

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS

EN LA

ARTRITIS REUMATOIDE

TESIS DOCTORAL

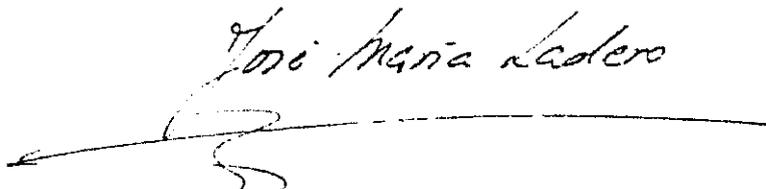
Madrid, 1993

Presentada por María del Pilar ANDRES PARRA
Director: Dr. José M^a Ladero Quesada

D. José María Ladero Quesada, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICO que el trabajo de Investigación que presenta D^a M^a del Pilar Andrés Parra, con el título de "POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE" bajo mi dirección, reúne las condiciones necesarias para ser leída y juzgada como Tesis Doctoral.

Y para que conste extendiendo el presente informe en Madrid a 20 de abril de 1993


Fdo. Prof. José M^a Ladero

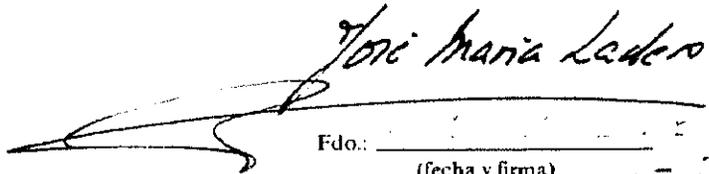
INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

La Tesis realizada por D^a María del Pilar Andrés Parra bajo mi dirección cumple los requisitos necesarios para su presentación a lectura, estando conforme con los métodos y técnicas empleados así como con los resultados obtenidos en la misma.

V.º B.º
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis

Fdo: _____
(fecha y firma)
D.N.I.:

Jose Maria Ladero


Fdo: _____
(fecha y firma) 23-4-93
D.N.I.:

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

DR. D. CARLOS PEREZAGUA CLAMAGIRAND, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA. U.C.M.

INFORMO: Que una vez examinado el Trabajo presentado por D^{ña}. M^a del Pilar Andrés Parra, titulado: "Polimorfismos enzimáticos en la artritis reumatoide", dirigido por el Prof. Dr. D. Jose María Ladero Quesada, este Departamento da su conformidad para que dicho trabajo sea leído y defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo Departamento

23-4-1993

El Director del Departamento



Fdo: _____
(fecha y firma)

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis, Profesor José María Ladero Quesada, por su continua ayuda y estímulo en la realización de esta Tesis.

A los todos médicos del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario de San Carlos, en las personas de los doctores Juan A. Jover y Antonio Bañares, que me han facilitado el acceso a los pacientes y ayudado en numerosos aspectos prácticos.

Al Profesor Julio Benitez Rodríguez, director del Departamento de Farmacología de la Universidad de Extremadura, por la ayuda técnica prestada para las determinaciones del polimorfismo oxidativo de debrisoquina. Este agradecimiento es extensivo a D. Luis Lozano, que ha intervenido directamente en este aspecto del estudio.

A Hoffmann-La Roche, Ltd., por facilitarnos amablemente los comprimidos de debrisoquina utilizados en este estudio.

A todos los enfermos que libre y voluntariamente aceptaron participar en este estudio, asumiendo las molestias derivadas del mismo a sabiendas de que ello no iba a generar un beneficio inmediato para ellos.

INDICE

INTRODUCCION

1. Artritis reumatoide: Consideraciones etiopatogénicas	2
1.1. Concepto	2
1.2. Epidemiología	2
1.3. Factores etiopatogénicos	5
2. Polimorfismo genético: Concepto	17
3. Sistema oxidativo microsomal citocromo P450	21
3.1. Aspectos generales	21
3.2. Localización	22
3.3. Ciclo catalítico del citocromo P450	23
3.4. Isoenzimas del citocromo P450	24
4. Polimorfismo oxidativo de tipo debrisoquina/ esparteína	26
4.1. Primeros descubrimientos	26
4.2. Distribución en poblaciones	27
4.3. Bases genético-moleculares	28
4.4. Aspectos técnicos	32
4.5. Polimorfismo oxidativo de debrisoquina en enfermedades "espontáneas"	36
4.6. Consecuencias farmacológicas del polimorfismo OXIDATIVO de tipo debrisoquina/esparteína	45
5. Polimorfismo acetilador	50
5.1. Conceptos básicos	50
5.2. Bases genético-moleculares	51
5.3. Distribución en poblaciones	54
5.4. Aspectos técnicos	55
5.5. Factores modificadores	56
5.6. Polimorfismo acetilador y reacciones adversas a fármacos	59
5.7. Polimorfismo acetilador y enfermedades "espontáneas"	60

<u>OBJETIVOS</u>	71
<u>PACIENTES, MATERIAL Y METODOS</u>	72
1. Pacientes	73
2. Métodos de laboratorio	77
2.1. Polimorfismo oxidativo de debrisoquina	77
2.2. Polimorfismo acetilador	82
3. Métodos estadísticos	85
<u>RESULTADOS</u>	87
<u>DISCUSION</u>	98
<u>CONCLUSIONES</u>	110
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	112

CAPITULO I

INTRODUCCION

1. ARTRITIS REUMATOIDE : CONSIDERACIONES ETIOPATOGENICAS.

1.1 CONCEPTO DE ARTRITIS REUMATOIDE.

Es una enfermedad inflamatoria crónica que conduce a una poliartropatía simétrica con daño en el cartílago articular y zonas óseas de la proximidad. Esta enfermedad afecta a un número variable de articulaciones a las que en último término lleva a la destrucción. Además presenta a lo largo de su evolución un grado variable de afectación extraarticular.

Se trata de una enfermedad común, de causa desconocida, aunque su descripción es relativamente reciente, ya que empezó a saberse de ella a partir del siglo XVII.

1.2 EPIDEMIOLOGIA.

La artritis reumatoide es una enfermedad de distribución mundial, sin límites geográficos. No hay área geográfica o grupo étnico que esté completamente libre de ella.

Es más frecuente en el sexo femenino. Su máxima incidencia se da entre los 40 y 60 años. En las mujeres la edad de presentación más frecuente se sitúa entre 45 y 54 años, posteriormente la incidencia se estabiliza, mientras que continúa aumentando en los varones conforme lo hace su edad (Spector et al., 1990; Lawrence 1977).

Sin embargo estos datos no han sido confirmados por un estudio más reciente llevado a cabo en la Clínica Mayo, que ha puesto de manifiesto la existencia de un incremento similar en ambos sexos de la incidencia de la enfermedad en relación con la edad (Linus et al, 1980).

Los datos sobre si la aparición de nuevos casos a partir de los 60 años de edad es más o menos frecuente que en edades inferiores no son concluyentes. Parece apreciarse una tendencia a la disminución de la frecuencia de la enfermedad y de sus complicaciones más graves, especialmente en el sexo femenino (Linus A et al.1983). No obstante la enfermedad afecta al 1 por ciento de la población mundial.

En 1.958 la American Rheumatism Association (ARA) estableció 11 criterios diagnósticos para establecer la existencia segura, probable o posible de la enfermedad. Aunque se elaboraron con una finalidad epidemiológica y no para hacer un diagnóstico individual, se estuvieron utilizando durante 30 años (Mitchell et al 1982).

En 1.988 la ARA revisó éstos antiguos criterios (Arnett FC et al., 1988), para establecer otros siete con los cuales sí es posible hacer un diagnóstico individualizado de la enfermedad (Tabla 1). Para ello es necesario que al menos los cuatro primeros criterios hayan estado presentes durante 6 o más semanas. La especificidad que se alcanza es de un 89% y entre un 91-

94% de sensibilidad a la hora de establecer el diagnóstico de A.R. (Harris 1990).

T A B L A i

Criterios diagnósticos de artritis reumatoide (*)

1. Rigidez matutina de al menos una hora de duración.
2. Artritis (**) de 3 o más articulaciones
3. Artritis de articulaciones de las manos
4. Artritis simétrica
5. Nódulos reumatoides
6. Positividad para factor reumatoide en suero
7. Alteraciones radiográficas típicas en manos y muñecas.

(*) Arnett et al., 1987.

(**) Artritis se define como tumefacción de tejidos blandos o derrame articular observado por un médico.

Se considera que existe artritis reumatoide si al menos se cumplen 4 de los siete criterios. Los criterios 1 a 4 deben haber estado presentes durante al menos 6 semanas.

1.3 FACTORES ETIOPATOGENICOS .

La causa de la enfermedad es desconocida, aunque se han propuesto diversos factores que podrían estar relacionados con su etiopatogenia:

1. Factores hormonales (sexo)
2. Factores ambientales
virus y otros agentes externos (Clima -habitat-
alimentación.)
3. Factores étnicos
4. Factores genéticos

1.3.1. Sexo y factores hormonales

Se cree que los factores hormonales juegan un papel importante en la etiología y curso de la enfermedad, que muestra un marcado predominio femenino, en una proporción que oscila de 2:1 a 4:1.

Las hormonas sexuales femeninas, y específicamente los estrógenos, ejercen diversos efectos sobre los mecanismos inmunitarios, especialmente sobre los linfocitos T (Ahmed SA et al. 1985).

El embarazo suele inducir una remisión de la enfermedad, que suele exacerbarse después del parto (Persellin et al., 1977; Spector et al., 1990). No se conocen los mecanismos que se escon-

den tras el efecto del embarazo sobre la enfermedad. Se ha intentado relacionar la supresión de la actividad de la enfermedad con una alfa 2 glucoproteína identificada en el suero de las enfermas, aunque no se conoce con exactitud cuál es el papel biológico de éstas proteínas in vivo (Thomson et al., 1980; Ungar A et al. 1983).

En Rochester, Minnesota, se observó un descenso en la incidencia de A.R. a partir del año 1.960, y este descenso fue achacado al empleo de anticonceptivos orales, y de estrógenos tras la menopausia (Linos A et al. 1980). Sin embargo, estudios posteriores efectuados sobre esta misma población por un grupo de la Clinica Mayo no pudieron confirmar ningún efecto protector de los anticonceptivos orales frente al riesgo de padecer A.R. (Linos A et al.1983)

Es posible que los anticonceptivos orales no prevengan la enfermedad pero modifiquen bastante su curso, de tal manera que no aparezca como un proceso grave y permanente, y sí como un desorden leve o transitorio (Spector y Hochberg, 1989).

Si tanto el embarazo como el uso de píldoras anticonceptivas actúan modificando de alguna manera la enfermedad, ¿disponemos de una explicación biológica?.

Se ha comprobado que ambas circunstancias , uso de anticonceptivos orales y embarazo, producen una elevación marcada de factores inmunosupresores en seres humanos, de lo que es un

rellejo la elevación de alfa 2 glicoproteína (Ungar et al. 1983; Von Schoultz y Stigbraund, 1982).

Es posible pues que estos factores actúen modificando la actividad del sistema y de la respuesta inmunitarios en un sentido favorable y duradero en lo que atañe a la evolución de la enfermedad.

1.3.2. Agentes infecciosos y factores ambientales.

Durante mucho tiempo se ha pensado que algún tipo de virus o bacteria podría estar implicado en el desencadenamiento de la A.R.. Esta relación fue sugerida por la mayor incidencia de la enfermedad en sujetos en contacto con determinados animales domésticos (Gottlieb et al. 1974)

Posteriormente se ha creído identificar diferentes agentes infecciosos (o sus marcadores específicos) en las articulaciones de pacientes con A.R.. De entre ellos, han sido objeto de especial y sucesivo interés mycoplasma, clostridia, proteus, virus de Ebstein-Barr y determinados retrovirus.

El interés de la teoría infecciosa ha aumentado cuando se ha sabido que hay agentes patógenos relacionados con una artropatía de larga duración (crónica) en lugar de producir una artropatía aguda. Algunos de estos agentes son bacterias (Borrelia, Yersinia) y otros son virus (virus de la rubeola y Parvovirus), capaces de producir una artritis crónica, espe-

cialmente en sujetos portadores de HLA-DR4 ((Klonda et al. 1986; White et al.1985).

A titulo de ejemplo conviene comentar lo relativo al virus de Ebstein Barr (VEB). Los argumentos esgrimidos son epidemiológicos pero también específicamente etiológicos. El virus tiene una glicoproteína de superficie (gp 110) cuya secuencia de aminoácidos glu-leu-arg-ala-ala o glu-arg-arg-ala-ala es similar a la del antígeno HLA-DW4 y son reconocidos por los mismos anticuerpos (Roudier et al. 1989; Harris 1990). Parvovirus y VEB podrían tener un mecanismo considerado como toxicogénico. Los enfermos con A.R. son portadores faríngeos de VEB con mayor frecuencia que el grupo control. Tienen también un número mayor de células B circulantes infectadas por el virus y una disminución de la respuesta inmune dependiente de células T citotóxicas e inducida por VEB (Stastny P 1980).

En resumen la hipótesis de que uno o más agentes infecciosos virales o bacterianos pudieran actuar como agentes desencadenantes en un huésped genéticamente susceptible es muy atractiva.

Cabe la posibilidad de que una pequeña alteración en la respuesta de las células T ante una infección viral o bacteriana o la formación de un neoantígeno al integrarse el genoma viral en el huésped sea suficiente para desencadenar la enfermedad (Harris et al. 1989).

1.3.3. Factores étnicos.

Se han encontrado con frecuencia variable en diversas poblaciones unos marcadores de susceptibilidad para el padecimiento de A.R. . Estos marcadores no son sino diversos antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad (HLA). Los antígenos involucrados, bien que en poblaciones diferentes, han sido los HLA-DR4 y, en menor medida, HLA-DR1.

Numerosos estudios han apoyado esta asociación en sujetos de diferente origen étnico. El 60 por ciento de los enfermos de raza blanca poseen HLA-DR4 por tan solo el 26 % de la población general. Algo similar ocurre con los japoneses (Nakai et al. 1981) , negros norteamericanos (Mody et al 1989) y africanos (Stastny 1980; Karr et al. 1980), indios (Stastny 1980), venezolanos (Pérez-Rojas et al 1980), mejicanos (Stastny 1980; Ueno et al. 1981) e indios Chipena (Harvey et al. 1983). Pero no se ha podido establecer esta asociación en otras poblaciones, como por ejemplo judíos de Israel (Schiff et al 1982), árabes (Lattar et al.1990) y algunas comunidades indígenas de los EE.UU. (Willkens et al. 1982).

Sin embargo, en algunas poblaciones en las que no se ha encontrado relación con HLA-DR4, sí se ha detectado relación con el antígeno HLA-DR1 (Schiff et al. 1982). Esto sucede entre la población de Indios Asiáticos y Judios de Israel.

1.3.4. Factores genéticos. El complejo mayor de histocompatibilidad.

La causa de la enfermedad es desconocida pero los factores genéticos son responsables en un 30% de la susceptibilidad a padecer la enfermedad.

El reconocimiento de la existencia de esta susceptibilidad heredada a padecer artritis reumatoide y de que un elemento que determina esta susceptibilidad sea un gen cercano al complejo mayor de histocompatibilidad MHC ha sido uno de los mayores avances en los esfuerzos por comprender la etiología de ésta enfermedad (Moreno y Sánchez 1991; William et al. 1990).

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en los mamíferos es la región genética que determina la estructura de aquellas moléculas de superficie celular responsables en gran medida de las reacciones de rechazo de transplantes.

En el hombre, dicho complejo de histocompatibilidad está constituido por el grupo de genes HLA localizados en el brazo corto del cromosoma 6 (Roitt et al. 1991).

a) Herencia de los genes MHC

Cada individuo hereda un cromosoma 6 materno y otro paterno, es decir, de cada uno de los padres se deriva un genotipo haploide HLA (Halotipo) (Roitt et al. 1991).

b) Ordenamiento de los genes MHC

El mapa de los genes MHC-HLA humano está en regiones netamente diferenciadas, y cada una de ellas produce polipéptidos de una determinada clase. Las moléculas de clase I y II son las que intervienen en el reconocimiento inmunitario.

La región D a su vez se subdivide en tres zonas génicas principales: HLA DP, DQ y DR. (Moreno y Sánchez 1991; Guillemot 1988).

Los genes que codifican los heterodímeros alfa y beta de las moléculas de clase II son :

Para las moléculas DR : HLA DRB1 / DRB3 / DRA1

Para las moléculas DQ : DQ B1 / DQ A1

Para las moléculas DP : DP B / DP A

Las bases inmunogenéticas que confieren la susceptibilidad individual para padecer A.R. se encuentran en relación con el locus D, que es el que controla la expresión de los determinantes de la clase II del MHC.

c) Especificidades HLA antiqénicas conocidas actualmente y desequilibrio de unión.

En cada locus génico de la población humana se pueden detectar muchas especificidades diferentes. Puesto que cualquier

antígeno de la región A puede aparecer junto a cualquier antígeno B,C o D , el número de haplotipos presentes en los seres humanos es muy grande y con dos cromosomas no idénticos la cantidad de genotipos posibles es enorme.

No obstante éste sistema consta de 7 series de antígenos agrupados en dos clases :

clase I (HLA A,B,C.)

clase II (HLA DR,DQ,DP y para las especificidades aún no definidas suficientemente DW) (Moreno y Sanchez 1991; Roitt et al.1991).

El desequilibrio de unión es un aspecto importante en la genética del sistema HLA. Consiste en que dos antígenos, cada uno de una serie diferente, aparecen juntos en la población con mayor frecuencia genética de lo que cabría esperar si su combinación fuera puramente aleatoria (Nakai et al 1981).

Este fenómeno es importante cuando se considera la asociación con enfermedad, ya que algunos antígenos pueden estar asociados con una enfermedad simplemente porque están en desequilibrio de ligamiento con otro antígeno que establece la asociación primaria con la enfermedad de que se trate (Moreno y Sánchez 1991; Roitt et al. 1991; Mody et al 1989).

d) Estructura de los antígenos MHC

Por tratarse de moléculas involucradas en el reconocimiento célula/célula, la mayoría de los antígenos MHC celulares se encuentran en la membrana celular. La mayoría son glucoproteínas transmembrana.

Los antígenos de clase II son heterodímeros y constan de dos cadenas distintas de polipéptidos, denominadas alfa y beta y unidas entre sí mediante enlaces no covalentes. Ambas cadenas atraviesan la membrana plasmática.

La cadena más corta, la beta, contiene los sitios aloantigénicos, aunque algunas moléculas de clase II tienen cadenas alfa con cierto polimorfismo estructural. Las dos cadenas poseen unidades de carbohidratos (Roitt et al 1991).

e) Funciones de los antígenos del MHC

Estos antígenos son esenciales para las reacciones de reconocimiento inmunitario. Los diferentes antígenos MHC son reconocidos por tipos diferentes de células.

Antígenos HLA relacionados con Artritis Reumatoide. Peculiaridades estructurales y diferencias raciales.-

Hace aproximadamente unos quince años se detectó una alta frecuencia de una molécula de tipo II, concretamente el tipo DW4, en pacientes con Artritis Reumatoide (Stastny 1978).

En trabajos sucesivos se asoció el riesgo de padecer la enfermedad con los genes que codifican la especificidad serológica DR4 (McCusker et al., 1988; Cooke et al., 1989).

Poco después se observó que es el HLA-DR4 el que muestra la asociación más estrecha con la enfermedad (Moreno y Sánchez 1991; Lechler et al., 1990).

La frecuencia de HLA DR4 en pacientes con A.R. es de un 60-70%, mientras que el grupo control presenta una frecuencia de 27-35%. Las personas HLA-DR4 + tienen un riesgo de desarrollar artritis reumatoide cinco a siete veces superior que los que no son positivos para éste antígeno (Gran et al 1983; Harris 1990).

La frecuencia con que se presenta este antígeno muestra una gran variabilidad racial, como se ha señalado en apartados anteriores.

El antígeno HLADRI también muestra una cierta asociación con la presentación de la enfermedad (Schiff et al., 1982).

La susceptibilidad genética para padecer la enfermedad se ha asociado con los antígenos HLA DR4 y DR1 dependiendo del origen étnico de la población (Harris 1990; Spector et al 1990).

Un mecanismo por el que los antígenos HLA DR4 y HLA DR1 pueden compartir la susceptibilidad para presentar artritis reumatoide descansa en el concepto de "Epitope compartido" o la

hipótesis de la equivalencia conformacional derivada de un estudio detallado de la estructura molecular de las partículas clase II MHC (Gregersen et al. 1987; Harris 1990; Spector et al. 1990).

El antígeno HLADR4 tiene varios subtipos: DW4, DW10, DW13, DW14 y DW15 (Jaraquemada et al. 1984; Harris 1990; Spector et al. 1990).

Gracias a la secuenciación del DNA del gen que codifica las moléculas de clase II se han obtenido las diferentes secuencias de aminoácidos de las cadenas alfa y beta de las diferentes moléculas HLA, y la diferente disposición de los aminoácidos influirá sobre la interacción entre la célula presentadora de antígeno (CPA) y el antígeno y el receptor de la célula T helper (Roudier et al. 1989; Gregersen et al. 1988).

La secuencia específica de aminoácidos encontrada en la tercera región hipervariable de las cadenas beta es la que confiere la susceptibilidad asociada a artritis reumatoide (Merriman et al., 1989).

El epítipo compartido desde el aminoácido en posición 70 hasta el que se encuentra en posición 74 y que favorece la susceptibilidad a presentar A.R. es glutamina-leucina-arginina-alanina-alanina o glutamina-arginina-arginina-alanina-alanina (Spector et al. 1990; Harris 1990; Watanabe et al. 1989). Los subtipos DW4 y DW14 del antígeno HLA DR4 son independientes de

las otras formas en cuanto a su relación con el riesgo de aparición de artritis reumatoide y tienen la secuencia de aminoácidos mencionada en la tercera región hipervariable de las cadenas beta (Harris 1990).

2. POLIMORFISMO GENETICO: CONCEPTO

Puede definirse de diversas formas, todas ellas coincidentes en el fondo y en gran medida intercambiables (Arias et al., 1991):

1.- Presencia en el mismo habitat de dos o más formas discontinuas de un gen, en proporciones tales que las formas más raras no pueden ser mantenidas por sucesivas mutaciones .

2.- Rasgo mendeliano que existe en la población en al menos dos fenotipos (y posiblemente en al menos dos genotipos), sin que ninguno de ellos esté presente en menos de 1 o el 2 por ciento de los individuos.

3.- Presencia en la misma población de dos o más alelos en un locus, cada uno con una frecuencia apreciable .

Los genes polimórficos pueden ser estructurales o afectar a moléculas con acción enzimática. En este último caso los sustratos pueden ser endógenos (endobióticos) o exógenos (xenobióticos). Un xenobiótico es toda aquella sustancia que penetra en el organismo y que no puede ser utilizada como elemento estructural ni para la obtención de energía, aunque sí pueda influir sobre el funcionamiento de los sistemas metabólicos. La mayor parte de los fármacos son xenobióticos, así como los contaminantes ambientales de todo origen que están penetrando continuamente en el organismo.

Cuando un polimorfismo genético afecta a una molécula enzimática involucrada en el metabolismo de xenobióticos determinará el grado de respuesta a sus sustratos específicos. Si son medicamentos, variará la respuesta o la toxicidad de los mismos. Si son xenobióticos ambientales, su acción lesiva podrá variar dependiendo de que hayan de enfrentarse a una forma activa o inactiva de su enzima específico.

