabolizan los fármacos de manera lenta comparada con el fenotipo NM. En el caso de los profármacos podría requerir un aumento de dosis.
- Metabolizadores lentos o pobres (PM): Poseen deficiencia para metabolizar los fármacos; este tipo de fenotipo requiere menores dosis del medicamento cuando es un fármaco activo. Para el caso de los profármacos, el paciente precisa un aumento de dosis.
- Metabolizadores ultrarrápidos (UM): Se caracterizan por tener mayor capacidad metabólica. La dosis estándar del fármaco es metabolizada de forma inmediata y como resultado su concentración en plasma disminuye. Para fármacos activos el paciente precisa un aumento de dosis, mientras que para los profármacos es recomendable disminuir la dosis para evitar efectos adversos.

### **2.3 HORMONOTERAPIA PARA CÁNCER DE MAMA**

El tratamiento hormonal en CM está dirigido a pacientes cuyos tumores expresan receptores hormonales (HR+), ya sea receptores de estrógenos (ER+), progesterona (PR+), o ambos, siendo el subtipo ER+ el CM más común. Los dos ER estructuralmente relacionados e involucrados en el CM son el ER $\alpha$  y ER $\beta$ , los cuales ofician de factores de transcripción en la glándula mamaria normal al unirse el 17 $\beta$ -estradiol (E2), translocándose al núcleo y controlando la proliferación y diferenciación celular<sup>19</sup>.

Los dímeros de ER se unen a la región potenciadora en el ADN denominada elementos de respuesta a estrógeno (ERE) de los genes diana y reclutan coreguladores que modulan su actividad transcripcional<sup>20</sup> (Figura 5). La isoforma ER $\alpha$  es el agente predominante de la actividad mitogénica en el tejido mamario y se sobreexpresa en las primeras etapas del CM, convirtiéndolo en una diana terapéutica<sup>21</sup>.



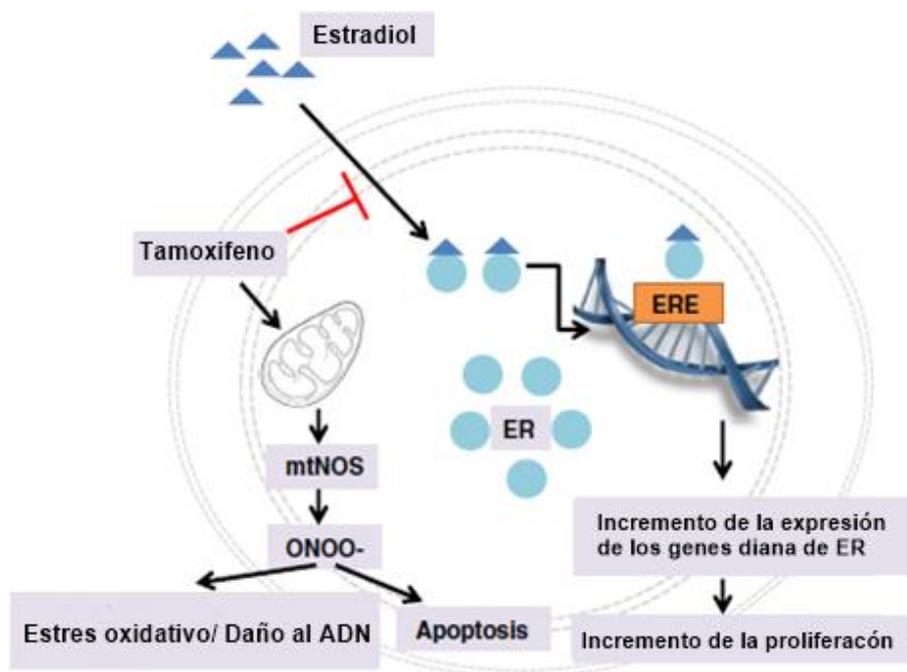
**Figura 5.** Vías de señalización del RE, donde se observa el mecanismo de regulación transcripcional estrogénico asociado a regiones ERE y el mecanismo independiente de regiones ERE. Modificado de Feng *et al*<sup>21</sup>.

El tratamiento del CM ER+ comprende intervenciones que suprimen la producción de estrógeno y/o modulan directamente al ER. La terapia hormonal ha reducido considerablemente la recurrencia y la mortalidad por CM y puede administrarse de forma neoadyuvante o adyuvante<sup>22</sup>.

### 2.3.1 Tamoxifeno

El Tamoxifeno (TMX) es el modulador selectivo de los receptores estrogénicos (SERM) más utilizado y se administra en pacientes pre y posmenopáusicas a una dosis de 20 mg/día. La respuesta al TMX varía según el porcentaje de ER y PR de las células de CM HR+. Además de actuar como antagonista de estrógenos en células de CM HR+, también actúa como agonista de estrógenos parcial en células endometriales y agonista de estrógenos en células óseas. La terapia con TMX durante cinco años disminuye el riesgo de recurrencia en un 41 % y el riesgo de muerte por CM en un 34 %<sup>23</sup>. El tratamiento con TMX de 20 mg/día durante 5 años se considera el estándar de atención para la reducción del riesgo de CM<sup>24</sup>.

El TMX ejerce su mecanismo de acción sobre los ERs, induciendo un cambio conformacional e impidiendo su unión con el estradiol. En consecuencia, la expresión de los genes que dependen de estos receptores queda bloqueada o alterada. El resultado final es un bloqueo de la captación de estradiol y una respuesta estrogénica disminuida. La mayor parte de la actividad del TMX se observa cuando la célula tumoral se encuentra en fase G2 del ciclo celular, comportándose como un citostático. Además, reduce los niveles del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1, factor que estimula la proliferación de las células tumorales e induce la secreción del factor de transformación del crecimiento (TGF- $\beta$ ), factor que actúa como inhibidor del crecimiento de las células tumorales<sup>25,26</sup>. Al mismo tiempo, se ha demostrado que el TMX aumenta el estrés oxidativo e induce la apoptosis mediante la regulación de la concentración de iones de calcio y las especies reactivas de nitrógeno en las mitocondrias (mtNOS). El superóxido reacciona con el NO para formar un potente agente oxidante peroxinitrito ONOO(-) y, en consecuencia, se genera un alto estado de oxidación para el ADN y las proteínas. Estos eventos pueden provocar la apoptosis celular, o la acumulación de lesiones y mutaciones en el ADN<sup>27</sup> (Figura 6).

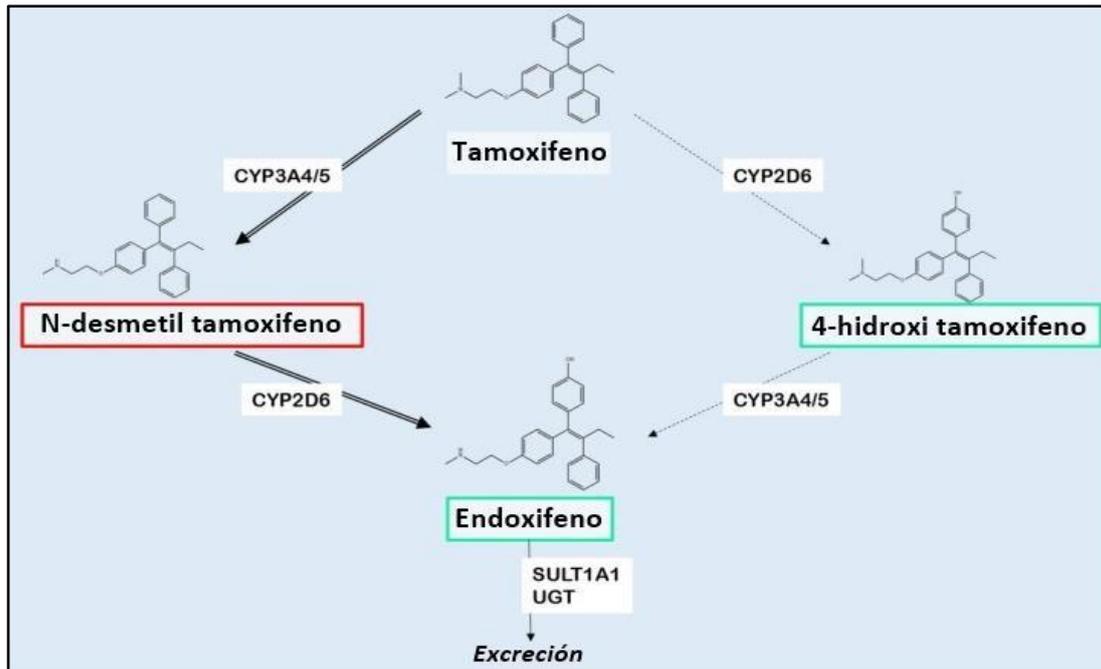


**Figura 6.** Mecanismo de acción del TMX en la célula. Se observa como el TMX bloquea la unión del estradiol a los receptores de estrógenos (ER), evitando la expresión de genes activada por ER a través de las regiones ERE. Extraído de Yang *et al*<sup>27</sup>.

### 2.3.2 Farmacocinética del Tamoxifeno

El TMX es un profármaco que requiere ser transformado a sus respectivos metabolitos, primarios y secundarios, los cuales son los responsables de la actividad farmacológica. El metabolismo de este fármaco se lleva a cabo en el hígado por las enzimas CYP450, a través de dos vías, 4-hidroxilación y N-desmetilación, que resultan en el metabolito secundario más importante y con mayor actividad farmacológica, el endoxifeno<sup>28</sup>. En presencia de la enzima CYP2D6, el metabolito inmediatamente resultante, es el 4-hidroxi-tamoxifeno (4-hidroxi-TAM). Por otra parte, la N-desmetilación es catalizada principalmente por los citocromos: CYP3A4 y CYP3A5, donde produce N-desmetiltamoxifeno, que al oxidarse es convertido en una serie de metabolitos, siendo el más importante el endoxifeno. De manera que el endoxifeno, se forma a partir de N-desmetiltamoxifeno mediante hidroxilación por CYP2D6, y de 4-hidroxi-TAM a través de una desmetilación por CYP3A4 (Figura 7). El 4-hidroxi-TAM y el endoxifeno tienen efectividades similares presentando aproximadamente de 30 a 100 veces más actividad antiestrogénica que el propio TMX, ya que presentan una mayor afinidad por el ER. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de endoxifeno son, en promedio, diez veces superiores a las del 4-hidroxitamoxifeno y de allí su relevancia. Adicionalmente los citocromos CYP2C9 y CYP2C19, participan en estas vías metabólicas al metabolizar TMX a 4-hidroxi-TAM o N-desmetiltamoxifeno<sup>29,30,31</sup>. CYP3A4 y CYP2D6, contribuyen a más del 50% del metabolismo de los fármacos relacionado con CYP. Pero la relevancia clínica recae sobre CYP2D6 por estar codificada por un gen altamente polimórfico<sup>29</sup>.

El TMX es transportado por los transportadores dependientes de ATP o transportadores ABC: ABCB1 (glucoproteína P o P gp/MDR1), ABCC1 (proteína de resistencia al CM o BCRP) y ABCC2 (proteína 2 asociada a la resistencia a múltiples fármacos o MRP2). Los transportadores ABC normalmente se expresan en el lado luminal de los enterocitos, en las células endoteliales de los capilares cerebrales, en los canalículos biliares y en los túbulos proximales del riñón en las células de la línea germinal. Por último, las enzimas UDP-glucuronosiltransferasa (UGT, principalmente UGT1A8, UGT1A10, UGT2B7 y UGT2B15) y las enzimas sulfotransferasa (SULT, principalmente SULT1A1) catalizan la conversión de los metabolitos de TMX en formas excretables<sup>30</sup>.



**Figura 7.** Representación esquematizada de la biotransformación del tamoxifeno y sus metabolitos. La generación de N-desmetiltamoxifeno está catalizada predominantemente por CYP3A4/5, mientras que CYP2D6 es el principal responsable de la formación de 4-hidroxitamoxifeno y endoxifeno. Los diversos metabolitos son inactivados por UGT y SULT, principalmente la isoforma SULT1A1. Abreviaturas: CYP: isoenzimas del citocromo P450, UGT: UDP-glucuronosiltransferasa, SULT: isoenzima sulfotransferasa. Modificado de Mulder *et al*<sup>28</sup>.

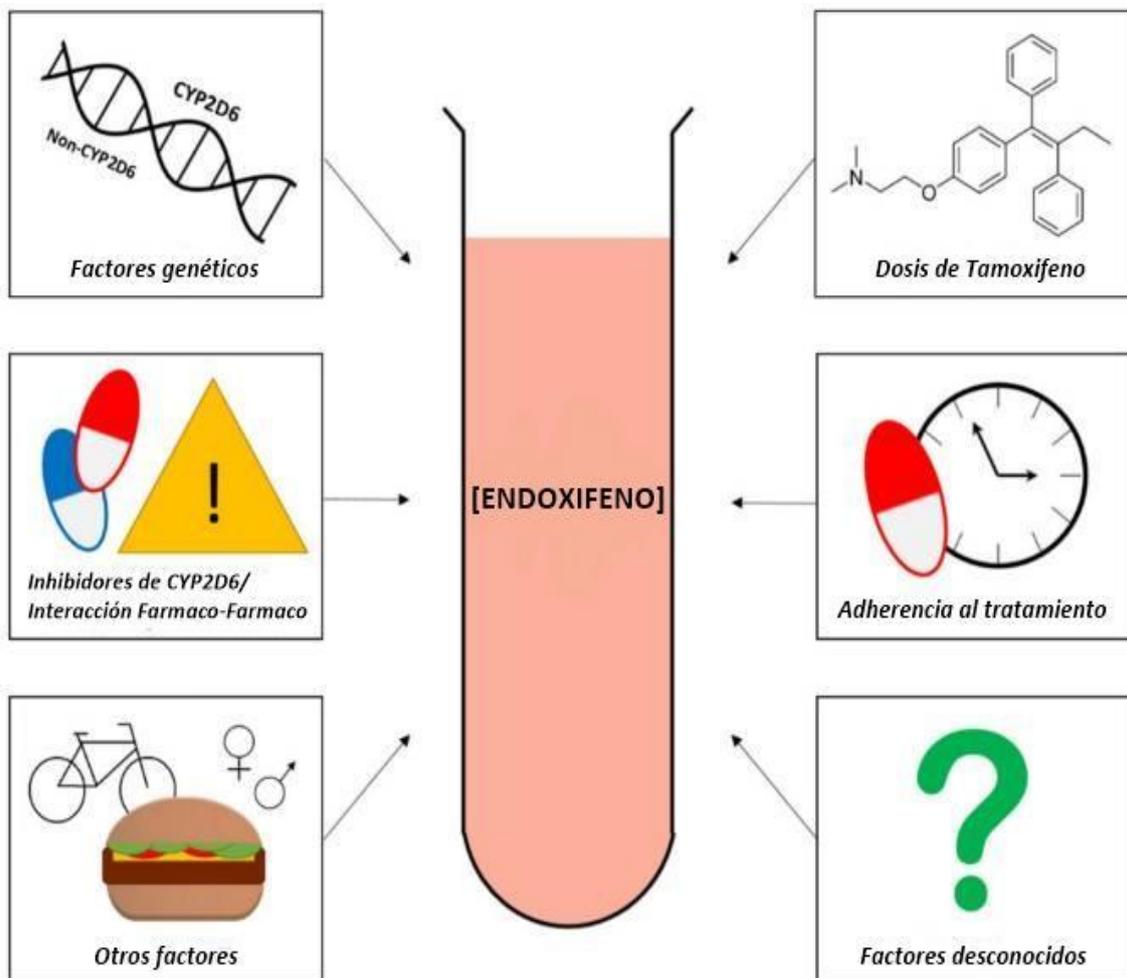
### 2.3.3 Factores que afectan los niveles de endoxifeno

A pesar del tratamiento hormonal, se ha visto que dentro de los primeros 5 años la enfermedad reaparece en el 11 al 23% de los pacientes, mientras que en los 15 años en aproximadamente el 30%. Los pacientes con niveles de endoxifeno plasmático superior a 5,97 ng/ml ( $\approx 16$  nM) tienen un riesgo relativo de recurrencia de CM un 26% menor. Por lo que varios autores establecen como valor umbral un nivel plasmático de endoxifeno de 16 nM, para que el tratamiento con TMX sea efectivo<sup>32,33</sup>.

La concentración plasmática de endoxifeno se ve afectada por muchos factores (Figura 8), uno de ellos es la dosis de TMX utilizada. Los pacientes con CM que presentan niveles de endoxifeno más bajos que el umbral de eficacia (16 nM), pueden aumentar su concentración plasmática si se les administra una dosis más alta de TMX y beneficiarse del tratamiento. A su vez, se observó una correlación entre las concentraciones de endoxifeno en plasma y la actividad de la enzima CYP2D6.<sup>28</sup> Muchas variantes genéticas de CYP2D6 se expresan como enzimas con actividad reducida o nula, dando como resultado una variación fenotípica considerable en la actividad de CYP2D6. Por lo tanto, la eficacia del TMX y su biotransformación al endoxifeno, está relacionada

con la actividad de CYP2D6 y el genotipo de cada individuo. Los pacientes con actividad reducida de CYP2D6 debido a variaciones genéticas a menudo no alcanzan el umbral plasmático de endoxifeno para beneficiarse con una dosis estándar de TMX en el tratamiento<sup>28</sup>.

Otro factor importante es la falta de adherencia al tratamiento, ya que se ha observado que algunos pacientes suspenden o discontinúan el tratamiento con TMX antes de completar el período estándar de 5 años de tratamiento, lo que afecta directamente en las concentraciones de endoxifeno<sup>28</sup>.



**Figura 8.** Resumen de los factores que influyen en las concentraciones plasmáticas de endoxifeno. Extraído de Mulder *et*<sup>28</sup>.

## **2.4. SUPERFAMILIA DE LOS CITOCROMOS P450**

La superfamilia del citocromo P450 (CYP) es una familia de enzimas conservadas evolutivamente e identificadas en cientos de especies de eucariotas y procariotas. En humanos hay 57 genes CYP funcionales junto con 58 pseudogenes. De estos 57 CYP humanos funcionales, 12 están implicados en el metabolismo de 70 al 80% de los fármacos de uso común. Estas enzimas son: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2J2, CYP3A4 y CYP3A5<sup>34</sup>.

Los CYP son hemoproteínas; abarcando alrededor de 400-500 aminoácidos en sus secuencias y un solo grupo protésico hemo en el sitio activo. Las estructuras y plegamientos generales de las proteínas miembro de la superfamilia CYP450 están conservados. Los miembros comparten aproximadamente un 40 % de homología de secuencia dentro de cada familia y un 55% de identidad de secuencia dentro de cada subfamilia. Las CYP son típicamente las enzimas oxidasas terminales en las cadenas de transferencia de electrones. El principal donante de electrones para los CYP microsomales es la P450 reductasa (POR), que dona el primero y, a menudo, los dos electrones requeridos por las CYP para la catálisis. La reacción canónica catalizada por las CYP es la monooxigenación, aunque también pueden catalizar otras reacciones como la hidroxilación y la desalquilación. Las enzimas CYP humanas y de otros mamíferos son proteínas ancladas a las membranas, específicamente incrustadas en las bicapas de fosfolípidos del retículo endoplásmico y/o mitocondrias<sup>29,34</sup>.

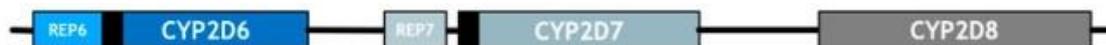
### **2.4.1 Citocromo P450 2D6 (CYP2D6)**

CYP2D6 es una de las enzimas CYP más estudiadas. Está formada por 497 aminoácidos. El 25% de los fármacos comercializados son sustratos de esta enzima, aunque constituye únicamente el 5% de todas las CYPs hepáticas. Hasta la fecha, 52 medicamentos diferentes tienen a CYP2D6 mencionado en su etiqueta de producto aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y 11 por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), en donde se recomienda realizar algún tipo de estudio genético en los pacientes ya que pueden existir cambios en la eficacia, la dosificación, el metabolismo o la toxicidad del fármaco debido a variantes genéticas de CYP2D6. Para 49 de estos medicamentos se han desarrollado guías farmacogenómicas con recomendaciones prácticas<sup>35</sup>. Entre los fármacos utilizados en la clínica y metabolizados por CYP2D6 se encuentran algunos  $\beta$ -bloqueantes (metoprolol, propanolol, etc.), antidepresivos (fluoxetina, imipramina, etc.), antipsicóticos (aripiprazol, haloperidol, etc.), antineoplásicos (tamoxifeno) y opioides (codeína)<sup>36</sup>.

La enzima CYP2D6 además de llevar a cabo el metabolismo de los fármacos, también es responsable de la oxidación de compuestos endógenos como tiraminas para la producción de dopamina, adrenalina y noradrenalina<sup>37</sup>.

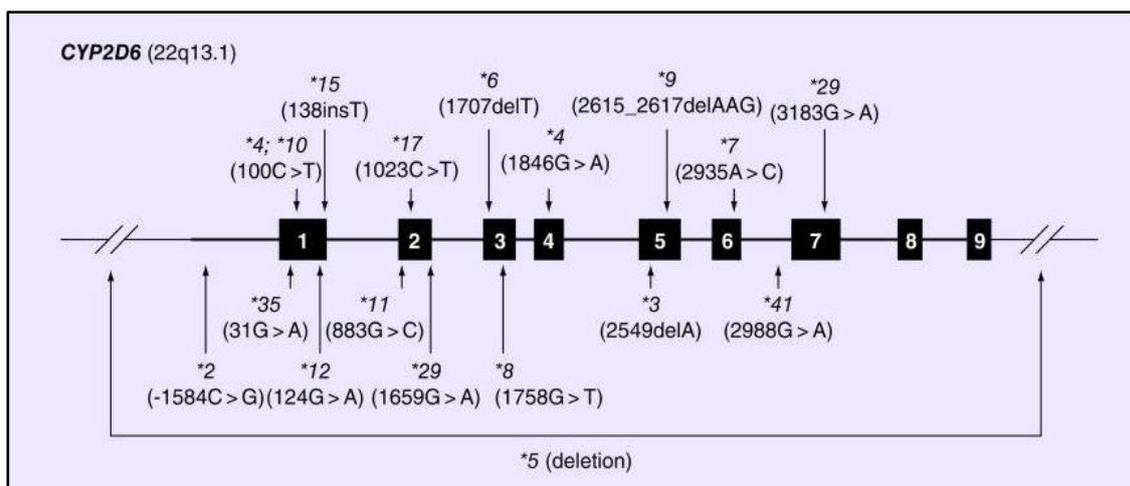
#### 2.4.2 Genética molecular y polimorfismos de CYP2D6

El locus CYP2D está conformado por el gen CYP2D6 y dos pseudogenes, CYP2D7 y CYP2D8 altamente homólogos a CYP2D6, el único gen funcional en la subfamilia CYP2D del genoma humano. El gen CYP2D6 ha sido mapeado en el cromosoma 22, en la posición 22q13.1, consta de 4.4 kb de largo, que se agrupan en 8 intrones y 9 exones, adyacente a sus dos pseudogenes inactivos. El pseudogén CYP2D7 contiene la inserción de una timina en el primer exón, lo que origina una interrupción en el marco de lectura y una interrupción prematura de la traducción; mientras el pseudogén CYP2D8 abarca múltiples deleciones e inserciones en sus exones<sup>38</sup>. CYP2D6 y CYP2D7 tienen secuencias repetitivas casi idénticas denominadas REP6 y REP7, respectivamente. La secuencia REP7 está separada de CYP2D7 por otra secuencia corta adicional al elemento, a diferencia de REP6 en CYP2D6 (Figura 9).



**Figura 9.** Esquema del locus CYP2D ubicado en el cromosoma 22, el cual contiene al gen CYP2D6, sus pseudogenes CYP2D7 y CYP2D8 y las regiones de secuencias repetitivas REP6 y REP7. Modificado de Taylor *et al*<sup>34</sup>.

El gen CYP2D6 es muy polimórfico, y presenta más de 170 variantes polimórficas, duplicaciones o deleciones génicas (el detalle de cada una de las variantes se encuentra disponible en: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>). Estas variantes alélicas se originan como consecuencia de diversos cambios nucleotídicos: que puede ser de única base en la región codificante, promotora o intrónica del gen (que da lugar por ejemplo a las variantes CYP2D6\*2, \*4 o \*17), inserciones o deleciones de uno o más nucleótidos (como ocurre en CYP2D6\*3, \*6 o \*9, entre otros alelos) e inserciones del pseudogén CYP2D7 (por ejemplo CYP2D6\*13)<sup>34,39</sup>. Las relaciones de dominancia entre estos alelos no se conocen en profundidad. Algunas de estas variantes pueden observarse en la Figura 10.



**Figura 10.** Esquema del gen CYP2D6, donde se destacan las ubicaciones de las variantes alélicas (\*N) más comunes y que frecuentemente se incluyen en los ensayos de genotipado dirigidos, incluido el alelo de la delección completa del gen (\*5). Extraído de Yang *et al*<sup>39</sup>.

### 2.4.3 Variantes de números de copias (CNV) en CYP2D6

Aproximadamente el 12 % del genoma humano contiene variantes en el número de copias (CNV). En CYP2D6 incluyen duplicaciones y delecciones de genes completos<sup>42</sup>. La variante CYP2D6\*5 es una CNV que hace referencia la delección completa del gen, mientras que las duplicaciones son representadas con el tipo de variante alélica seguido de un “xN” que indica el número de copias del gen CYP2D6. Las duplicaciones del gen pueden darse con alelos funcionales (CYP2D6\*1xN o \*2xN) y no funcionales (CYP2D6\*4xN). Estas variantes, pueden influir en la interpretación del genotipado y la predicción del fenotipo de CYP2D6, particularmente porque no todos los alelos que se duplican codifican enzimas funcionales. Las frecuencias de las delecciones de CYP2D6 entre las poblaciones de todo el mundo (africanas, europeas, asiáticas, judía, americanas y oceánicas) oscilan entre el 2% y el 6% y la duplicación de alelos funcionales de CYP2D6 oscila entre el 2% y el 12%<sup>40</sup>.

### 2.4.4 Epigenética y los citocromos P450

La expresión de los genes CYP puede estar regulada por mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN, las modificaciones de histonas, los microARNs y la remodelación de nucleosomas. Estos mecanismos de regulación epigenética controlan la expresión de estos genes y pueden explicar la variación en la respuesta interindividual a los fármacos. En particular, la metilación del ADN en los promotores de los genes impide la unión de los factores de transcripción a sus sitios de unión al ADN y pueden provocar el silenciamiento transcripcional a través de mecanismos indirectos que implican cambios en la conformación de la cromatina. La metilación del ADN promueve el reclutamiento de proteínas remodeladoras de la cromatina generando una configuración de heterocromatina que impide la expresión de los genes.<sup>41</sup>

La metilación del ADN ocurre predominantemente en los sitios CpG en el genoma de los mamíferos por las enzimas ADN metiltransferasa (DNMT). Los dinucleótidos CpG tienden a agruparse en islas CpG (CGI), regiones con una alta densidad de sitios CpG. La mayoría de los dinucleótidos CpG (75%) en todos los genomas de los mamíferos están metilados<sup>42</sup>, sin embargo, las CGI en células somáticas humanas, están hipometiladas (6-8%).<sup>43</sup> El 70% de los promotores humanos contienen CGI y estas se encuentran asociadas a los mecanismos de silenciamiento genético.<sup>42</sup> Sin embargo, existen CGI que no se encuentran en los promotores y se pueden encontrar en potenciadores de la expresión génica ubicados en regiones intragénicas o regiones intergénicas. Para muchas de estas CGI se desconoce la relevancia y la consecuencia de la metilación del ADN respecto a la regulación de la expresión génica.<sup>44</sup>

La metilación del ADN, podría influir en la expresión génica de los CYPs, al igual que en el resto de los genes. En algunos miembros de la familia, esta modificación reprime la expresión al impedir la unión de algunos factores de transcripción con sus sitios de unión al ADN<sup>45</sup>. En particular, en el gen CYP2D6, las hipermetilaciones en las CGI pueden estar relacionadas con la regulación negativa del mismo<sup>29</sup>. Sin embargo, no hay estudios que claramente muestren la participación de este mecanismo epigenético sobre la expresión del gen CYP2D6.

#### **2.4.5 Relación genotipo-fenotipo en CYP2D6**

Los alelos de CYP2D6 se clasifican según su actividad enzimática de la siguiente manera: función normal (ejemplo CYP2D6\*1 y \*2), función aumentada (ejemplo CYP2D6\*1xN o 2xN), función disminuida (ejemplo CYP2D6\*9, \*10, \*17 y \*41) y sin función o nulos (ejemplo CYP2D6\*3, \*4, \*5, \*6). La combinación de alelos se utiliza para determinar el genotipo de un paciente y asignarle un valor de puntaje de actividad o *activity score* (AS)<sup>46</sup>. A cada alelo se le otorga un valor de actividad preestablecido, en donde a los alelos normales se les asigna un valor de 1, a los alelos de actividad disminuida se les asigna una puntuación de 0.5 o 0.25, a los alelos nulos se les asigna una puntuación de 0 y a los alelos duplicados el valor asignado se multiplica por el número de copias presentes. El valor de actividad de cada alelo es un consenso basado en la relación metabólica o *metabolic ratio* (la proporción entre el fármaco inalterado y el metabolito), la cual se mide en suero u orina. Para obtener el valor de relación metabólica de los alelos de función decrecida, se toma en cuenta que los alelos de función normal exhiben una puntuación de actividad de 1, porque poseen el 100% de la actividad metabólica y los alelos de función nula tiene una puntuación de actividad de 0, debido a la pérdida completa de la enzima<sup>47</sup>. Por lo tanto, el puntaje de actividad de CYP2D6 se usa para inferir el fenotipo de CYP2D6 y es la suma de los valores asignados para cada alelo, la cual generalmente varía de 0 a 3.0, pero puede exceder 3.0 en casos raros<sup>46</sup>.

El Consorcio de Implementación de Farmacogenética Clínica (CPIC), se encarga de recopilar la información brindada por las pruebas farmacogenéticas y publicar guías con las pautas de práctica clínica recomendadas sobre cada par gen/fármaco<sup>46</sup>. El puntaje de actividad de CYP2D6 se ha traducido al sistema de clasificación de fenotipos metabolizadores para diferentes guías CPIC, entre ellas las que otorgan recomendaciones para el tratamiento con TMX, donde en el año 2019 se publicaron cambios importantes para armonizar la interpretación internacionalmente. De esta forma, los pacientes con un AS de 0 son metabolizadores lentos o pobres (PM), aquellos con una puntuación AS de 0.25 a 1 se consideran metabolizadores intermedios (IM) y aquellos con una puntuación AS de 1.25-2.25 representan a los metabolizadores normales (NM). Los pacientes con una puntuación mayor a 2.25 se clasifican como metabolizadores ultrarrápidos (UM)<sup>28</sup>.

#### **2.4.6 Recomendaciones Terapéuticas para TMX**

En función de los fenotipos metabolizadores de CYP2D6, en base a las guías CPIC se establecen recomendaciones terapéuticas para la prescripción de TMX (Tabla 1). Se espera que los pacientes clasificados como UM y NM alcancen concentraciones terapéuticas de endoxifeno después de la administración de TMX y deben recibir las dosis estándar recomendadas para el fármaco. Los pacientes clasificados como PM e IM tienen concentraciones de endoxifeno más bajas en comparación con los NM y tienen un mayor riesgo de recurrencia de CM y peor supervivencia libre de eventos en comparación con los NM<sup>46</sup>. En estos casos se recomienda terapia hormonal alternativa. El aumento de la dosis de TMX de 20 a 40 mg/día en pacientes PM aumenta las concentraciones de endoxifeno, pero no a las concentraciones alcanzadas por los NM, por lo que se recomienda un cambio de terapia, salvo que existan contraindicaciones con la nueva terapia<sup>46</sup>.

**Tabla 1.** Recomendaciones de dosis para el TMX basadas en el fenotipo metabolizador de CYP2D6 con el puntaje de actividad (AS) asociado a cada uno de ellos. Modificado de Goetz *et al*<sup>46</sup>.

<b>Fenotipo metabolizador</b>	<b>Puntaje de actividad (AS)</b>	<b>Recomendación terapéutica</b>
<b>Metabolizador ultrarrápido (UM)</b>	>2.25	Evitar los inhibidores moderados y fuertes de CYP2D6. Iniciar tratamiento con la dosis estándar tamoxifeno (20 mg/día).
<b>Metabolizador normal (NM)</b>	1.25-2.25	Evitar los inhibidores moderados y fuertes de CYP2D6. Iniciar tratamiento con la dosis estándar de TMX (20 mg/día).
<b>Metabolizador intermedio (IM)</b>	0.25-1	Considerar la terapia hormonal con un inhibidor de la aromatasa para mujeres posmenopáusicas o un inhibidor de la aromatasa junto con la supresión de la función ovárica en mujeres premenopáusicas. Si el uso de inhibidores de la aromatasa está contraindicado, se debe considerar el uso de una dosis de TMX más alta pero aprobada por la FDA (40 mg/día). Evitar los inhibidores fuertes a débiles de CYP2D6.
<b>Metabolizador pobre (PM)</b>	0	Recomendar una terapia hormonal alternativa, como un inhibidor de la aromatasa para mujeres posmenopáusicas o un inhibidor de la aromatasa junto con la supresión de la función ovárica en mujeres premenopáusicas. Las dosis más altas de TMX (40 mg/día) aumentan, pero no normalizan las concentraciones de endoxifeno y se pueden considerar si existen contraindicaciones para la terapia con inhibidores de la aromatasa.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Conocer las frecuencias de las variantes genéticas y estados epigenéticos del gen CYP2D6 en la población uruguaya y realizar un estudio de la farmacogenética del TMX en un grupo de pacientes con CM.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la frecuencia alélica de los polimorfismos \*3, \*4, \*6, \*9, \*17 y \*41 y las frecuencias genotípicas del gen CYP2D6 en la población uruguaya.
2. Determinar las frecuencias de las variantes de número de copias (CNVs) del gen CYP2D6 en la población uruguaya.
3. Determinar el estado de metilación del gen CYP2D6 en la población uruguaya.
4. Inferir las frecuencias de los fenotipos metabolizadores de CYP2D6 en la población uruguaya.
5. Correlacionar el estado de metilación y el genotipo de CYP2D6 de los pacientes con CM tratados con TMX, con el estado menopaúsico, el tabaquismo, el uso de anticonceptivos orales y la respuesta evolutiva al tratamiento en los diferentes fenotipos metabolizadores.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 PACIENTES Y MUESTRAS

Se recolectaron 199 muestras de sangre en el periodo del 2016 al 2020 para el genotipado y el análisis de las frecuencias, de las cuales 41 muestras pertenecían a pacientes con CM tratadas con TMX del Hospital Central de las Fuerzas Armadas (HCFFAA) y 158 a personas voluntarias. Tanto los pacientes como los voluntarios fueron de nacionalidad uruguaya y no estaban emparentados biológicamente entre sí. El comité de Bioética de la Facultad de Química aprobó el trabajo de acuerdo con la versión actual de la Declaración de Helsinki. Se obtuvo un consentimiento informado firmado de todos los participantes. Las muestras e historias clínicas fueron brindadas por el banco de tumores del HCFFAA bajo la dirección de la Dra. Adriana de la Valle. Para evaluar si el tamaño de la muestra fue representativo se utilizó el software OpenEpi versión 3.01<sup>48</sup>.

### 4.2 ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE CYP2D6

#### 4.2.1 Extracción de ADN genómico

A partir de las muestras tomadas, se extrajo el ADN genómico haciendo uso del kit comercial Quick-DNA Miniprep Plus Kit (*Zymo Research<sup>TM</sup>*), siguiendo el protocolo especificado en el mismo y se cuantificó su concentración en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis. Las muestras de ADN fueron conservadas a -20 °C hasta el momento de ser utilizadas.

#### 4.2.2 Análisis por Real-Time PCR

Los polimorfismos CYP2D6 \*3, \*4, \*6, \*9, \*17 y \*41 se analizaron mediante PCR Real-Time cualitativa con sondas del ensayo TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays (*Thermo Fisher Scientific*) (tabla 2) en un Rotor Gene 6000 (*Corbett Life Science, Qiagen*). Por convención, CYP2D6\*1 representa el alelo de tipo salvaje. Las muestras de ADN genómico se analizaron por duplicado, realizando diluciones 1/5 y 1/10 en agua estéril para cada una de ellas. La mezcla de reacción en la real-time PCR se realizó con un volumen final de 10µl, donde se colocó:

- 5 µl de Universal PCR Master Mix 2X (*Applied Biosystems<sup>TM</sup>*).
- 3.5 µl de agua estéril.
- 0.5 µl TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay Mix (20X).
- 1 µl de ADN genómico diluido.

El experimento realizado constó de un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C, donde se adquirió la fluorescencia de las sondas en los canales Green (470-510nm) y Yellow (530-555nm). Los genotipos se infirieron mediante el análisis utilizando la interfase de discriminación alélica.

**Tabla 2.** Variantes CYP2D6 analizadas mediante PCR Real-Time con la identificación (ID) del ensayo TaqMan® y su número rs asociado. Se detalla el tipo de mutación involucrada para cada variante siguiendo la nomenclatura RefSeqGene (LRG\_303) desde el codón de inicio en la secuencia NG\_008376.4.

Variante CYP2D6	ID del ensayo	Tipo de mutación	Función enzimática
CYP2D6*3	C_32407232_50 (rs35742686)	Delección (2550delA). Corrimiento del marco de lectura.	nula.
CYP2D6*4	C_27102431_D0 (rs3892097)	SNP (1847G>A). Error en el splicing de la proteína.	nula.
CYP2D6*6	C_27102431_D0 (rs5030655)	Delección (1708delT). Corrimiento del marco de lectura.	nula.
CYP2D6*9	C_32407229_60 (rs5030656)	Delección (2616delAAG). Delección de una lisina en la proteína (K281del).	disminuida.
CYP2D6*17	C_2222771_A0 (rs28371706)	SNP (1022C>T). Cambio de aminoácido de la proteína (T107I).	disminuida.
CYP2D6*41	C_34816116_20 (rs28351725)	SNP (2989G>A). Error en el splicing de la proteína.	disminuida.

#### 4.2.3 Amplificación por PCR a tiempo final

Con el fin de verificar por secuenciación la presencia de las variantes CYP2D6 \*3, \*4, \*6, \*9, \*17 y \*41 se diseñaron cinco juegos de *primers* para amplificar fragmentos de ADN que incluyeran los polimorfismos mencionados (tabla 3). El diseño de los *primers* se realizó a través del programa Gene Runner (Versión 6.5.52 Beta), utilizando como molde el genoma humano de referencia GRCh38.p13 (GCA\_000001405.28).

Para corroborar la amplificación específica de nuestras regiones de interés, la secuencia de todos los *primers* fueron comparadas con las secuencias registradas en el GenBank utilizando la herramienta BLAST, disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

**Tabla 3.** Lista de polimorfismos estudiados y *primers* utilizados para la amplificación de las distintas regiones del gen CYP2D6. Se detalla la secuencia de los *primers*, la temperatura de hibridación utilizada en el ciclado de PCR (TM) y el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados.

Polimorfismos	Secuencia (5'→3')	TM	Tamaño
CYP2D6*4	GTTGGAGTGGGTGGTGGGA	56 °C	610 pb
	CCTTCTTACAGTGGGGTCTC		
CYP2D6*6	GGGAGATGCGGGTAAGGGG	60 °C	441 pb
	AAAGGCGGTCAGGGTGGG		
CYP2D6*17	ACTCGTCACAAGCCCCGC	60 °C	478 pb
	TCCTTCCACCTGCTCACTC		
CYP2D6*41	TCCTTCTTGCCCTCCTATGTTG	68 °C	287 pb
	GCTGACCTGTTCTCTGCCG		
CYP2D6*3 CYP2D6*9	TCAGTGGTAAGGACAGGCAG	58 °C	466 pb
	AGCATACTCGGGACAGAACG		

Las reacciones de PCR se realizaron con un volumen final de 20 µl para cada tubo, donde se colocó:

- 10 µl de BioMix™ 2X (*Bioline Inc, Meridian Life Science*).
- 1 µl de dimetilsulfóxido (DMSO).
- 0.8 µl *Primer* directo (5µM).
- 0.8 µl *Primer* reverso (5µM).
- 2 µl de ADN genómico.