Los individuos que tienen un metabolismo deficiente en relación a un cierto sustrato son metabolizadores lentos o portadores del fenotipo PM (del inglés "poor metabolizer"). Los sujetos portadores de la forma funcionante del enzima se clasifican como metabolizadores rápidos o portadores del fenotipo EM ("extensive metabolizers").

En la actualidad se conocen al menos cuatro polimorfismos enzimáticos que afectan a sustratos exógenos (xenobióticos) y que están bien caracterizados. Tres de ellos son de tipo estructural, y afectan a la ordenación o el número de aminoácidos de la molecula enzimática. El otro es un polimorfismo de regulación que afecta a la capacidad de inducción de la enzima arilhidrocarburhidroxilasa (CYP1A1), involucrada en la activación de numerosos carcinógenos presentes en el humo del tabaco y presuntamente relacionado con el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en sujetos fumadores (Caporaso et al., 1991).

Dos de los tres polimorfismos estructurales afectan a isoenzimas del sistema P-450 y el otro a la actividad de una

enzima de fase 2, la N-acetil transferasa polimórfica (ver más adelante). Aunque los tres polimorfismos son completamente independientes entre sí, comparten el mismo tipo de herencia mendeliana simple o autosómica. El alelo que comporta la capacidad de sintetizar la forma activa del enzima es dominante, y el (o los) alelo(s) incapaz de sintetizar moléculas funcionalmente activas es recesivo. Por lo tanto los "metabolizadores rápidos" pueden ser homo o heterocigotos para el alelo dominante mientras que los "metabolizadores lentos" han de ser homocigotos obligados para el alelo recesivo.

La Farmacogenética estudia la influencia que tienen las características genéticamente determinada sobre el metabolismo y, en general, sobre la actuación de los fármacos. Podemos ampliar el campo de su interés a todos los xenobióticos. Los polimorfismos enzimáticos que hemos definido constituyen el aspecto más importante de la farmacogenética, y si utilizamos el concepto amplio que acabamos de proponer, no cabe duda de que tales polimorfismos han de influir de forma importante sobre los efectos patógenos de los xenobióticos que utilizan enzimas polimórficos en su tránsito por el organismo.

Un xenobiótico sometido a un polimorfismo enzimático y nocivo para el organismo puede actuar como carcinógeno, como desencadenante de una reacción inmunitaria inadecuada, como genotóxico o simplemente como tóxico celular. Si es el propio xenobiótico el responsable de la actuación nociva, es evidente que los metabolizadores rápidos estarán mejor equipados para

neutralizarlo que los lentos. Si por el contrario es el metabolismo generado a través de la vía polimórfica el que ejerce la acción patógena, serán los metabolizadores lentos los que tengan ventaja genética contra esa agresión en concreto. Ambas situaciones se dan en la realidad.

De lo que se acaba de señalar se deduce que son muchas, potencialmente, las enfermedades humanas que pueden guardar relación con algún polimorfismo enzimático. De entre ellas destacan los tumores malignos, las enfermedades auto o disímunes, las reacciones tóxicas idiosincráticas a medicamentos e incluso las alteraciones genéticas producidas durante el desarrollo embrionario.

Este estudio se centra en la posible relación entre dos polimorfismos enzimáticos, el oxidativo de tipo debrisoquina/esparteína y el acetilador, y una enfermedad autoinmune, la artritis reumatoide. En los puntos siguientes se profundiza en los conocimientos actuales sobre las características de ambos polimorfismos.

3. SISTEMA OXIDATIVO MICROSOMAL CITOCROMO P-450

3.1. Aspectos generales

El sistema citocromo P-450 es un complejo de enzimas o isoenzimas responsables del metabolismo oxidativo de numerosas sustancias exógenas y endógenas, entre estas últimas prostaglandinas, ácidos grasos y esteroides.

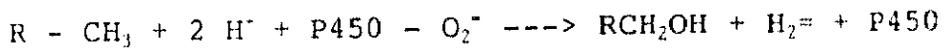
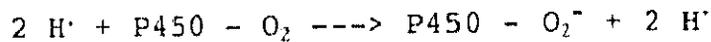
Diferentes reacciones son catalizadas por este sistema P-450 pero la más importante es la mono-oxigenación de sustratos. Las enzimas que catalizan dichas reacciones se denominan monooxigenasas u oxidasas de función mixta.

Su función es la oxidación de un compuesto, mediante la transferencia de un átomo de oxígeno (obtenido a partir de oxígeno molecular, que sufre una división interaccionando con un par de electrones transportados por dos átomos de hidrógeno), mientras que el otro átomo de oxígeno, producto de la división del oxígeno molecular, se utiliza para la formación de agua (Vessey 1990).

Este conjunto de enzimas o isoenzimas se encuentra localizado en las membranas del retículo endoplásmico de numerosos tipos celulares, pero sobre todo de las células hepáticas (Brosen 1990).

Cada isoenzima del sistema citocromo P-450 está formado por una proteína y un grupo hem que actúa como grupo prostético. Se trata por tanto de hemoproteínas cuyos PM varían entre 48.000 y 56.000 Kd. Las diferentes formas de P-450 son isoenzimas con distinta secuencia de sus aminoácidos (Vessey 1990).

Los citocromos P-450 son hemoproteínas que participan en la cadena transportadora de electrones en los microsomas hepáticos, aceptando electrones cedidos por el NADP, aunque también pueden proceder del NAD, y donando un átomo de oxígeno posteriormente al sustrato.



Cada isoenzima P-450 tiene la capacidad de incorporar un átomo de oxígeno molecular a un sustrato o grupo de sustratos específico. Las reacciones de oxidación forman parte de las reacciones de fase I. Los productos que han sido oxidados pueden ser metabolizados en reacciones posteriores de conjugación, denominadas también reacciones de fase II (Brosen 1990).

3.2 Localización.

El sistema microsomal multienzimático citocromo P-450 se localiza de forma principal, aunque no exclusiva, en el retículo endoplásmico de las células hepáticas (Vessey 1990). También se

han encontrado representantes de este sistema en otros órganos y tejidos: riñón, corteza suprarrenal, etc.

En el ser humano el número total de isoenzimas del sistema P-450 es superior a 20, y con sus isoformas puede llegar a 200 (Nelson y Strobel 1987).

3.3 Ciclo catalítico del citocromo P-450.

Las etapas de la hidroxilación de un sustrato y las reacciones de oxidación-reducción son las siguientes (Vessey 1990):

1.- Interacción del sustrato con el citocromo P-450. 2.- El complejo citocromo P-450 + sustrato formado, es reducido al aceptar un electrón procedente de la citocromo P-450 reductasa. (El hierro de citocromo se reduce pasando a la forma ferrosa).

3.- La forma citocromo P-450 + sustrato reducido puede captar oxígeno, dando lugar a oxicitocromo P-450. Si en condiciones experimentales se une a monóxido de carbono se origina la forma característica, cuyo pico máximo de absorción óptica se fija en 450 nm, del que deriva el nombre de P-450.

4.- En una cuarta etapa, el oxicitocromo puede ligar un segundo electrón, dando lugar a peroxicitocromo P-450.

5.- Tras dos etapas intermedias el ciclo es completado. Se descompone el oxígeno activado, se forma un sustrato oxidado y se recupera el citocromo P-450 en su forma oxidada inicial.

3.4 Isoenzimas del citocromo P-450.

Se conocen numerosas isoenzimas del citocromo P-450. Formando parte de su estructura cada isoenzima consta de una proteína y de un grupo heme. Todas las isoenzimas llevan a cabo reacciones de oxidación. La secuencia de aminoácidos próxima al grupo hem guardan mucha similitud entre las diferentes isoenzimas. Por el contrario, los aminoácidos restantes o más alejados del grupo hem difieren considerablemente de un tipo a otro de isoenzimas.

Las diferencias encontradas en las secuencias de aminoácidos de los lugares activos son los que dan a las isoenzimas su diferente especificidad para sus funciones de oxidación (en la mayoría de los casos en el interior del retículo endoplásmico) sobre sus sustratos específicos (Nebert y Gonzalez 1987).

El sistema P-450 es una superfamilia de isoenzimas. Las isoenzimas que tienen una similitud estructural en su secuencia de aminoácidos constituyen una familia. Cada familia se denomina con las letras CYP y el número de orden correspondiente. Se conocen 30 familias en la Naturaleza; de ellas, diez son propias de los mamíferos (CYP 1,2,3,4,7,11,17,19,21 y 27).

Los genes que codifican la síntesis de las isoenzimas del sistema P-450 proceden todos de un antecesor común que existió hace 1.500 millones de años (Brosten 1990; Nebert y Gonzalez 1987; Nelson y Strobel 1987) y que por mutaciones y duplicaciones sucesivas fue originando diferentes formas isoenzimáticas.

Las familias 1,2,3 y 4 se encargan fundamentalmente del metabolismo de xenobióticos, mientras que las otras están involucradas en el procesamiento de sustancias endógenas. Cada familia puede incluir a su vez diversas subfamilias; las isoenzimas que pertenecen a una misma subfamilia han de tener una similaridad estructural superior al 55 %. Una descripción detenida de las familias CYP 1 a 4 y de las especificidades de sus isoenzimas queda fuera de esta introducción (ver Gonzalez 1992). La presencia de familias dedicadas al metabolismo de xenobióticos se explica por la aparición sucesiva en el mundo vegetal de toxinas capaces de dañar a sus predadores animales, que a su vez seleccionaron las mutaciones protectoras capaces de neutralizar estos tóxicos. Las diferencias inter-especies de su especificidad se deben a las distintas agresiones ambientales a las que cada especie se ha ido viendo expuesta a lo largo de su evolución (González 1992).

La isoenzima CYP2D6 de la subfamilia CYP2D, cuya presencia se ha detectado sobre todo en hígado, pero también en riñón e intestino, está dotada de polimorfismo, según se ha definido anteriormente. Uno de los dos aspectos de que consta esta Tesis se basa en la existencia de esta isoenzima y de su presunta relación con diversas enfermedades "espontáneas", por lo que a continuación se desarrollan en profundidad los conocimientos actuales sobre la misma.

4. POLIMORFISMO OXIDATIVO DE TIPO DEBRISOQUINA-ESPARTEINA

4.1 Primeros descubrimientos:

En 1977 Mahgoub et al. estudiaron un grupo de 94 sujetos sanos, a quienes administraron 10 mg de debrisoquina (DBQ). La determinación en la orina de las 8 horas siguientes de debrisoquina y de su metabolito 4-OH-DBQ mostró que 3 individuos apenas mostraban indicios del metabolito en la orina, mientras que los demás parecían oxidar eficazmente el medicamento. Dado que el estudio se realizó en grupos familiares, pudieron sugerir que se hallaban ante un polimorfismo genético y que los metabolizadores ineficaces de DBQ eran homocigotos para un alelo recesivo. La demostración de este hecho fue proporcionada tres años más tarde por el mismo grupo (Price-Evans et al, 1980).

Quedó así establecida la existencia de un segundo polimorfismo genético (el primero identificado fue el acetilador). Los metabolizadores lentos de debrisoquina representan menos del 10 % de la población y son homocigotos para un alelo recesivo.

Debrisoquina es un antihipertensivo bloqueante adrenérgico comercializado por Roche bajo el nombre de "Declinax". No está disponible en España pero sí en Gran Bretaña. Su utilización como antihipertensivo es prácticamente nula en el momento actual y el interés de esta molécula se centra, fundamentalmente, en ser el primer sustrato que sigue esta vía polimórfica que se identificó. De no ser por esta circunstancia, hace tiempo que habría sido

retirada del mercado, en el que se mantiene probablemente por una concesión del fabricante hacia los muchos laboratorios que la utilizan para estudios como el que se presenta en esta tesis.

En 1979, un grupo alemán de investigadores detectó una deficiencia en la N-oxidación de esparteína en un pequeño porcentaje de mujeres que recibían este fármaco como oxitócico (Eichelbaum et al, 1979). Pronto se llegó a la conclusión de que ambos fármacos seguían la misma vía oxidativa polimórfica (Eichelbaum, 1982). Desde entonces han sido numerosos los medicamentos que se han sumado a esta lista (Tabla 2), aunque en muchos casos no utilizan sólo esta vía metabólica, sino que pueden utilizar otras alternativamente, cuando la enzima encargada de esta reacción no es operativa o no existe.

4.2 Distribución en poblaciones:

Hay numerosos estudios en poblaciones distintas que muestran que el porcentaje de metabolizadores lentos de debrisoquina es siempre inferior al 10 %. Los realizados en poblaciones europeas han sido objeto recientemente de un estudio conjunto (Alvan 1990). En España el porcentaje de metabolizadores lentos de debrisoquina se sitúa alrededor del 6 % (Benítez et al, 1988). En otros grupos étnicos el porcentaje de metabolizadores lentos parece ser aún menor. Al menos eso es lo señalado en una población negra nigeriana (Iyun et al., 1986), en chinos (Lou et al., 1987), en japoneses (Ishizaki et al., 1987; Horai et al., 1990) y en general en la mayor parte de los grupos no caucásicos

estudiados (Clark 1985, Horai 1988). La importancia de estas diferencias étnicas reside, desde el punto de vista de investigaciones como la aquí presentada, en la necesidad de seleccionar grupos controles del mismo origen étnico que los de estudio, algo que debe tenerse en cuenta en sociedades multirraciales, como la norteamericana y menor grado la británica.

4.3 Bases genético-moleculares:

La isoenzima del sistema microsomal P-450 responsable del polimorfismo de tipo debrisoquina-esparteína ha sufrido muchos avatares en su denominación: P-450BI (Gut et al., 1.986); P450IID1 (Nebert et al. 1.987), P-450db1 (Gonzalez et al., 1988; Brosen 1990) y finalmente P-450IID6. En el momento actual parece imponerse la tendencia de usar la misma denominación (CYP2D6) tanto para el gen como para su producto proteico, aunque no es incorrecto seguir denominado a este último P-450IID6.

El gen que codifica la síntesis de la isoenzima CYP2D6 está ubicado en el brazo largo del cromosoma 22 , en estrecha proximidad al gen del grupo sanguíneo P1 (Eichelbaum et al., 1987) y al oncogen *SIS* (Skoda et al., 1988).

Este gen (CYP2D6) ha sido secuenciado (Kimura et al., 1989). Contiene 9 exones y 8 intrones y está acompañado por otras dos estructuras genéticas de secuencia muy similar, denominadas respectivamente CYP2D7 y CYP2D8, que aparentemente tienen las suficientes modificaciones en su secuencia (especialmente la

segunda) para ser incapaces de elaborar el mensaje para la síntesis de la enzima. El gen CYP2D6 muestra numerosas modificaciones en su secuencia, pero la mayoría de ellas no implican un funcionamiento deficiente (Tyndale et al., 1988). Sin embargo, cuando alguna mutación interesa el punto estratégico, en el que reside la capacidad funcional, se origina un alelo mutante no funcionante (Skoda et al., 1988; Gonzalez et al., 1988; Kagimoto et al., 1990). Este punto estratégico podría haber sido identificado en la transición entre el intrón 3 y el exon 4 del gen (Gough et al., 1990). La antigua (!1987!) polémica acerca de si no se producía proteína enzimática o si se originaba una molécula no funcionante parece pues zanjada a favor de la primera teoría (Dayer et al., 1987; Osikowska-Evers et al., 1987).

El conocimiento de las mutaciones que acarrearán la ineficacia del gen y la aplicación de técnicas reacción en cadena de polimerasa (PCR) y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) han permitido desarrollar métodos para identificar genéticamente a los sujetos metabolizadores lentos (Heim & Meyer, 1991), no sin cierta polémica acerca de la validez y de la paternidad de las técnicas (Daly et al., 1990; Heim & Meyer 1991).

En esencia, el estado actual de nuestros conocimientos es el siguiente: Mediante la técnica de RFLP utilizando la enzima de restricción *Xba*I se identificaron dos fragmentos correspondiente al locus genético P450IID6 que tenían respectivamente 11,5 y 44 kilobases (kb), y otros fragmentos de 29 kb que la técnica

empleada no podía dilucidar si eran idénticos o diferentes entre sí. Los sujetos con genotipo 44/44, 11,5/11,5 y 44/11,5 eran metabolizadores lentos, pero estos tres genotipos sólo representaban al 25 % de los metabolizadores lentos, mientras que el 75 % restante quedaba englobado, junto con los metabolizadores rápidos, dentro del genotipo 29/29 (Skoda et al., 1988).

En este punto se añadió a la técnica de RFLP la de PCR (Heim & Meyer, 1990), que permitió diferenciar dentro de los fragmentos de 29 kb al menos cuatro variedades. La variedad más frecuente o wt ("wild type") es la que comporta la capacidad de síntesis de moléculas enzimáticas funcionalmente activas. Los alelos mutantes 29A y 29B carecen de esta capacidad. El alelo 29C es poco frecuente, pero es capaz de codificar la síntesis de una molécula enzimática funcionalmente activa. Los sujetos homocigotos para el alelo 29wt o heterocigotos para este alelo y cualquiera de los mutantes 29A, 29B, 44 u 11,5 (mutación D) son metabolizadores rápidos, pero aquellos con combinaciones diversas de cualquiera de los 4 alelos mutantes citados son metabolizadores lentos. Los sujetos heterocigotos WT/29C se comportan como metabolizadores rápidos homocigotos. Mediante el empleo sucesivo de ambas técnicas es posible identificar genotípicamente a todos los metabolizadores rápidos, ya sean homo o heterocigotos para el alelo 29wt, y al 90,6 % de los metabolizadores lentos (Broly et al., 1991). En un estudio reciente sobre la población sueca este porcentaje de identificación se ha elevado hasta el 99 % (Dahl et al., 1992). Sin embargo, es prácticamente seguro que existe al menos otro alelo mutante asociado al genotipo lento y

que la proporción relativa de estas mutaciones no es la misma en todas las poblaciones. Hay datos que indican que, en algunos casos (sujetos de origen chino), el fragmento de 44 kb posee aún cierto grado de capacidad funcional, lo cual indica que hay cierta heterogeneidad dentro de él (Yue et al, 1990). Probablemente es la existencia de esta variante alélica parcialmente activa la que explica la aparente paradoja de que en las poblaciones orientales apenas haya PM y sin embargo la tasa metabólica media sea significativamente inferior a la de los EM de grupos de raza blanca (Kalow 1991). Concretamente este estudio cita los primeros 377 miembros del grupo de controles sanos presentado en esta tesis (Benítez et al. 1988).

La mutación 29A se debe a la delección de un nucleótido en el exón 5. La 29B es consecuencia de siete mutaciones puntuales. La mutación 11,5 (mutación D) se debe a la delección del gen *CYP2D6* completo y la mutación 44 es la asociación del alelo 29B (en sujetos caucásicos, al menos) con otro gen extra hasta el momento no filiado (Heim & Meyer, 1990).

De forma paralela se ha investigado sobre las propiedades estructurales que han de tener las moléculas para poder actuar como sustratos de esta isoenzima. Se ha elaborado un patrón tridimensional al que se ajustan estos sustratos (Islam et al., 1991). Es posible que pequeñas mutaciones que afecten a un solo aminoácido de la molécula enzimática alteren la capacidad oxidativa de la isoenzima para un sustrato bufuralol) pero no para otro (debrisoquina) (Matsunaga et al., 1990).

4.4 Aspectos técnicos:

El método clásico para clasificar a los sujetos que constituyen una población de estudio como metabolizadores rápidos o lentos se ha basado desde los trabajos iniciales y ya citados de Mahgoub et al. (1977) y de Eichelbaum (1979) en la administración de un sustrato, debrisoquina y esparteína respectivamente, y en la determinación en la orina de las horas siguientes de la excreción del fármaco administrado y de su metabolito originado precisamente a través de la vía P450IID6. De la proporción entre ambas fracciones se obtenía una cifra, denominada índice metabólico o "metabolic ratio" (MR). Mediante análisis matemático de los valores para MR en grupos amplios de población se infería el valor de la "antimoda", que es aquel que marca el punto de menos acumulación de casos y que separa las dos poblaciones, la de metabolizadores rápidos y la de metabolizadores lentos. Posteriormente se ha utilizado el dextrometorfano como sustrato, con resultados equiparables y la ventaja de que está fácilmente disponible y carece prácticamente del riesgo de efectos adversos (Hildebrand et al., 1989).

Cuando, como se ha hecho en el estudio aquí presentado, se utiliza debrisoquina como sustrato, el valor de la antimoda más universalmente admitido desde que fue propuesto por Price-Evans en 1980, es el de 12,6 (Log 10 1,1). Tan generalizada es su utilización que un investigador en este campo ha comparado a esta constante con la velocidad de la luz, dada su inmutabilidad. Sin embargo, ha sido cuestionada (Henthorn et al., 1989).

Los métodos basados en la administración de un sustrato tienen varios inconvenientes. El más importante desde un punto de vista doctrinal es que no permiten diferenciar a los metabolizadores rápidos homo- de los heterocigotos. Se ha propuesto, cuando se utiliza debrisoquina como sustrato, que los metabolizadores rápidos homocigotos tienen valores para MR inferiores a 1, mientras que los heterocigotos estarían por encima de este límite, y lógicamente por debajo de 12,6. Sin embargo este límite es arbitrario, no se ajusta a la ley de Hardy-Weimberg y algunos autores han considerado que debe ser rechazado (Evans et al., 1989). Los últimos hallazgos en relación con el genotipo oxidativo de debrisoquina y la identificación de EM homo- y heterocigotos han dado cierta validez a esta aproximación empírica, como se comentará más adelante (discusión).

El segundo factor que resta fiabilidad y exactitud a las técnicas de fenotipado basadas en la administración de un sustrato es la existencia de productos que interaccionan con la enzima. Estas interacciones son de dos tipos: potenciadoras (inductoras) y bloqueantes.

La inducción enzimática es un fenómeno muy frecuente en el sistema microsomal P-450. Las sustancias inductoras suelen ser las mismas que utilizan la isoenzima inducida. La isoenzima P450IID6 es muy poco o nada inducible por diversos inductores habituales (Eichelbaum et al., 1986; Schellens et al., 1989; Kallio J et al., 1988), aunque hay algunas discordancias al respecto (Zhou et al., 1991). En todo caso, si existiera algún

inductor eficaz, éste sólo actuaría en metabolizadores rápidos, que son los únicos capaces de sistetizar la molécula enzimática, por lo que en la práctica no podrían transformar un metabolizador lento en rápido.

El bloqueo enzimático sí representa un grave problema práctico. Los numerosos sustratos de la isoenzima P450IID6 ejercen una inhibición competitiva con los sustratos utilizados para la determinación del fenotipo, de modo que tal determinación se ve falseada si se realiza en sujetos que están bajo tratamiento con alguno de tales fármacos.

Esta cuestión está sobradamente demostrada en numerosísimos estudios que muestran marcadas elevaciones de MR en sujetos en tratamiento con neurolépticos (Syvälahti et al., 1986; Gram et al., 1989 Spina et al., 1991; Fischer et al, 1992, Spina et al, 1992), antidepresivos (Derenne et al, 1989; Crewe et al., 1992), y una amplia gama de moléculas, tanto xeno como endobióticos (Inaba et al., 1985; Fonne-Pfister y Meyer, 1988).