El experimento realizado constó de un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos con la temperatura específica de cada juego de *primers* más 60 segundos a 72 °C, y un último paso de extensión a 72 °C durante 15 minutos. La secuencia de los *primers* con la cual se amplificó cada fragmento y la temperatura de hibridación utilizada en el ciclado para cada caso pueden observarse en la tabla 5.

#### **4.2.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida**

La visualización de los productos de PCR se realizó a través de una electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% a 100V durante 50 minutos. La presencia de las bandas se pone en evidencia mediante la tinción del gel con nitrato de plata. Una vez finalizada la migración, se coloca el gel durante 5 minutos en una solución fijadora (0.5% ácido acético glacial y 10% etanol 95% en agua destilada), luego se coloca 8 minutos en la solución de nitrato de plata 0.2% en agua destilada, se lava con agua destilada el menor tiempo posible (10 segundos) y luego se lo coloca en la solución reveladora (hidróxido de sodio 0.75M y formaldehído 0.5% en agua destilada) hasta la aparición de las bandas. El posterior secado del gel se realiza colocando el mismo entre 2 hojas de papel celofán.

#### **4.2.5 Purificación y secuenciación**

Los amplicones con las variantes CYP2D6\*3, \*4, \*6, \*9 y \*17 se purificaron a través de la técnica de ExoSAP, colocando a cada tubo de amplificación 1 µl de fosfatasa alcalina (1 U/µl) y 0.5 µl de exonucleasa I (20 U/µl) e incubando 1 hora a 37°C y 5 minutos a 80°C. Por otra parte, la variante CYP2D6\*41 se purificó a través del kit PureLink™ Quick Gel Extraction (*Invitrogen™, Life Technologies*) luego de una corrida electroforética de los amplicones en un gel de agarosa al 2% a 100V por 20 minutos sumergido en buffer TAE 0.5X y revelado con bromuro de etidio. Una vez purificados los fragmentos, se realizó su secuenciación por Sanger en el servicio de MACROGEN (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias obtenidas fueron cotejadas en el *software BioEdit* versión 7.0.5.3<sup>49</sup> para verificar la presencia de los polimorfismos analizados.

### **4.3 ANÁLISIS DE LAS VARIANTES DE NÚMERO DE COPIAS (CNVs) DE CYP2D6**

#### **4.3.1 Análisis de CNVs por StepOnePlus™ Real-Time PCR**

Se analizó para las 199 muestras, la delección completa del gen (CYP2D6\*5) y su duplicación (CYP2D6xN) mediante el ensayo TaqMan® copy number assays (*Life Technologies Corporation*) con las sondas Hs00010001\_cn (para el exón 9) y Hs04083572\_cn (para el intrón 2). Se utilizó como referencia al gen de la RNasa P mediante la sonda del ensayo TaqMan® Copy Number Reference Assay (*Life Technologies Corporation*). La concentración de cada muestra se midió mediante NanoDrop y se diluyó en agua libre de nucleasas para obtener una concentración de 5 ng/µl de ADN genómico. La mezcla de reacción para la PCR se realizó con un volumen final de 10 µl por tubo, conteniendo:

- 5 µl de Universal PCR Master Mix 2X.
- 0.5 µl de TaqMan® copy number assays 20X (Hs00010001\_cn o Hs04083572\_cn).
- 0.5 µl de TaqMan® Copy Number Reference Assay 20X.
- 2 µl de Agua estéril.
- 2 µl de ADN genómico diluido.

Las reacciones de PCR se realizaron en el sistema de PCR real-time StepOnePlus (Applied Biosystems™) de acuerdo con el protocolo del fabricante, con un primer paso de primer paso de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C. La cuantificación relativa se realizó siguiendo el método comparativo de  $\Delta\Delta CT$  en el software CopyCaller® (Life Technologies Corporation).

#### 4.3.2 Análisis de CNVs por Long-PCR a tiempo final

Se analizó la delección (CYP2D6\*5) y las múltiples copias del gen (CYP2D6xN) en las 199 muestras de ADN a través de la técnica de Long-PCR descrita previamente por Dorado *et al*<sup>50</sup>. En la reacción de PCR para CYP2D6\*5 se utilizó el *primer* directo 5'2D6\*5 y el *primer* reverso 3'2D6\*5, que dan como resultado un fragmento de 3500 pb en caso de encontrarse la delección completa del gen. Para la reacción de PCR de CYP2D6xN se utilizó el *primer* directo 2D6dupl-F y el *primer* reverso 2D6dupl-R, que dan como resultado un fragmento de 3500 pb en caso de encontrarse la duplicación del gen. Para ambos casos, en la misma reacción de PCR se amplificó como control interno el gen CYP2D6 completo utilizando un *primer* directo DPKup y un *primer* reverso DPKlow, que dan como resultado un fragmento de 5100 pb. La secuencia y detalle de todos los *primers* utilizados se encuentran en la tabla 4.

Las reacciones de PCR se realizaron con un volumen final de 20µl, donde se colocó:

- 10 µl de Ranger Mix 2X (Bioline Inc., Meridian Life Science).
- 0.4 µl del *primer* directo (5µM) (5'2D6\*5 o 2D6dupl-F).
- 0.4 µl del *primer* reverso (5µM) (3'2D6\*5 o 2D6dupl-R).
- 0.4 µl del *primer* DPKup (5µM).
- 0.4 µl del *primer* DPKlow (5µM).
- 6.4 µl de agua estéril.

El experimento constó de un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, 30 ciclos de 20 segundos a 94°C y 5 minutos a 68°C, y un último paso de extensión a 72 °C durante 7 minutos. Los productos de PCR se visualizaron luego de una electroforesis de 50 minutos a 100V en un gel de agarosa al 1%, revelado con bromuro de etidio.

**Tabla 4.** *Primers* utilizados para la detección de las variantes del número de copias del gen CYP2D6. Se detalla la secuencia de los *primers* utilizados para la duplicación (CYP2D6xN), la delección (CYP2D6\*5) y el control interno correspondiente al gen CYP2D6 completo. Extraídos de Dorado *et al.* 2005<sup>49</sup>.

Variante	Nombre	Secuencia (5'→3')
CYP2D6*5	5'D6*5	CACCAGGCACCTGTACTCCTC
	3'D6*5	CAGGCATGAGCTAAGGCACCCAGAC
CYP2D6xN	2D6dupl-F	CCTGGGAAGGCCCCATGGAAG
	2D6dupl-R	CAGTTACGGCAGTGGTCAGCT
Control interno	DPKup	GTTATCCCAGAAGGCTTTGCAGGCTTCA
	DPKlow	CCGACTGAGCCCTGGGAGGTAGGTA

#### 4.4 PREDICCIÓN DEL FENOTIPO METABOLIZADOR CYP2D6

La actividad de CYP2D6 se clasificó según la clasificación descrita por Gaedigk *et al*<sup>51</sup>. Se utilizó una nueva definición de puntuación de actividad estandarizada (AS) que combina las directrices del Consorcio de Implementación de Farmacogenética Clínica (CPIC en inglés) y el Grupo de Trabajo de Farmacogenética alemán (DPWG) con nuevos conocimientos farmacogenéticos<sup>52</sup>. Los pacientes se clasificaron como metabolizadores pobres (PM, AS = 0), metabolizadores intermedios (IM, AS = 0,5 a 1), metabolizadores normales (NM, AS = 1,25 a 2,25) o metabolizadores ultrarrápidos (UM, AS > 2,25) para el gen CYP2D6. Cuando se encontró un alelo de tipo salvaje (wt), se consideró el AS de CYP2D6\*1 para la predicción del fenotipo, basándonos en que se estudiaron previamente los polimorfismos más frecuentes esperados para nuestra población. Las pautas utilizadas para predecir los fenotipos de metabolizadores se extrajeron del sitio web de PharmGKB<sup>53</sup>.

#### 4.5 ANÁLISIS DE LA METILACIÓN EN CYP2D6

##### 4.5.1 Predicción CGI y diseño de *primers*

Para el análisis de la metilación de CYP2D6, se predijo la presencia de las CGI a lo largo de todo el gen y se diseñaron *primers* específicos para amplificar las mismas en ADN modificado con bisulfito utilizando el programa MethPrimer<sup>54</sup> disponible en: <https://www.urogene.org/methprimer/>. Se tomaron en cuenta como CGI aquellas regiones de al menos 100 pb de tamaño y con una densidad de GC mayor al 60%. Para la predicción y diseño de *primers* se utilizó la secuencia del gen CYP2D6 (NM\_000106.6) correspondiente al genoma humano de referencia GRCh38.p13 (GCA\_000001405.28).

#### 4.5.2 Modificación del ADN con bisulfito de sodio

Los sitios CpG metilados se evidenciaron a través de la técnica de secuenciación por bisulfito. Todas las muestras de ADN se modificaron con el kit comercial EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research<sup>TM</sup>) utilizando el siguiente protocolo:

- Agregar 130  $\mu$ l de reactivo de conversión Lightning a 20  $\mu$ l de una muestra de ADN. Mezclar y centrifugar brevemente.
- Colocar el tubo en un termociclador con un ciclado de 98°C durante 8 minutos, 54°C durante 60 minutos, almacenamiento a 4°C (hasta 20 horas).
- Agregar 600  $\mu$ l de M Binding Buffer a una columna y colocarla en un tubo de recolección.
- Agregar la muestra, y mezclar invirtiendo la columna varias veces.
- Centrifugar a máxima velocidad (> 10000 g) durante 30 segundos. Descartar el eluido.
- Agregar 100  $\mu$ l de M-Wash Buffer a la columna. Centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos.
- Agregar 200  $\mu$ l de L-Desulfonation Buffer a la columna y dejar reposar a temperatura ambiente (20-30°C) durante 15-20 minutos. Después de la incubación, centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos.
- Agregar 200  $\mu$ l de M-Wash Buffer a la columna. Centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos. Repetir este paso de lavado.
- Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y agregar 10  $\mu$ l de M-Elution Buffer directamente a la matriz de la columna. Centrifugar 30 segundos a máxima velocidad para eluir el ADN.

#### 4.5.3 Amplificación por PCR del ADN modificado

Se diseñaron *primers* para realizar una PCR anidada con la secuencia modificada por bisulfito de la CGI predicha otorgada por el programa MethPrimer (tabla 5). Para corroborar el correcto diseño de los *primers* se comparó sus secuencias con las secuencias registradas en el GenBank utilizando la herramienta BLAST, disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

**Tabla 5.** *Primers* para la secuenciación con bisulfito, se detalla su secuencia y el tamaño del fragmento de ADN amplificado.

Ronda de PCR	Nombre	Secuencia	Tamaño del fragmento
<b>1er Ronda</b>	Bisulf-F1	TGATTTTGGTTTGATAAGAGGTTTTG	305 pb
	Bisulf-R1	CCTCCCTAATACAAATAATTTCTTAACC	
<b>2da Ronda</b>	Bisulf-F2	ACGTGTTTAGTTTGTAGTTGGTTTGG	189 pb
	Bisulf-R2	CACGAAAATCTATCTCTATCCCCAC	

La primera ronda de amplificación constó de un paso de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 51°C más 60 segundos a 72 °C, y un último paso de extensión a 72 °C durante 15 minutos. El amplicón del primer paso fue utilizado para una segunda ronda de PCR que consto de un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 59°C más 60 segundos a 72 °C, y un último paso de extensión a 72 °C durante 15 minutos. Las mezclas de reacción se realizaron con un volumen final de 20 µl, las cuales contenían:

- 4 µl Flexi Buffer (*Promega Corporation*)
- 1.2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 0.8 µl dNTPs (20 mM)
- 0.8 µl *Primer* directo (5 µM) (Bisulf-F1 o Bisulf-F2)
- 0.8 µl *Primer* reverso (5 µM) (Bisulf-R1 o Bisulf-R2)
- 0.2 µl GoTaq® Hot Start Polymerase (*Promega Corporation*)
- 10.2 µl de agua estéril
- 2 µl de ADN modificado

La visualización de los productos de PCR se realizó a través de una electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% como se especifica en la sección 4.2.5 y se purificaron con la técnica de ExoSAP especificada en la sección 4.2.6. Los fragmentos se enviaron a secuenciar al servicio de MACROGEN (Seúl, Corea del Sur).

#### **4.5.4 Análisis del estado de metilación de la región amplificada**

Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el software BioEdit versión 7.0.5.3, para evaluar el estado de metilación de los sitios CpG. Para descartar la amplificación inespecífica de los pseudogenes CYP2D7 y CYP2D8P, se alinearon en BLAST las secuencias CYP2D7 (NR\_002570.6) y CYP2D8P (NG\_000854.4) con la secuencia de CYP2D6 (NM\_000106.6) para determinar las diferencias entre las mismas y verificar que las secuencias amplificadas para el análisis del estado de metilación pertenecieran al gen CYP2D6.

#### **4.6 VARIABLES UTILIZADAS EN LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN**

En las 41 pacientes se evaluó la asociación entre los fenotipos metabolizadores CYP2D6 y los datos clínicos.

Los pacientes que interrumpieron el tratamiento con TMX debido a efectos adversos, progresión o recurrencia del CM, o que murieron a causa de la enfermedad, se clasificaron como de mal resultado. Se definió un buen resultado si los pacientes habían completado el seguimiento de 5 años o habían logrado una remisión clínica completa al final del período de estudio (2020). La remisión completa se determinó cuando mediante pruebas paraclínicas, exámenes físicos y exploraciones no se encontró evidencia de la enfermedad.

Se comparó el tiempo de suspensión de TMX entre los diferentes fenotipos metabolizadores de CYP2D6, y se definió la discontinuación de TMX como el período entre la fecha de inicio del tratamiento con TMX y la fecha de suspensión para cada paciente.

Por último, se categorizaron a las pacientes con diferentes variables para determinar si existe un sesgo en estos grupos con respecto al conjunto de los pacientes. Se analizó el estado menopáusic, el tabaquismo y el uso de anticonceptivos orales y se estudió la asociación con los resultados clínicos en los diferentes fenotipos metabolizadores de CYP2D6.

#### 4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron en el software GraphPad Prism, versión 8.0.1. En una primera instancia, se puso a prueba si la población de estudio se encontraba en el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) para las variantes alélicas de CYP2D6 analizadas. Para este análisis se utilizó una prueba de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) en una tabla de contingencia, considerando HWE cuando  $\chi^2$  fue menor a 3.84 (valor  $p > 0.05$ ).

Para la asociación entre los polimorfismos de CYP2D6 con el resultado clínico de las pacientes construimos una tabla de contingencia y se puso a prueba los modelos de herencia dominantes y recesivos para cada variante genética mediante una prueba  $\chi^2$ , como se describe en *Iniesta et al*<sup>55</sup>. El modelo dominante supone que la presencia de un alelo mutado es suficiente para modificar el riesgo de tener un mal resultado clínico al tratamiento con TMX, mientras que el modelo recesivo supone que son necesarias dos copias en homocigosis para modificar el riesgo. Las tablas de contingencia de la prueba  $\chi^2$  no aceptan que los valores de frecuencias esperadas sean menores a 1, por lo tanto, en los análisis de asociación solo serán consideradas aquellas variantes que en sus tablas de contingencia contengan individuos en todos los grupos categóricos.

Por otra parte, las diferencias significativas entre los resultados clínicos de los diferentes fenotipos metabolizadores de CYP2D6 en el conjunto de las pacientes y en las pacientes categorizadas según las variables de estado menopáusico, tabaquismo, y uso de anticonceptivos orales, se estudiaron a través de la prueba  $\chi^2$ , tomando en cuenta un grado de libertad y un valor significativo cuando el valor  $p < 0.05$ . Por último, las diferencias en la discontinuación de TMX entre los fenotipos metabolizadores de los pacientes con mal resultado clínico se evaluaron con la prueba no paramétrica Log-rank<sup>56</sup>, considerando que existían diferencias significativas con un valor  $p < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS Y DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES

En este estudio retrospectivo se incluyeron 41 pacientes del sexo femenino de una edad media de  $57 \pm 14$  años. El 90% (37/41) de las pacientes dieron de mamar en algún momento de su vida y un 68% (28/41) eran posmenopáusicas. Por otra parte, el 34% (14/41) declaró ser tabaquista y el 73% (30/41) tomó anticonceptivos orales en algún momento de su vida.

En cuanto a los estadios clínicos del cáncer de las pacientes estudiadas, el 51% de ellas se encontraban en estadio I (IA: 19, IB: 2), el 34% en estadio II (IIA: 12, IIB: 2), el 10% en estadio III (IIIA: 2, IIIC: 2) y 5% en estadio IV (IV: 2). Los registros médicos se utilizaron para recopilar información detallada sobre el tratamiento y se determinó que el tiempo medio de seguimiento fue de 52 meses. De las 41 pacientes analizadas, 22 alcanzaron la remisión clínica. Las 19 pacientes restantes mostraron un mal resultado clínico (7 pacientes fallecieron a causa de la enfermedad, 7 suspendieron el tratamiento con TMX cambiando de medicación y 5 mostraron recaída de la enfermedad). En todos los casos la dosis prescrita de TMX fue de 20 mg al día con un tiempo de tratamiento de 5 años.

### 5.2 GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN CYP2D6

#### 5.2.1 Cálculo del tamaño de la muestra

Se calculó en el software OpenEpi el tamaño de la muestra necesario para determinar la frecuencia de un alelo en nuestra población y se utilizó un tamaño poblacional grande ( $N > 1000000$ ), una frecuencia alélica hipotética ( $p$ ) desconocida, una precisión de  $\pm 7$  y una confianza del 95%. El resultado de ese estudio indicó que el tamaño de la muestra debe ser de 196 individuos.

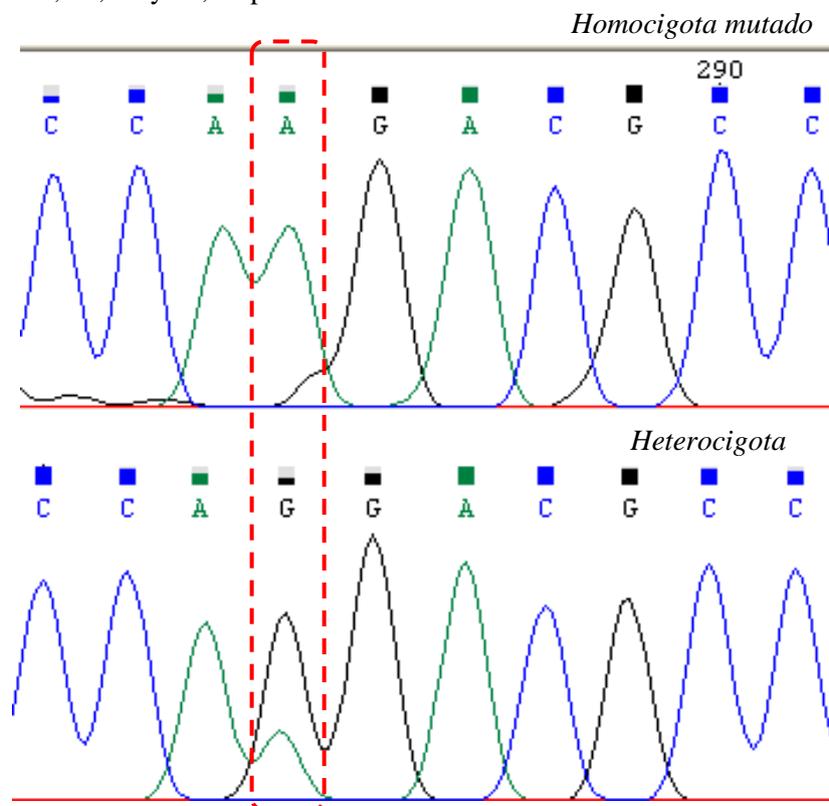
#### 5.2.2 Determinación de los polimorfismos de CYP2D6

Se determinaron las frecuencias alélicas de los polimorfismos del gen CYP2D6 a partir 199 muestras recolectadas (Tabla 6). Se constató que, entre las variantes alélicas relacionadas con la pérdida de función, la variante \*4 presentó la frecuencia más elevada en la población analizada. Por otro lado, se evidenció la ausencia de la variante \*3, lo cual sugiere su escasa presencia o incluso su inexistencia en esta población específica. Todas las variantes alélicas analizadas se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg (HWE), lo cual implica que no se están produciendo eventos de selección o fuerzas evolutivas que distorsionen la distribución esperada de los alelos en el gen CYP2D6.

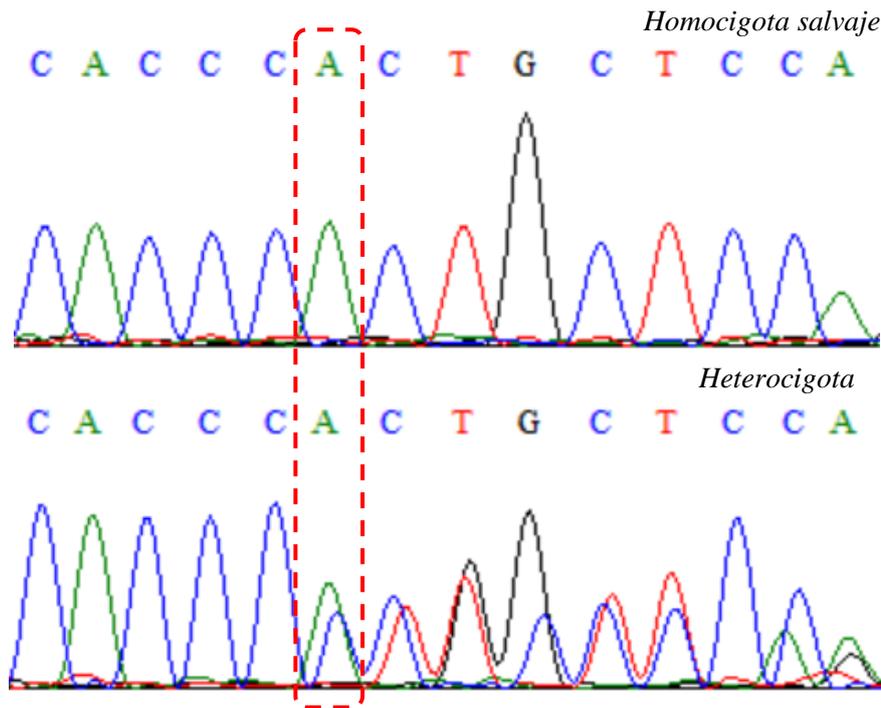
**Tabla 6.** Frecuencias alélicas de los polimorfismos de CYP2D6. Las variantes se muestran con su identificación (rsID), su frecuencia y el estadístico para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) con su valor p asociado.

Polimorfismo	Frecuencia	HWE (valor p)
rs3892097 (CYP2D6*4)	0.178	2.45 (0.12)
rs28371725 (CYP2D6*41)	0.107	1.19 (0.27)
rs28371706 (CYP2D6*17)	0.010	0.02 (0.89)
rs5030656 (CYP2D6*9)	0.018	0.06 (0.80)
rs5030655 (CYP2D6*6)	0.005	>0.01 (0.97)
rs35742686 (CYP2D6*3)	0	No calculado

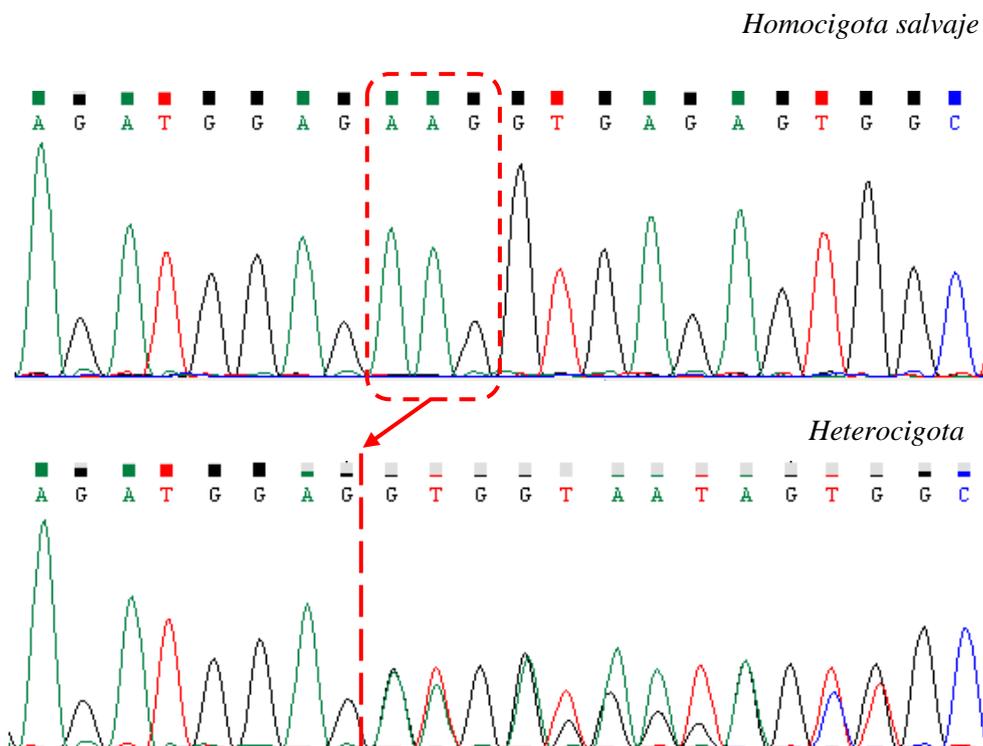
Los electroferogramas con la secuencia de los polimorfismos \*4, \*6, \*9 y \*17 se pueden observar en las Figuras 11, 12, 13 y 14, respectivamente.



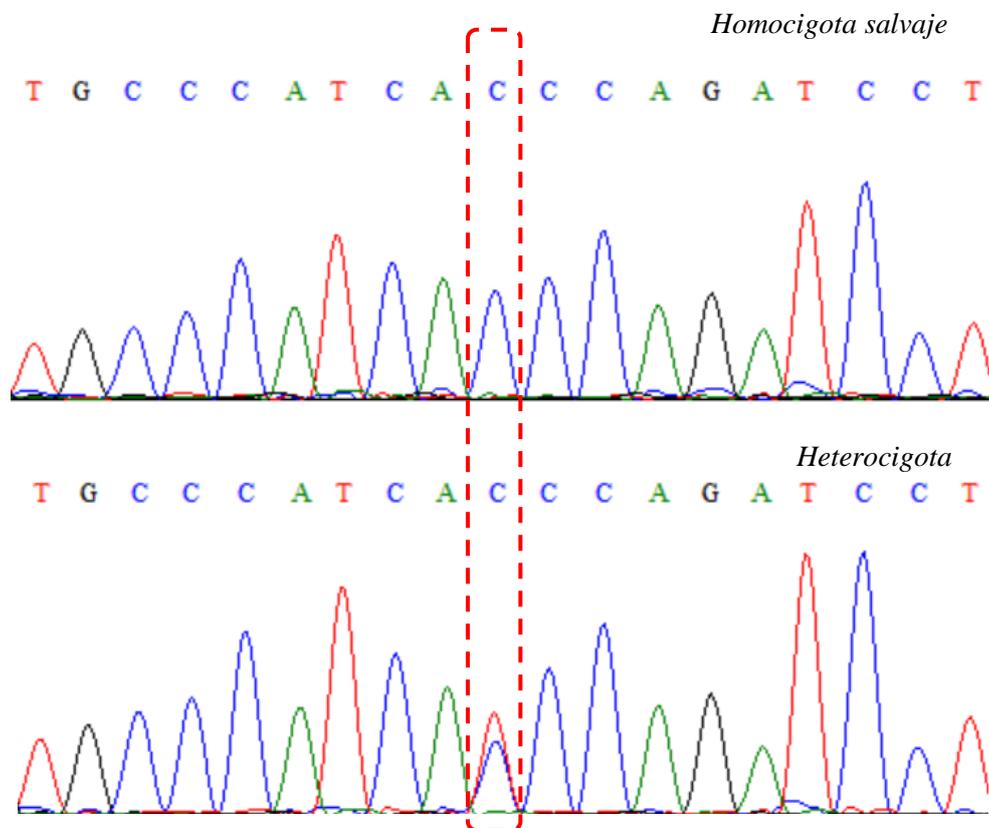
**Figura 11.** Electroferograma de la secuencia del polimorfismo CYP2D6\*4 (1846 G>A). En la parte superior se observa la secuencia de una muestra homocigota mutada, mientras que en la parte inferior se observa la secuencia de una muestra heterocigota. Se señala con una línea punteada roja entre ambas secuencias el sitio de la variante.



**Figura 12.** Electroferograma de la secuencia del polimorfismo CYP2D6\*6 (1708delA). En la parte superior se observa la secuencia de una muestra homocigota salvaje, mientras que en la parte inferior se observa la secuencia de una muestra heterocigota. Se señala con una línea punteada roja entre ambas secuencias el sitio de la variante.



**Figura 13.** Electroferograma de la secuencia del polimorfismo CYP2D6\*9 (2616delAAG). En la parte superior se observa la secuencia de una muestra homocigota salvaje, mientras que en la parte inferior se observa la secuencia de una muestra heterocigota. Se señala con una línea punteada roja entre ambas secuencias el sitio de la delección.



**Figura 14.** Electroferograma de la secuencia del polimorfismo CYP2D6\*17 (1022C>T). En la parte superior se observa la secuencia de una muestra homocigota salvaje, mientras que en la parte inferior se observa la secuencia de una muestra heterocigota. Se señala con una línea punteada roja entre ambas secuencias el sitio de la variante.

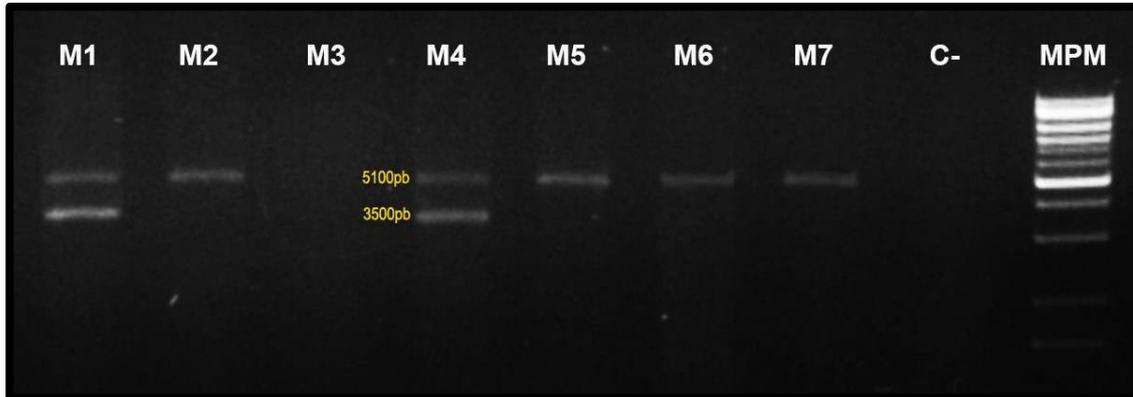
### 5.2.3 Determinación de las CNVs de CYP2D6

En las 199 muestras analizadas por PCR real-time, se determinó que 195 muestras tenían el número de copias normal, 2 muestras contenían 3 copias (un alelo duplicado) y 2 muestras presentaban una sola copia (un alelo deletado). Las frecuencias de las CNVs se muestran en la Tabla 7.

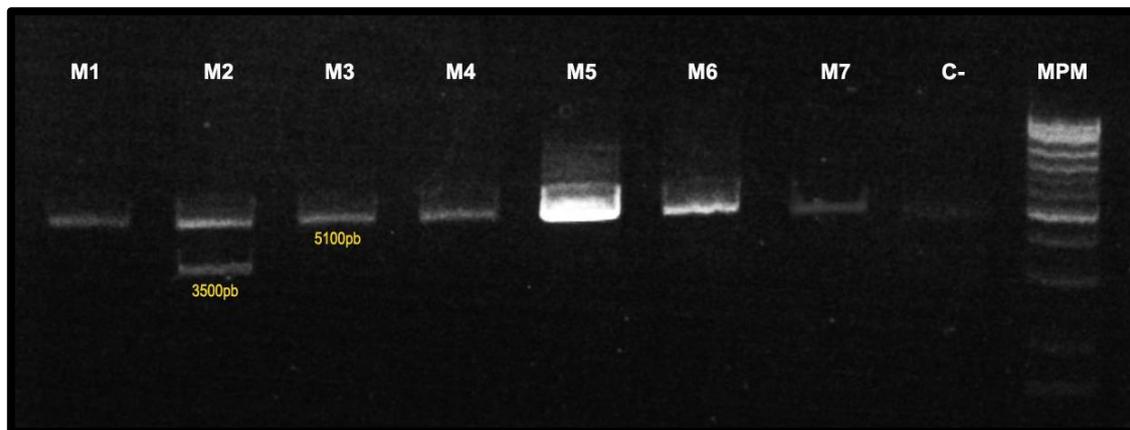
**Tabla 7.** Frecuencias de las variantes en el número de copias (CNVs) de CYP2D6 (duplicación y deleción completa del gen). La frecuencia, se encuentra acompañada del estadístico para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) con su valor p asociado.

CYP2D6 CNV	Frecuencia	HWE (valor p)
CYP2D6x2 (duplicación)	0.005	No calculado
CYP2D6*5 (deleción)	0.005	>0.01 (0.97)

Por otra parte, la presencia de la delección (CYP2D6\*5) y la duplicación (CYP2D6x2) del gen analizadas mediante la técnica de Long-PCR obtuvieron resultados consistentes con lo observado en análisis por PCR Real-time. Los productos de PCR obtenidos se visualizaron en una electroforesis en gel de agarosa (Figura 15 y 16).



**Figura 15.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se observan los productos de la Long-PCR diseñada para la detección de la variante CYP2D6\*5. El tamaño de las bandas se indica en pares de bases (pb). En el carril M1 y M4 se observan dos bandas de distinto tamaño, correspondientes a la presencia de un alelo normal (5100 pb) y otro con la delección (3500pb). El carril de control negativo (C-) no presenta amplificación. En el último carril se observa el marcador de peso molecular (MPM) de 1 kb (GeneRuler™, Fermentas Life Sciences).



**Figura 16.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se observan los productos de la Long-PCR diseñada para la detección de alelos duplicados del gen CYP2D6. El tamaño de las bandas se indica en pares de bases (pb). En el carril M2 se observan dos bandas de distinto tamaño, correspondientes a la presencia de un alelo normal (5100 pb) y otro con la duplicación (3500pb). El carril de control negativo (C-) no presenta amplificación. En el último carril se observa el marcador de peso molecular (MPM) de 1 kb (GeneRuler™, Fermentas Life Sciences).

## 5.2.4 Comparación de frecuencias de las variantes de CYP2D6 en Latinoamérica y otras poblaciones

El análisis comparativo de las frecuencias alélicas de los polimorfismos del gen CYP2D6 de nuestra muestra con las frecuencias de otras poblaciones extraídas de la base de datos 1000 genomas<sup>57</sup> (tabla 8), reveló patrones distintivos para cada variante, destacando la diversidad genética inherente que existe entre las diferentes poblaciones del mundo.

**Tabla 8.** Comparación de las frecuencias alélicas de los polimorfismos del gen CYP2D6 analizados en el presente trabajo de tesis con las frecuencias extraídas de la base de datos 1000 genomas para la población europea (EUR), africana (AFR), asiática oriental (EAS), sudasiática (SAS) y americana mixta (AMR).

Polimorfismo	Base de datos 1000 genomas					Frecuencias en nuestra muestra
	EUR	AFR	EAS	SAS	AMR	
<b>CYP2D6*4</b>	0.186	0.061	0.002	0.109	0.130	0.178
<b>CYP2D6*41</b>	0.093	0.018	0.038	0.122	0.062	0.107
<b>CYP2D6*17</b>	0.002	0.218	0.000	0.000	0.009	0.010
<b>CYP2D6*9</b>	0.026	0.001	0.000	0.000	0.013	0.018
<b>CYP2D6*6</b>	0.020	0.001	0.000	0.001	0.003	0.005
<b>CYP2D6*3</b>	0.019	0.002	0.000	0.002	0.006	0.000

Es importante destacar que estas bases de datos tienden a generalizar a las poblaciones, en particular a las americanas, obviando las notables diferencias genéticas que existen entre ellas. Esta falta de especificidad puede ocultar diferencias genéticas significativas y conducir a interpretaciones inadecuadas de los análisis comparativos. En respuesta a esta problemática de la limitada discriminación genética que ofrecen estas bases de datos, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica y una comparación de las frecuencias alélicas de las variantes del gen CYP2D6 en diferentes países latinoamericanos con respecto a las frecuencias encontradas en nuestro trabajo. Cabe resaltar que todos los trabajos seleccionados de la literatura científica se realizaron en poblaciones cuyos individuos tienen una ascendencia mezclada (europea, africana y amerindia). Los datos del análisis comparativo se detallan en la tabla 9.

**Tabla 9.** Comparación de las frecuencias alélicas de CYP2D6 en las poblaciones de Latinoamérica con las frecuencias encontradas en este estudio. ND: No determinada.

Población (región)	N	Frecuencias								Referencias
		Alelos multiplicados	*3	*4	*5	*6	*9	*17	*41	
<b>Uruguay (General)</b>	199	<b>0.005</b>	<b>0.000</b>	<b>0.178</b>	<b>0.005</b>	<b>0.005</b>	<b>0.018</b>	<b>0.010</b>	<b>0.107</b>	<b>Ramírez et al. 2023<sup>58</sup></b>
<b>Argentina (General)</b>	246	0.042	0.006	0.164	0.028	0.004	ND	0.002	0.077	Moya et al. 2017 <sup>59</sup>
<b>Brasil (General)</b>	1020	0.085	0.007	0.094	0.046	ND	0.011	0.056	0.055	Friedrich et al. 2014. <sup>60</sup>
<b>Chile (Santiago de Chile)</b>	321	0.003	0.011	0.118	ND	ND	ND	0.000	ND	Varela et al. 2015 <sup>61</sup>
<b>Venezuela (Lara)</b>	149	ND	0.000	0.134	0.020	0.012	ND	ND	ND	Griman et al. 2012 <sup>62</sup>
<b>Venezuela (Aragua)</b>	145	ND	ND	0.145	ND	0.003	ND	ND	ND	Flores et al. 2015 <sup>63</sup>
<b>Colombia (Bogotá)</b>	212	0.093	0.005	0.141	0.021	0.005	ND	0.000	0.049	P Sarmiento et al. 2020 <sup>64</sup>
<b>Perú (General)</b>	234	ND	0.030	0.094	ND	ND	ND	ND	ND	Alvarado et al. 2021 <sup>65</sup>
<b>Ecuador (General)</b>	118	0.016	0.004	0.106	0.021	0.000	ND	0.004	ND	Dorado et al. 2012 <sup>66</sup>
<b>Cuba (La Habana)</b>	126	0.047	0.000	0.143	0.016	0.012	ND	0.102	ND	Llerena et al. 2012 <sup>67</sup>
<b>Nicaragua (León)</b>	98	0.020	0.000	0.142	0.046	0.000	ND	0.000	ND	
<b>México (Chiapas)</b>	100	0.015	0.000	0.011	0.020	0.000	ND	0.000	0.000	López-López et al. 2014 <sup>68</sup>
<b>México (Sonora &amp; Guerrero)</b>	96	0.036	0.000	0.140	0.020	ND	ND	0.000	ND	Contreras et al 2011 <sup>69</sup>

### 5.2.5 Frecuencias genotípicas y sus fenotipos metabolizadores asociados

En la población analizada, la mayoría (65%) presentó un fenotipo NM. Los fenotipos clínicamente más relevantes, IM y PM, tuvieron una frecuencia del 30% y 5%, respectivamente. El fenotipo UM no pudo ser determinado debido a que las 2 muestras con duplicaciones de CYP2D6 (3 copias) presentan genotipos heterocigotos wt/\*4 y wt/\*9. La imposibilidad de establecer que alelo es el duplicado no permite confirmar que estas personas exhiban un fenotipo UM.