Algunas de estas moléculas inhibidoras no son sustratos de la isoenzima P450IID6, pero se fijan a sus sitios activos y la inactivan de forma persistente. Es el caso de quinidina (Brosen et al., 1987) y en menor grado de cimetidina (Philip et al, 1989) y cloroquina (Inaba et al., 1985). La importancia de las interacciones de tipo inhibidor sobre la actuación de la isoenzima P450IID6 ha sido comentada recientemente (Caporaso & Shaw, 1991), y uno de los errores de interpretación más importantes que se han

cometido por este motivo fue el que puso en relación el riesgo de padecer enfermedad de Parkinson con la posesión del fenotipo oxidativo lento de debrisoquina (Barbeau, 1985), cuando este hallazgo era motivado por la inhibición enzimática ejercida por un antihistamínico administrado a los enfermos. No obstante, como se comentara después, este falso hallazgo ha tenido cierta repercusión posterior y puede, finalmente, haber algo de cierto en la existencia de la relación señalada.

La edad y el sexo no ejercen un efecto significativo sobre la eficacia oxidativa de debrisoquina (Steiner et al., 1985; Siegmund et al., 1990; Vincent-Viry et al., 1991). Este hecho es importante, porque permite utilizar como controles a sujetos jóvenes y sanos, que no toman medicación ninguna, aunque el grupo de estudio esté formado por personas de más edad. No es aconsejable realizar estudios de distribución del polimorfismo oxidativo de debrisoquina en sujetos con enfermedades que puedan alterar el metabolismo del sustrato, especialmente hepáticas o renales, pero aún así parece que la presencia de hepatopatía no muy avanzada no afecta significativamente a la actividad de esta isoenzima (Larrey et al., 1989).

Se discute si la actividad de la isoenzima P450IID6 varía a lo largo del día, de acuerdo con un ritmo circadiano (Lee, 1988; Shaw et al., 1990). Mientras se esclarece esta cuestión, parece recomendable realizar todas las pruebas a la misma hora del día.

Todas estas cuestiones perderán importancia en el momento en el que se generalice el empleo de métodos de genotipado, basados en los conocimientos resumidos en el punto 3 de este capítulo. Estas técnicas serán las únicas que se utilizarán en un futuro inmediato, porque permiten separar metabolizadores lentos homo de heterocigotos e identificar individualmente los diferentes alelos mutantes, no precisan de la administración de un sustrato, que siempre implica cierto riesgo, y la posibilidad de una recogida defectuosa de la orina, y están libres de interacciones medicamentosas, ambientales o de efectos dependientes de la edad, el sexo, la hora del día o cualesquiera que quieran plantear los críticos. De hecho, todos los estudios con técnicas de fenotipado que muestren alguna relación entre este polimorfismo y el riesgo de padecer alguna enfermedad habrán de ser contrastados con nuevos estudios que utilicen técnicas de genotipado e identificación alélica.

4.5 Polimorfismo oxidativo de debrisoquina y enfermedades "espon-táneas"

Un rasgo genéticamente determinado, como es el que estamos estudiando, puede guardar relación con el riesgo de padecer numerosas enfermedades a través de uno o más de los siguientes mecanismos:

a) Porque entre el gen que codifica la síntesis de la enzima y un gen relacionado con el riesgo de padecer la enfermedad existe una vecindad suficiente como para establecer un dese-

equilibrio de ligamiento. Se sabe que el gen polimórfico CYP2D6 está situado en el brazo largo del cromosoma 22 (Eichelbaum et al., 1987) y en la proximidad del oncogén c-sys (Skoda et al., 1988).

b) Porque algún xenobiótico involucrado en la patogenia de la enfermedad sea procesado por la enzima polimórfica. De este modo los metabolizadores lentos deberían procesar el sustrato por otras vías, o tratar de eliminarlo inmodificado, mientras que los rápidos lo metabolizarían eficazmente por la vía P-450IID6. Este mecanismo es perfectamente conocido en lo referente a las reacciones adversas por muchos fármacos que siguen esta vía polimórfica, pero en lo referente a enfermedades de aparición espontánea y etiología no filiada apenas hay datos y los argumentos son fundamentalmente hipotéticos.

Existen dos posibilidades. La primera es que el presunto xenobiótico sea el agente nocivo y por lo tanto que la oxidación eficiente lo inactive y reduzca el riesgo de padecer la enfermedad. En este caso los metabolizadores rápidos estarían protegidos contra el agente nocivo y la enfermedad sería más rara en ellos. La segunda opción es que el metabolito producido a través de la vía polimórfica sea el agente lesivo y en este caso la posesión de una elevada capacidad oxidativa incrementaría el riesgo de sufrir la enfermedad.

¿Qué enfermedades guardan mayor relación con agentes xenobióticos?. Desde luego muchos tumores malignos, en los que la

actuación de carcinógenos ambientales es indudable. Sin embargo, hasta hace poco no se había identificado ningún carcinógeno que utilizara la vía P-450IID6 para su procesamiento y presunta activación. Hoy sabemos que al menos hay uno, el NNK (4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona, presente en el humo del tabaco y que sigue, al menos parcialmente, esta vía (Penman et al., 1993). No obstante, la mayoría de los hidrocarburos aromáticos carcinógenos del humo del tabaco son procesados por la arilhidrocarburo-hidroxilasa (P450IA1), que también muestra una forma de polimorfismo inductivo, no estructural (Caporaso et al., 1991b).

Además de los tumores, aquellas enfermedades en las que se supone que existe un mecanismo disimmune que puede ser puesto en marcha por xenobióticos son también candidatas a guardar relación con rasgos polimórficos. Las reacciones adversas a fármacos no serían sino un subgrupo de estos procesos en los que el xenobiótico desencadenante es conocido. La hipotética intervención de agentes ambientales en el desencadenamiento de muchas enfermedades ha sido propuesta en colagenosis y enfermedades auto o disimmune, enfermedades neurodegenerativas y procesos de base metabólica, entre otros. En los párrafos que siguen se desarrollan los conocimientos existentes a este respecto en lo referente al polimorfismo oxidativo de DBQ, que están en la base de la justificación de este trabajo.

4.5.1. Neoplasias

El interés por la posible relación surgió en 1981, cuando Idle et al. publicaron un estudio sobre la distribución del fenotipo oxidativo de DBQ en un grupo de 59 pacientes nigerianos de raza negra portadores de tumores diversos, especialmente digestivos. Todos los enfermos salvo uno eran EM, un exceso que alcanzaba significación estadística al compararlo con los controles. Este trabajo es muy criticable desde el punto de vista metodológico por la cortedad y heterogeneidad de la serie, y además sus conclusiones no son aplicables a otras zonas del mundo (la etiopatogenia del hepatoma, por ejemplo, es totalmente distinta), pero sirvió para abrir una línea de investigación muy interesante en la que se han obtenido avances importantes que se resumen a continuación.

4.5.1.1. Cáncer de vejiga: En un estudio se ha detectado una mayor capacidad oxidativa en pacientes con urotelioma vesical que estuvieron sometidos a exposición profesional a carcinógenos, pero sin diferencias en la distribución del fenotipo (Benítez et al. 1990). Tales diferencias fueron sugeridas, pero no firmemente establecidas, por Cartwright et al., 1984). En otro estudio se señaló que los sujetos con urotelioma invasor o de alta agresividad eran metabolizadores más rápidos que los demás y que los controles (Kaisary et al., 1987), pero intencionadamente se excluyeron aquellos enfermos con antecedentes de exposición profesional. En enfermos de urotelioma de origen japonés no expuestos a riesgo profesional no se detectó diferencia alguna en su capacidad oxidativa de DBQ con respecto a los controles (Horai et al., 1988).

4.5.1.2. Cáncer de pulmón: Los resultados de los estudios publicados son contradictorios. Algunos no detectan ninguna diferencia respecto a controles y otros señalan un exceso de metabolizadores rápidos, especialmente en los tipos epidermoide y microcítico (Benítez et al., 1991), que son los más estrechamente relacionados con el consumo de tabaco. La discusión en profundidad de esta cuestión queda fuera de los objetivos de esta introducción, por lo que se remite al lector interesado a una revisión reciente (Caporaso et al., 1991b), aunque hay que advertir que estos autores son "parte interesada" en la discusión. Es interesante reseñar, sin embargo, que un carcinógeno presente en el humo del tabaco, denominado NNK (4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona) sigue la vía oxidativa P450IID6, y es activado por ella (Penman et al., 1993).

4.5.1.3. Cáncer de mama: Hay tres estudios sobre la distribución de este fenotipo y los tres coinciden en mostrar un ligero exceso de metabolizadoras lentas, del orden de un 5 % más que en la población general (Pontin et al., 1990; Ladero et al., 1991a; Huober et al. 1991).

4.5.1.4. Otros tumores : acerca del cáncer de colon y recto sólo hay un estudio, que no detecta relación alguna (Ladero et al., 1991b). La relación del polimorfismo oxidativo de debrisoquina con el cáncer gástrico ha sido estudiada por un solo grupo con resultados poco consistentes, que sugieren que hay un exceso de metabolizadores lentos en los enfermos con tumor de tipo intestinal (Roots et al., 1987). Los mismos autores comunican

hallazgos equiparables, pero también de dudosa significación, en tumores malignos de laringe y faringe. Un estudio sobre linfomas malignos (Hodgkin y no-Hodgkin) tampoco detecto diferencia alguna con los controles (Philip et al. 1987a).

4.5.2 Enfermedades neurológicas y psiquiátricas

4.5.2.1. Enfermedad de Parkinson

La analogía estructural entre el insecticida Paraquat y el ion 1-metil-4-fenil-piridinio (MPP^+), el metabolito de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetradidropiridina (MPTP), responsable de su neurotoxicidad sobre la sustancia nigra (Jiménez-Jimenez y Ladero 1990), junto con la demostración de una estrecha correlación positiva entre los índices de venta de pesticidas y la prevalencia de enfermedad de Parkinson en varias zonas del Canadá, sugirió a Barbeau y cols (1986) que podía existir una relación entre los pesticidas y esta enfermedad. Como muchos pesticidas son metabolizados por el sistema P450, este mismo grupo determinó el polimorfismo oxidativo de debrisoquina en una serie de enfermos de Parkinson, utilizando a sus cónyuges como controles (Barbeau et al 1985, Poirier et al., 1987); su conclusión final fue que los sujetos con fenotipo lento inician la enfermedad a una edad más temprana que los metabolizadores rápidos. Como ocurría con el cáncer de pulmón, los estudios posteriores son contradictorios (Ladero et al., 1989) la respuesta definitiva se obtendrá cuando haya suficientes estudios con técnicas de genotipificación, como recientemente han señalado

Steiger et al. (1992) en una exhaustiva revisión de los trabajos publicados hasta la fecha. De momento, los dos únicos estudios sobre genotipificación publicados detectan una frecuencia más elevada del genotipo wt/CYP2D6B en pacientes que en controles sanos. (Armstrong et al., 1992; Smith et al., 1992).

4.5.2.2. Otras enfermedades neurológicas y psiquiátricas

El grupo de Steventon, rozando en ocasiones la doble y hasta la triple publicación, ha señalado que la distribución del polimorfismo oxidativo de debrisoquina es similar en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Steventon et al., 1990) y con enfermedad de la neurona motora (Steventon et al., 1988) y en controles sanos. Nuestro grupo ha confirmado estos hallazgos preliminares en una serie más amplia de pacientes con demencia de tipo Alzheimer (Benítez et al. 1993) y en un grupo de 18 enfermos con enfermedad de la motoneurona (datos no publicados). Tampoco un estudio realizado en China ha detectado diferencias en la enfermedad de Alzheimer (Liu et al., 1992).

En su grupo de 769 controles sanos de origen sueco, Bertilsson et al. (1989) pudieron comprobar que los 51 individuos PM mostraban tasas más bajas en la escala de psicastenia y más elevada en la de respuestas extremas que los EM. Llerena et al. (1989) se vieron sorprendidos cuando tres de los seis voluntarios sanos que aceptaron participar en un ensayo clínico en fase I resultaron ser PM, un porcentaje demasiado alto como para ser casual. Estos mismos investigadores, mientras realizaban su

estudio inicial en controles sanos, procedentes en su mayoría de un colectivo bastante cerrado y poco variable (estudiantes de Medicina de una sola Facultad) comprobaron cómo el porcentaje de PM iba disminuyendo conforme aumentaba la casuística, como si los EM precisaran una mayor garantía de seguridad antes de someterse a la prueba (comunicación personal). Es posible que la isoenzima P450IID6 esté involucrada en el metabolismo de algún mediador cerebral y que los PM tengan rasgos psicológicos que, siendo normales, les impulsen a asumir más riesgo que los EM. Sin embargo, ni los numerosos estudios de fenotipación llevados a cabo en pacientes psiquiátricos sometidos a terapéuticas con tricíclicos o neurolépticos (ver sección 4.6) ni un estudio de genotipación realizado en pacientes esquizofrénicos (Vallada et al. 1992) muestran diferencias en relación con los grupos de control.

4.5.2.3. Enfermedades "disinmunes" y del colágeno

En la introducción de este capítulo se ha señalado la posibilidad teórica de que xenobióticos presentes en el medio puedan actuar desencadenando la reacción inmunitaria anormal que conduce al desarrollo de este tipo de enfermedades, incidiendo sobre una predisposición genética doble; por un lado una estructura del sistema inmunitario que permite o facilita respuestas inmunes anormales contra autoantígenos y por otra una configuración del sistema de metabolización de xenobióticos que permita la aparición de metabolitos capaces de generar tales autoantígenos, presumiblemente actuando como haptenos.

La experiencia publicada acerca del polimorfismo oxidativo de DBQ es escasa. Sólo conocemos un estudio sobre el lupus eritematoso diseminado "espontáneo" (Baer et al., 1986), que detecta un exceso (21 % frente a 8 % en controles) de PM en un grupo de 42 pacientes portadores de esta enfermedad. El grupo es demasiado pequeño como para poder descartar un error beta significativo y es necesario contrastarlo con estudios más amplios, preferentemente con métodos de genotipado.

Un segundo estudio en 84 enfermos con esclerodermia no mostró diferencias en la distribución del fenotipo oxidativo de DBQ, aunque si un exceso de metabolizadores lentos de mefenitoína (un polimorfismo independiente) y de N-hidroxiladores rápidos de dapsona, aunque en este caso no se ha confirmado que exista polimorfismo genético (May et al. 1990).

No conocemos ningún estudio previo al que aquí se presenta sobre la distribución del polimorfismo oxidativo de DBQ en la artritis reumatoide.

Un aspecto diferente, a priori muy interesante pero que parece haber despertado poco interés es la constatación de que en la variedad de hepatitis crónica autoinmune caracterizada por la presencia de autoanticuerpos anti-LKM₁, el antígeno contra el que se dirigen estos anticuerpos es precisamente la molécula de la isoenzima P450IID6 (Zanger et al., 1988). No obstante se desconoce si este trastorno juega un papel patogénico en la enfermedad o si, como parece más probable, es un epifenómeno más

originado por el disturbio inmunológico que se produce en la misma. Un significado parecido tiene el hallazgo de que los anticuerpos anti-LKM₂, que se detectan en un tipo de hepatitis crónica inducida por ácido tienílico, están dirigidos contra la isoenzima P450 encargada del metabolismo de esta sustancia, que parece ser la misma involucrada en el polimorfismo oxidativo de mefenitoina (Beaune et al., 1987).

4.6 Consecuencias farmacológicas del polimorfismo oxidativo de tipo debrisoquina/esparteína

Este polimorfismo es el de mayor importancia práctica en este sentido, porque la mayor parte de los fármacos involucrados en él tienen una amplia utilización y porque esta isoenzima del sistema P-450 es susceptible de inhibición o bloqueo por sus propios sustratos y por otras moléculas, especialmente quinidina (Brosen et al, 1987, Caporaso & Shaw 1991) y en menor grado cloroquina (Inaba et al 1985) y cimetidina (Philip et al, 1989). No obstante la relación de este aspecto con el tema de esta Tesis es sólo marginal, y no lo desarrollaremos en profundidad. Existen excelentes revisiones al respecto que pueden ser consultadas por las personas interesadas (Brosen y Gram 1989, Brosen 1990, Eichelbaum y Gross 1990). Por lo tanto sólo se analizarán los aspectos más novedosos o llamativos.

En la Tabla 2 figuran los medicamentos que han sido identificados hasta el momento como usuarios de esta vía metabólica. Se ha diseñado un modelo molecular genérico al que deben

adaptarse las moléculas para seguir esta vía metabólica (Islam et al, 1991).

TABLA 2

Medicamentos que siguen oxidación polimórfica tipo DBQ

1. Triciclicos	2. Antiarrítmicos	3. Beta-bloq.
Nortriptilina	Esparteína	Metoprolol
Desimipramina	N-Propilajmalina	Bufuralol
Clomipramina	Propafenona	Timolol
Imipramina	Flecainida	Propranolol
Amitriptilina	Encainida	
4. Neurolépticos	5. Inhibidores recaptación serotonina	
Perfenacina	Paroxetina	
Tioridacina	Fluoxetina	
Haloperidol	Fluvoxamina	
Clozapina		
6. Otros fármacos		
Dextrometorfano	Debrisoquina	
Codeína	Perhexilina	
Metoxianfetamina	Fenformina	

En la mayoría de los casos, los PM tienen tendencia a sufrir más efectos secundarios, debido a que los niveles plasmáticos alcanzados a igualdad de dosis son más elevados, o a que la vida media del fármaco se prolonga. La importancia práctica de esta tendencia varía para cada fármaco en función de su margen terapéutico y de la existencia de otras vías metabólicas o de eliminación alternativas. Resultó ser grave para los pacientes que recibían los dos medicamentos en los que primero se identificó el polimorfismo, debrisoquina y esparteina. Los PM tratados con ellos sufrían hipotensión ortostática (Mahgoub et al. 1977)* y ruptura uterina (Newton et al., 1966), respectivamente, con bastante frecuencia. Las consecuencias para los EM consisten en una menor eficacia terapéutica si el fármaco es metabolizado rápidamente. No se considera necesario determinar el fenotipo oxidativo en todos los enfermos que vayan a tomar algún fármaco que siga esta vía, pero si se dispone de la técnica, sí es aconsejable hacerlo en aquellos que vayan a ser tratados con tricíclicos, neurolépticos y antiarrítmicos involucrados en este polimorfismo (Brosen, 1990). El caso de los nuevos antidepresivos inhibidores de la recaptación de serotonina es también interesante, ya que está empezando a comprobarse que existen diferencias de acción en función del fenotipo (Crewe et al., 1992). La perhexilina, un antiarrítmico de introducción relativamente reciente, alcanza fácilmente niveles plasmáticos tóxicos en PM de DBQ, de modo que el 50 % de los casos de neuropatía periférica inducidos por este fármaco se dan en sujetos con este fenotipo (Shah et al., 1982). No obstante, no se debe responsabilizar automáticamente al fenotipo lento de los efectos secundarios

provocados por los medicamentos que siguen esta vía: las reacciones distónicas inducidas por neurolepticos no parecen más frecuentes en metabolizadores lentos (Spina et al., 1991).

Un caso especial es el de la codeína. El 10 % de la sustancia es transformada en morfina por la isoenzima CYP2D6 y el resto origina metabolitos inactivos. La codeína también lo es. Por lo tanto, la codeína es ineficaz en los PM de DBQ, ya que no generan el único metabolito activo (Dayer et al., 1988).

Otra cuestión a tener en cuenta es la de las interacciones medicamentosas. Cuando un EM recibe simultáneamente dos sustratos de la isoenzima o un sustrato con un inhibidor, los niveles plasmáticos de los sustratos pueden subir peligrosamente. La administración de un tricíclico, por ejemplo, a un sujeto tratado con alguno de estos fármacos inhibidores o con un neuroleptico que compite con el tricíclico, implica un mayor riesgo de efectos secundarios (Eichelbaum & Gross, 1990). En lo que se refiere a la codeína, las consecuencias son las opuestas, ya que la inhibición de su transformación en morfina la priva de su efecto analgésico; como la asociación de codeína con tricíclicos es relativamente frecuente en el tratamiento del dolor de enfermos terminales, no debe perderse de vista esta circunstancia que explicaría la aparente ineficacia de este fármaco en esta situación (Dayer et al., 1988)

Un último aspecto es la posible trascendencia de este sistema polimórfico sobre la metabolización de sus sustratos en

la etapa de la morfogénesis fetal. La prescripción de fenotiacinas durante el embarazo se asocia a una tasa elevada de malformaciones, pero por el momento se desconoce la eficacia metabólica de este sistema en las fases intrauterinas del desarrollo (Jacqz-Aigrain 1989).

5. POLIMORFISMO ACETILADOR

5.1. Conceptos básicos:

Las oxidaciones que se han revisado en el capítulo anterior son, junto con las reacciones de reducción e hidrólisis, un grupo de mecanismos en virtud de los cuales el hígado y otros tejidos modifican moléculas de xenobióticos dejando al descubierto grupos muy reactivos que de inmediato han de reaccionar con otras moléculas para generar compuestos estables. Este conjunto de reacciones se denominan biotransformaciones de Fase I cuando intervienen en el metabolismo de xenobióticos y tienen como objetivo facilitar su eliminación del organismo (Vessey 1990).

Esos metabolitos intermedios altamente reactivos pueden ser muy peligrosos si se combinan con elementos estructurales o enzimáticos de la célula. Por ello existen otras enzimas que inmediatamente los unen a un radical que estabiliza la molécula y la hace más polar (hidrosoluble), facilitando de este modo su excreción posterior. Estas reacciones de conjugación son las biotransformaciones de Fase II. La más utilizada por el organismo es la glucuronización, pero también son habituales las conjugaciones con radicales acetato, metilo, sulfato, glutatión, etc. (Vessey 1990).

Las reacciones de acetilación, en concreto, son utilizadas por xenobióticos que tienen un radical amino ($-NH_2$) en su molécula, especialmente aminas aromáticas (arilaminas) e hidracinas

(Weber 1987). Algunas sustancias, como PAS (Jenne 1965) y PABA (La Du 1971) se acetilan con una velocidad similar en todos los individuos, de forma que las frecuencias de las distintas tasas de conjugación se distribuyen de forma unimodal. Se trata de la denominada acetilación monomórfica. Por el contrario, otras muchas sustancias muestran grandes diferencias interindividuales en la velocidad con la que son acetiladas, de modo que la distribución de frecuencias de las tasas de acetilación de un grupo amplio de individuos se refleja en una gráfica bimodal. Es la denominada acetilación polimórfica (Price-Evans 1964) o polimorfismo acetilador.

5.2 Bases genético-moleculares

Este polimorfismo es totalmente independiente del oxidativo de debrisoquina, pero comparte unos mecanismos genéticos prácticamente idénticos. Se trata de un tipo de herencia mendeliana simple. El alelo dominante es el único que confiere la capacidad de síntesis de una molécula enzimática funcionalmente activa, de modo que los sujetos homo o heterocigotos para el alelo dominante son acetiladores eficientes (acetiladores rápidos), en tanto que los homocigotos para el alelo (o los alelos) recesivo(s) son acetiladores lentos (Price-Evans 1960).

Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con el polimorfismo oxidativo de debrisoquina, los acetiladores lentos conservan aún cierta capacidad de acetilación de sustratos. Esto parece debido a que existen otras acetiltransferasas, las responsables

de la acetilación monomórfica antes citada, que son capaces también de procesar estos sustratos, aunque con menor eficacia. De este modo, un acetilador rápido lo es porque dispone de una doble actividad enzimática, la monomórfica y la polimórfica, mientras que un acetilador lento sólo poseería la actividad monomórfica.

No deja de ser sorprendente que, siendo el polimorfismo acetilador conocido desde hace más de 30 años, no se haya profundizado en sus mecanismos moleculares tanto como en el polimorfismo oxidativo de debrisoquina, descubierto bastantes años después. Hasta hace poco se discutía incluso si los acetiladores lentos lo son porque carecen de molécula proteica con actividad enzimática o porque tienen una forma molecular ineficaz (Patterson et al., 1980; Hein et al., 1982). Lo que es evidente es que la actividad enzimática se concentra fundamentalmente en el citoplasma de los hepatocitos (Weber 1987) pero está presente también en el intestino delgado (Jenne 1965).