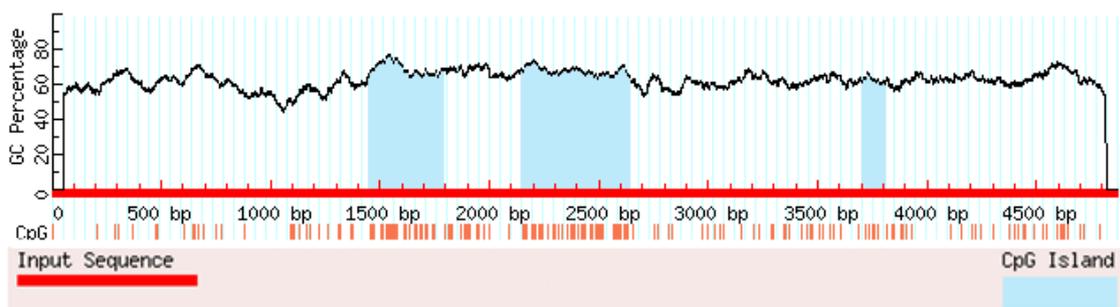
El genotipo wt/wt fue el de mayor frecuencia y se encontró en 90 muestras, mientras que el genotipo \*4/\*4 fue el único genotipo asociado al fenotipo PM y se encontró en 10 muestras, lo que corresponde al 5% del total de sujetos estudiados. La tabla 10 muestra las frecuencias de los genotipos encontrados y sus fenotipos metabolizadores CYP2D6 asociados.

**Tabla 10.** Frecuencias genotípicas y distribución de los fenotipos CYP2D6 inferidos mediante el genotipo. Wt: Alelo salvaje o Wild-Type

Fenotipo metabolizador inferido	Genotipo	Frecuencia	Puntaje de actividad (AS)
<b>NM (65%)</b>	wt/wt	0.452 (90/199)	2
	wt/*9	0.020 (4/199)	1.5
	wt/*17	0.010 (2/199)	1.5
	wt/*41	0.166 (33/199)	1.5
<b>IM (30%)</b>	wt/*4	0.221 (44/199)	1
	wt/*5	0.010 (2/199)	1
	wt/*6	0.005 (1/199)	1
	*4/*9	0.005 (1/199)	0.5
	*4/*17	0.010 (2/199)	0.5
	*4/*41	0.030 (6/199)	0.5
	*41/*41	0.005 (1/199)	1
	*41/*9	0.010 (2/199)	1
	*41/*6	0.005 (1/199)	0.5
<b>PM (5%)</b>	*4/*4	0.050 (10/199)	0

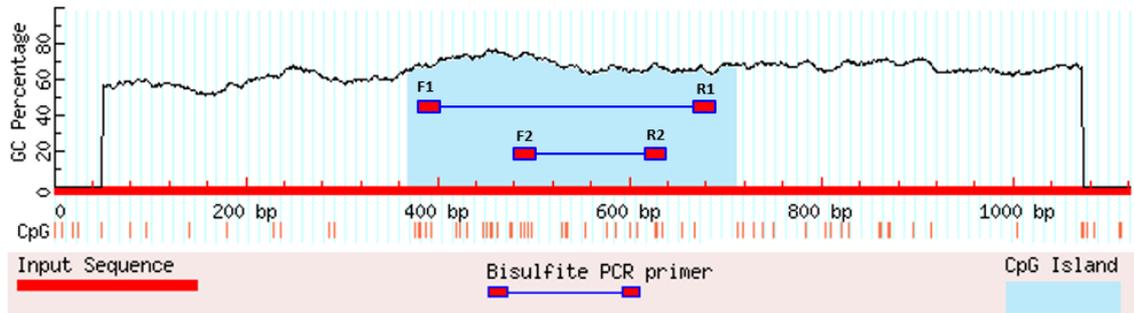
### 5.3 METILACIÓN DE CYP2D6

La predicción de CGI a lo largo del gen CYP2D6 a través del software MethPrimer no mostró que existieran CGI en el promotor del mismo. Sin embargo, se pudo determinar tres CGI en el resto del gen (Figura 17). La primera, de 342 pb abarca todo el exón 2 y el comienzo del intrón 2 de CYP2D6. La segunda, de 498 pb cubre al tercer y cuarto exón en su totalidad. Por último, una CGI de 104 pb que abarca el final del intrón 6 y parte del exón 7.



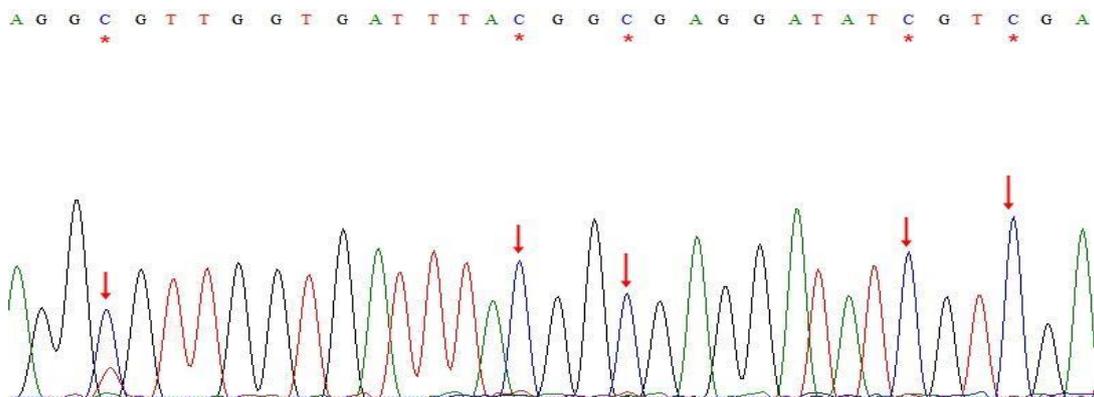
**Figura 17.** Esquema de las CGI predichas en el gen CYP2D6 por el software MethPrimer (en celeste).

El estado de metilación se analizó en una única CGI, para la cual se muestra el diseño de cebadores para la secuenciación con bisulfito en la Figura 18. El estudio de metilación se inició con la elección de una de las 3 islas. Las otras dos islas no fueron analizadas en este trabajo y se plantea su estudio como perspectiva.



**Figura 18.** Esquema de la CGI predicha en el gen CYP2D6 por el software MethPrimer (en celeste) y estudiada mediante secuenciación con bisulfito. En el esquema se observan las regiones de ADN amplificadas en la PCR anidada para secuenciar y estudiar el estado de metilación de la misma. F1: *Primer* directo para la primera ronda de PCR. R1: *Primer* reverso para la primera ronda de PCR. F2: *Primer* directo para la segunda ronda de PCR. R2: *Primer* reverso para la segunda ronda de PCR.

Las muestras de ADN modificadas con bisulfito se encontraron metiladas en todos sus sitios CpG (Figura 19). La secuencia obtenida correspondía al gen CYP2D6 por lo que se descartó la amplificación inespecífica de los pseudogenes CYP2D7 y CYP2D8. Por lo tanto, se observó que la CGI encontrada entre el exón 2 y el intrón 2 del gen CYP2D6 se encontraba metilada en el 100% de los casos, tanto para las pacientes como para los individuos voluntarios.



**Figura 19.** Electroferograma de la secuencia de ADN modificada con bisulfito de la región amplificada en la CGI en el gen CYP2D6. Se detallan con asteriscos y flechas rojas las 5-metilcitosinas en los sitios CpG que no fueron afectadas por el bisulfito.

## 5.3 ASOCIACIÓN CON LOS DATOS CLÍNICOS

### 5.3.1 Asociación de los polimorfismos genéticos de CYP2D6 con los resultados del tratamiento con TMX

El modelo de herencia dominante fue puesto a prueba en los polimorfismos \*4 y \*41, mientras que el modelo de herencia recesivo fue puesto a prueba en el polimorfismo \*4. Esto se debió a que el resto de las variantes de CYP2D6 tuvieron una baja frecuencia en las pacientes y se descartaron para este análisis por contener frecuencias esperadas menores a 1 en sus tablas de contingencia. Los análisis no mostraron asociaciones estadísticamente significativas entre presencia de los polimorfismos estudiados y el resultado clínico del tratamiento con TMX. El número de pacientes que tienen un buen o mal resultado clínico según el genotipo de las variantes y la asociación estadística para los modelos dominantes y recesivos, se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Estudios de asociación de los polimorfismos \*4 y \*41 para los modelos de herencia dominante y recesivo. Se detalla la cantidad de individuos con un buen o mal resultado clínico al tratamiento con TMX para cada genotipo. Se indica el valor de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y su valor p.

<b>CYP2D6*4</b>			
<b>Modelo dominante</b>			
<i>Genotipos</i>	<i>Buen resultado</i>	<i>Mal resultado</i>	$\chi^2$ (valor p)
CYP2D6*4 <sub>GG</sub>	15	13	2.7×10 <sup>-4</sup> (p=0.987)
CYP2D6*4 <sub>GA+AA</sub>	7	6	
<b>Modelo recesivo</b>			
<i>Genotipos</i>	<i>Buen resultado</i>	<i>Mal resultado</i>	$\chi^2$ (valor p)
CYP2D6*4 <sub>GG+GA</sub>	19	17	0.016 (p=0.899)
CYP2D6*4 <sub>AA</sub>	3	2	
<b>CYP2D6*41</b>			
<b>Modelo dominante</b>			
<i>Genotipos</i>	<i>Buen resultado</i>	<i>Mal resultado</i>	$\chi^2$ (valor p)
CYP2D6*41 <sub>GG</sub>	17	12	0.981 (p=0.322)
CYP2D6*41 <sub>GA+AA</sub>	5	7	

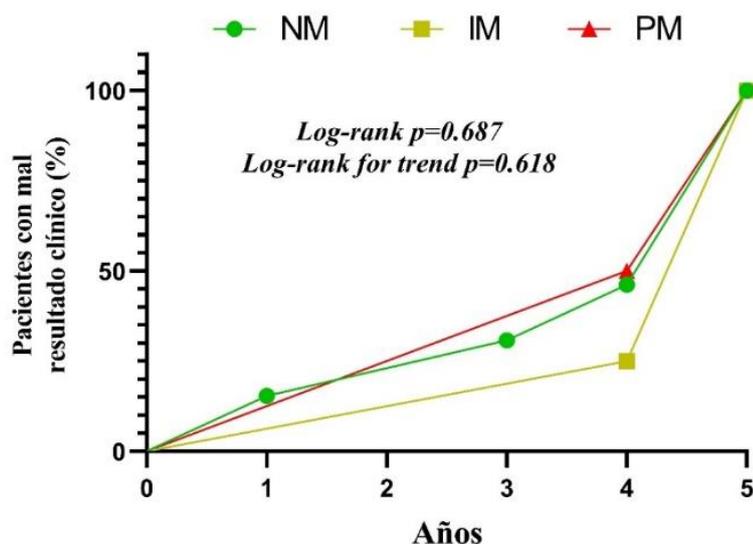
### 5.3.2 Asociación entre los fenotipos metabolizadores CYP2D6 y los resultados del tratamiento con TMX

Los fenotipos metabolizadores de CYP2D6 con relevancia clínica (PM e IM) pueden estar dados por genotipos que contengan polimorfismos de baja función enzimática o función enzimática reducida y que no hayan sido incluidos en el análisis anterior. Pero en concordancia con el resultado anterior, la relación entre los fenotipos metabolizadores CYP2D6 y la respuesta clínica del CM en las 41 pacientes no mostró ninguna asociación estadística significativa ( $p > 0.05$ ). El número de pacientes que tienen un buen o mal resultado clínico según su fenotipo metabolizador y su asociación estadística se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Pacientes clasificados según su resultado clínico y los fenotipos metabolizadores CYP2D6 esperados. Se indica el valor de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y su valor p. NM: metabolizador normal, IM: metabolizador intermedio, PM: metabolizador lento.

Resultado clínico	NM	PM o IM	$\chi^2$ (valor p)
Bueno	15	7	$2.7 \times 10^{-4}$ (p=0.987)
Malo	13	6	

La comparación del tiempo de suspensión del tratamiento entre los diferentes fenotipos metabolizadores de CYP2D6 en el grupo con un resultado clínico malo muestra una tendencia y distribución similar (log-rank  $p > 0.05$ ) (Figura 20).



**Figura 20.** Porcentaje de pacientes con malos resultados clínicos que interrumpieron el tratamiento con TMX durante el período de 5 años según su fenotipo de metabolizador CYP2D6. Se muestra el valor p asociado a la distribución de los fenotipos y la tendencia de estos en la suspensión del tratamiento a lo largo del tiempo según las pruebas de log-rank. NM: metabolizador normal (en verde), IM: metabolizador intermedio (en amarillo), PM: metabolizador lento (en rojo).

### 5.3.3 Asociación entre los fenotipos metabolizadores CYP2D6 y los resultados del tratamiento con TMX con el estado menopáusico

De las 41 pacientes, 28 se clasificaron como posmenopáusicas y 13 como premenopáusicas. En este caso, se estudió únicamente la asociación de los fenotipos metabolizadores en pacientes posmenopáusicas, las pacientes premenopáusicas se descartaron para este análisis por contener frecuencias esperadas menores a 1 en la tabla de contingencia. El análisis estadístico realizado en las pacientes posmenopáusicas indicó que no hubo una relación estadísticamente significativa entre el resultado del tratamiento y los fenotipos metabolizadores ( $p = 0.334$ ) (tabla 12).

### 5.3.4 Asociación entre los fenotipos metabolizadores CYP2D6 y los resultados del tratamiento con TMX en pacientes con uso anticonceptivos orales

Respecto al uso de anticonceptivos orales, 30 declararon utilizar o estar utilizando anticonceptivos orales. El análisis estadístico realizado en la cohorte indicó que no hubo una relación estadísticamente significativa entre el resultado del tratamiento y los fenotipos metabolizadores en las pacientes que declararon el uso de anticonceptivos orales ( $p = 0.469$ ) (tabla 12).

### 5.3.5 Asociación entre los fenotipos metabolizadores CYP2D6 y los resultados del tratamiento con TMX en pacientes fumadoras

Con respecto al tabaquismo, 14 pacientes declararon consumir tabaco frecuentemente. El análisis estadístico realizado en la cohorte indicó que no hubo asociación significativa entre el resultado del tratamiento y los fenotipos metabolizadores en pacientes fumadoras ( $p = 1.000$ ) (tabla 13).

**Tabla 13.** Asociación entre el fenotipo metabolizador y las distintas variables. Se muestran las pacientes tratadas con TMX posmenopáusicas, fumadoras y con uso de anticonceptivos orales. Se indica la cantidad de pacientes con mal o buen resultado para cada una de las variables y su análisis estadístico mediante la prueba chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) con su valor p asociado.

Variable	Fenotipo metabolizador	Buen resultado	Mal Resultado	$\chi^2$ (valor p)
Pacientes posmenopáusicas	NM	16	4	0.934 (0.334)
	PM o IM	5	3	
Pacientes con uso de Anticonceptivos orales	NM	11	10	0.526 (0.469)
	PM o IM	6	3	
Pacientes fumadoras	NM	4	3	0.000 (1.000)
	PM o IM	4	3	

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Evaluación de las frecuencias alélicas de los polimorfismos CYP2D6

En esta tesis, caracterizamos con éxito las variantes alélicas más relevantes del gen CYP2D6 en una cohorte de 199 personas de Uruguay. La muestra cumple con un tamaño representativo con una precisión de  $\pm 7$  y una confianza del 95%. El número de muestras conseguidas y analizadas, fue similar o incluso mayor al tamaño muestral de estudios realizados en países de la región con mayor cantidad de habitantes (tabla 9).

Nuestra población presenta una ascendencia genética trihíbrida. Los primeros trabajos mostraron que en Montevideo el acervo genético presentaba una ancestralidad principalmente europea (92%), seguido de un aporte africano (7%) y amerindio (1%)<sup>70</sup>. Sin embargo, Bonilla determinó en el año 2015 con personas de todo el territorio nacional que el componente ancestral tiene un origen europeo en un  $76.6 \pm 13.7\%$ , amerindio en un  $14.0 \pm 10.8\%$  y africano en un  $9.4\% \pm 7.5$ <sup>71</sup>. Estos resultados, son concordantes con el reciente estudio de Burgueño-Rodríguez en el año 2020.<sup>72</sup>

En cuanto a la distribución de las diferentes variantes de CYP2D6 en la población estudiada en comparación con la base de datos 1000 genomas (tabla 8), encontramos que las frecuencias de los alelos CYP2D6\*4 (17,8%), CYP2D6 \*41 (10.7%) y CYP2D6\*9 (1,8%) fueron similares a las reportadas en europeos. Sin embargo, para el resto de los alelos analizados, las frecuencias presentaron similitud con otras poblaciones. Los alelos CYP2D6\*3 (0%) y CYP2D6\*6 (0.5%) fueron similares a las reportadas en africanos, asiáticos del este, asiáticos del sur y americanos mixtos, mientras que la frecuencia de CYP2D6\*17 (1%) fue similar únicamente a la frecuencia encontrada en poblaciones americanas mixtas. Si tomamos en cuenta el porcentaje de frecuencia acumulada de los alelos con función nula o disminuida de CYP2D6 estudiados en esta tesis (\*3, \*4, \*5, \*6, \*9, \*17 y \*41), se observa que alcanza un 32.3%, levemente mayor a lo que se observó en la población europea (29.5%) y levemente menor a lo observado en los asiáticos del sur (35%).

En América Latina, se ha observado que las frecuencias de las diversas variantes de CYP2D6 presentan distribuciones distintas (tabla 9). En la base de datos de 1000 genomas, las poblaciones categorizadas como latinoamericanas, las frecuencias no están subdivididas a pesar de que las poblaciones de cada país difieren en cuanto a su acervo genético.

En esta tesis para investigar las CNVs del gen CYP2D6, utilizamos dos técnicas, Long-PCR y PCR en tiempo real con sondas TaqMan. Los resultados obtenidos por ambas técnicas fueron consistentes.

La frecuencia alélica observada para los CNVs fue de 1%, de los cuales 0.5% correspondieron al gen duplicado y 0.5% al gen deleciónado. La duplicación de CYP2D6 mostró una frecuencia de 1.75% en población europea, 6.21% la población africana y 2.73% en americanos mixtos<sup>73</sup>. Mientras que la deleción génica (CYP2D6\*5) presentó una frecuencia alélica de 3% en la población europea, 5.9% en la población africana y 2.2% en los americanos mixtos<sup>73</sup>. En todos los casos las frecuencias encontradas tanto para las duplicaciones como para la deleción del gen CYP2D6 son mayores a las encontradas en nuestra población.

Las poblaciones sudamericanas de la bibliografía utilizada presentan origen étnico trihíbrido, pero la proporción de ascendencia europea, africana y amerindia es variable. Por ejemplo, la población de Bogotá (Colombia) tiene una estructura poblacional con una ascendencia predominantemente amerindia (52%), seguida de europea y africana (45% y 3% respectivamente). En esta población, se determinó que las frecuencias para las CNV de CYP2D6 fueron de 9.3% para la duplicación y 2.1% para la deleción<sup>64</sup>, frecuencias que son superiores a las encontradas en nuestra población. Por otra parte, la población del sur de Brasil presentó frecuencias de CNV para CYP2D6 de 6.3% para las duplicaciones y 4.9% para la deleción<sup>60</sup>, mostrando ser superiores a la de la población uruguayana. Las poblaciones sudamericanas presentan su propio acervo genético característico, por lo que los estudios de frecuencias de cada país en particular no son extrapolables a individuos de otra población a pesar de pertenecer al mismo continente.

Recientemente, trabajos que han estudiado las poblaciones nativas Iberoamericanas, han visto que la deleción (CYP2D6\*5) y la multiplicación del gen CYP2D6 poseen una frecuencia y un patrón de distribución que es independiente al proceso de mestizaje entre los nativos de Latinoamérica y los europeos. Por lo que la presencia en el continente latinoamericano de las CNVs es anterior a este proceso migratorio, y muestra un origen convergente entre Latinoamérica y Europa<sup>74</sup>.

## **6.2 Evaluación de los fenotipos metabolizadores de CYP2D6 inferidos**

La prevalencia de los fenotipos NM (65%), IM (30%) y PM (5%), mostró valores similares a los descritos en Europa<sup>51</sup>. En la bibliografía publicada en poblaciones europeas y/o caucásicas antes del nuevo consenso de AS realizado por la CPIC y el DPWG<sup>51</sup>, el fenotipo NM mostraba una mayor prevalencia, mientras que el fenotipo IM presentaba una menor prevalencia a la establecida en esta tesis. Sin embargo, esta diferencia es producto de un cambio de clasificación en cuanto a la predicción fenotípica del genotipo \*1/\*4 de CYP2D6. Previo al nuevo consenso, este genotipo era considerado dentro del grupo de NM, pero con la nueva estandarización es considerado en el grupo de los IM. Por lo tanto, más allá de la bibliografía que se tome de referencia al comparar nuestra población con la europea, la prevalencia de los fenotipos metabolizadores de CYP2D6 es similar.

El fenotipo UM no pudo ser inferido con los resultados obtenidos en esta tesis debido a que el mismo es producto de duplicaciones génicas, las cuales se presentaron en individuos heterocigotas sin poder determinar cuál alelo es el duplicado. A pesar de esto, estamos en condiciones de afirmar que el fenotipo UM inferido para la población uruguaya es nulo o en el mejor de los casos de muy baja frecuencia (0.5%). Este resultado es distinto al observado en la población europea (3.1%) y en el resto de las poblaciones americanas (4.6%)<sup>51</sup>. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, a pesar de que las poblaciones latinoamericanas suelen ser en muchos casos poblaciones trihíbridas, el origen de su acervo genético es diferente. Por lo tanto, no resulta sorprendente que el fenotipo UM no presente ninguna semejanza con otra población cercana, remarcando la importancia de estudiar y conocer las frecuencias fenotípicas y genotípicas a nivel local.

Basándonos en estudios sobre la distribución fenotípica de la metabolización oxidativa del dextrometorfano en una población uruguaya, fármaco también metabolizado por CYP2D6, se encontró que en una cohorte de 302 pacientes existía un patrón fenotípico de distribución trimodal con un 78.8% de metabolismo intermedio/normal, un 13.9% metabolismo rápido y un 7.3% de metabolismo lento. Sin perjuicio de que el método utilizado por los investigadores no es comparable con la predicción fenotípica a través del genotipo de CYP2D6, podemos decir que la proporción de pacientes PM encontrada en la cohorte utilizada en esta tesis se asemeja a la cantidad de metabolizadores lentos del dextrometorfano encontrada. Por lo que existe cierto grado de concordancia entre los resultados de nuestro trabajo y los resultados publicados<sup>75</sup>.

Los fenotipos metabolizadores inferidos a través de los genotipos difieren entre los diferentes trabajos<sup>76,77</sup>. Esto debe tenerse en cuenta al evaluar los estudios para el desarrollo de directrices o guías farmacogenéticas. La mayoría de los trabajos estudian un fármaco específico y el efecto que tenga una o varias variantes genéticas. Es común que un genotipo específico para la enzima CYP2D6 tenga un gran efecto sobre la farmacocinética de un fármaco y no tenga ningún efecto sobre otros, a pesar de que sean sus sustratos, debido a que existen otros genes involucrados<sup>78</sup>.

Por otra parte, la puntuación AS utilizada para inferir a los fenotipos metabolizadores de CYP2D6 toma en cuenta valores de actividad muy estrictos para los alelos de función decrecida. En particular, se ha visto que la estimación de actividad enzimática mediante la relación metabólica de los alelos CYP2D6\*9, \*17 y \*41, es diferente y puede variar según el fármaco. Recientemente, estudios en donde se utilizó al fármaco brexpiprazol como biomarcador de la actividad de CYP2D6, determinó que la actividad enzimática relativa respecto al alelo de función normal CYP2D6\*1: es del 23% para CYP2D6\*9, del 4% para CYP2D6\*17 y del 9% para CYP2D6\*41<sup>79</sup>. A pesar de esto, la predicción del fenotipo de CYP2D6 a través consenso AS sigue siendo

utilizado y constantemente actualizado, lo que deriva en una fuente de información para los profesionales en la toma de decisiones clínicas.

Una de las limitaciones de este trabajo es la cobertura de alelos de CYP2D6 estudiados. Si bien, se cubrió a las variantes de CYP2D6 con mayor frecuencia en las poblaciones con las cuales tenemos mayor parentesco genético según nuestra ancestralidad, no se incluyeron variantes raras de baja frecuencia con consecuencias conocidas o nuevas en CYP2D6 que podría estar presentes en la población. La precisión de la predicción de los fenotipos metabolizadores de CYP2D6 mediante el análisis genético podría mejorarse ampliando la cobertura de alelos de CYP2D6, incluyendo estos alelos raros de CYP2D6, que en esta tesis pudieron haber sido clasificados incorrectamente como wild-type.

Debemos tener en cuenta que cualquier estudio genético tendrá sus limitaciones a menos que se integren otros factores, incluida la variación genética en otros loci que contribuyan al transporte, metabolismo y disposición de un fármaco de interés, como también los factores clínicos del paciente como la medicación concomitante, las condiciones fisiológicas y las patológicas subyacentes. Además, se ha visto que, en individuos con el mismo fenotipo metabolizador, pero de poblaciones con diferentes orígenes ancestrales, la actividad de la enzima CYP2D6 puede ser diferente<sup>80</sup>, por lo que los orígenes ancestrales poblacionales de las cohortes de estudio deberán ser tenidas en cuenta en los estudios de predicción fenotípica.

### **6.3 Evaluación de los estudios de metilación en CYP2D6**

En el análisis del estado de metilación de CYP2D6 realizado en esta tesis, encontramos que la CGI estudiada (exón 2 e intrón 2) estaba totalmente metilada para todas las muestras analizadas. Se descartó que la secuencia estudiada perteneciera a los pseudogenes CYP2D7 o CYP2D8 a través de un análisis de homología, resaltando el correcto diseño de los *primers* para la secuenciación con bisulfito. Un análisis en recién nacidos de origen caucásico en Glasgow (Escocia), estableció que el porcentaje de metilación en el exón 1 de CYP2D6 fue de aproximadamente un 90%<sup>81</sup>. Si bien la región estudiada por los autores no corresponde a la CGI estudiada en esta tesis, nos indica el grado de metilación que posee este gen.

La metilación del ADN también puede influir directamente en la transcripción cuando un dinucleótido CpG se encuentra dentro de un sitio de unión de un factor de transcripción<sup>82</sup>. Zhang *et al* encontró hipermetilación en la misma CGI de CYP2D6 estudiada en esta tesis<sup>83</sup>. No obstante, a raíz de nuestros resultados, cabe considerar la posibilidad de que la regulación epigenética de este gen no sea llevada a cabo por la metilación del ADN la CGI estudiada.

Otras investigaciones que estudiaron la metilación de CYP2D6 en hepatocitos de hígados de adultos encontraron una metilación variable, la cual se correlaciona inversamente con la expresión

del ARNm<sup>84</sup>. Estos resultados, en conjunto con los de Ingelman-Sundberg<sup>45</sup>, los cuales establecen la presencia de una CGI al 5' del intrón 4 de 75 pb con posible función regulatoria, indicando que otra región, diferente a la estudiada en esta tesis, podría regular la expresión del gen por metilación. El análisis del grado de metilación de la CGI de 75 pb encontrada por Ingelman-Sundberg<sup>45</sup> con posible función regulatoria, al igual que el resto de las CGI encontradas en este trabajo no fueron puestos a prueba debido a la necesidad de cumplir con los plazos asignados para culminar la tesis.

#### **6.4 Análisis de asociación en las pacientes**

La asociación entre los genotipos de CYP2D6 y el resultado clínico de los pacientes tratados con TMX sigue siendo controversial<sup>28</sup>. Algunos autores señalan que sus hallazgos no respaldan ningún impacto de los fenotipos de CYP2D6 inferidos a partir del genotipo y la supervivencia libre de CM<sup>85</sup>. Mientras que otros autores observan que los pacientes con CM categorizados como PM o UM respecto a CYP2D6, tienen un peor pronóstico (mayor mortalidad o suspensión temprana de tratamiento) en comparación con los pacientes categorizados como NM, luego de recibir una dosis estándar de TMX<sup>86</sup>. En nuestra cohorte de 41 pacientes, los resultados no respaldan ninguna incidencia de los genotipos del gen CYP2D6 y/o los fenotipos metabolizadores esperados en los resultados clínicos (mortalidad, suspensión del tratamiento, recaída y/o efectos adversos).

Recientemente, se ha trabajado en un algoritmo de predicción de endoxifeno donde se incluye la genética de otros farmacogenes además de CYP2D6<sup>87</sup>, lo que podría ayudar a seleccionar dosis personalizadas de TMX que garantice que todos los pacientes con CM alcancen concentraciones adecuadas de endoxifeno y sacar el máximo provecho del tratamiento. A pesar de esto, siguen existiendo trabajos donde se observa que los niveles de endoxifeno se reducen significativamente en los portadores homocigotos de alelos nulos de CYP2D6 y también en los portadores de alelos de función reducida, los cuales no logran alcanzar el umbral terapéutico de endoxifeno (5.97 ng/mL) para la eficacia clínica<sup>88</sup>.

Para el caso de pacientes fumadoras, no influyeron sus fenotipos metabolizadores de CYP2D6 con su resultado clínico. En la bibliografía publicada, se ha visto que estas pacientes poseían una mayor probabilidad de reportar efectos secundarios relacionados al fármaco<sup>89</sup>. Sin embargo, en esta tesis no pudimos establecer tal asociación. En cuanto a las pacientes que usaron anticonceptivos orales, no se observó una influencia de los fenotipos metabolizadores de CYP2D6 con su resultado clínico, lo cual es consistente con la bibliografía que indica que no hay evidencia de asociación en el uso de los mismos con la respuesta al TMX<sup>90</sup>. En lo que respecta al estado menopáusico de las pacientes, en nuestra cohorte no se pudo asociar una diferencia en el resultado clínico con el fenotipo metabolizador en pacientes posmenopáusicas.

Una posible limitación del estudio podría estar en el tamaño de la muestra para el cálculo de las asociaciones estadísticas, ya que el grupo PM incluyó un pequeño número de pacientes. Esto genera una dificultad para realizar un análisis estadístico sólido al comparar las diferencias en el resultado del tratamiento con TMX entre los cuatro fenotipos metabolizadores CYP2D6 (UM, NM, IM y PM). En futuras investigaciones, creemos que es necesario realizar estudios con un esquema de tratamiento similar al aquí presentado, pero incorporando un número suficiente de pacientes con fenotipo PM para garantizar un poder estadístico adecuado.

## 7. CONCLUSIONES

- Esta tesis, es uno de los pocos trabajos realizados en Latinoamérica y en Uruguay que reporta el estado genético del gen CYP2D6.
- Establece los datos de las frecuencias alélicas, genotípicas y fenotípicas de CYP2D6 en nuestro país sobre una cohorte de 199 individuos contribuyendo con más información sobre las diferencias interétnicas a nivel mundial sobre polimorfismos genéticos de este gen.
- En este manuscrito se establecieron los datos genéticos específicos como antecedentes para CYP2D6 en la población uruguaya, pudiendo ayudar a realizar análisis farmacogenéticos y posteriores ensayos clínicos, sin la necesidad de extrapolar datos genéticos de otras poblaciones.
- El estudio del estado de metilación del gen CYP2D6 es un campo poco explorado y nuestro estudio del estado de metilación es una de las pocas aproximaciones que existen en este tema. En el grupo de muestras aquí estudiadas, se determinó un alto porcentaje de metilación en una CGI que abarca el exón 2 e intrón 2, lo que nos lleva a hipotetizar que CYP2D6 no se encuentra regulado por este mecanismo en la región estudiada.
- Nuestro trabajo informa sobre una falta de asociaciones entre el genotipo CYP2D6 y sus fenotipos metabolizadores inferidos, con los resultados clínicos en un grupo de pacientes tratados con TMX. Sin embargo, sería útil realizar más estudios que incluyan más pacientes y una evaluación del nivel de endoxifeno en plasma. De esta forma, se podrá comprender mejor la contribución de las variantes del gen CYP2D6 y resolver las controvertidas asociaciones entre el fenotipo CYP2D6 y los resultados clínicos en pacientes tratados con TMX.
- Los datos aquí proporcionados, pueden ser utilizados para ampliar el entendimiento de la farmacogenética asociada al gen CYP2D6 en una cohorte de pacientes con una ascendencia genética particular, determinando la importancia de sus variantes genéticas en la respuesta clínica y clarificando su impacto en el campo de la medicina de precisión.

## 8. PERSPECTIVAS

- Aumentar la muestra de pacientes con CM tratadas con Tamoxifeno para aumentar la robustez de las conclusiones y detectar asociaciones más sólidas entre los polimorfismos de CYP2D6 o los fenotipos metabolizadores y la respuesta al tratamiento.
- Explorar la asociación de la respuesta al tratamiento con TMX con otros genes que participan en su metabolismo.
- Ampliar la cobertura de alelos que puedan estar afectando la correcta metabolización de TMX y obtener una comprensión más completa de la variabilidad en la respuesta al tratamiento hormonal en las pacientes con CM.
- Investigar la metilación del ADN en el gen CYP2D6 en mayor cantidad de muestras y estudiar si el estado de metilación de las islas CpG en CYP2D6 que no fueron incluidas en esta tesis se asocian con el resultado clínico en las pacientes con CM tratadas con TMX.
- Estudiar otros mecanismos de regulación epigenética en CYP2D6, con el fin de corroborar su asociación con los resultados clínicos.

## 9. ANEXO

### 9.1 Estadios tumorales del cáncer de mama

Una vez diagnosticado el CM, se realizan pruebas para determinar la etapa de la enfermedad en la que se encuentra el paciente. La estadificación clínica del CM es compartida por todos los subtipos moleculares de CM y se compone de: Estadio 0, Estadio I, Estadio II, Estadio III y Estadio IV, los cuales presentan características diferentes (Tabla 2). La mayoría de los cánceres de mama surgen de los lóbulos o los conductos de la mama. En algunos casos, el tumor infiltra la piel o componentes de la pared torácica como los músculos pectorales. Las células tumorales también son capaces de modificar el microambiente tumoral promoviendo el crecimiento y la expansión tumoral<sup>17</sup>.

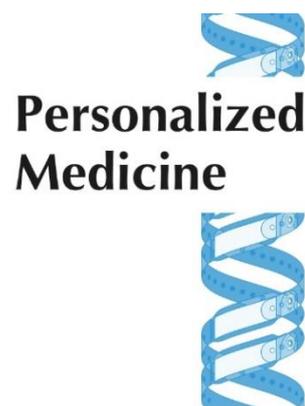
**Tabla Anexo 1.** Estadios y subestadios anatómicos del CM con sus características. Extraído de Feng et al<sup>21</sup>.

Estadio	Subestadio	Características
<b>Estadio 0</b>		Carcinoma ductal in situ (benigno)
<b>Estadio I</b>	IA	Tumor invasivo primario con un tamaño de $\leq 20$ mm, sin compromiso ganglionar.
	IB	Micrometástasis ganglionares ( $> 0,2$ mm, $< 2,0$ mm) con o sin tumor primario de $\leq 20$ mm.
<b>Estadio II</b>	IIA	Metástasis de ganglios linfáticos móviles ipsilaterales de nivel I, II con tumor primario de 20 mm; O tumor $> 20$ mm y $\leq 50$ mm sin afectación ganglionar.
	IIB	Metástasis de ganglios linfáticos móviles ipsilaterales de nivel I, II con tumor $> 20$ mm y $\leq 50$ mm; O tumor $> 50$ mm sin afectación ganglionar.
<b>Estadio III</b>	IIIA	Metástasis de ganglios linfáticos móviles ipsilaterales de nivel I, II con tumor $> 50$ mm; O tumor primario de cualquier tamaño con metástasis ipsilaterales fijas de nivel I, II o de ganglios linfáticos internos.
	IIIB	Tumor primario con invasión de pared torácica y/o piel.
	IIIC	Tumor primario de cualquier tamaño con metástasis en los ganglios linfáticos supraclaviculares o ipsilaterales de nivel III; O con metástasis ipsilaterales de nivel I, II y de ganglios linfáticos internos.
<b>Estadio IV</b>		Cualquier caso con metástasis a órganos distantes.

## 9.2 Artículo publicado

Short Communication

For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)



# CYP2D6 genotyping and the clinical impact on outcomes in breast cancer tamoxifen-treated patients

Gabriel Ramírez<sup>1</sup>, Marcelo Vital<sup>1</sup>, Carolina Vergara<sup>2</sup>, Florencia Carusso<sup>2</sup>, Florencia Neffa<sup>2</sup>, Adriana Della Valle<sup>2</sup> & Patricia Esperón<sup>\*1,2</sup> 

<sup>1</sup>Molecular Genetic Unit, School of Chemistry, Universidad de la República, Montevideo, 11800, Uruguay

<sup>2</sup>Grupo Colaborativo Uruguayo, Dirección Nacional de Sanidad de las Fuerzas Armadas, Montevideo, 11600, Uruguay

\*Author for correspondence: Tel.: +598 2924 2426; [pesperon@fq.edu.uy](mailto:pesperon@fq.edu.uy)

**Aims:** To report the distribution of allele frequencies of *CYP2D6* gene and to evaluate their influence on the clinical outcomes of a group of breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen treatment from Uruguay. **Patients & methods:** 199 samples were genotyped through real-time polymerase chain reaction assays. Metabolization profiles were inferred from the genotypes. Correlations were evaluated using Pearson's  $\chi^2$  test. **Results:** Phenotype frequencies were 0.65 normal (NM), 0.30 intermediate (IM) and 0.05 poor metabolizers (PM). Similar clinical outcomes between NM and (PM + IM) patient groups (odds ratio = 1.011, 95% CI = 0.2703–3.7826;  $p = 0.987$ ) were found. **Conclusion:** *CYP2D6* allele frequencies were analyzed for the first time in a cohort from Uruguay. Results did not support any impact of *CYP2D6* gene polymorphisms on clinical outcomes.

First draft submitted: 31 May 2023; Accepted for publication: 10 October 2023; Published online: 10 November 2023

**Keywords:** breast cancer • *CYP2D6* • tamoxifen

Breast cancer (BC) is a growing public health concern. In 2020, it was the malignant neoplasm with the highest incidence worldwide, with 2.26 million cases, causing the death of approximately 685,000 people [1]. BC is the most frequent cancer in Uruguayan women and the one with the highest mortality [2]. Tamoxifen (TMX) is a selective estrogen receptor modulator widely used as adjuvant therapy for estrogen receptor positive (ER+) BC [3]. Despite its efficacy, near 40% of early BC patients who undergo treatment relapse or progress and eventually die of the disease [4]. Through the action of the *CYP2D6* enzyme, TMX is converted into endoxifen, its most active metabolite [5]. The interindividual response to TMX is highly variable, partly due to genetic factors, mainly variations in the *CYP2D6* gene [6]. At least one functional *CYP2D6* allele is required to ensure the presence of optimal plasma levels of endoxifen [7]. In addition, TMX biotransformation is also mediated by other enzymes such as *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* and *CYP2C19*. Dietary factors, adherence or compliance to treatment, BMI, age, hormonal status and concomitant medication should also be considered [8].