Tan sólo en los tres últimos años se han empezado a esclarecer los fundamentos genómicos de este polimorfismo. Blum et al. (1990) han clonado y secuenciado tres genes humanos a los que han denominado respectivamente *NAT1*, *NAT2* Y *NATP*. Los genes *NAT1* y *NAT2* se localizan en el cromosoma 8, mientras que el gen *NATP* no ha sido localizado todavía. La secuencia del gen *NAT2* se corresponde estrechamente con la secuencia de aminoácidos de la N-acetil-transferasa polimórfica humana, lo que indica que casi con toda seguridad es el gen que codifica la síntesis de esta enzima.

La secuencia del gen *NAT1* se corresponde con un producto proteico que probablemente represente a la enzima N-acetil-transferasa monomórfica. Por último, según estos autores, el gen *NATP* es un pseudogen inactivo. Los genes *NAT1* y *NAT2* comparten el 87 % de su secuencia de nucleótidos y codifican sendas proteínas de 290 aminoácidos que son idénticas en un 81 %.

Por su parte, Deguchi et al (1990), en un trabajo realizado prácticamente al mismo tiempo que el anterior, aislaron tres variantes alélicas del gen de la acetil-transferasa polimórfica (por lo tanto, presumiblemente, del gen *NAT2*), y han identificado en seres humanos 5 de las 6 posibles combinaciones de estos alelos. Al mismo tiempo, y mediante una técnica de sobrecarga oral con isoniacida clasificaron a estos mismos sujetos en acetiladores rápidos, intermedios y lentos (ver más adelante). Los individuos homocigotos para el gen (alelo) 1 (genotipo I en la clasificación propuesta por los autores) eran acetiladores rápidos, con dos excepciones. Los sujetos heterocigotos para el alelo 1 con los alelos 2 o 3 (genotipos II y III, respectivamente) eran acetiladores intermedios. Finalmente los sujetos heterocigotos para los alelos 2 y 3 y los homocigotos para el alelo 3 (genotipos IV y V respectivamente) eran acetiladores lentos. No se identificó ningún sujeto homocigoto para el alelo 2. Por lo tanto, el alelo 1, de 5,5 kb, es el dotado de la capacidad de codificar la síntesis de la molécula enzimática activa.

Un nuevo paso en el camino hacia el esclarecimiento total de estos mecanismos, fue el dado por Graf et al. (1992), quienes

señalan la existencia de un alelo funcionante ("Wild type") y de tres alelos mutantes no funcionantes (M1, M2 y M3) y realizan un estudio en un grupo de 81 voluntarios sanos de origen europeo, en el que demuestran que la determinación del genotipo identifica correctamente a todos los acetiladores rápidos y a 33 de los 35 acetiladores lentos.

La última clasificación de los alelos variantes del gen *NAT2* es la propuesta por Grant (1993), que distingue dos alelos funcionantes asociados al fenotipo rápido, denominados R1 y R2, y seis alelos no funcionantes, ligados al carácter de acetilador lento, denominados S1A, S1B, S1C, S2, S3 y S4. Los alelos S1B, S2 y S3 son, respectivamente, los anteriormente conocidos como M1, M2 y M3. Los otros son de nueva descripción. Los alelos R1 y S1A son los más frecuentes en la raza blanca.

5.3 Distribución en poblaciones

Hay una gran variabilidad en la distribución de este polimorfismo en los diversos grupos étnicos. Entre los esquimales hay un predominio casi absoluto de acetiladores rápidos (ya sean homo o heterocigotos), porcentaje que desciende ligeramente entre chinos y japoneses. En los grupos de raza blanca tiene a haber un ligero predominio de acetiladores lentos, que por ejemplo representan el 57 % en la población española (Ladero et al, 1979), y este predominio tiende a incrementarse en la mayoría de las poblaciones de raza negra. Prácticamente en todos los países o áreas geográficas del mundo se han realizado estudios de

distribución del polimorfismo acetilador en las poblaciones correspondientes, por lo que obviamos reproducir centenares de citas. Este extremo ha sido objeto de varias revisiones (Clark 1985; La Du 1971; Ellard 1976). Se ha llamado la atención sobre la estrecha correlación ($r = 0,88$, $p < 0,001$) entre la frecuencia del alelo lento (q) y la latitud geográfica en el hemisferio norte en el área del Pacífico. El significado de este hecho se desconoce (Price-Evans, 1976).

La gran frecuencia del fenotipo lento, muy superior a la de los metabolizadores lentos de debrisoquina, indica que la posesión de este fenotipo no implica una desventaja genética, sino más bien al contrario, al menos en algunos grupos étnicos en los que es predominante. Probablemente el hecho de que los acetiladores lentos posean una capacidad significativa de acetilación, debido a que tienen actividad de NAT monomórfica, les proteja de la acción nociva de xenobióticos que se inactivan por esta vía. No obstante, como veremos más adelante, la posesión del fenotipo acetilador lento comporta más inconvenientes que ventajas tanto en lo referente a efectos secundarios de fármacos como en el riesgo de padecer determinadas enfermedades espontáneas.

5.4 Aspectos técnicos:

Teóricamente, cabe determinar el fenotipo acetilador administrando cualquiera de los sustratos de la NAT polimórfica y midiendo en sangre, en orina, o en ambas, la proporción entre la sustancia original y su metabolito acetilado. Los estudios

iniciales se realizaron con isoniacida (Price-Evans 1960), que no se ha abandonado en algunos laboratorios, pero la mayor parte de los estudios se han llevado a cabo con sulfametacina, que es fácil de determinar con un método espectrofotométrico clásico (Varley 1962). La dapsona y la salazopirina también han sido empleadas en algunos estudios (ver Weber, 1987). La administración de fármacos implica un riesgo, aunque mínimo, de reacciones adversas, por lo que el método descrito por Grant et al (1984) que emplea cafeína, ofrece más seguridad a cambio de una mayor dificultad, ya que exige la identificación de un metabolito menor de la cafeína, el AFMU, y el empleo de técnicas cromatográficas más complejas y caras.

La discriminación entre acetiladores rápidos homocigotos y heterocigotos mediante técnicas basadas en la administración de un sustrato no es segura, aunque el empleo de dosis elevadas ("de saturación") de ese sustrato permiten una aproximación a este objetivo (Lee y Lee 1982 y Deguchi et al., 1990). La puesta a punto de las técnicas de identificación alélica que se han citado anteriormente permitirá, como en el caso del polimorfismo oxidativo de DBQ, clasificar con seguridad a los sujetos como acetiladores rápidos homo o heterocigóticos y acetiladores lentos, y además permitirá conocer qué alelos mutantes portan los pertenecientes a estas dos últimas categorías.

5.5 Factores modificadores:

5.5.1 Edad: La edad no parece modificar de forma significativa la capacidad de acetilación polimórfica (Farah et al 1977, Pontiroli et al. 1985, Philip et al 1987, Ladero et al. 1983). Sin embargo la maduración de la actividad enzimática no está presente desde el nacimiento, por lo que la determinación del fenotipo no es fiable en los primeros años de la vida (Pariante-Khayat et al., 1991). Algunos estudios han detectado, en sujetos mayores, un incremento de la tasa de acetilación (Ladero et al. 1989, Siegmund et al., 1990), probablemente como consecuencia de modificaciones farmacocinéticas del sustrato relacionadas con el envejecimiento, pero no en grado suficiente como para modificar el fenotipo y convertir a un acetilador lento en rápido.

5.5.2 Sexo: Ninguno de los estudios realizados en seres humanos han mostrado diferencias en la distribución del polimorfismo acetilador en relación con el sexo (Ladero et al 1983, Ladero et al., 1989, Siegmund et al., 1991, Philip et al. 1987, Poulsen & Nilsson 1985).

5.5.3 Peso corporal: El hallazgo de una correlación positiva significativa entre el peso corporal y la tasa de acetilación en acetiladores rápidos (Chapron et al., 1982) no se ha visto confirmado posteriormente por un estudio que incluía un número mucho más elevado de sujetos (Philip et al, 1987). Tampoco parece compaginarse esta presunta diferencia con la práctica igualdad en la tasa de acetilación que hemos encontrado en nuestros controles de ambos sexos, tanto lentos como rápidos (Ladero et al, 1979).

5.5.4 Factores hormonales: Ya se ha señalado que el sexo no influye sobre la distribución del fenotipo acetilador. Sin embargo hay datos experimentales en la rata que sugieren que los estrógenos incrementan la capacidad de acetilación (Zidek & Janku, 1979). Por otra parte, la administración de dosis elevadas de cortisona a conejos (DuSouich & Courteau 1981; Reeves et al., 1989) y a seres humanos (Sarma et al., 1980) si parece incrementar la capacidad de acetilación, probablemente por estímulo de la síntesis de la molécula enzimática.

5.5.5 Enfermedades preexistentes: La insuficiencia hepática avanzada altera la capacidad de acetilación polimórfica y puede hacer que un genotipo rápido se comporte como un fenotipo lento (Levi et al., 1968). La insuficiencia renal avanzada puede también modificar el fenotipo por afectar en grado distinto a la eliminación del sustrato libre y del acetilado (Hall 1981; Du Souich et al., 1979), por lo que no es fiable la determinación del fenotipo acetilador con métodos basados en la administración de sustratos con cifras de creatinina superiores a 2 mg/dl. Una observación un tanto anecdótica es que el estado nutricional no afecta a la capacidad de acetilación polimórfica (Shastri, 1982).

5.5.6 Interacciones medicamentosas: Como norma general, los diferentes sustratos de la N-acetil transferasa polimórfica compiten entre sí para la utilización de la enzima. Es importante tener esto en cuenta cuando se quiere determinar el polimorfismo acetilador en individuos que están recibiendo alguno de tales fármacos: sulfamidas, procainamida, hidralacina, etc., ya que

puede clasificarse erróneamente como acetilador lento a un sujeto que en realidad es rápido (Albengres et al., 1977; Schneck et al., 1979; Aubry et al., 1980). El consumo de alcohol en las horas previas a la determinación del fenotipo acetilador puede incrementar ligeramente la tasa de acetilación, ya que en su metabolismo produce acetato, que es el sustrato utilizado por la N-acetiltransferasa para llevar a cabo su reacción específica (Olsen & Morland, 1978). Sin embargo, no parecen existir sustancias capaces de bloquear no competitivamente la enzima, tal y como ocurría con la isoenzima P450IID6; al menos así se ha comprobado con cimetidina (Wright et al., 1984). La NAT polimórfica tampoco es inducible (Ladero et al., 1980).

5.6 Polimorfismo acetilador y reacciones adversas a fármacos:

Este es un aspecto que sólo de forma marginal afecta al tema de este trabajo, por lo que no se hará especial hincapié en él (ver revisiones de Ladero 1981, 1984 y 1992, Weber 1987). Las reacciones de tipo lúpico inducida por hidralacina son prácticamente exclusivas de los sujetos acetiladores lentos (Strandberg 1976; Batchelor 1980; Mansilla-Tinoco 1982) y las inducidas por procainamida mucho más frecuentes en los poseedores de este mismo fenotipo (Woosley et al, 1978). En ambos casos el motivo parece ser que la fracción del fármaco que no se acetila, y que es muy superior en acetiladores lentos, sigue otras vías metabólicas que conducen a la producción de sustancias capaces de reaccionar con macromoléculas celulares y de originar neoautoantígenos contra los que se desencadena la reacción inmunitaria de tipo lúpico.

La hepatitis por isoniacida no es más frecuente en acetiladores rápidos, tal y como se señaló en un principio (Mitchell et al., 1976) como numerosos estudios sobre grupos muy amplios de sujetos tratados con este fármaco han venido a demostrar (Weber 1987; Price-Evans 1989).

Los efectos secundarios de las sulfamidas que sufren acetilación polimórfica pueden dividirse en dos categorías. Por un lado, aquellos que dependen de niveles sanguíneos elevados del medicamento, y que lógicamente son más frecuentes en acetiladores lentos (Price-Evans, 1989). Estos efectos son frecuentes y, en general poco importantes (náuseas, vértigos, hemolisis leve, metahemoglobinemia). En segundo lugar existen reacciones idiosincráticas, mucho más graves e infrecuentes (agranulocitosis, reacciones cutáneas graves), cuya aparición no guarda relación con los niveles plasmáticos de la sustancia pero que también son más frecuentes en acetiladores lentos (Rieder et al., 1991); en este caso la relación con el polimorfismo acetilador se debe a que los metabolitos que originan estas reacciones, cuyo mecanismo es inmunitario, se generan por vías oxidativas alternativas a la acetilación deficiente (Pirmohamed et al., 1991).

5.7 Polimorfismo acetilador y enfermedades "espontáneas"

En la Tabla 3, resumida y modificada de Price-Evans (1989), figuran las principales enfermedades en las que se ha estudiado la distribución del polimorfismo acetilador. En la mayor parte de los casos no se han hallado diferencias con respecto a los

controles; en otros se han obtenido conclusiones precipitadas a partir de grupos de pacientes demasiado pequeños o sin controles adecuados, y en algunos, por fin, se ha identificado una relación bastante firme entre polimorfismo acetilador y riesgo de padecer una determinada enfermedad. Se comentan a continuación los aspectos más interesantes de este amplio campo, que sigue abierto a la investigación especialmente ahora que las modernas técnicas de genotipación van a permitir confirmar o desmentir los datos hasta ahora existentes.

5.7.1. Enfermedades neoplásicas:

El cáncer de vejiga por exposición laboral a carcinógenos es más frecuente en acetiladores lentos (Ladero et al., 1985; Woodhouse et al., 1982). Esto es así, probablemente, porque los carcinógenos implicados son arilaminas que sufren acetilación polimórfica, reacción que las inactiva como carcinógenos vesicales. La activación tiene lugar por vías oxidativas que funcionan más activamente en acetiladores lentos.

No se ha encontrado relación entre el polimorfismo acetilador y el riesgo de otras neoplasias, como el cáncer de pulmón (Ladero et al., 1991c), el cáncer de mama (Ladero et al., 1987a) o el cáncer de colon (Ladero et al., 1991d). Esta cuestión se analiza en profundidad en una reciente revisión (Caporaso et al., 1991b).

T A B L A 3

Enfermedades en las que se ha estudiado la distribución del
polimorfismo acetilador (*)

1. Tumores malignos

Cáncer de vejiga
Cáncer de mama
Cáncer de pulmón
Cáncer de colon
Cáncer de estómago
Cáncer de laringe y cavum

2. Enfermedades neuropsíquicas

Enfermedad de Parkinson
Demencia de tipo Alzheimer
Enfermedad de la motoneurona
Esclerosis múltiple
Esquizofrenia
Depresión

3. Enfermedades disinmunes

Lupus eritematoso
Artritis reumatoide
Diabetes de tipo 1
Psoriasis
Colitis ulcerosa
Enfermedad de Crohn
Enfermedad de Basedow

4. Trastornos metabólicos

Porfiria cutánea tarda
Síndrome de Gilbert
Diabetes de tipo 2
Polineuropatía diabética

5. Otras enfermedades

Tuberculosis
Lepra
Cardiopatía isquémica
Mastopatía fibroquística

(*) Esta relación no es exhaustiva

5.7.2 Enfermedades auto- o dis inmunes:

A pesar de lo que podría esperarse ante el mayor riesgo de reacciones lupoides por determinados fármacos en acetiladores lentos, y de los resultados de estudios pioneros, el lupus eritematoso "esencial", tanto sistémico como cutáneo, no es más frecuente en acetiladores lentos (Ladero et al., 1988).

Sin embargo, la diabetes mellitus de tipo I sí parece algo más frecuente en acetiladores rápidos, de acuerdo con un metaanálisis (Price-Evans 1989) en el que, sin embargo, se incluye un estudio de nuestro grupo que no concuerda con los resultados obtenidos en otras poblaciones (Ladero et al., 1982).

La enfermedad inflamatoria intestinal crónica ha sido objeto de bastantes estudios, dado el uso terapéutico que en ella se hace de la salazopirina y por las mismas razones que se indican más adelante para la artritis reumatoide. En la mayoría de ellos se detecta una ligera tendencia a un exceso de acetiladores lentos, aunque un metaanálisis formal es imposible por la heterogeneidad de los grupos de estudio y la ausencia de grupos de control adecuados (revisado por Price-Evans, 1989).

5.7.3. Artritis reumatoide (A.R.):

Este proceso entra plenamente dentro del apartado anterior, pero dado que es el objetivo de esta Tesis Doctoral, se analiza por separado. El interés por la relación entre esta enfermedad

y el polimorfismo acetilador viene de antiguo y se debe a que la salazopirina, un profármaco que se desdobla en la luz intestinal en sus dos componentes - ácido 5-amino salicílico y sulfapiridina - (Ireland & Jewell, 1990) fue diseñada inicialmente para el tratamiento de la artritis reumatoide (Svartz, 1942), y a que su mitad sulfamídica sufre acetilación polimórfica (Schröder y Price-Evans, 1972). Posteriormente la salazopirina ha encontrado su principal aplicación terapéutica en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal crónica (Watkinson, 1986), pero ha seguido empleándose como fármaco de segunda línea en el tratamiento de la artritis reumatoide (de Villa et al., 1991). Por lo tanto, la mayor parte de los estudios realizados sobre distribución del polimorfismo acetilador en la artritis reumatoide tenían como objetivo principal analizar la repercusión del polimorfismo acetilador sobre la eficacia y tolerancia del fármaco, y sólo de manera secundaria se referían a posibles diferencias en su distribución con respecto a la población general.

5.7.3.1. Distribución del polimorfismo acetilador en la artritis reumatoide:

El primer estudio publicado (Oka & Seppala, 1978) sugirió ya un exceso de acetiladores rápidos en un grupo de 39 pacientes con A.R., ya que lo eran el 59 % de los enfermos frente a un 45 % de los controles. No se hace estudio por sexos ni se indica si había lapones entre los sujetos de estudio (en este grupo étnico hay un marcado predominio de acetiladores rápidos).

En ese mismo año (Lawson et al., 1978) se publicó un estudio sobre 25 enfermos, de los que sólo el 28 % eran acetiladores rápidos, frente al 36 % de los 25 controles. Este mismo ligero exceso de acetiladores lentos fue comunicado al año siguiente (Ehrlich et al., 1979) en un estudio realizado en los EE.UU. sobre 25 enfermos, de los cuales 19 eran acetiladores lentos. Este estudio no aporta grupo control, pero la frecuencia de acetiladores lentos en norteamericanos blancos es del 55 %. De todos modos no se señala la raza de los enfermos, y es sabido que en la raza negra la frecuencia de acetiladores lentos es aún mayor.

El primer estudio sobre un grupo relativamente amplio de enfermos fue el realizado en Suecia (Leden et al., 1981) sobre 61 enfermos, de los cuales el 59 % eran acetiladores lentos. Tampoco se aporta grupo control ni referencia específica a la distribución de este polimorfismo en la población sueca. Tampoco lo aporta un pequeño estudio sobre 13 enfermos (Kelly & Griffiths, 1981), de los que 8 eran acetiladores rápidos.

Ehrenfeld et al. (1983) determinaron el fenotipo acetilador en 47 enfermos de origen judío y en 47 controles afectados de colitis ulcerosa, procurando que cada paciente tuviera un control de su mismo origen étnico, dada la diversidad racial de la población israelí (ashkenazis y sefardíes, fundamentalmente). 59,6 % de los enfermos con A.R. y 44,7 % de los afectados de colitis ulcerosa quedaron clasificados como acetiladores lentos. Este estudio es criticable por dos motivos. En primer lugar,

clasifica a 4 enfermos de A.R. como "acetiladores intermedios", categoría que no existe y que denota una técnica inadecuada, y en segundo lugar utiliza como controles a enfermos de un proceso, la colitis ulcerosa, que podría guardar relación con el polimorfismo acetilador.

El siguiente estudio por orden de publicación (Crook et al., 1983) se efectuó sobre 54 enfermos británicos (presumiblemente blancos), el 63 % de los cuales eran acetiladores lentos. La determinación del fenotipo se realizó con isoniacida mientras los enfermos recibían dapsona, y no se aclara en el artículo si este último fármaco fue suspendido temporalmente antes de determinar el fenotipo. Esta cuestión es importante, pues ambos fármacos compiten para la NAT polimórfica y su administración conjunta pudo llevar a clasificar erróneamente como acetilador lento a sujetos con genotipo rápido. En este artículo se señala la distribución del fenotipo por sexos: 8 de 22 varones (36 %) y 12 de 32 mujeres (38 %) eran acetiladores rápidos. No se aportaba grupo control específico.

La serie más amplia estudiada hasta el momento (Pullar et al., 1985) se basó en 149 pacientes, de los cuales 83 (55,7 %) eran acetiladores rápidos. Se trata de un estudio parcialmente retrospectivo y diseñado fundamentalmente para valorar la eficacia y tolerancia de salazopirina, lo que puede introducir un sesgo, ya que no todos los enfermos con A.R. pueden recibir este fármaco (alergia a sulfamidas) o son buenos candidatos (formas particularmente graves que requieren tratamientos más agresivos).

No se incluyó grupo control ni se hizo un análisis por sexos de la distribución del polimorfismo. Pese a todo, este estudio sugiere la existencia de un exceso de acetiladores rápidos en la A.R.

Amos et al. (1986) detectaron un 57,8 % de acetiladores lentos entre los 108 enfermos en quienes determinaron el polimorfismo acetilador. Aunque tampoco aportan grupo control, este porcentaje es muy similar al existente en la población británica de raza blanca. Por el contrario, un nuevo estudio sueco sobre 59 enfermos de A.R. (Dahlqvist & Mjorndal, 1987) detectó un exceso significativo ($p < 0,05$) de acetiladores lentos (76,3 %) en el grupo de casos en comparación con los controles (54,5 %). Un tercer estudio publicado ese mismo año (Taggart et al., 1987) identificó como acetiladores lentos a 19 enfermos de un grupo de 30 (63,3 %). El último estudio publicado hasta el momento (Chalmers et al., 1990) realizado en 45 enfermos que mostraban mala respuesta a tratamiento con AINEs, comunica los resultados de la determinación del fenotipo acetilador en 37 de ellos, de los cuales 19 (51,3 %) eran acetiladores rápidos.

En resumen, se conoce el fenotipo acetilador en un total de 599 enfermos de A.R.. Sin embargo, la gran heterogeneidad étnica de los grupos estudiados, la ausencia de controles adecuados en la mayoría de los estudios, los diferentes criterios de selección de los enfermos en función de la gravedad de su enfermedad, y el hecho de que los protocolos de estudio estuvieran orientados principalmente a comprobar la eficacia y tolerancia de salazopi-

rina y/o dapsona, no permite obtener ninguna conclusión firme en cuanto a la distribución del fenotipo acetilador en la artritis reumatoide, aunque, como ha señalado Price-Evans, quepa inferir una cierta tendencia hacia un exceso de acetiladores rápidos en esta enfermedad (Price-Evans, 1989).

5.7.3.2. Artritis reumatoide, fenotipo acetilador y eficacia y tolerancia de salazopirina.

La eficacia terapéutica de salazopirina en la artritis reumatoide guarda escasa o nula relación con el polimorfismo acetilador, como han señalado diversos autores (Pullar et al., 1985; Bax et al., 1986; Taggart et al., 1987; Chalmers et al., 1990). Esto no es sorprendente si se tiene en cuenta que la fracción activa terapéuticamente de la salazopirina es el 5-ASA, al menos en lo referente a la enfermedad inflamatoria intestinal crónica (Watkinson, 1986). Dado que esta fracción de la salazopirina no se absorbe de manera significativa, es difícil explicar cómo podría actuar a nivel articular en la artritis reumatoide, pero también es poco probable que sea la sulfapiridina la responsable de esta acción, ya que ninguna otra sulfamida la posee.