The *CYP2D6* gene is highly polymorphic, and 171 variants have been described to date [9]. *CYP2D6* alleles are grouped according to their functionality and are classified as follows: normal function (e.g., \*1, \*2, \*35), null-function (e.g., \*3, \*4, \*5, \*6, \*40), reduced-function (e.g., \*9, \*10, \*17, \*29, \*41) or increased-function alleles (e.g., \*1xN, \*2xN) [10]. On the basis of the *CYP2D6* enzyme activity, four distinctive metabolizer phenotypes could be defined: ultra-rapid metabolizers (UM), normal metabolizers (NM), intermediate metabolizers (IM) and poor metabolizers (PM) according to international guidelines. The new standardized activity score (AS) definition and the metabolization profiles inferred from genotypes, were applied following the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and the Dutch Pharmacogenetics Working Group Guidelines. Samples were classified as PM (AS = 0), IM (AS = 0.5 to 1.25), NM (AS = 1.5 to 2.25) or UM (AS >2.25). PM carriers often have inactivating mutations or complete deletion in both alleles of the *CYP2D6* gene and consequently have a defective ability to metabolize substrates such as TMX [11,12] [13]. TMX-treated patients (TTP) with PM and IM phenotype have a worse prognosis (death, contralateral breast cancer, local recurrence, distant metastasis etc.) after receiving a

Future  
Medicine 

standard dose of TMX. On the other hand, TTP UM phenotype carriers present the greatest adverse drug reactions and reduced risk of contralateral BC [14–16].

This study aimed to report the distribution of allele and genotype frequencies of *CYP2D6* gene. In addition, the influence of the genetic variability in this gene on the clinical outcomes of a group of TMX-treated patients from Uruguay was also evaluated.

## Materials & methods

### Patients

199 individuals were analyzed: 41 TMX-treated women and 158 controls. Samples and clinical data were gathered between 2016 and 2020. The institutional bioethics committees of the participating centers approved the study, and it was in accordance with the current version of the Declaration of Helsinki. A signed informed consent was obtained from all individual participants.

### Methods

DNA was isolated using the High Pure PCR Template Preparation Kit<sup>®</sup> (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). DNA concentration was quantified in a NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

*CYP2D6* gene polymorphisms were selected according to the ancestry of our population. *CYP2D6* \*3, \*4, \*6, \*9, \*17 and \*41 polymorphisms were analyzed using TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assays (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) in a Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Qiagen, MD, USA) using the allelic discrimination interface. *CYP2D6* *wt* (wild-type) was assigned when no other allele analyzed was detected.

*CYP2D6* copy number variation (CNV) was analyzed using two TaqMan<sup>®</sup> copy number assays (Hs00010001\_cn [Exon 9] and Hs04083572\_cn [Intron 2]; Life Technologies Corporation, CA, USA) with VIC<sup>®</sup> Dye-labeled TaqMan<sup>®</sup> Copy Number (Rnase P) Reference Assay as reference. Polymerase chain reaction (PCR) reactions were performed on the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems<sup>™</sup>, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Relative quantification was performed following the comparative  $\Delta\Delta$ CT method in CopyCaller<sup>®</sup> Software (Life Technologies Corporation).

Patients who discontinued TMX treatment due to adverse effects or to progression or recurrence of breast cancer and those who died from the disease were classified as having a poor outcome. A good outcome indicated patients had completed a 5-year follow-up or achieved a complete clinical remission at the end of the study period (2020), whichever came first. Complete remission was determined by paraclinical tests, physical examinations, and scans and no evidence of the disease was found.

Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) was analyzed for each allelic variant using a chi-square ( $\chi^2$ ) test in a contingency table, considering HWE when  $\chi^2$  was less than 3.84 ( $p > 0.05$ ). The associations between metabolizer phenotypes and clinical outcomes were assessed using a logistic regression method to ascertain the odds ratio (OR) and 95% CI and the chi-square goodness-of-fit test, considering one degree of freedom and  $p < 0.05$ . PM and IM phenotypes were grouped and analyzed as PM + IM. For statistical analyses, we used the GraphPad Prism software, version 8.0.1 (CA, USA).

## Results

In this single-center retrospective study, a cohort of 41 patients was recruited. The control group (mean age  $55 \pm 13$  years) consisted of healthy women without breast cancer who were not taking TMX. Baseline characteristics of all TMX-treated patients are shown in Table 1. The mean age of the patients was  $57 \pm 14$  years.

Complete treatment information was obtained from medical records. In all cases, the prescribed dose of TMX was 20 mg/day. The mean follow-up time was 54 months.

The allelic frequencies of *CYP2D6* gene polymorphisms are shown in Table 2. Among null-function alleles, the *CYP2D6*\*4 variant had the highest frequency, whereas the *CYP2D6*\*3 variant was absent. The genotypic frequencies are shown in Table 3. The \*4/\*4 was the only genotype associated with the PM phenotype that was found in this study.

195 samples showed normal gene copy number, two samples had duplicated alleles (three copies) and two samples had a single copy (deleted allele).

*CYP2D6* genotype was translated into four distinctive phenotypes based on *CYP2D6* alleles combination according to international guidelines. Within the analyzed population (N = 199), 65% (129/199) presented a NM

**Table 1. Characteristics of the 41 tamoxifen-treated patients.**

Characteristic	n (%)
<b>Age</b>	
≥50	23 (56.0)
<50	18 (44.0)
<b>Age at diagnosis</b>	
≥50	17 (41.5)
<50	24 (58.5)
<b>Menopausal status</b>	
Premenopausal	13 (31.7)
Postmenopausal	28 (68.3)
<b>Cancer stage</b>	
I	21 (51.2)
II	14 (34.1)
III	4 (9.7)
IV	2 (5.0)
<b>Family history of breast cancer</b>	
No	34 (82.9)
Yes	6 (14.6)
Unknown	1 (2.5)
<b>BMI, kg/m<sup>2</sup></b>	
<25	22 (53.7)
25–29	14 (34.1)
≥30	4 (9.7)
Unknown	1 (2.5)
<b>Cigarette smoking</b>	
Yes	22 (53.7)
No	19 (46.3)
<b>Parity</b>	
0	7 (17.0)
1–2	26 (63.5)
≥3	10 (25.0)
Unknown	1 (2.5)
<b>Adjuvant therapy (chemotherapy)</b>	
No	33 (80.5)
Yes	7 (17.0)
Unknown	1 (2.5)
<b>Oral contraceptive use</b>	
Yes	11 (26.8)
No	30 (73.2)

**Table 2. Distribution of CYP2D6 allelic variants analysed.**

SNP	rsID	HGVS cDNA nomenclature	Frequency	HWE (p-value)
CYP2D6*3	rs35742686	c.775del	0.000 (0/398)	Not calculated
CYP2D6*4	rs3892097	c.506-1G>A	0.178 (71/398)	2.45 (0.12)
CYP2D6*5	N/A	N/A	0.005 (2/398)	0.01 (0.97)
CYP2D6*6	rs5030655	c.454del	0.005 (2/398)	0.01 (0.97)
CYP2D6*9	rs5030656	c.841.843del	0.018 (7/398)	0.06 (0.80)
CYP2D6*17	rs28371706	c.320C>T	0.010 (4/398)	0.02 (0.89)
CYP2D6*41	rs28371725	c.985 + 39G>A	0.107 (43/398)	1.19 (0.27)

HGVS: Human Genome Variation Society; HWE (p-value): p-values for Hardy–Weinberg equilibrium; N/A: Not applicable; rsID: SNP identifier.

Table 3. Distribution of genotypes and phenotypes of the <i>CYP2D6</i> gene that were analyzed.				
Genotypes	No. of carriers/genotype (P)	Frequency (P/N)	Metabolizer phenotype (MP)	% MP
Cohort size N:199				
wt/wt	90	0.452		
wt/*9	4	0.020	NM	65
wt/*17	2	0.010		
wt/*41	33	0.166		
wt/*4	44	0.221		
wt/*5	2	0.010	IM	30
wt/*6	2	0.005		
*4/*9	1	0.005		
*4/*17	2	0.010		
*4/*41	6	0.030		
*41/*41	1	0.005		
*41/*9	2	0.010		
*41/*6	1	0.005		
*4/*4	10	0.050	PM	5

IM: Intermediate metabolizer; MP: Metabolizer phenotype; NM: Normal metabolizer; PM: Poor metabolizer; P: No. of carriers/genotype; P/N: No. of carriers-genotype/cohort size; wt: Wild-type.

Table 4. Type of events and metabolizer phenotypes of the 41 tamoxifen-treated patients.			
Type of events	Phenotype		Total
	NM	PM or IM	
Clinical remission	15	7	22
Discontinuation of treatment <sup>†</sup>	4	3	7
Disease progression	3	2	5
Death <sup>‡</sup>	6	1	7
			41

<sup>†</sup>Related to side effects.  
<sup>‡</sup>All patients included in this category died of breast cancer.  
IM: Intermediate metabolizer; NM: Normal metabolizer; PM: Poor metabolizer.

phenotype, and 30%, (60/199) and 5% (10/199) were IM and PM, respectively. UM phenotype could not be determined. Frequency values of the *CYP2D6* genotypes are shown in Table 3.

The stratification of patients according to the type of events and their metabolizer phenotypes are shown in Table 4. No significant association between phenotypes and clinical outcomes was found (OR = 1.011, 95% CI = 0.2703–3.7826; p = 0.987).

### Discussion

In this study, we successfully characterized most relevant allelic variants and the CNV of the *CYP2D6* gene in a cohort from Uruguay. Our population presents a peculiar ancestry with a trihybrid genetic composition: Europeans (92%), Africans (7%) and Amerindians (1%), which gives it a unique genetic identity [17].

Regarding the *CYP2D6* distribution of different variants, we found that the frequencies of the alleles *CYP2D6*\*4 (17.8%), *CYP2D6*\*9 (1.8%) and *CYP2D6*\*41 (10.7%) were similar to those reported in Europeans. However, the frequencies of *CYP2D6*\*3 (0%) and *CYP2D6*\*6 (0.5%) were similar to those reported in Africans and admixed Americans. Finally, the frequency of *CYP2D6*\*17 (1%) was more similar to that found in admixed American populations [18].

Regarding the CNV, the frequency observed (1%) was lower than those reported in any other populations, which values ranged from 3.5 to 16.3% [19–21]. The prevalence of the NM (65%), IM (30%) and PM (5%) phenotypes showed similar values to those described in European [22]. Finally, the phenotype status of two samples carrying *CYP2D6* gene duplications (three copies) and heterozygous with a null or decreased-function allele (wt/\*4 or wt/\*9, respectively), could not be determined.

The association between *CYP2D6* genotype and clinical outcome is still been discussed, and conflicting data have been published [23–25]. In our cohort of 41 TTP, the results did not support any incidence of *CYP2D6* gene polymorphisms on clinical outcomes.

One of the limitations of this study was the lack of determination of TMX and endoxifen levels and CYP2D6 phenotypes were predicted based only on the combination of individual's *CYP2D6* alleles. A second limitation could be the sample size, particularly in the number of TMX-treated patients. However, considering that Uruguay has a population of 3.5 million inhabitants and an incidence of ~1600 ER+ tumors per year, the number of patients recruited could be considered a representative sample.

### Conclusion

This work, one of the few carried out in Latin America and the first performed in Uruguay, reports the distribution of allelic variants of *CYP2D6* gene in our country. These data provide more information on worldwide differences in allelic frequencies of this gene, seeking to contribute to the development of pharmacogenomic guidelines. Furthermore, it reports a lack of associations between *CYP2D6* genotype and clinical outcomes in a group of TMX-treated patients. However, further studies are needed to better understand the contribution of the *CYP2D6* gene variants and to solve the controversial results about the influence of the genetic variability in CYP2D6 on clinical outcomes of breast cancer patients with TMX treatment.

### Summary points

- Tamoxifen (TMX) is widely used as adjuvant therapy for estrogen receptor positive breast cancer in premenopausal and postmenopausal women.
- The interindividual response to TMX is highly variable, partly due to genetic factors, mainly to variations in the CYP2D6 gene.
- Poor metabolizer carriers often have inactivating mutations or complete deletion in both alleles of the CYP2D6 gene and consequently have a defective ability to metabolize substrates such as TMX.
- Frequencies of the alleles CYP2D6\*4, CYP2D6\*9 and CYP2D6\*41 were similar to those reported in Europeans.
- Frequencies of the alleles CYP2D6\*3 and CYP2D6\*6 were similar to those reported in Africans, and admixed Amerindian.
- Frequency of the allele CYP2D6\*17 was rather similar to that found in admixed American populations.
- The prevalence of the normal, intermediate and poor metabolizers phenotypes showed similar values than those described in European.
- Our results did not support any impact of CYP2D6 gene polym.

### Author contributions

G Ramírez: methodology and data analysis, writing – original draft. M Vital: writing – review and editing. F Carusso, F Neffa and C Valle: sample preparation, data collection. A Della Valle and P Esperón: conception and design. PE: writing – review and editing; supervision. All authors reviewed the manuscript.

### Financial disclosure

The authors have no financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending or royalties.

### Competing interests disclosure

The authors have no competing interests or relevant affiliations with any organization or entity with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending or royalties.

### Writing disclosure

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

### Ethical conduct of research

The Bioethical Boards of the School of Chemistry and the Armed Forces Hospital approved the study, and it was in accordance with the current version of the Helsinki Declaration. A signed informed consent was obtained from all individual participants.

## References

Papers of special note have been highlighted as: ● of interest; ●● of considerable interest

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 71(3), 209–249 (2021).
- Comisión honoraria de lucha contra el Cáncer. Registro Nacional de Cáncer. Situación Epidemiológica Del Uruguay En Relación al Cáncer (2022). [www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/Situacion-Epidemiologica-del-Uruguay-en-relacion-al-Cancer-Mayo-2022-uc108](http://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/Situacion-Epidemiologica-del-Uruguay-en-relacion-al-Cancer-Mayo-2022-uc108)
- **Reports the epidemiological trends of different kind of cancers in Uruguay.**
- Jordan V. Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. *Cancer Cell.* 5(3), 207–213 (2004). doi:10.1016/s1535-6108(04)00059-5
- Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr. Relat. Cancer.* 11, 643–658 (2004). doi:10.1677/erc.1.00776
- Wu X, Hawse JR, Subramaniam M *et al.* The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor  $\alpha$  for degradation in breast cancer cells. *Cancer Res.* 69(5), 1722–1727 (2009). doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3933
- Coller JK, Krebsfaenger N, Klein K *et al.* The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the potent antiestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 54, 157–167 (2002).
- Schroth W, Winter S, Mürdter T *et al.* Improved prediction of endoxifen metabolism by CYP2D6 genotype in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Front. Pharmacol.* 24(8), 582 (2017). doi: 10.3389/fphar.2017.00582
- Binkhorst L, Mathijssen RHJ, Jager A, van Gelder T. Individualization of tamoxifen therapy: much more than just CYP2D6 genotyping. *Cancer Treat. Rev.* 41(3), 289–299 (2015). doi:10.1016/j.ctrv.2015.01.002
- Gaedigk A, Casey ST, Whirl-Carrillo M, Miller NA, Klein TE. Pharmacogene Variation Consortium: A Global Resource and Repository for Pharmacogene Variation. *Clin Pharmacol Ther.* 110(3), 542–545 (2021).
- PharmGKB. Gene-specific information tables for CYP2D6. 3. [www.pharmgkb.org/page/cyp2d6RefMaterials](http://www.pharmgkb.org/page/cyp2d6RefMaterials)
- **Provides a centralized resource for key information concerning allele function, phenotype prediction etc. about CYP2D6 gene.**
- Caudle KE, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M *et al.* Standardizing CYP2D6 genotype to phenotype translation: consensus recommendations from the clinical pharmacogenetics implementation consortium and dutch pharmacogenetics working group. *Clin. Transl. Sci.* 13(1), 116–124 (2020). doi:10.1111/cts.12692
- Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. Final consensus CYP2D6 genotype to phenotype table – March (2019). [https://cpicpgx.org/wp-content/uploads/2019/03/Final-Consensus-CYP2D6-genotype-to-phenotype-table.-final\\_Mar2019.pdf](https://cpicpgx.org/wp-content/uploads/2019/03/Final-Consensus-CYP2D6-genotype-to-phenotype-table.-final_Mar2019.pdf)
- Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE *et al.* The CYP2D6 Activity Score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83(2), 234–242 (2008). doi:10.1038/sj.clp
- He W, Grassmann F, Eriksson M *et al.* CYP2D6 genotype predicts tamoxifen discontinuation and prognosis in patients with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 38, 548–557 (2019). doi:10.1200/JCO.19
- Brooks JD, Comen EA, Reiner AS *et al.* CYP2D6 phenotype, tamoxifen, and risk of contralateral breast cancer in the WECARE Study. *Breast Cancer Res.* 20(1), 149 (2018). doi:10.1186/s13058-018-1083-y
- Rolla R, Vidali M, Meola S *et al.* Side effects associated with ultrarapid cytochrome P450 2D6 genotype among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *Clin Lab.* 58(11–12), 1211–1218 (2012). doi:10.7754/Clin.Lab.2012.120114
- Sans M, Salzano FM, Chakraborty R. Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. 69, 161–170 (1997).
- **Reports the relative contribution of Europeans, Africans and Amerindians to the gene pool of Uruguayan population.**
- The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 526, 68–74 (2015). doi:10.1038/nature15393
- Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Worldwide distribution of cytochrome P450 alleles: a meta-analysis of population-scale sequencing projects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 102(4), 688–700 (2017). doi:10.1002/cpt.690
- Ramírez B, Niño-Orrero MJ, Cárdenas D *et al.* Copy number variation profiling in pharmacogenetics CYP-450 and GST genes in Colombian population. *BMC Med. Genomics.* 12, 110 (2019). doi:10.1186/s12920-019-0556-x
- Friedrich DC, Genro JP, Sortica VA *et al.* Distribution of CYP2D6 alleles and phenotypes in the Brazilian population. *PLOS ONE.* 9(10), e110691 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0110691
- Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M *et al.* Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet. Med.* 19(1), 69–76 (2017). doi:10.1038/gim.2016.80
- **Summarizes CYP2D6 allele frequencies and predicted phenotype in different populations.**
- Mulder TAM, de With M, Del Re M *et al.* Clinical CYP2D6 genotyping to personalize adjuvant tamoxifen treatment in *er*-positive breast cancer patients: current status of a controversy. *Cancers.* 13(4), 1–15 (2021). doi:10.3390/cancers13040771
- He W, Grassmann F, Eriksson M *et al.* CYP2D6 genotype predicts tamoxifen discontinuation and prognosis in patients with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 38, 548–557 (2020).

- **Reports a worse prognosis for breast cancer of poor and ultrarapid CYP2D6 metabolizers treated with tamoxifen.**
- 25. Rangel-Méndez JA, Rubi-Castellanos R, Ascencio-Montiel IJ, Moo-Puc RE. CYP2D6 does not impact on breast cancer-free survival in southeast Mexican patients under tamoxifen treatment. *Pers. Med.* 17, 261–270 (2020).
- **Reports a lack of association between CYP2D6 phenotypes and breast cancer-free survival in Mexican patients.**

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> Ministerio de Salud Pública (MSP). División Estadística. Estadísticas de Mortalidad. [Internet]. [citado 10 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/>
- <sup>2</sup> Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* mayo de 2021;71(3):209-49.
- <sup>3</sup> Organización Mundial de la Salud (OMS). GLOBOCAN. CANCER TOMORROW [Internet]. [citado 10 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>
- <sup>4</sup> Lafon L, Ronco Á. Análisis de la distribución geográfica del cáncer en Montevideo. *Rev. Méd. Urug.* 2002;18(1): 36-47.
- <sup>5</sup> Comisión honoraria de lucha contra el Cáncer. Registro Nacional de Cáncer. Situación Epidemiológica del Uruguay en relación al Cáncer [Internet]. 2022 may [citado 29 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/Situacion-Epidemiologica-del-Uruguay-en-relacion-al-Cancer--Mayo-2021-uc108>
- <sup>6</sup> Barrios E, Garau Mariela. Cáncer: magnitud del problema en el mundo y en Uruguay, aspectos epidemiológicos. *Epidemiol Cáncer En Urug El Mundo Fac Med Univ Repúb Urug.* 2017;4(1):9-46.
- <sup>7</sup> Fakhri N, Chad MA, Lahkim M, Houari A, Dehbi H, Belmouden A, et al. Risk factors for breast cancer in women: an update review. *Med Oncol.* 2022;39(12):197.
- <sup>8</sup> Lundqvist A, Andersson E, Ahlberg I, Nilbert M, Gerdtham U. Socioeconomic inequalities in breast cancer incidence and mortality in Europe - A systematic review and meta-analysis. *Eur J Public Health.* 1 de octubre de 2016;26(5):804-13.
- <sup>9</sup> Orsini M, Tretarre B, Daurès JP, Bessaoud F. Individual socioeconomic status and breast cancer diagnostic stages: A French case-control study. *Eur J Public Health.* 27 de junio de 2016;26(3):445-50.
- <sup>10</sup> Benabu JC, Stoll F, Gonzalez M, Mathelin C. Night work, shift work: Breast cancer risk factor? *Gynecol Obstet Fertil.* 2015;43(12):791-9.