En lo referente a los efectos secundarios de la salazopirina, está claramente demostrado que son más frecuentes e intensos en acetiladores lentos (ver apartado 5.6 de este mismo capítulo).

5.7.3.3. Polimorfismo acetilador y peculiaridades clínico-evolutivas de la artritis reumatoide.

Algunos de los estudios citados anteriormente han hecho hincapié en la posible relación de algunas peculiaridades clínicas de la artritis reumatoide y un fenotipo acetilador determinado. Ehrlich et al. (1979) comprobaron que 4 de sus 6 enfermos con fenotipo rápido presentaban formas particularmente agresivas de la enfermedad. Una base más firme parece tener el marcado predominio de acetiladores lentos (78 %) en los 24 enfermos con síndrome de Sjögren incluidos en su estudio por Leden et al. (1981). Sin embargo, Ehrenfeld et al. (1983) no confirmaron este extremo. En otros dos estudios (Amos et al., 1986; Chalmers et al., 1990), no detectan diferencias en la gravedad clínica ni las peculiaridades evolutivas en función del polimorfismo acetilador.

CAPITULO II

OBJETIVOS

1. Estudiar la distribución de dos polimorfismos enzimáticos, acetilador y oxidativo de Debrisoquina/esparteína, en un grupo representativo de enfermos con artritis reumatoide y en los correspondientes grupos de sujetos controles sanos.

2. Analizar la posible relación de estos polimorfismos con el riesgo de desarrollar artritis reumatoide y con diversas características epidemiológicas y clínicas de la enfermedad.

CAPITULO III

PACIENTES, MATERIAL Y METODOS

1. Pacientes

Este estudio se ha llevado a cabo en enfermos diagnosticados de artritis reumatoide de acuerdo con los criterios de la American Rheumatism Association revisados en 1988 (Arnett et al., 1988), que figuran en la Tabla 1. Todos los enfermos habían sido estudiados en el Servicio de Reumatología del Hospital Universitario de San Carlos (Madrid) y estaban bajo control clínico periódico en ese Servicio. Todos ellos estaban recibiendo o habían sido tratados con al menos un fármaco considerado como de segunda línea (de Villa et al., 1991), principalmente sales de oro y metotrexate. Los criterios de inclusión se especifican en la Tabla 4.

Todos los enfermos fueron informados verbalmente ante testigo de la naturaleza, objetivos y metódica del estudio, solicitándoles a continuación que participaran libremente en él. El estudio estaba aprobado por el Comité de Ética y Ensayos Clínicos del Hospital.

Ochenta enfermos dieron su consentimiento informado y fueron incluidos en el estudio. Veintidós eran varones y 58 mujeres. Se recogieron los siguientes datos : Edad, edad a la que fue diagnosticada la enfermedad, enfermedades concomitantes Y antecedentes de alergia a medicamentos y datos analíticos Y radiológicos relevantes.

La edad media de los 80 enfermos en el momento de su inclusión en el estudio era de 60,9 años, D.E. 9,7, límite inferior 22 años, límite superior 82, distribución no diferente de la normal (test de Kolmogorov-Smirnov). Estas mismas cifras eran de 59,3 años (D.E. 9,6) y 65,3 años (D.E. 8,7) en los pacientes varones y mujeres, respectivamente ($p < 0,05$).

El fenotipo acetilador fue realizado en 69 enfermos (22 varones, 47 mujeres). En los 11 restantes no se llevó a cabo este procedimiento porque estaban en tratamiento con medicamentos capaces de interferir con la técnica analítica empleada en este estudio (sulfonilureas o tiazidas, fundamentalmente) o por sospecha, aunque fuera remota, de hipersensibilidad a sulfamidas.

El grupo de controles de polimorfismo acetilador estaba constituido por 96 sujetos presuntamente sanos (42 varones, 54 mujeres), de edad media 63,4 años, D.E. 8,4, límite inferior 45 años, límite superior 83 años, distribución no diferente de la normal (test de Kolmogorov-Smirnov), que no estaban recibiendo ninguna medicación.

El fenotipo oxidativo de debrisoquina se determinó en 78 enfermos (23 varones, 55 mujeres). En los dos restantes no se realizó este procedimiento porque estaban recibiendo nifedipina, fármaco que puede interferir con el metabolismo de debrisoquina.

El grupo de controles del polimorfismo oxidativo de debrisoquina estaba constituido por 835 sujetos presuntamente sanos (391

varones, 446 mujeres) de edad media 26,3 años, D.E. 9,6, límite inferior 14 años, límite superior 83 años, distribución diferente de la normal (test de Kolmogorov-Smirnov) que no estaban recibiendo ninguna medicación.

T A B L A

T A B L A 4

Criterios de inclusión de enfermos en el estudio

- Diagnostico de A.R. según los criterios de la ARA.
- No padecer enfermedad grave o presuntamente relacionada con alguno de los polimorfismos objeto de estudio
- Consentimiento informado para participar en el estudio.
- Estado general aceptable con performance status según escala de Karnofsky superior a 60.
- Función hepática conservada.
- Función renal conservada (creatinina plasmática < 1,4 mg/dl).
- No estar recibiendo fármacos capaces de interferir con las técnicas utilizadas en el estudio (diferentes en cada polimorfismo)

2. Métodos de laboratorio

2.1. Polimorfismo oxidativo de debrisoquina

2.1.1. Recogida de muestra.-

Se administró a cada paciente 1 comprimido de sulfato de debrisoquina equivalente a 10 mg. de debrisoquina (Declinax[®], Roche), a las 22 horas y al menos dos horas después de una cena ligera. Se recogió la orina de las 8 horas siguientes a la toma. La orina se recogió en frigorífico a 4° C hasta la mañana siguiente, trasladada al laboratorio y medida. Una vez registrado el volumen total se recogieron muestras de 20 ml que se guardaron congeladas a - 20° C hasta el momento de la determinación.

2.1.2. Descripción de la técnica.-

El fenotipo oxidativo se determinó por una técnica de extracción por éter para cromatografía de gases con detector de ionización de llama de hidrógeno siguiendo la técnica de Lennard y cols. (1.977) con algunas modificaciones (Cobaleda, 1989). Todas las muestras se analizaron por duplicado, utilizándose reactivos de laboratorios Merck. El procedimiento es como sigue:

En una primera fase se toma 1 ml de orina y se pone en un tubo de vidrio de 15 ml con tapón de rosca y cubretapa interna de teflón. Sucesivamente se añaden:

A) 0,5 ml de una solución de HCO₃Na saturado.

B) Metanol 0,5 ml.

C) 75 microlitros de guanoxán (Pfizer), que se añade con microjeringa de vidrio de 100 microlitros (es muy importante la exactitud de ésta medida, ya que es el estándar interno).

D) 0,5 ml de acetilacetona (Merck 800023)

La mezcla así obtenida se agita con un vórtex durante 15 segundos, y se introduce en un baño de agua con agitación a 50° C durante 16 horas. En esta fase se preparan las muestras para que durante el tiempo de incubación la acetilacetona reaccione con un radical que poseen la debrisoquina, la 4-hidroxidebrisoquina y el guanoxán, para formar un derivado pirimidínico, el cual es soluble en solventes orgánicos y puede detectarse por cromatografía de gases.

Tras dicho periodo de incubación los mencionados compuestos deben ser extraídos para separarlos de los residuos orgánicos, para lo cual se hace lo siguiente.:

A) Añadir 6 mL de dietiléter (Merck 921) con dosificador o pipeta de vidrio.

B) Agitar enérgicamente durante 5 minutos con agitador de volteo marca Heidolph modelo Reax 2 con velocidad de giro de 60 rpm durante 8 minutos.

C) Extraer la fase superior (la de éter) con pipetas de vidrio tipo Pasteur y ponerla en tubos cónicos de 12 microlitros con tapón de vidrio.

D) Añadir 0,3 ml de CLH 4M y agitar durante 15 segundos en vórtex.

E) Separar la fase inferior acuosa, en la cual se disuelven los compuestos formados, y ponerla en nuevos tubos de vidrio de 6 ml con tapón de vidrio usando una pipeta Pasteur de vidrio.

F) Eliminar los posibles restos de éter que puedan haber sido trasvasados con la muestra anterior, lo que se realiza colocando las muestras en un baño de agua a 56° C durante 10-15 minutos.

G) Añadir 0,4 ml de una solución de NaOH 4 M; cantidad suficiente para neutralizar la acidez del ClH.

H) Añadir con microjeringa de vidrio 40 microlitros de S2C (Merck2210)

I) Agitar los tubos durante 15 segundos en vórtex (debe hacerse lo más precozmente posible dada la gran volatilidad del S2C)

J) Centrifugar a 1.500-2.000 rpm durante 5 minutos para que la gota de S2C, que contiene disueltos los compuestos pirimidínicos formados por la debrisoquina, 4-hidroxidebrisoquina y guanoxán, se deposite en el vértice del tubo cónico.

K) Recoger 2 microlitros de la muestra con una microjeringa de vidrio de 5 o 10 microlitros e inyectarlos en el cromatógrafo de gases.

Finalmente se obtienen unos cromatogramas en los que se identifican 3 picos, que en la técnica de Lennard y cols. aparecen tras un tiempo de retención de 1,2 minutos para la debrisoquina, 2,8 minutos para el guanoxán y 3,2 minutos para la 4-hidroxidebrisoquina. El pico de la debrisoquina es el que se identifica con más dificultad, pues pueden formarse derivados de la 3,4-dihidro-1-metil-2CH-isoquino-lincarboxamida que tienen un tiempo de retención similar.

Hay que tener en cuenta que el tamaño de los picos depende de muchos factores como la temperatura del aparato, el grado de pureza de los gases y

reactivos y sobre todo de la atenuación eléctrica del aparato (que en ocasiones hay que modificar) y de la calidad de la inyección. Para evitar dichos factores y conseguir una homogeneidad y reproducibilidad de los resultados se utiliza el estándar interno (guanoxán), que tiene una estructura química similar a la de los compuestos a detectar, y que como ya se comentó se añade al comienzo de la técnica.

2.1.3. Descripción de los aparatos.-

El cromatógrafo de gases es un aparato marca Varian de la serie 2440 dotado de inyector, columna de vidrio de 2 m. de longitud y 3 mm. de diámetro con un 3% de OV225 sobre una base de Chromosorb WHP 100/120 y un detector de ionización de llama de hidrógeno.

Los gases utilizados son hidrógeno de calidad para producir la llama del detector, aire sintético como soporte para la combustión del hidrógeno y nitrógeno de calidad N-48 como transportador.

Las condiciones de funcionamiento son una temperatura de 250° C en el inyector, columna y detector y unos flujos de gases de 60 ml/minuto para el hidrógeno, 240 ml/minuto para el aire sintético puro y 50 ml/minuto para el nitrógeno

El cromatógrafo está conectado a un registrador marca Varian Aerograph modelo A-25 de la serie 9245. La velocidad de avance del papel es de 1 cm/minuto.

2.1.4. Cálculo del índice metabólico

Una vez obtenidos los picos en el cromatograma se comparan con el cromatograma de una orina "blanco" (de un individuo que no haya ingerido ningún fármaco, café, alcohol y que no contenga ninguna de las sustancias que nos interesa determinar) y con el cromatograma de la orina del mismo individuo a la que se han añadido cantidades conocidas de las 3 sustancias a determinar (debrisoquina, 4-hidroxidebrisoquina y guanoxán), y se determinan sus tiempos de retención.

Se procede a la medición de la altura de los picos, representada por la longitud de la bisectriz de éstos desde el vértice del ángulo hasta el punto donde dicha bisectriz corta a la línea de base. La longitud de la bisectriz del pico del guanoxán será el denominador de dos cocientes que tienen como numeradores las longitudes de los picos de debrisoquina y 4-hidroxidebrisoquina. Estas medidas de longitud se transforman en unidades de concentración utilizando una curva patrón (en microMoles/mL). Puesto que un comprimido de sulfato de debrisoquina tiene 10 mg de debrisoquina, equivalente a 57,1 microMoles de dicho compuesto, el porcentaje eliminado se obtiene por una regla de tres, aplicando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ eliminado} = \frac{100 \times \text{diuresis} \times (\quad) / 1000}{57,1} = \frac{\text{diures} \times (\quad)}{57,1}$$

Finalmente, relacionando el porcentaje de 4-hidroxidebrisoquina con el de debrisoquina obtendremos el índice metabólico. Como ya ha sido referido, se consideran oxidadores lentos de debrisoquina a los individuos cuyo índice metabólico es mayor de 12,6, siendo oxidadores rápidos los que no superan dicho límite (Price-Evans, 1980)

2.2. Polimorfismo acetilador

2.2.1. Recogida de la muestra.-

Se administra una dosis aproximada de sulfametazina de 10 mg/kg de peso(< 53 kg, 500 mg; 53-81 kg, 750 mg; > 81 kg, 1000 mg). En los sujetos a quienes se determina también el polimorfismo oxidativo de debrisoquina, la sulfametacina se administra a las 6 de la mañana, inmediatamente después de recogida la orina para determinación de debrisoquina y 4-OH-debrisoquina.

Se permite desayunar al cabo de dos horas, se extrae sangre a las 6 horas utilizando heparina como anticoagulante, y se separa el plasma por centrifugación. Las muestras pueden conservarse a - 20° C hasta la práctica de la determinación.

2.2.2. Metodo de determinación.-

El fenotipo acetilador se determina a partir de la tasa o porcentaje de acetilación de sulfametacina, para lo cual se miden

la sulfametacina libre y la sulfametacina conjugada en plasma según el método de Bratton & Marshal (Varley, 1962)

Las determinaciones de este estudio se llevaron a cabo con un espectrofotómetro Hitachi 180 de alta sensibilidad. Se consideran acetiladores lentos a los sujetos que tienen menos del 45% de sulfametacina plasmática en su forma acetilada o conjugada. Son acetiladores rápidos aquellos que superan el citado límite y lentos los que no lo alcanzan (Viznerova et al., 1973)

La determinación se realiza en 2 fases.:

a) Fase 1.

1. Sulfametacina libre en plasma.

- En tubo de centrifuga poner 2 ml de agua desionizada, 1 ml de ácido tricloroacético al 20% y 1 ml de plasma.
- Centrifugar y separar el sobrenadante.
- Tomar 1 ml del sobrenadante y añadir 1 ml de ácido tricloroacético al 5%. Reservar los 2 ml resultantes.

2. Sulfametacina total en plasma.

- Se toma 1 ml del sobrenadante obtenido por centrifugación y se añade 1 ml de ClH 2 M.
- Se calienta a 100° C al baño maria durante 1 hora en un tubo graduado.
- Se añade el volumen de agua perdida por evaporación hasta completar los 2 ml originales.

b) Fase 2.

Común para los 2 tubos obtenidos durante la fase 1, para un blanco de tricloroacético al 5 % y para un patrón o estándar de 2ml de solución de sulfametacina en tricloroacético al 5% a una concentración de 5 microgramos/ml.

1. Añadir 0.2 ml de nitrito sódico al 0.1 % y agitar fuertemente.
2. A los 3 minutos añadir 0.2 ml de sulfamato amónico al 0,5% y agitar enérgicamente.
3. Al cabo de otros 2 minutos añadir 1 ml de solución de N-1-naftil-etilén-diamina hidrocloreuro al 0,05 %. Agitar.
4. A los 10 minutos proceder a la lectura espectrofotométrica con una longitud de onda de 548 milimicras. El estándar debe dar una lectura de 0,5 en absorción (densidad óptica).

La sulfametacina conjugada se averigua restando la libre de la total. Finalmente se establece el porcentaje de sulfametacina conjugada con respecto a la total, con cuya cifra disponemos del criterio numérico para fijar el fenotipo acetilador.

3. Métodos estadísticos

Se ha utilizado el paquete estadístico informatizado RSIGMA, aplicado mediante un ordenador personal IBM PS1 386. Los criterios estadísticos utilizados han sido de tipo descriptivo (media, desviación estándar, límites, distribución de frecuencias), y comparativos sobre variables cualitativas (Test de la ji al cuadrado, prueba exacta de Fisher) y sobre variables continuas (test t de Student, prueba U de Mann-Whitney). Se analizaron las correlaciones entre parámetros seleccionados (coeficiente de Spearman). La selección de los tests estadísticos se llevó a cabo en función de que la distribución de las variables se ajustara a la normal o no (test de Kolmogorov-Smirnov). El nivel de significación se estableció con $p < 0,05$.

CAPITULO IV

RESULTADOS

1. Datos generales del grupo de enfermos

El grupo de estudio estaba constituido por 80 pacientes. La edad al diagnóstico era significativamente más baja en las mujeres (53 años, D.E.= 12,2) que en los varones (60,7 años, D.E. =10,7) (Prueba de Mann-Whitney, $p = 0,014$).

2. Fenotipo oxidativo de debrisoquina

Este polimorfismo pudo determinarse en 78 enfermos. Cincuenta y cinco pacientes eran mujeres y 23 varones. La edad media de estos pacientes era de 60,9 años (D.E. 9,7).

Cuatro pacientes (3 varones y una mujer), con un valor de MR > 12,6, quedaron clasificados como metabolizadores lentos de debrisoquina (5,13 %).

La edad media de los miembros del grupo de control, constituido por 835 sujetos, era muy inferior a la de los pacientes ($p < 0,001$). Cuarenta y dos controles, con una cifra de MR > 12,6, quedaron clasificados como metabolizadores lentos (PM) de debrisoquina (5,03 %). El resto de los elementos del grupo quedaron clasificados como metabolizadores rápidos (EM). El coeficiente de correlación lineal entre la edad y el valor de \log_{10} de MR en los metabolizadores rápidos fue de 0,001 (n.s.).

La comparación del porcentaje de sujetos con fenotipo EM de DBQ no mostró diferencias significativas entre casos y controles, tanto en el conjunto de los grupos (Ji cuadrado $< 0,0001$, $p > 0,999$) como cuando se analizaron los sexos por separado (Ji al cuadrado $0,54$ para las mujeres y $1,44$ para los hombres, n.s.).

La distribución de frecuencias del logaritmo decimal de MR en metabolizadores rápidos se ajustaba a la normalidad tanto en casos como en controles (test de ajuste a la distribución normal de Kolmogorov-Smirnov) (Figura 1). La comparación de la media del logaritmo decimal de MR ($\log_{10}MR$) de metabolizadores rápidos entre casos ($\bar{x} = -0,085$, D.E. = $0,388$) y controles ($\bar{x} = -0,296$, D.E. = $0,427$) mostró diferencia estadísticamente significativa (t de Student $5,02$, $p < 0,001$) (Figura 2). Esta diferencia se mantuvo cuando la comparación se hizo por sexos (varones: $t = 2,56$, $p < 0,01$. Mujeres: $t = 3,65$, $p < 0,001$).

Cuando se separaron empíricamente los EM de ambos grupos utilizando como valor de división una tasa metabólica de 1 (Log decimal = 0), se comprobó que el 25,7 % de los controles (162 sujetos) y el 40,5 % de los casos (30 sujetos) tenían valores de MR comprendidos entre 1 y 12,6 (logs 0 y 1,1, respectivamente). Esta diferencia es estadísticamente signifi-

cativa (χ^2 al cuadrado 14,7, $p < 0,0005$; prueba exacta de Fisher, $p = 0,00014$). (Figura 3).

El coeficiente de correlación entre los valores para Log₁₀MR en los enfermos metabolizadores rápidos y la edad al comienzo de los síntomas de la enfermedad no alcanzó valores significativos en las mujeres ($r = 0,199$, n.s.), en los varones ($r = -0,254$, n.s.), ni en el conjunto del grupo de enfermos ($r = 0,091$, n.s.).

No se apreciaron diferencias significativas entre los valores para MR en los pacientes EM divididos en dos grupos, en función de que la determinación del factor reumatoide fuera positiva o negativa.

3. Fenotipo acetilador

La edad media de los 69 enfermos en quienes se determinó este polimorfismo era de 68,8 años (D.E. 9,77). En los controles la media era de 63,4 años (D.E. 8,4). La diferencia es estadísticamente significativa (t de Student 3,698, $p < 0,001$).

Treinta y dos enfermos (46,4 %) y 56 controles (58,3%) con una tasa de acetilsulfametacina en plasma inferior al 45

% de la sulfametacina total, quedaron clasificados como acetiladores lentos (prueba exacta de Fisher de dos colas 0,155, diferencia no significativa) (Figura 4).

La edad al diagnóstico de la enfermedad en el grupo de enfermos no difería significativamente entre los acetiladores lentos (57 años, D.E. 11,5) y los rápidos (53,2 años, D.E. 13) (prueba de Mann-Whitney $p= 0,14$, n.s.).

Cuando se realizó un análisis separado por sexos comparando casos y controles se comprobó que, entre las mujeres, 18 enfermas (38,3 %) y 34 controles (63 %) eran acetiladoras lentas (Figura 5). Este exceso de acetiladoras rápidas entre las pacientes es estadísticamente significativo (prueba exacta de Fisher de dos colas 0,017). Al comparar entre sí los varones de ambos grupos no se observaron diferencias significativas. (Figura 6).

La distribución de frecuencias del porcentaje de sulfametacina acetilada con respecto a la sulfametacina total en casos y controles adopta una disposición bimodal, como se aprecia en la figura 7, en la que además se pormenoriza esta distribución por sexos.

Log10 MR casos/controlos

Distribución de frecuencias (%)

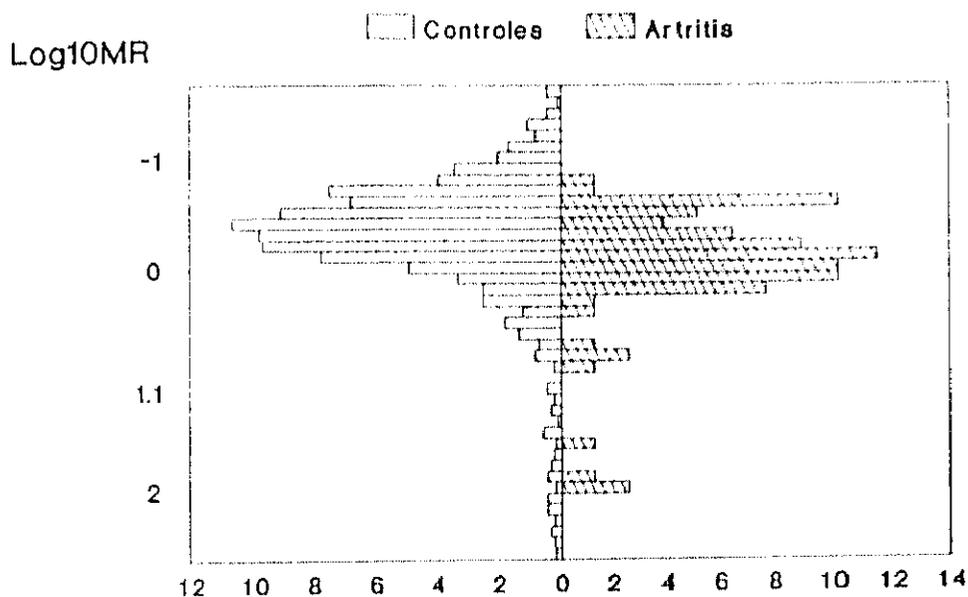
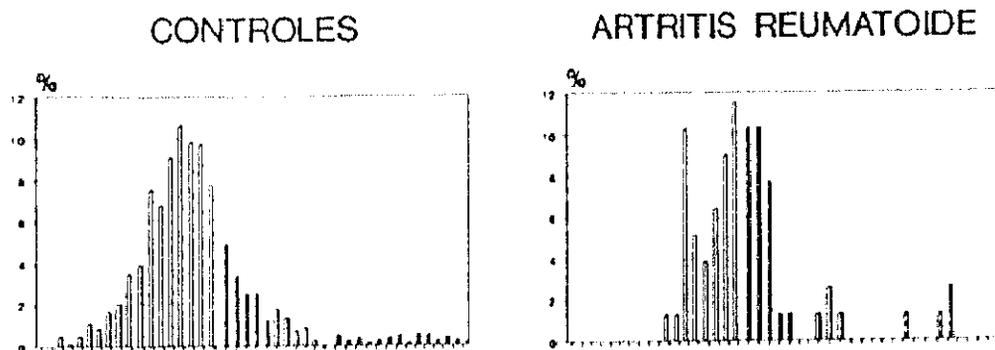


Figura 1: Distribución de frecuencias de los valores de Log 10 de MR de DBQ en controles (izquierda) y en enfermos con artritis reumatoide (derecha). El valor del logaritmo decimal de la antimoda que separa metabolizadores rápidos y lentos es 1.1 corresponde a un índice metabólico (MR) de 12.6. Los metabolizadores rápidos (EM) son los que tienen valores de MR por debajo de esta cifra. observese el ajuste a la normal de la distribución en los metabolizadores rápidos de ambos grupos.

POLIMORFISMO OXIDATIVO DE DEBRISOQUINA

Log10 MR. Distribución de frecuencias



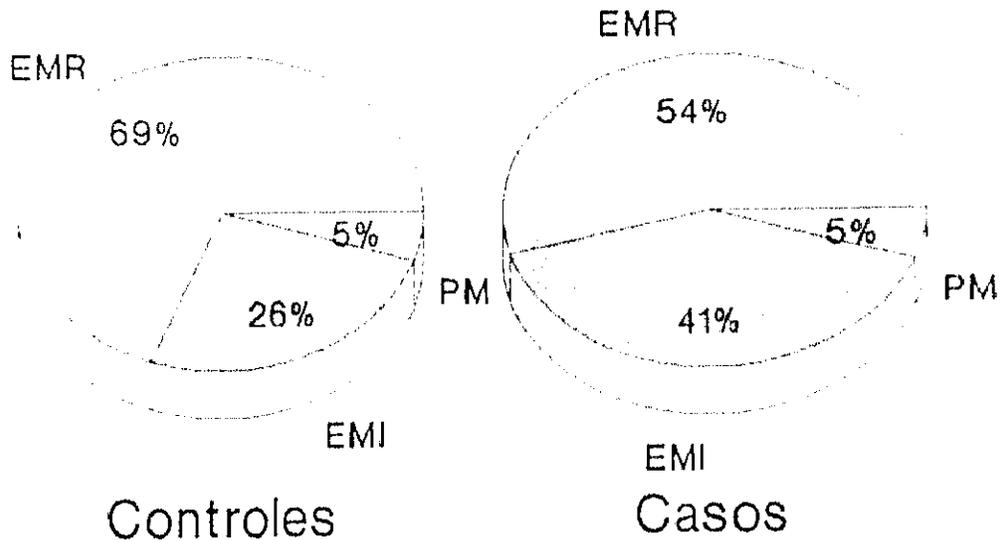
$$\underline{x = -0,295, DE = 0,427} \quad \underline{x = -0,085, DE = 0,388}$$

$$\underline{p < 0,001}$$

Figura 2: Distribución de frecuencias de los valores de Log 10 de MR de DBQ en controles (izquierda) y en enfermos con artritis reumatoide (derecha). En esta figura se han diferenciado estadísticamente los metabolizadores rápidos con MR < 1 y los que tienen MR entre 1 y 12,6. En la parte inferior figura se muestra la comparación de los valores de log 10 de MR realizada entre los sujetos metabolizadores rápidos de ambos grupos.

POLIMORFISMO OXIDATIVO DE DBQ EN A.R.

Distribución según valores para MR (*)



(*): EMR < 1. EMI = 1-12,6. PM >12,6

Figura 3: Proporción de sujetos con distintas categorías de valores para MR de DBQ en el grupo de controles (izquierda) y en el de enfermos con artritis reumatoide (derecha). La proporción de sujetos con valores de MR entre 1 y 12,6 (metabolizadores rápidos intermedios, EMI) es significativamente más alta entre los casos y paralelamente la proporción de sujetos con valores de MR por debajo de 1 (metabolizadores rápidos rápidos, EMR) es significativamente más alta en controles ($p < 0,0005$). La proporción de sujetos con MR > 12,6 (metabolizadores lentos) es prácticamente idéntica en ambos grupos.

POLIMORFISMO ACETILADOR

Distribución comparativa. Total series

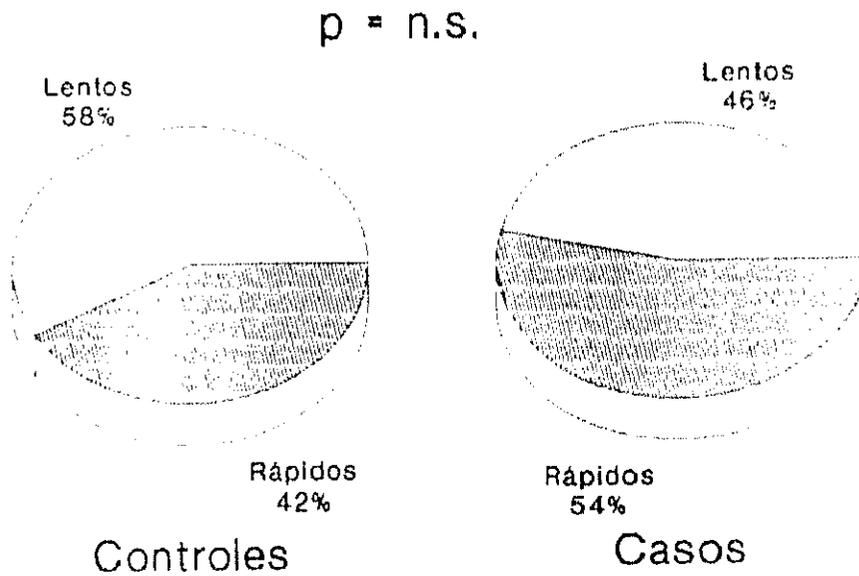


Figura 4: Distribución del fenotipo acetilador en controles (izquierda) y en enfermos con artritis reumatoide (derecha). El exceso de acetiladores rápidos en el grupo de enfermos no alcanza significación estadística ($p = 0,155$).

POLIMORFISMO ACETILADOR

Distribución en mujeres

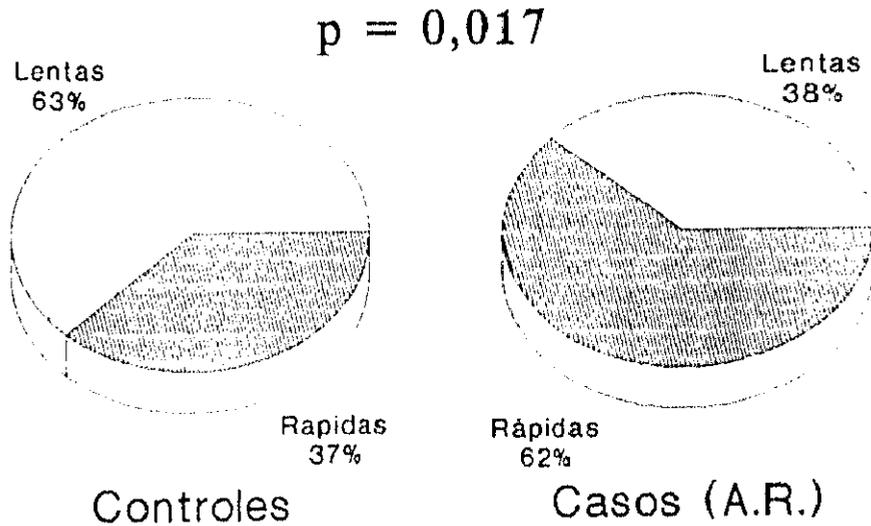


Figura 5: Distribución del fenotipo acetilador en las mujeres del grupo control (izquierda) y en las enfermas con artritis reumatoide (derecha). Hay un exceso significativo de acetiladoras rápidas entre las mujeres con artritis reumatoide ($p = 0,017$).

POLIMORFISMO ACETILADOR

Distribución en varones

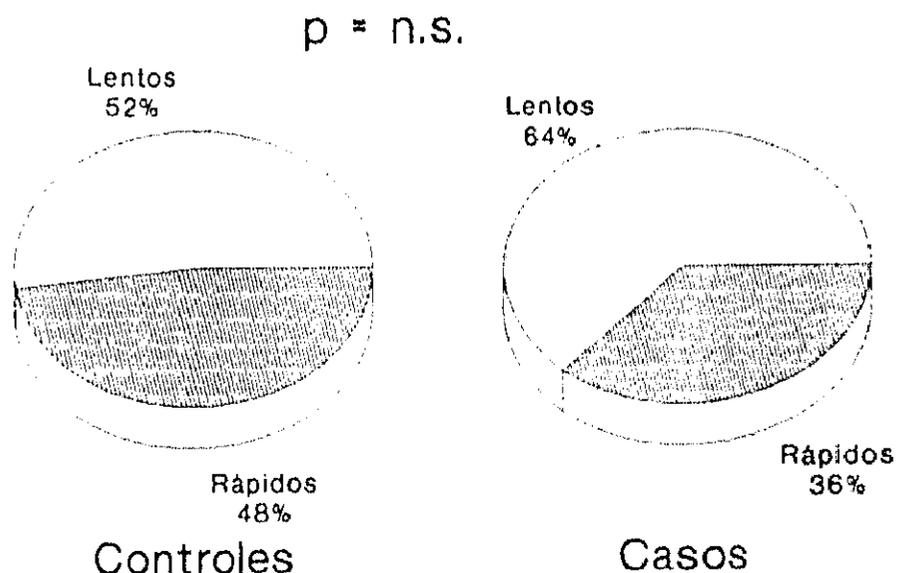


FIGURA 6: DISTRIBUCION DEL FENOTIPO ACETILADOR EN LOS VARONES DEL GRUPO CONTROL (IZQUIERDA) Y EN LOS ENFERMOS VARONES CON ARTRITIS REUMATOIDE (DERECHA). EL EXCESO DE ACETILADORES LENTOS QUE SE OBSERVA EN ESTE ULTIMO GRUPO NO ALCANZA SIGNIFICACION ESTADÍSTICA ($P = 0,43$).

POLIMORFISMO ACETILADOR EN A.R.

Distribución por sexos

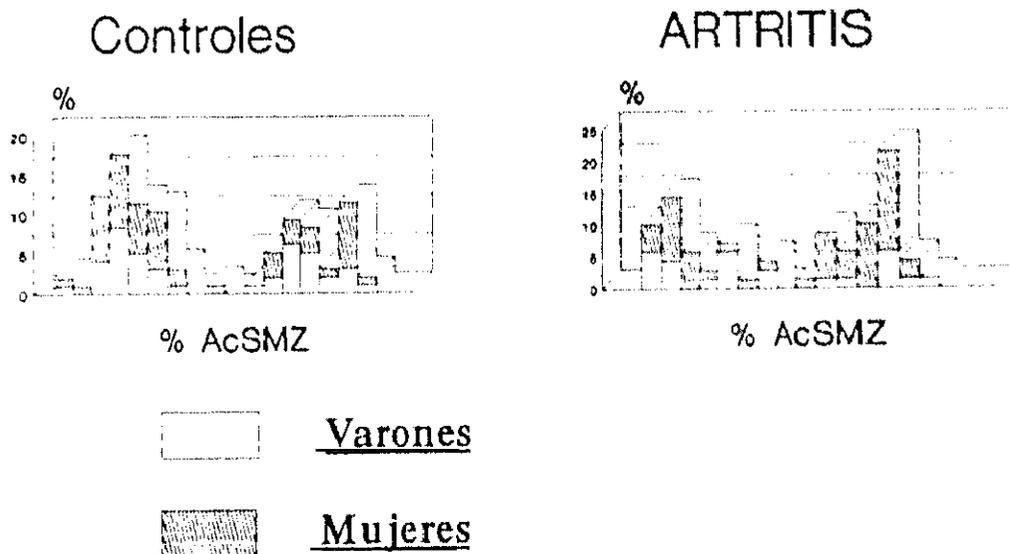


Figura 7: Distribución de frecuencias de los valores del porcentaje de acetilsulfametacina/sulfametacina total en plasma en controles (izquierda) y en enfermos con artritis reumatoide (derecha). Se aprecia la bimodalidad de esta distribución en los grupos y el exceso de mujeres en el grupo de acetiladores lentos con artritis reumatoide.

CAPITULO V

DISCUSION

1. Aspectos generales de la serie

Aunque este estudio no estaba diseñado para analizar aspectos epidemiológicos generales de la artritis reumatoide y el volumen de su casuística no es adecuada para ello, es interesante destacar que confirma dos hechos conocidos previamente: el predominio femenino de la enfermedad (2,6:1) y la edad de comienzo clínico significativamente más temprana en las mujeres, en las que los síntomas iniciales aparecieron, por término medio, 7,7 años antes que en los hombres.

Los pacientes seleccionados estaban recibiendo o habían recibido en el pasado medicamentos de segunda línea. Esta condición se introdujo para reforzar el diagnóstico de artritis reumatoide genuina y evitar incluir enfermos con formas iniciales u oligosintomáticas, en quienes es más fácil realizar un diagnóstico incorrecto de artritis reumatoide. Por esta razón hay un sesgo en la selección de los enfermos que impide establecer comparaciones válidas entre ambos sexos en cuanto a la gravedad clínica de la enfermedad.

2. Polimorfismo oxidativo de debrisoquina:

La distribución de este polimorfismo no difiere entre casos y controles, aunque hay un ligero exceso de metabolizadoras rápidas

entre las mujeres con A.R. que no alcanza significación estadística. Para que ello ocurriera hubiera sido preciso detectar esta diferencia en un grupo de más de 100 enfermas, algo fuera de las posibilidades de este estudio.

La edad media del grupo control es 35 años más baja que la de los enfermos. Aparentemente esta gran diferencia quita fiabilidad a la comparación, ya que cabe suponer que el envejecimiento reduce la actividad enzimática. Sin embargo no es así, y hay al menos tres estudios que señalan que la capacidad de oxidación polimórfica de DBQ no decrece con la edad en sujetos por lo demás sanos (ver apartado 3.4 de introducción). En nuestro propio grupo de controles hemos podido comprobar que el valor medio para MR no difiere significativamente entre los individuos menores de 20 años y los que tenían más de 40 ($0,6 = \text{D.E. } 0,65$ vs $0,68 \text{ D.E. } 0,8$), y el valor del coeficiente de correlación lineal entre los valores para MR y la edad en los sujetos del grupo de controles se aproxima a cero ($r = 0,001$). Por otra parte, reunir un grupo de sujetos controles presuntamente sanos de edad equiparable a la de los enfermos incluidos en este estudio es muy difícil, ya que estas personas no suelen acudir a los hospitales y facultades de Medicina, suelen ser refractarias a ofrecerse como "conejiillos de Indias" (que es como se conoce vulgarmente y en los medios de comunicación a los voluntarios sanos y a los enfermos que se ofrecen a participar en ensayos clínicos), toman con frecuencia medicaciones diversas (muchas veces innecesarias) que pueden interferir con los resulta-

dos de las determinaciones y éticamente es discutible administrar una dosis de debrisoquina a una persona que, por su edad, puede sufrir una hipotensión que implique consecuencias negativas para su salud.

Por lo tanto las comparaciones entre casos y controles son válidas. Hacemos tanta insistencia en este punto, a pesar de que el resultado global de esta parte del estudio es negativo, porque hay un aspecto parcial en el que se aprecia una diferencia que puede ser relevante a la vista de los conocimientos actuales sobre este genotipo.

Parece lógico aceptar que los metabolizadores rápidos homocigotos, al tener dos alelos funcionantes, dispondrán de una mayor capacidad metabólica que los metabolizadores rápidos heterocigóticos, que sólo tienen un alelo que sintetiza la forma activa de la enzima. Sin embargo, la distribución de frecuencias del índice metabólico (MR) en los metabolizadores rápidos se aproxima a la normal, por lo que parece difícil poder discriminar EM homocigotos de EM heterocigotos, al no haber un valor claramente identificable como antimoda. En algunos estudios se ha sugerido que un valor de $MR = 1$ ($\log_{10} = 0$) podría discriminar eficazmente ambos subgrupos de EM, pero este valor se escogió de forma arbitraria, la distribución no se ajustaba a la ley de Hardy-Weimberg y en general lo aducían investigadores a quienes se acomodaba bien para explicar hallazgos menores. La validez de este

criterio de clasificación fue puesta en duda muy seriamente (Evans et al., 1989), pero también es evidente que la probabilidad de ser EM heterocigoto aumenta enormemente cuanto más se acerca el valor de MR a 12,6, que es el límite universalmente aceptado con los PM.

Esta propuesta empírica se ha mostrado, finalmente, bastante próxima a la realidad. La aparición de técnicas de genotipado que permiten identificar perfectamente a los tres genotipos de este polimorfismo ha puesto de manifiesto que existe bastante solapamiento de los valores de MR entre EM homo y heterocigotos, pero que las cifras medias son notablemente inferiores (y por tanto indicativas de una mayor eficacia oxidativa) en los homocigotos. Aunque los autores de los tres estudios publicados (Broly et al, 1991; Dahl et al, 1992; Graf et al., 1992) no profundizan en esta cuestión, podría proponerse, a la vista de sus datos, un valor de MR de 0,7 ($\log_{10} = -0,15$) como límite entre EM homo y heterocigotos, aunque con una capacidad discriminativa inferior al 70 % (estimación personal).

Utilizando este valor de 0,7, 521 controles EM (65,5 %) y 28 pacientes EM (36,8 %) quedan por debajo de este límite y por lo tanto son metabolizadores más eficientes y con una alta probabilidad de ser homocigotos. Hacemos este comentario sin aportar el correspondiente estudio estadístico en el apartado de Resultados, ya que es una disgresión puramente empírica. Sin embargo, esta diferencia se repite cuando el límite se fija en un valor para MR

de 1 ($\log_{10} = 0$), que era el más utilizado anteriormente. Cuando se aplica la t de Student para variables continuas los controles EM tienen valores de MR significativamente más bajos que los enfermos. Es decir, sin que se pueda fijar un punto de corte o separación, parece claro que, a valores más bajos de MR, mayor probabilidad de ser EM homocigoto.

Si esta diferencia no se debe a la mayor edad de los pacientes, como parece deducirse de lo antes analizado, la causa debe radicar en que entre los enfermos hay más heterocigotos que entre los controles. Por lo tanto, la posesión de un alelo mutante no funcionante puede predisponer al desarrollo de artritis reumatoide, y ello tanto en varones como en mujeres. Esta conclusión es totalmente provisional y debe ser contrastada con estudios de determinación del genotipo, que además de confirmarla si es cierta, indicarán si es suficiente la condición de heterocigoto o si es uno de los varios alelos mutantes no funcionantes que existen el que está relacionado con el mayor riesgo de padecer la enfermedad. Este interrogante tendrá, sin duda, respuesta en los próximos años ya que hay varios grupos, y entre ellos el nuestro, que están llevando a cabo investigaciones utilizando técnicas de genotipado cuyos resultados sólo estamos empezando a conocer.

3.- Polimorfismo acetilador:

Nuestro grupo de 69 enfermos con artritis reumatoide es uno de los más amplios estudiados hasta el momento. El grupo de controles es adecuado en cuanto a la edad y el sexo, si bien hay que hacer notar que ninguno de estos dos factores influye de manera significativa en la distribución del polimorfismo acetilador (ver introducción) y que la distribución del polimorfismo acetilador es prácticamente similar en este grupo de controles y en los sujetos sanos estudiados previamente por Ladero et al.(1979).

En el total de la serie existe un exceso de acetiladores rápidos que no alcanza significación estadística. Para que el exceso de un 11,9 % a favor de los acetiladores rápidos entre los enfermos alcanzara significación estadística con errores alfa de 0,05 y beta de 0,20, hubiera sido preciso estudiar 292 enfermos de A.R., cifra inalcanzable para nosotros y probablemente para cualquier servicio de Reumatología. Por otra parte, del análisis de los resultados se desprende claramente que esta diferencia se debe a un marcado exceso de acetiladoras rápidas entre las enfermas de A.R., del 24,7 %, que alcanza una clara significación estadística.

Este hallazgo de nuestro estudio confirma una suposición de Price-Evans (1989) que no había sido contrastada hasta ahora. Algunos estudios publicados con anterioridad no son adecuados para establecer este tipo de comparaciones, por la insuficiencia de su casuística o por la ausencia de grupo control. La mayoría de los demás no mostraban diferencias con respecto a los controles o

señalaban una tendencia al exceso de acetiladores lentos. Tan solo el estudio de Pullar et al. (1985) detecta un exceso de acetiladores rápidos de grado similar al encontrado por nosotros, con el inconveniente de que no aporta grupo control y hay que basarse en controles históricos de la población británica para sostener la realidad de esta diferencia.

En el citado estudio de Pullar et al. no se hace un análisis pormenorizado por sexos. Tan solo se prestó atención a este detalle en el estudio de Crook et al (1983), en el que no se aprecian diferencias en la distribución por sexos del fenotipo acetilador.

De nuestros resultados cabe inferir, en términos estadísticos, que existe una relación entre el fenotipo acetilador rápido y el riesgo de desarrollar artritis reumatoide en mujeres. El paso siguiente es tratar de explicar esta relación en términos causales. ¿De qué forma puede facilitar la aparición de la enfermedad el hecho de poseer una mayor capacidad de acetilar determinados sustratos?. La respuesta más lógica es asumir que uno o más de tales sustratos origina por acetilación metabolitos directamente involucrados en la patogenia de la enfermedad. Como hasta la fecha no se conoce ningún sustrato endógeno que siga la vía de la acetilación polimórfica, los candidatos han de ser necesariamente sustratos exógenos, es decir, xenobióticos.

La patogenia de la A.R. es disimmune. No se sabe porqué el organismo pone en marcha esta reacción anormal dirigida contra si mismo. Los estudios sobre el sistema HLA señalan a determinados antígenos como relacionados con el riesgo de padecer la enfermedad. Hubiera sido interesante disponer de estos datos en nuestros enfermos para ver si existe alguna correlación entre estos antígenos y el fenotipo acetilador, pero no nos ha sido posible realizar este estudio. No se conoce ningún xenobiótico relacionado epidemiológicamente con la A.R., aunque ello no quiera decir que no exista, sobre todo porque la mayoría de los estudios orientados a identificar agentes externos relacionados con la enfermedad han estado dirigidos por la creencia de que tales agentes son gérmenes, y no sustancias químicas. Es difícil encontrar una enfermedad en la que exista una relación tan clara entre determinados xenobióticos y el riesgo de padecerla como el cáncer de vejiga por exposición laboral a aminas aromáticas (Ladero et al., 1985), y lamentablemente para nuestros fines la A.R. no es una de ellas. Tampoco lo es el lupus eritematoso diseminado, que es otra enfermedad disimmune que ha sido objeto de numerosos estudios (Ladero et al., 1988) cuyo resultado final es negativo, ni la enfermedad de Basedow, en la que hace años se observó una tendencia a un comienzo clínico más precoz en acetiladores lentos (Ladero et al., 198), ni la esclerosis múltiple (Ladero et al., 1993), ni la enfermedad inflamatoria intestinal crónica (Ladero et al., datos no publicados), en las que no se ha establecido ninguna relación con el polimorfismo acetilador, por citar tan solo enfermedades de base auto o disimmune, que

han sido objeto de atención preferente por parte de nuestro grupo en los últimos años.