---

<sup>11</sup> Aguilar Cordero MJ, Neri Sánchez M, Padilla López CA, Pimentel Ramírez ML, García Rillo A, Sánchez López AM. Factores de riesgo como pronóstico de padecer cáncer de mama en un estado de México. *Nutr Hosp.* 2012;27(5):1631-6.

<sup>12</sup> American Cancer Society. Riesgo y prevención del cáncer de seno [Internet]. 2019 [citado 31 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.org/content/cancer/es/cancer/cancer-de-seno/riesgos-y-prevencion/puedo-reducir-el-riesgo-de-cancer-de-seno.html>

<sup>13</sup> EMA: European Medicines Agency. International Conference on harmonisation (ICH). Topic E15. Definitions for genomic biomarkers, pharmacogenomics, pharmacogenetics, genomic data and sample coding categories. [Internet]. 2007. Disponible en: <http://www.ema.europa.eu>

<sup>14</sup> U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics and Research (CBER). Guidance for Industry. E15 Definitions for Genomic Biomarkers, Pharmacogenomics, Pharmacogenetics, Genomic Data and Sample Coding Categories. [Internet]. 2008 p. 20852-1448. Disponible en: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm><http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.

<sup>15</sup> Patrinos GP, Andritsou A, Chalikiopoulou K, Mendrinou E, Tsermpini EE. Pharmacogenomics in clinical care: Implications for public health. En: *Applied Genomics and Public Health*. Elsevier; 2019. p. 111-30.

<sup>16</sup> Martín-Lunas E, Director A, Moya FB. Informe farmacogenético en el tratamiento de cáncer de mama con tamoxifeno. Aspectos médico-legales. 2019.

<sup>17</sup> Flórez J. *Farmacología Humana*. Vol. 6. España: Elsevier Masson: Barcelona; 2014.

<sup>18</sup> Bakhouche H, Slanař O. Pharmacogenetics in Clinical Practice. *Prague Med Rep.* 2012;113(4):251-61.

<sup>19</sup> Renoir JM, Marsaud V, Lazennec G. Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. *Biochem Pharmacol.* 15 de febrero de 2013;85(4):449-65.

<sup>20</sup> Chen P, Li B, Ou-Yang L. Role of estrogen receptors in health and disease. *Front Endocrinol.* 18 de agosto de 2022;13.

---

<sup>21</sup> Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis.* 1 de junio de 2018;5(2):77-106.

<sup>22</sup> American Cancer Society. Tratamiento del cáncer de seno [Internet]. 2019 [citado 18 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/9021.00.pdf>

<sup>23</sup> Drăgănescu M, Carmocan C. Hormone therapy in breast cancer. *Chir Rom.* 1 de julio de 2017;112(4):413-7.

<sup>24</sup> Visvanathan K, Fabian CJ, Bantug E, Brewster AM, Davidson NE, Decensi A, et al. Use of Endocrine Therapy for Breast Cancer Risk Reduction: ASCO Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2019; 37:3152-65.

<sup>25</sup> Klopp-Schulze L, Joerger M, Wicha SG, ter Heine R, Csajka C, Parra-Guillen ZP, et al. Exploiting Pharmacokinetic Models of Tamoxifen and Endoxifen to Identify Factors Causing Subtherapeutic Concentrations in Breast Cancer Patients. *Clin Pharmacokinet.* 1 de febrero de 2018;57(2):229-42.

<sup>26</sup> Li W, Shi X, Xu Y, Wan J, Wei S, Zhu R. Tamoxifen promotes apoptosis and inhibits invasion in estrogen-positive breast cancer MCF-7 cells. *Mol Med Rep.* 1 de julio de 2017;16(1):478-84.

<sup>27</sup> Yang G, Nowsheen S, Aziz K, Georgakilas AG. Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. *Pharmacol Ther.* septiembre de 2013;139(3):392-404.

<sup>28</sup> Mulder TAM, de With M, Del Re M, Danesi R, Mathijssen RHJ, van Schaik RHN. Clinical CYP2D6 genotyping to personalize adjuvant tamoxifen treatment in er-positive breast cancer patients: Current status of a controversy. *Cancers.* 1 de febrero de 2021;13(4):1-15.

<sup>29</sup> Zhao M, Ma J, Li M, Zhang Y, Jiang B, Zhao X, et al. Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23).

<sup>30</sup> Cronin-Fenton DP, Damkier P. Tamoxifen and CYP2D6: A Controversy in Pharmacogenetics. En: *Advances in Pharmacology.* Academic Press Inc.; 2018. p. 65-91.

<sup>31</sup> Ariza Márquez YV, Briceño Balcázar I, Ancízar Aristizábal F. Tratamiento de cáncer de seno y farmacogenética. *Rev Colomb Biotecnol.* 1 de mayo de 2016;18(1).

- 
- <sup>32</sup> Madlensky L, Natarajan L, Tchu S, Pu M, Mortimer J, Flatt SW, et al. Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clin Pharmacol Ther.* mayo de 2011;89(5):718-25.
- <sup>33</sup> Braal CL, Jager A, Hoop EO de, Westenberg JD, Lommen KMWT, de Bruijn P, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Endoxifen for Tamoxifen Precision Dosing: Feasible in Patients with Hormone-Sensitive Breast Cancer. *Clin Pharmacokinet.* 1 de abril de 2022;61(4):527-37.
- <sup>34</sup> Taylor C, Crosby I, Yip V, Maguire P, Pirmohamed M, Turner RM. A review of the important role of cyp2d6 in pharmacogenomics. *Genes.* 1 de noviembre de 2020;11(11):1-23.
- <sup>35</sup> PHARMGKB. CYP2D6: clinical and drug label annotation. [Internet]. [citado 13 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.pharmgkb.org/gene/PA128>
- <sup>36</sup> Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): Clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.* 2005;5(1):6-13.
- <sup>37</sup> Hiroi T, Imaoka S, Funae Y. Dopamine Formation from Tyramine by CYP2D6. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 249:838-43.
- <sup>38</sup> Zhou SF. Polymorphism of Human Cytochrome P450 2D6 and Its Clinical Significance Part I. *Clin Pharmacokinet.* 2009;48(11):689-723.
- <sup>39</sup> Yang Y, Botton MR, Scott ER, Scott SA. Sequencing the CYP2D6 gene: From variant allele discovery to clinical pharmacogenetic testing. *Pharmacogenomics.* 1 de mayo de 2017;18(7):673-85.
- <sup>40</sup> Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein T, Steven Leeder J. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet Med.* 1 de enero de 2017;19(1):69-76.
- <sup>41</sup> Ivanov M, Kacevska M, Ingelman-Sundberg M. Epigenomics and interindividual differences in drug response. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(6):727-736.
- <sup>42</sup> Itai Y, Rappoport N, Shamir R. Integration of gene expression and DNA methylation data across different experiments. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(15):7762-7776.

- 
- <sup>43</sup> Illingworth R, Kerr A, Desousa D, et al. A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol.* 2008;6(1):e22.
- <sup>44</sup> Pachano T, Sánchez-Gaya V, Ealo T, Mariner-Faulí M, Bleckwehl T, Asenjo HG, Respuela P, Cruz-Molina S, Muñoz-San Martín M, Haro E, van IJcken, WFJ, Landeira D, Rada-Iglesias A. Orphan CpG islands amplify poised enhancer regulatory activity and determine target gene responsiveness. *Nature genetics.* 2021; 53(7), 1036–1049.
- <sup>45</sup> Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther.* diciembre de 2007;116(3):496-526.
- <sup>46</sup> Goetz MP, Sangkuhl K, Guchelaar HJ, Schwab M, Province M, Whirl-Carrillo M, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy. *Clin Pharmacol Ther.* 1 de mayo de 2018;103(5):770-7.
- <sup>47</sup> Jukić MM, Smith RL, Molden E, Ingelman-Sundberg M. Evaluation of the CYP2D6 Haplotype Activity Scores Based on Metabolic Ratios of 4,700 Patients Treated With Three Different CYP2D6 Substrates. *Clin Pharmacol Ther.* 2021;110(3):750-758.
- <sup>48</sup> Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versión 3.01. [www.OpenEpi.com](http://www.OpenEpi.com), actualizado 2013/04/06, accedido 2023/08/29.
- <sup>49</sup> Hall T. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999; 41:95-8.
- <sup>50</sup> Dorado P, Cáceres MC, Pozo-Guisado E, Wong ML, Licinio J, Llerena A. Development of a PCR-based strategy for CYP2D6 genotyping including gene multiplication of worldwide potential use. *BioTechniques.* octubre de 2005;39(4S): S571-4.
- <sup>51</sup> Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ, Leeder JS. The CYP2D6 Activity Score: Translating Genotype Information into a Qualitative Measure of Phenotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83(2):234-42.
- <sup>52</sup> Caudle KE, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Swen JJ, Haidar CE, Klein TE, et al. Standardizing CYP2D6 Genotype to Phenotype Translation: Consensus Recommendations from the Clinical

---

Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. *Clin Transl Sci.* 1 de enero de 2020;13(1):116-24.

<sup>53</sup> PharmGKB. Gene-specific Information Tables for CYP2D6 [Internet]. [citado 2 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.pharmgkb.org/page/cyp2d6RefMaterials>

<sup>54</sup> Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* 1 de noviembre de 2002;18(11):1427-31.

<sup>55</sup> Iniesta R, Guinó E, & Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria,* 2005;19(4), 333-341.

<sup>56</sup> Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *marzo de 1966;*50(3):163-70.

<sup>57</sup> 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526(7571):68-74.

<sup>58</sup> Ramírez G, Vital M, Vergara C, et al. CYP2D6 genotyping and the clinical impact on outcomes in breast cancer tamoxifen-treated patients. *Per Med.* 2023;10.2217/pme-2023-0063.

<sup>59</sup> Moya G, Dorado P, Ferreiro V, Naranjo MEG, Peñas-Lledó EM, Llerena A. High frequency of CYP2D6 ultrarapid metabolizer genotypes in an Ashkenazi Jewish population from Argentina. *Pharmacogenomics J.* 2017;17(4):378-381.

<sup>60</sup> Friedrich DC, Genro JP, Sortica VA, Suarez-Kurtz G, de Moraes ME, Pena SDJ, et al. Distribution of CYP2D6 Alleles and Phenotypes in the Brazilian Population. *Carvalho LH, editor. PLoS ONE.* 20 de octubre de 2014;9(10): e110691.

<sup>61</sup> Varela N, Quiñones LA, Stojanova J, Garay J, Cáceres D, Cespedes S, Sasso J, Miranda C. Characterization of the CYP2D6 drug metabolizing phenotypes of the Chilean mestizo population through polymorphism analyses. *Pharmacol Res.* 2015; 101:124-129.

<sup>62</sup> Grimán P, Moran Y, Valero G, Loreto M, Borjas L, Chiurillo MA. CYP2D6 gene variants in urban/admixed and Amerindian populations of Venezuela: pharmacogenetics and anthropological implications. *Ann Hum Biol.* 2012;39(2):137-142.

---

<sup>63</sup> Flores-Angulo C, Villegas C, Mora Y, Martínez JA, Oropeza T, Moreno N. Variantes alélicas de CYP2D6: \*4, \*6 y \*10 en una muestra de residentes del estado Aragua, Venezuela. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2015;32(4):746.

<sup>64</sup> P Sarmiento A, Dorado P, Borbón A, de Andrés F, Llerena A; CEIBA Consortium of the Ibero-American Network of Pharmacogenetics and Pharmacogenomics RIBEF. High prevalence of CYP2D6 ultrarapid metabolizers in a mestizo Colombian population in relation to Hispanic mestizo populations. *Pharmacogenomics*. 2020;21(17):1227-1236.

<sup>65</sup> Alvarado AT, Ybañez-Julca R, Muñoz AM, Muñoz AM, Tejada-Bechi C, Cerro R, Quiñones LA, Varela N, Alvarado CA, Alvarado E, Bendezú MR, García JA. Frequency of CYP2D6\*3 and \*4 and metabolizer phenotypes in three mestizo Peruvian populations. *Pharmacia*. 2021;68(4):891-898.

<sup>66</sup> Dorado P, Heras N, Machín E, Hernández F, Teran E, Llerena A. CYP2D6 genotype and dextromethorphan hydroxylation phenotype in an Ecuadorian population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2012;68(5):637-644.

<sup>67</sup> Llerena A, Dorado P, Ramírez R, González I, Alvarez M, Peñas-Lledó EM, Pérez B, Calzadilla LR. CYP2D6 genotype and debrisoquine hydroxylation phenotype in Cubans and Nicaraguans. *Pharmacogenomics J*. 2012;12(2):176-183.

<sup>68</sup> López-López M, Peñas-Lledó E, Dorado P, Ortega A, Corona T, Ochoa A, Yescas P, Alonso E, Llerena A. CYP2D6 genetic polymorphisms in Southern Mexican Mayan Lacandones and Mestizos from Chiapas. *Pharmacogenomics*. 2014;15(15):1859-1865.

<sup>69</sup> Contreras AV, Monge-Cazares T, Alfaro-Ruiz L, Hernandez-Morales S, Miranda-Ortiz H, Carrillo-Sanchez K, Jimenez-Sanchez G, Silva-Zolezzi I. Resequencing, haplotype construction and identification of novel variants of CYP2D6 in Mexican Mestizos. *Pharmacogenomics*. 2011;12(5):745-756.

<sup>70</sup> Sans M, Salzano FM, Chakraborty R. Historical Genetics in Uruguay: Estimates of Biological Origins and Their Problems. Vol. 69, *Human Biology*. 1997 p. 161-70.

<sup>71</sup> Bonilla C, Bertoni B, Hidalgo PC, et al. Breast cancer risk and genetic ancestry: a case-control study in Uruguay. *BMC Womens Health*. 2015;15:11.

---

<sup>72</sup> Burgueño-Rodríguez G, Méndez Y, Olano N, et al. Ancestry and TPMT-VNTR Polymorphism: Relationship with Hematological Toxicity in Uruguayan Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Pharmacol.* 2020;11:594262.

<sup>73</sup> Kane M. CYP2D6 Overview: Allele and Phenotype Frequencies. 2021 Oct 15. In: Pratt VM, Scott SA, Pirmohamed M, et al., editors. *Medical Genetics Summaries* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). [citado 30 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574601/>

<sup>74</sup> Rodrigues-Soares F, Peñas-Lledó EM, Tarazona-Santos E, Sosa-Macías M, Terán E, López-López M, et al. Genomic Ancestry, CYP2D6, CYP2C9, and CYP2C19 Among Latin Americans. *Clin Pharmacol Ther.* enero de 2020;107(1):257-68.

<sup>75</sup> Estévez F, Giusti M, Parrillo S, Prando M. Variabilidad del metabolismo oxidativo de fármacos en la población uruguaya: polimorfismo genético del citocromo P-450 2D6. *Rev. méd. Urug* 1997;13(2):93-100.

<sup>76</sup> Brockmoller J, Kirchheiner J, Schmider J, Walter S, Sachse C, Mulleroerlinghausen B, et al. The impact of the polymorphism on haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment. *Clin Pharmacol Ther.* octubre de 2002;72(4):438-52.

<sup>77</sup> Kirchheiner J, Müller G, Meineke I, Wernecke KD, Roots I, Brockmüller J. Effects of Polymorphisms in CYP2D6, CYP2C9, and CYP2C19 on Trimipramine Pharmacokinetics. *J Clin Psychopharmacol.* octubre de 2003;23(5):459-66.

<sup>78</sup> Abdullah-Koolmees H, Van Keulen AM, Nijenhuis M, Deneer VHM. Pharmacogenetics Guidelines: Overview and Comparison of the DPWG, CPIC, CPNDS, and RNPx Guidelines. *Front Pharmacol.* 25 de enero de 2021;11:595219.

<sup>79</sup> Frederiksen T, Areberg J, Raoufinia A, Schmidt E, Stage TB, Brøsen K. Estimating the In Vivo Function of CYP2D6 Alleles through Population Pharmacokinetic Modeling of Brexpiprazole. *Clin Pharmacol Ther.* 2023 Feb;113(2):360-369.

<sup>80</sup> Frederiksen T, Areberg J, Schmidt E, Stage TB, Brøsen K. Does ethnicity impact CYP2D6 genotype–phenotype relationships? *Clin Transl Sci.* 23 de marzo de 2023;cts.13506.

- 
- <sup>81</sup> McLaughlin P, Mactier H, Gillis C, Hickish T, Parker A, Liang WJ, et al. Increased DNA Methylation of ABCB1 , CYP2D6 , and OPRM1 Genes in Newborn Infants of Methadone-Maintained Opioid-Dependent Mothers. *J Pediatr.* noviembre de 2017;190:180-184.e1.
- <sup>82</sup> Kacevska M, Ivanov M, Ingelman-Sundberg M. Perspectives on Epigenetics and Its Relevance to Adverse Drug Reactions. *Clin Pharmacol Ther.* junio de 2011;89(6):902-7.
- <sup>83</sup> Zhang J, Zhu X, Li Y, Zhu L, Li S, Zheng G, Ren Q, Xiao Y, Feng F. Correlation of CpG Island Methylation of the Cytochrome P450 2E1/2D6 Genes with Liver Injury Induced by Anti-Tuberculosis Drugs: A Nested Case-Control Study. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(8):776.
- <sup>84</sup> Habano W, Kawamura K, Iizuka N, Terashima J, Sugai T, Ozawa S. Analysis of DNA methylation landscape reveals the roles of DNA methylation in the regulation of drug metabolizing enzymes. *Clin Epigenetics.* 2015;7:105.
- <sup>85</sup> Rangel-Méndez JA, Rubi-Castellanos R, Ascencio-Montiel IDJ, Moo-Puc RE. CYP2D6 does not impact on breast cancer-free survival in Southeast Mexican patients under tamoxifen treatment. *Pers Med.* 1 de julio de 2020;17(4):261-70.
- <sup>86</sup> He W, Grassmann F, Eriksson M, Eliasson E, Margolin S, Thorén L, et al. CYP2D6 Genotype Predicts Tamoxifen Discontinuation and Prognosis in Patients With Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2019;38:548-57.
- <sup>87</sup> Helland T, Alsomairy S, Lin C, Sjøiland H, Mellgren G, Hertz DL. Generating a Precision Endoxifen Prediction Algorithm to Advance Personalized Tamoxifen Treatment in Patients with Breast Cancer. *J Pers Med.* 13 de marzo de 2021;11(3):201.
- <sup>88</sup> Thorén L, Lindh JD, Ackehed G, Kringen MK, Hall P, Bergh J, et al. Impairment of endoxifen formation in tamoxifen-treated premenopausal breast cancer patients carrying reduced-function CYP2D6 alleles. *Br J Clin Pharmacol.* marzo de 2021;87(3):1243-52.
- <sup>89</sup> Zhan M, Flaws JA, Gallicchio L, Tkaczuk K, Lewis LM, Royak-Schaler R. Profiles of tamoxifen-related side effects by race and smoking status in women with breast cancer. *Cancer Detect Prev.* enero de 2007;31(5):384-90.

---

<sup>90</sup> Huzell L, Persson M, Simonsson M, Markkula A, Ingvar C, Rose C, et al. History of oral contraceptive use in breast cancer patients: impact on prognosis and endocrine treatment response. *Breast Cancer Res Treat.* enero de 2015;149(2):505-15.