Nuestra hipótesis, puramente teórica, es que un metabolito generado por acetilación polimórfica a partir de un xenobiótico no identificado, sería capaz de inducir la puesta en marcha de una reacción inmune anormal responsable de los eventos patogénicos iniciales de la A.R.; lo más lógico es que el citado metabolito actuara como hapteno, modificando la estructura de alguna proteína del organismo que se comportaría como neoantígeno. Este mecanismo es aducido para justificar muchas reacciones adversas idiosincráticas a fármacos, cuyo origen es claramente disimmune, y un ejemplo muy relacionado con el campo en que nos movemos es el de las reacciones adversas a sulfamidas (Rieder et al., 1991; Pirmohamed et al 1991).

Este es el primer estudio sobre este particular que se realiza en nuestro ámbito geográfico y étnico, ya que todos los demás han sido desarrollados en países anglosajones y nórdicos, salvo el de Ehrenfeld et al. (1983) en el que hay judíos sefardíes, de origen mediterráneo, pero también ashkenazis, procedentes de Centroeuropa. El hecho de que nunca antes se hubiera comunicado un resultado similar al de nuestro estudio sugiere que el xenobiótico presuntamente responsable podría ser específico de nuestro ambiente geográfico (¿dietético?).

Un segundo aspecto es que el predominio de acetiladores rápidos entre los enfermos de A.R. se ciñe a las mujeres. La mayoría de las enfermedades clásicamente denominadas "autoinmunes" muestran un claro predominio femenino, y la A.R. no es una excepción, como nuestro propio estudio confirma. Sin embargo, el polimorfismo acetilador es un carácter autosómico o mendeliano simple y no muestra diferencia alguna de sexos en su distribución. Tampoco parece susceptible la actividad de la N-acetil-transferasa polimórfica de ser modificada por la acción de hormonas femeninas (ver apartado 5.5.2. de la Introducción), de modo que no podemos explicar el porqué de esta diferencia, sino únicamente constatarla.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

1. La distribución del fenotipo oxidativo de tipo debrisoquina/esparteína no difiere entre los enfermos con artritis reumatoide y los controles sanos.

2. Sin embargo, dentro del grupo de metabolizadores rápidos de debrisoquina, constituido por el 95 por ciento, aproximadamente, de casos y controles, se aprecia una menor eficacia metabólica en los enfermos de artritis reumatoide. Este hallazgo sugiere que en esta enfermedad hay un exceso de metabolizadores rápidos heterocigóticos para un alelo no funcionante. Esta cuestión debe ser esclarecida mediante estudios de genotipificación.

3. La distribución del fenotipo acetilador muestra un exceso de acetiladoras rápidas en las mujeres con artritis reumatoide en relación con las mujeres sanas del grupo control. Este hallazgo permite concluir que la posesión del fenotipo acetilador rápido puede ser un factor de riesgo para el padecimiento de artritis reumatoide en las mujeres. El mecanismo de esta posible relación se desconoce.

4. No se detectan diferencias significativas en la distribución del fenotipo acetilador entre casos y controles del sexo masculino.

5. La artritis reumatoide comienza a una edad más temprana en las mujeres de nuestro grupo de estudio que en los varones. Ninguno de los polimorfismos estudiados en esta Tesis guarda relación con ningún aspecto clínico ni evolutivo de la artritis reumatoide.

BIBLIOGRAFIA

Ahmed SA, Penhale WJ, Falal N. Sex hormones, immune responses and autoimmune diseases. AM J PATHOL 1985; 121: 531-551.

Albengres F, Houin G, Breau JL et al. Modification en cours de traitement de la vitesse d'acetylation de l'isoniazide sans atteinte hepatique décelable. NOUV PRESSE MED 1977; 6: 2869-2871

Alvan G, Bechtel P, Iselius L. Hydroxylation polymorphisms of debrisoquine and mephenytoin in European populations. EUR J CLIN PHARMACOL 1990; 39: 533-537.

Amos RS, Bax DE, Creaves MS. Sulphasalazine therapy in rheumatoid arthritis. ANN RHEUM DIS 1986;45:439

Arias TD, Jorge LF, Barrantes R. Uses and misuses of definitions of genetic polymorphism. A perspective from population pharmacogenetics. BR J CLIN PHARMACOL 1991; 31: 117-120.

Armstrong M, Daly AK, Cholerton S, Bateman DN, Idle JR. Mutant debrisoquine hydroxylation genes in Parkinson's disease. LANCET 1992; 339: 1017-1018.

Arnett F.C., Edworthy S.M., Bujak J.S et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. ARTHRITIS RHEUM. 1988; 31:315-324.

Aubry JP, Biour M, Cheymol A, Jaillon P. Modification de la détermination du phénotype d'acétylation au cours d'un traitement par le procainamide. THERAPIE 1980; 35: 653-660.

Baer AN, McAllister CB, Wilkinson GR, Woosley RL, Pincus T. Altered distribution of debrisoquine oxidation phenotypes in patients with systemic lupus erythematosus. ARTHRITIS RHEUM. 1986; 29: 843-850.

Barbeau A, Roy M, Cloutier T, Plasse L, Paris S. Environmental and genetic factors in the etiology of Parkinson's disease. ADV NEUROL 1986; 45: 299-306.

Barbeau A, Roy M, Paris S, Cloutier T, Plasse L, Poirier J. Ecogenetics of Parkinson's disease: 4 Hydroxylation of debrisoquine. LANCET 1985; II: 1213-1216.

Bass NM, Williams RL. Hepatic function and pharmacokinetics. En Hepatology, a textbook of liver disease, eds. D Zakim & TD Boyer, 2^a edición. W.B. Saunders Co 1990, Philadelphia, pp 235-254.

Batchelor J, Welsh KI, Mansilla-Tinoco R et al. Hydralazine-induced systemic lupus erythematosus: influence of HLA-DR and sex on susceptibility. LANCET 1980; I: 1107-1109.

Bax DE, Greaves MS, Amos RR. Sulphasalazine for rheumatoid arthritis: relationship between dose, acetylator phenotype and response to treatment. BR J RHEUMATOL 1986; 25: 282-287.

Beaune PH, Dansette PM, Mansuy D, et al. Human anti-endoplasmic reticulum autoantibodies appearing in a drug-induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P-450 that hydroxylates the drug. PROC NATL ACAD SCI 1987; 84: 551-555.

Benítez J, Llerena A, Cobaleda J. Debrisoquine oxidation polymorphism in a Spanish population. CLIN PHARMACOL THER 1988; 44: 74-77.

Benítez J, Ladero JM, Fernández-Gundín MJ. et al. Polymorphic oxidation of debrisoquine in bladder cancer. ANN MED 1990; 22: 157-160.

Benítez J, Ladero JM, Jara C et al. Polymorphic oxidation of debrisoquine in lung cancer patients. EUR J CANCER 1991; 27: 158-161.

Benítez J, Barquero MS, Coria F, Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ, Ladero JM. Oxidative polymorphism of debrisoquine is not related to the risk of Alzheimer's disease. J Neurol Sci (en prensa)

Bertilsson L, Alm C, de las Carreras C, Widen J, Edman G, Schalling D. Debrisoquine hydroxylation polymorphism and personality. LANCET 1989; 1: 555.

Blum M, Grant DM, McBride W, Heim M, Meyer UA. Human arylamine N-acetyltransferase genes: Isolation, chromosomal localization, and functional expression. DNA CELL BROL 1990; 9: 193-203.

Broly F, Gaedigk A, Heim M, Eichelbaum M, Movike K, Meyer U.A. Debrisoquine/sparteine hydroxylation genotype and phenotype: Analysis of common mutations and alleles of CYP2D6 in a European population. DNA CELL BIOL 1991; 10: 545-558

Brosen K, Gram L.F, Haghfelt T, Bertilsson L. Extensive metabolizers of debrisoquine become poor metabolizers during quinidine treatment. PHARMACOL TOXICOL 1987; 60: 312-314.

Brosen K, Gram LF. Clinical significance of the sparteine/debrisoquine oxidation polymorphism. EVR J CLIN PHARMACOL 1989; 36: 537-547.

Brosen K. Recent developments in hepatic drug oxidation. Implications for clinical pharmacokinetics. CLIN PHARMACOKINET 1990; 18: 220-239.

Caporaso NE, Shaw GL. Clinical implications of the competitive inhibition of the debrisoquin-metabolizing isozyme by quinidine. ARCH INTERN MED 1991; 151: 1985-1992

Caporaso N, Landi MT, Vinies P. Relevance of metabolic polymorphisms to human carcinogenesis: evaluation of epidemiologic evidence. PHARMACOGENETICS 1991 (b); 1: 4-19.

Cartwright RA, Philip PA, Rogers HJ, Glasham RW. Genetically determined debrisoquine oxidation capacity in bladder cancer. CARCINOGENESIS 1984; 5: 1191-1192.

Chalmers IM, Sitar DS, Hunter T. A one year open prospective study of sulfasalazine in the treatment of rheumatoid arthritis: Adverse reactions and clinical response in relation to laboratory variables, drug and metabolite serum levels and acetylator status. J RHEUMATOL 1990; 17: 764-770.

Chapron DJ, Kramer PA, Mercik SA. Potencial influence of body weight on the clearance of polymorphically acetylated drugs. J JCLIN PHARMACOL 1982; 22: 271-275.

Clark DWJ. Genetically determined variability in acetylation and oxidation: Therapeutic implications. DRUGS 1985; 29: 342-375.

Cobaleda J. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura. 1989.

Cooke TD, Seudamore RA. Studies in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Immunogenetic associations. BR J RHEUMATOL 1989; 28: 243-250.

Crewe HK, Lennard MS, Tucker GT, Woods FR, Haddock RE. The effect of selective serotonin re-uptake inhibitors on cytochrome P-450 2D6 (CYP 2D6) activity in human liver microsomes. BR J CLIN PHARMACOL 1992; 34: 262-265.

Crook PR, Hortas C, Roberts EJM, Swinson DR, Mucklow JC, Shadforth MF. Acetylator phenotype and the effect of dapsone in rheumatoid arthritis. J RHEUMATOL 1983; 10: 805-8.

Dahl M-L, Johanson L, Palmertz MP, Ingelman-Sundberg M, Sjöqvist F. Analysis of the CYP2D6 gene in relation to debrisoquin and desimipramine hydroxylation in a Swedish population. CLIN PHARMACOL THER 1992; 51: 12-17.

Dahlqvist SR, Mjörndal T. Acetylator phenotypes in rheumatoid arthritis patients with or without adverse drug reactions to sodium aurothiomalate or d- penicilamine. SCAND J RHEUM 1987; 16: 235-239.

Daly AK, Armstrong M, Idle JR. Molecular genotyping to predict debrisoquine hydroxylation phenotype. LANCET 1990; 336: 889-890.

Dayer P, Kronbach T, Eichelbaum M, Meyer U.A. Enzymatic basis of the debrisoquine/sparteine-type genetic polymorphism of drug oxidation. BIOCHEM PHARMACOL 1987; 36: 4145-4152.

Dayer P, Desmeules J, Leeman T, Striberni R. Bioactivation of the narcotic drug codeine in human liver is mediated by the polymorphic monooxygenase catalysing debrisoquine 4-hydroxylation. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 1988; 152: 411-416

De Villa LF, Alvarez M, Rico H, Alvarez M. Avances en el tratamiento de la artritis reumatoide. INFLAMACION 93, (número especial) 1991; 17-33

Deguchi T, Mashimo M, Suzuki T. Correlation between acetylator phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine N-acetyltransferase in human liver. J BIOL CHEM 1990; 265: 12757-12760.

Derenne F, Joanne C, Vendel S, Bertschy G, Volmat R, Bechtel P. Debrisoquine oxidative phenotyping and psychiatric drug treatment. EUR J CLIN PHARMACOL 1989; 36: 53-58.

Du Souich P, Courteau H. Induction of acetylating capacity with complete Freund's adjuvant and hydrocortisone in the rabbit. DRUG METABOL DISPOS 1981; 9: 279-283.

Du Souich P, Laika D, Slaughter R, Elvin AT, McLean AJ. Mechanism of nonlinear disposition kinetics of melfamethazine. CLIN PHARMACOL THER 1979; 25: 172-183.

Ehrenfeld M, Levy M, Zylber-Katz E. Acetylator phenotype in Rheumatoid Arthritis. ISR J MED SCI 1983; 19: 368-370.

Ehrlich GE, Freeman-Narrod M, Wineburgh GS. Predominance of slow acetylators among patients with rheumatoid arthritis. EUR J RHEUMATOL INFLAM 1979; 2: 196-198.

Eichelbaum M, Spannbrucker N, Deugler HJ. Defective N-oxidation of sparteine in man : a new pharmacogenetic defect. EUR J CLIN PHARMACOL 1979; 16: 183-187.

Eichelbaum M, Bertilsson L, Säwe J, Zekorn C. Polymorphic oxidation of sparteine and debrisoquine; related pharmacogenetic entities. CLIN PHARMACOL THER 1982; 31: 184-186

- Eichelbaum M, Reetz KP, Schmidt EK, Zekorn C. The genetic polymorphism of sparteine metabolims. XENOBIOTICA 1986; 16: 465-481.
- Eichelbaum M, Mineshita S, Ohnhaus EE, Zekorn C. The influence of enzyme induction on polymorphic sparteine oxidation. BR J CLIN PHARMACOL 1986; 22: 49-53.
- Eichelbaum M, Baur MP, Dengler HJ, Osi Kowskaevers BO, Tieves G, Zekorn C, Rittner C. Chromosomal assignment of human cytochrome P-450 (debrisoquine/spar-teine type) to chromosome 22. BR J CLIN PHARMACOL 1987; 23: 455-458.
- Eichelbaum M, Gross A.S. The genetic polymorphism of debrisoquine/sparteine metabolism - clinical aspects. PHARMACOL THER 1990; 46: 377-394.
- Ellard GA. Variations between individuals and populations in the acetylation of isoniazid and its significance for the treatment of the pulmonary tuberculosis. CLIN PHARMACOL THER 1976; 19: 610-625.
- Evans E, Zanger UM, Meyer UA. Debrisoquine hydroxylase (P450 db1) activity in human livers heterozygous for a mutant p450db1 allele. CLIN PHARMACOL THER 1989; 45: 23(abstr).
- Farah F, Taylor W, Rawlins MD, James O. Hepatic drug acetylation and oxidation - effects of ageing in man. BR MED J 1977; 2: 155-156.

Fischer V, Vogels B, Maurer G, Tynes RE. The antipsychotic clozapine is metabolized by the polymorphic human microsomal and recombinant cytochrome P4502D6. J PHARMACOL EXP THER 1992; 260: 1355-1360

Fonne-Pfister R, Meyer UA. Xenobiotic and endobiotic inhibitors of cytochrome P-450db1 function, the target of the debrisoquine/sparteine type polymorphism. BIOCHEM PHARMACOL 1988; 37: 3829-3835.

Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S et al. Characterization of common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. NATURE 1988; 33: 442-446.

Gonzalez FJ, Schmid BJ, Umeno M et al. Human P450 PCN1: sequence, chromosome localization and direct evidence through CDNA expression that P450 PCN1 is nifedipine oxidase. DNA 7 1988; 79-86.

Gonzalez FJ. Human cytochromes P450: problems and prospect . TIPS 1992; 13: 346-352.

Gottlieb NL, Ditchek N, Polley J, et al. Pets and Rheumatoid arthritis. ARTHRITIS RHEUM 1974; 17: 229-34.

Gough AC, Miles JS, Spun NK, Moss JE, Gaedigk A, Eichelbaum M, Wolf CR. Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus. NATURE 1990; 347: 773-776.

Graf T, Broly F, Hoffmann F, Probst M, Meyer UA, Howald H. Prediction of phenotype for acetylation and for debrisoquine hydroxylation by DNA-test in healthy human volunteers. EUR J CLIN PHARMACOL 1992; 43: 399-403.

Gram LF, Debryne D, Caillard V et al. Substantial rise in sparteine metabolic ratio during haloperidol treatment. BR J CLIN PHARMACOL 1989; 29: 272-275

Gran JT, Husby G, Thorsby E. The association between Rheumatoid Arthritis and the HLA antigen HLA-DR4. ANN RHEUM DIS 1983; 42: 292-296.

Grant DM. Molecular genetics of the N-acetyltransferases. PHARMACOGENETICS 1993; 3: 45-50.

Grant DM, Tang BK, Kalow W. A simple test for acetylator phenotype using caffeine. BR J CLIN PHARMACOL 1984; 17: 459-464.

Greenan DM, Dyen PA. Immunogenetic of rheumatoid arthritis. IMMUNOL TODAY 1988; 9: 33-34.

Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to Rheumatoid Arthritis. ARTHRITIS RHEUM 1987; 30: 1205-1213.

Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. Genetic susceptibility to Rheumatoid Arthritis and human leukocyte antigen class II Polymorphism. AM J MED 1988; 85: 17-19

- Guillemot F, Auffray CH, Orr Ht, Strominger JL. MHC antigen genes, in B.D. Hames and D.M. Glover. MOLECULAR IMMUNOLOGY. IRL PRES 1988; 103-143. *
- Gut J, Catin T, Dayer P, Kronbach T, Zanger U, Meyer UA. Debrisoquine/sparteine-type polymorphism of drug oxidation. Purification and characterization of two functionally different human liver cytochrome P-450 isozymes involved in impaired hydroxylation of the prototipe substrate bufuralol. J BIOL CHEM 1986; 261: 11734-11743.
- Hall S. Evaluation of the sulphadimidine acetylator phenotyping test in patients with reduced renal function. ACTA MED SCAD 1981; 209: 505-507.
- Harris ED. Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. En Textbook of Rheumatology. Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB Eds. WB Saundesr Co 1989. Philadelphia. Pp. 905-942.
- Harris ED. Rheumatoid Arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. NEW ENGL J MED 1990; 322: 1277-1289.
- Harvey J, M.Lotze, FC Arnett. Rheumatoid Arthritis in a chippewa band. 11 field study with clinical serologic and HLA-D correlations. J RHEUMATOL 1983; 10: 28. *
- Heim M, Meyer UA. Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification. LANCET. 1990; 336: 529-532.

- Heim M, Meyer UA. Predicting debrisoquine phenotype. LANCET 1991; 337: 633.
- Hein DW, Smolen TN, Fox RR, Weber WN. Identification of genetically homozygous rapid and slow acetylators of drugs and environmental carcinogens among established inbred rabbit strains. J PHARMACOL EXP THER 1982; 223: 40-44.
- Henthorn TK, Benítez J, Auram MJ, Martinez C, LLerena A, Cobaleda J, Krejcie TC, Gibbons RD. Assessment of the debrisoquine and dextromethorphan phenotyping test by Gaussian mixture distribution analysis. CLIN PHARMACOL THER 1989; 45: 328-333.
- Hildebrand M, Seifert W, Reichenberger A. Determination of dextromethorphan metabolizer phenotype in healthy volunteers. EUR J CLIN PHARMACOL 1989; 36: 315-318.
- Horai Y, Fujita K, Ishizaki T. Genetically determined N-acetylation and oxidation capacities in Japanese patients with non-occupational urinary bladder cancer. EUR J CLIN PHARMACOL 1989; 37: 581-587.
- Horai Y, Taga J, Ishizaki T, Ishikawa K. Correlation among the metabolic ratios of three test probes (metoprolol, debrisoquine and spartine) for genetically determined oxidation polymorphism in a Japanese population. BR J CLIN PHARMACOL 1990; 29: 111-115.
- Horai Y, Ishizaki T. Pharmacogenetics and its clinical implications. Part II. Oxidation polymorphism. PHARMACOL PHYSICIAN 1988; 22: 1-8.

Huober J, Bertram B, Petro R, Kaufmann M, Schmähl D. Metabolism of debrisoquine and susceptibility to breast cancer.

BREAST CANCER RES TREAT 1991; 18: 43-48.

Idle JR, Mahgoub A, Sloan TP, Smith RL, Mbanefo CO, Bababunmi EA. Some observations on the oxidation phenotype status of Nigerian patients presenting with cancer. Cancer Let 1981; 11: 331-338.

Idle JR, Oates NS, Shah RR, Smith RL. Protecting poor metabolisers, a group at high risk of adverse drug reactions. LANCET 1 1983; 1388.

Inaba T, Jurima M, Mahon WA, Kalow N. In vitro inhibition studies of two isozymes of human liver cytochrome P-450. DRUG METABOL DISPOS 1985; 13: 443-447.

Ireland A, Jewell DP. Mechanism of action of 5-aminosalicylic acid and its derivatives. CLIN SCI 1990; 78: 119-125.

Ishizaki T, Eichelbaum M, Horay J, Hashimoto K, Chiba K, Dengler HJ. Evidence for polymorphic oxidation of sparteine in Japanese subjects. BR J CLIN PHARMACOL 1987; 23: 482-485.

Islam SA, Wolf CR, Lennard MS, Sternsberg MJE. A three-dimensional molecular template for substrates of human cytochrome P450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation. Carcinogenesis 1991; 12: 2211-2219.

Iyun AO, Lennard MS, Tucker GT, Woods HF, Phil D. Metoprolol and debrisoquine metabolism in Nigerians: Lack of evidence for polymorphic oxidation. CLIN PHARMACOL THER 1986; 40: 387-394.

Jacqz-Aigrain E. Genetic polymorphisms of drug metabolism. Possible implications during development. DEV PHARMACOL THER 1989; 13: 78-84.

Jaraquemada D, Reinsmoen NR, Olhler N, Okaje R, Bach FH, Fertenstein H. First level testing of HLA-DR4 associated new HLA-D specificities Dw13. Histocompatibility testing 1984: Report on the 9th international Histocompatibility Workshop and Conference. Springer-Verlag, Heidelberg, 1984.

Jenne JW. Partial purification and biochemical properties of the isoniazid transacetylase in human liver. Its relations to the acetylation on p-aminosalicylic acid. J CLIN INVEST 1965; 44: 1992-2002.

Jimenez-Jimenez FJ, Ladero JM. Modelo experimental de parkinsonismo por una neurotoxina: implicaciones en la clínica y en la etiología de la enfermedad de Parkinson. MED CLIN 1990; 94: 585-595.

Kagimoto M, Heim M, Kagimoto K, Zeugin T, Meyer UA. Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. J BIOL CHEM 1990; 265: 17209-17214.

Kaisary A, Smith P, Jaczq E, Mcallister CB, Wilkinson GR, Ray WA, Branch RA. Genetic predisposition to bladder cancer : ability to hydroxylate debrisoquine and mephenytoin as risk factors. *CANCER RES* 1987; 47: 5488-5493.

Kallio J, Lindberg R, Huupponen R, Iisalo E. Debrisoquine oxidation in a Finnish population: the effect of oral contraceptives in the metabolic ratio. *BR J CLIN PHARMACOL* 1988; 26: 791-795.

Kalow W. Interethnic variation of drug metabolism *TIPS* 1991; 12: 102-107.

Karr RW, GE Rodey, T Lee, BD Schwartz. Association of HLA-DRW4 with Rheumatoid Arthritis in black and white patients. *ARTHRITIS RHEUM.* 1980; 23: 1241-1245.

Kelley WN, Edward DH, Shaum R, Sledge CB. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. In *Textbook of Rheumatology* 3rd.ed. W.B Saunders CO. 1989; 905-942.

Kelly C, Griffiths ID. Dapsone in rheumatoid arthritis .*ANN RHEUM DIS* 1981; 40: 630-632.

Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, González FJ. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYD2D) locus: Sequence and identification of the polymorphic CYD2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *AM J HUM GENET* 1989; 45: 889-904.

Klonda PT, Corbin SA, Bradley BA et al. HLA and acute arthritis following human parvovirus infections. *TISSUE ANTIGENS* 1986; 28: 318-319.

- Ladero JM, Arrojo A, Gilsanz V. Acetilación hepática en la población Española. GASTROENTEROL HEPATOL 1979; 2: 236-240.
- Ladero JM, Arrojo A, Sanchez F, Gilsanz V. Efecto de la Rifampicina sobre la acetilación hepática polimórfica. GASTROENTEROL HEPATOL 1981; 4: 15-17.
- Ladero JM. Importancia clínica del fenotipo acetilador hepático. GASTROENTEROL HEPATOL 1981; 4: 256-262.
- Ladero JM, Arrojo A, De Salamanca RE, Gómez M, Cano F, Alfonso M. Hepatic acetylator phenotype in diabetes mellitus. ANN CLIN RES 1982; 14: 187-189.
- Ladero JM, Arrojo A. Envejecimiento y fenotipo acetilador hepático. REV IBERAM INVEST CLIN 1983; 2: 21-26.
- Ladero JM, Ruiz JI, Cano F. Fenotipo acetilador en la enfermedad de Basedow. N Arch Fac Med 1983; 41: 79-81.
- Ladero JM. Acetilación hepática polimórfica. N ARCH FAC MED. 1984; 42: 263-270.
- Ladero JM, Kwok CK, Jara C, Fernandez L, Silmi AM, Tapia D, Uson AC. Hepatic acetylator phenotype in bladder cancer patients. ANN CLIN RES 1985; 17: 96-99.

Ladero JM, Fernandez MJ, Palmeiro R, Muñoz JJ, Jara C, Lazaro C, Perez-Manga G. Hepatic acetylator polymorphism in breast cancer patients. *ONCOLOGY* 1987; 44: 341-344.

Ladero JM, Jimenez LC, Fernandez MJ, Robledo A. Acetylator polymorphism in discoid lupus erythematosus. *EUR J CLIN ONCOL* 1988; 34: 307-308.

Ladero JM, Fernández MJ, Jiménez LC. Influencia del sexo, la edad y la pigmentación corporal sobre el polimorfismo acetilador. *AN MED INTERN* 1988 (b); 5: 241-244.

Ladero JM, Jimenez-Jiménez FJ, Benítez J et al. Acetylator polymorphism in Parkinson's disease. *EUR J CLIN PHARMACOL* 1989; 37:391-393.

Ladero JM, Benítez J, Jara C et al. Polymorphic oxidation of debrisoquine in women with breast cancer. *ONCOLOGY* 1991 (a); 48: 107-110.

Ladero JM, Benitez J, González FJ, Vargas E, Diaz Rubio M. Oxidative polymorphism of debrisoquine is not related to human colo-rectal cancer. *EUR J CLIN PHARMACOL* 1991 (b); 40: 525-527.

Ladero JM, Jara C, Benitez J et al. Polimorfismo acetilador en el cancer de pulmón. *AN MED INTERN* 1991 (c); 8: 66-68.

Ladero JM, González JF, Benitz J et al. Acetylator polymorphism in human colorectal carcinoma. *CANCER RES* 1991 (d); 51: 2098-2100.

- La Du BN. Isoniazid and pseudocholinesterase polymorphism. FED PROC 1971; 31: 1276-1285.
- Larrey D, Babany G, Tindel M, Freneaux E, Amouyal G, Habersetzer F, Letteroon P, Pessayre D. Effect of liver disease on dextromethorphan oxidation capacity and phenotype: a study in 107 patients. BR J CLIN PHARMACOL 1989; 28: 297-304.
- Lattar MA, Al-Lajfar M, Guindi RT, Sugathan TN, Behbehani K. Associations between HLA-DR antigens and rheumatoid arthritis in Arabs. ANN RHEUM DIS 1990; 49: 147-149.
- Lawrence JS. Rheumatism in populations. London. Heineman 1977.
- Lawson DM, Henry DA, Lowe J, Reavey P, Rennie Jan, Solomon A. Acetylator phenotype in spontaneous SLE and rheumatoid arthritis. ANN RHEUM DIS 1979; 38: 171-173.
- Lechler RI, Nombardi G, Batchelor R, Reinsmoen N, Bach FH. The molecular basis of alloreactivity. IMMUNOL TODAY 1991; 11: 83-88.
- Leden I, Hanson A, Melander A, Sturfelt G, Svensson B, Wahlin-Boll E. Varying distribution of acetylation phenotypes in R.A. patients with and without Sjögren's syndrome. SCAND J RHEUM 1981; 10:253-255.
- Lee EJD. Diurnal effects on debrisoquine hydroxylation phenotyping. EUR J CLIN PHARMACOL 1988; 35: 441-442.

Lee EJD, Lee LKH. A simple pharmacokinetic method for separating the three acetylation phenotypes. BR J CLIN PHARMACOL 1982; 13: 375-378.

Lennard MS, Silas JH, Smith AJ, Tucker GT. Determination of debrisoquine and its 4-hydroxymetabolite in biological fluids by gas chromatography with flame-ionization and nitrogen-selective detection. J CHROMATOGRAPH 1977; 133: 161-166.

Levi AJ, Sherlock S, Walku D. Phenylbutazone and isoniazid metabolism in patients with liver disease in relation to previous drug therapy. LANCET 1968; 1: 1275-1279.

Linos A, Worthington JW, O'Fallon WM, Kurland LT. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota. A study of incidence, prevalence and mortality. AM J EPIDEMIOL 1980; 111: 87-98.

Linos A, Worthington JW, O'Fallon WM et al. Case control study of rheumatoid arthritis and prior use of oral contraceptives. LANCET 1983; 1: 1299-1300.

Liu T-Y, Chi C-N, Yang JC, Cheung SC, Liu HC. Debrisoquine metabolism in Chinese patients with Alzheimer's and Parkinson's disease. MOL CHEM NEUROPATHOL 1992; 17: 31-37.

Llerena A, Cobaleda J, Benítez J. Debrisoquine hydroxylator phenotypes in healthy volunteers. LANCET 1989; I: 1398.

Lou Y, Ying L, Bertilsson L, Sjöqvist . Low frequency of slow debrisoquine hydroxylation in a native chinese population. LANCET 1987; 2: 852-853.

McCusker CT, Singal DP. Molecular relationship between class II HLA antigens and susceptibility to rheumatoid arthritis. J RHEUMATOL 1988; 15; 1050-1053.

Maghoub A, Idle J.R, Dryng LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. LANCET 1977; 2; 584 - 586.

Matsunaga E, Zeugin T, Zanger UM, Aoyama T, Meyer UA, González FJ. Sequence requirements for cytochrome P-450d1 catalytic activity. J BIOL CHEM 1990; 265: 17197 - 17201.

Mansilla-Tinoco, Harland S.J, Ryan P.J, Bernstein RM, Dollery CT, Hughes G.R.V, Bulpitt CJ, Morgan A, Jones J.M. Hydralazine, antinuclear antibodies and the lupus syndrome. BR MED J 1982; 284: 936 - 939.

May G, Black CM, Olsen NJ, Csuka ME, Tanner SB, Bellino L, Porker J.A, Wilkinson GR, Branch RA. Scleroderma is associated with differences in individual routes of drug metabolism: a study with dapsone, debrisoquin, and mephenytoin. CLIN PHARMACOL THER 1990; 48: 286 - 295.

Mehra N.K, Mc Vaidya, V Tanifa, A. Agarwal, A.N. Malavuya. HLA-DR antigens in rheumatoid arthritis in north India. TISSUE ANTIGENS 1982; 2: 300.

*

Merryman PF, Crapper RM, Lee S, Gresersen PK, Winchester RJ. Class II major histocompatibility complex gene sequence in rheumatoid arthritis the third diversity region of both DR-beta-1 genes in two DR1-DRw10 individuals specify the same inferred amino acid sequence as the DR-beta-1 and DR-beta-2 genes. ARTHRIT RHEUMAT 1989; 32: 251-258.

Meyer NA, Skoda C, Zanger UM. The genetic polymorphism of debrisoquine/sparteine metabolism. Molecular mechanisms. PHARM THER 1990; 46: 297 - 308.

Mitchell D.M, Fries JF. An analysis of the American Rheumatism Association criteria for Rheumatoid Arthritis. ARTHRITIS RHEUM 1982; 25: 481- 487.

Mitchell JR, Zimmerman HJ, Ishak K.G, Thorgeirsson UP, Timbrell JW, Snodgrass WR, Nelson S.D. Isoniazid liver injury. Clinical spectrum, pathology, and probable pathogenesis. ANN INTERN MED 1976; 84: 191 - 192.

Mody G.M, Hammond MG, Naidoo PD. Associations with rheumatoid arthritis in African Blacks. J RHEUMATOL 1989; 16: 1226 - 1228.

Moreno J, Sanchez B. Factores genéticos implicados en la susceptibilidad a la artritis reumatoide. REV ESP REUMATOL 1991; 18:1: 30 - 36.

Nakai J, Wakisak A, Alzawa M, Iwakura K, Nakai H and Ohashi A. HLA association with rheumatoid arthritis in Japanese. ARTHRITIS RHEUM 1981; 24: 722 - 725.

Nebert DW, Gonzalez FJ. P-450 genes and evolutionary genetics . HOSP PRACTICE 1987; 22: 63 - 74.

Nebert DW, Nelson DR, Adenisk M, Coon MJ, Estabrook RW et al. The P-450 superfamily : update on listing of all genes and recommended nomenclature of the chromosomal loci. DNA 1989; 8: 1-13.

Nelson DR, Strobel HW. Evolution of P 450 proteins. MOLEC BIOL EVOL 1987; 4: 572-593

Newton BN, Benson RC, McCorriston CC. Sparteine sulfate: a potent capricious oxytocic. AM J OBSTET GYNECOL 1966; 94: 234 - 241.

Olsen H, Morland J. Ethanol-induced changes in drug acetylation in man and isolated liver cells. BR MED J 1978; 2: 1260 - 1262.

Oka M, Seppälä O. Acetylation phenotyping in rheumatoid arthritis. SCAND J RHEUMATOL 1978; 7: 29 - 30.

Osikowska-Evers B, Dayer P, Meyer UA, Robertz Gm, Eichelbaum M.

Evidence for altered catalytic properties of the cytochrome P-450 involved in sparteine oxidation in poor metabolizers. CLIN PHARMACOL THER 1987; 41: 320 - 325.

- Pariante-Khayat A, Pons G, Rey E et al. Caffeine acetylator phenotyping during maturation in infants. PEDIATRIC RES 1991; 29: 429 - 495.
- Patterson E, Radtke H.E, Weber WW. Immunochemical studies of rabbit N-acetyltransferases. MOL PHARMACOL 1980; 17: 367 - 373.
- Penman BW, Reece J, Smith T et al. Characterization of a human cell line expressing high levels of cDNA-derived CYP2D6. PHARMACOGENETICS 1993; 3: 28-39.
- Perez-Rojas G, Pencharzadch G, Rodriguez M, Carmas P, N Bianco. HLA-DRw4 antigen and B40-CW3-Drw4 Haplotype in rheumatoid arthritis. A histocompatibility testing. TISSUE TYPING LABORATORY, LOS ANGELES 1980. 952-953.
- Persellin RH. The effect of pregnancy on rheumatoid arthritis. BULL RHEUM DIS 1977; 27: 922. *
- Philip PA, Rogers HJ, Harper PG. Acetylation and oxidation phenotypes in malignant lymphoma. CANCER CHEMOTHER PHARMACOL 1987; 20: 235-238.
- Philip PA, Gayed SL, Rogers HJ, Crome P. Influence of age, sex and body weight on the dapsone acetylation phenotype. BR J CLIN PHARMACOL 1987; 23: 709 - 713.
- Philip PA, James CA, Rogers HJ. The influence of cimetidine on debrisoquine 4-hydroxylation in extensive metabolizers. EUR J CLIN PHARMACOL 1989; 36: 319 - 321.

- Pirmohamed M, Coleman MD, Breckenridge CAM, Park K. The role of metabolism in sulphasalazine-mediated toxicity. BR J CLIN PHARMACOL 1991; 31: 593P.
- Poirier J, Roy M, Campanella G, Cloutier T, Paris S. Debrisoquine metabolism in parkinsonian patients treated with antihistamine drugs. LANCET 1987; II: 386.
- Pontin JE, Hamed H, Fentiman IS, Idle JR. Cytochrome P450 db1 phenotypes in malignant and benign breast disease. EUR J CANCER 1990; 26: 790 - 792.
- Pontiroli AE, de Pasqua A, Bonisolli L, Pozza G. Ageing and acetylator phenotype as determined by administration of sulphadimidine. EUR J CLIN PHARMACOL 1985; 28: 485-486.
- Poulsen O, Nilsson LG. Distribution of acetylator phenotype in relation to age and sex in Swedish patients. EUR J CLIN PHARMACOL 1985; 28: 311 - 315.
- Price-Evans DA, Manley KA, Mckusick UA. Genetic control of isoniazid metabolism in man . BR MED J 1960; 2: 458 - 491.
- Price-Evans DA, White T.A. Human acetylation polymorphism. J LAB CLIN MED 1964; 63: 394 - 403.
- Price-Evans DA, Mahgoub A, Sloan TP, Idle JR, Smith RL. A family and population study of the genetic polymorphism of debrisoquine oxidation in a white British population. J MED GENET 1980; 17: 102 - 105.

Price-Evans DA. Survey of the human acetylator polymorphism in spontaneous disorders. J MED GENET 1984; 21: 243-253.

Price-Evans DA. Acetylation. En Ethnic differences in reactions to drugs and xenobiotics. N Kalow. HZ Goedde. DP Agarwal eds.

Alan R. Liss 1986. New York 209-242.

Price-Evans DA. N-Acetyltransferase. PHARMACOL THER 1989; 42: 157-234.

Pullar T, Hunter JA, Capell HA. Effect of acetylator phenotype on efficacy and toxicity of sulphasalazine in rheumatoid arthritis. ANN RHEUM DIS 1985; 44: 831 - 837.

Reeves PT, Minchin RF, Llett KF. In vivo mechanisms for the enhanced acetylation of sulfamethazine in the rabbit after hydrocortisone treatment. J PHARMACOL EXP THER 1989; 248: 348 - 352.

Relling VM. Polymorphic drug metabolism. CLIN PHARMACOL 1989; 8: 852 - 863.

Rieder MJ, Shear NH, Kanec E, Tang BK, Spielberg SP. Prominence of slow acetylator phenotype among patients with sulfonamide hypersensitivity reactions. CLIN PHARMACOL THER 1991; 49: 13 - 17.

Roitt I, Brosloff J, Male D. Inmunología. Salvat (Barcelona) 1991.

Roots S, Heinemeyer G, Drakoulis N, Kampf D. The role of Pharmacogenetics in drug epidemiology. En Epidemiological concepts in clinical pharmacology. H.Kewitz, L Roots, K Voigt eds. Springer-Verlag 1987, Berlin-Heidelberg 105 -118.

Roudier J, Peterson J, Roudes G.H, Luka J, Carson DA. Susceptibility to rheumatoid arthritis maps to a T-cell epitope shared by the HLA-DW4 B-1 chain and the Epstein-Barr virus glycoprotein gp 110. PROC NATL ACAD SCI USA 1989; 86: 5104 - 5108.

Sanders PA, Thomson N, Dyer PA, Greenan DM. Haplotypes bearing HLA-A-B- and DR BP and C4 genes in rheumatoid arthritis families. TISSUE ANTIGENS 1989; 33: 21-29.

Sarma GR, Kailasam S, Nair NGK, Narayana ASL, Tripathy SP. Effect of prednisolone and rifampicin on isoniazid metabolites in slow and rapid inactivators of isoniazid. ANTIMICROB CHEMOTHER 1980; 18: 661 - 666.

Schellens JHM, Van der Eart JHF, Brugman M, Breimer DD. Influence of enzyme induction and inhibition on the oxidation of nifedipine, sparteine, mephenytoin and antipyrine in humans as assessed by "cocktail" study design. J PHARMACOL EXP THER 1989; 249: 638 - 645.

Schiff B, Mizrahi J, Orgad S, Yaron M, Gazit E. Association of HLA-AW31 and HLA DR1 with adult rheumatoid arthritis. ANN RHEUM DIS 1982; 41: 403 - 404.

Schreck DW, Sprons JS, Shiroff RA, Vary JE, Dewitt FD, Hayes AH. Effect of coadministration of procainamide and isoniazid on each other's acetylation pathway. PHARMACOLOGY 1979; 18: 34-41.

Schroeder H, Price-Evans DA. Acetylator phenotype and adverse effects of sulphasalazine in healthy subjects. GUT 1972; 13: 278-284.

Shah RR, Oates NS, Idle JR, Smith RL, Luckart JAF. Impaired oxidation of debrisoquine in patients with perhexiline neuropathy. BR MED J 1982; 284: 295 - 298.

Shastri RA. Undernourished adults and acetylation phenotype. INT J CLIN PHARMACOL THER TOXICOL 1982; 20: 194 - 196.

Shaw GL, Falk RT, Caporaso NE, IssaQHJ, Kase RG, Fox SD, Tucker MA. Effect of diurnal variation on debrisoquine metabolic phenotyping. J NATL CANCER INST 1990; 82: 1573 - 1575.

Siegmund W, Hanke W, Zschiache M, Franke G, Biebler KE, Wilke A. N-acetylation and debrisoquine type oxidation polymorphism in Caucasians - with reference to age and sex. INT J CLIN PHARMACOL THER TOXICOL 1990; 28: 504 - 509.

Skoda RC, Gonzalez FJ, Demierre A, Meyer UA. Two mutant alleles of the human cytochrome P-450 db1 gene (P450 C2D1) associated with genetically deficient metabolism of debrisoquine and other drugs. PROC NATL ACAD SCI USA 1988; 85: 5240 - 5243.

Smith RL. Introduction. En Human genetic variations in oxidative drug metabolism. Franklin RA, Parke DV (eds). XENOBIOTICA 1986; 16: 361-365.

Smith CAD, Gough AC, Leigh PN et al. Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease. LANCET 1992; 339: 1375 - 1377.

Spector TD, Hochberg MC. The protective effect of the oral contraceptive pill on rheumatoid arthritis: an overview of the analytic epidemiological studies using meta-analysis. Br J Rheumatol 1989; 28 (Suppl 1) 11-12; discussion 18-23.

Spina E, Martinez C, Caputi AP, Cobaleda J, Piñas B, Carrillo JA, Benitez J. Debrisoquine oxidation phenotype during neuroleptic monotherapy. EUR J CLIN PHARMACOL 1991; 41: 467 - 470.

Spina E, Campo GM, Calandra S, Caputi AP, Carrillo JA, Benitez J. Debrisoquine oxidation in an Italian population : A study in healthy subjects and in schizophrenic patients. PHARMACOL RES 1992; 25: 43 - 50.

Stastny P. Association of B-cell alloantigen DRW4 with rheumatoid arthritis. NEW ENG J MED 1978; 298: 869 - 871.

Stastny P. Rheumatoid arthritis in histocompatibility testing . Terasaki PI editor. UCLA Tissue Typing Laboratory , Los Angeles 1980: 681 - 686.

- Stastny P, Ball EJ, Khan MA, Olsen NY, Puiens T, Gaox. HLA-DR4 and other genetic markers in rheumatoid arthritis. BR J RHEUMATOL 1988; 27(supp-2) 132 - 138.
- Steiger MJ, Lledo P, Quinn NP, Marsden CD, Turner P, Jenner PG. Debrisoquine hydroxylation in Parkinson's disease. ACTA NEUROL SCAND 1992; 86: 159 - 164.
- Steiner E, Iselius L, Alvan G, et al. A family study of genetic and environmental factors determining polymorphic hydroxylation of debrisoquine. CLIN PHARMACOL THER 1985; 38: 394 - 401.
- Steventon G, Waring RH, Williams AC, Pau HS, Adams D. Xenobiotic metabolism in motorneuron disease. LANCET 1988; II: 644 - 647.
- Steventon GB, Heafield MTE, Sturman S, Waring RH, Path MRC, Williams AC. Xenobiotic metabolism in Alzheimer's disease. NEUROLOGY 1990; 40: 1095 - 1098.
- Strandberg I, Boman G, Hasler L, Sjöquist F. Acetylator phenotype in patients with hydralazine-induced lupoid syndrome. ACTA MED SCAND 1976; 201: 269 - 274.
- Svartz N. Salazopyrin, a new sulfanilamide preparation. ACTA MED SCAND 1942; 110: 577 - 598.
- Syvälähti E K G, Luidberg R, Kallio J, De Vocht M. Inhibitory effect of neuroleptics on debrisoquine oxidation in man. BR J CLIN PHARMACOL 1986; 22: 89 - 92.

Taggart AJ, McDermott B, Delargy M et al. The pharmacokinetics of sulphasalazine in young and elderly patients with rheumatoid arthritis. SCAND J RHEUM 1987, suppl 64: 29 - 36.

Thomson A W, Horne C H W. Biological and clinical significance of pregnancy-associated alfa 2 glycoprotein (PAG). INVEST CELL PATHOL 1980: 3: 295.

*

Tyndale RF, Inaba T, Kalow W. Evidence in humans for variant allozymes of the nondeficient sparteine/debrisoquine monooxygenase (P450IID1) in vitro. DRUG METABOL DISPOS 1988; 17: 334 - 340.

Ueno J, Waki JI, Teraski M et al. HLA-DR4 in black and Mexican Rheumatoid Arthritis patients. J RHEUM 1981; 8: 804-807.

Ungar A, Kay CR, Griffin AJ, Pennayi G.S. Disease activity in rheumatoid arthritis during pregnancy. BR MED J 1983 ; 286: 750 - 752.

Vallada H, Collier D, Dawson E, Owen M, Nanko S, Murray R, Gill M. Debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus and possible susceptibility to schizophrenia. LANCET 1992; 340: 181-182.

Varley H. Practical clinical biochemistry. Heineman Co, London, 1962.

Vessey DA. Metabolism of drugs and toxins by human liver. En "Hepatology . A textbook of liver disease", 2^a ed. D Zakim. TD Boyer eds. Saunders 1990. Philadelphia 196 - 234.

Vincet-Viry M, Muller J, Fournier B, Galteau MM, Slet G. Relation between debrisoquine oxidation phenotype and morphological, biological, and pathological variables in a large population. CLIN CHEM 1991; 37: 327- 332.

Viznerová A, Slaviková A, Ellard GA. The determination of the acetylator phenotype in tuberculosis patients in Tchechoslovakia using sulfadimidine. TUBERCLE 1973; 54: 67-71.

Von Schoultz B, Stigbrand T. Pregnancy zone protein: Chemistry, biology and clinical studies. En "Pregnancy proteins biology, chemistry and clinical application". Drudzinskas JG et al (eds). LONDON ACAD PRESS (Londres) 1982: 167-175.

Watanabe Y, Tokunaga K, Matsuki K, Takeuchi F, Matsuta K, Maeda H, Omoto K, Juj T. Putative amino acid sequence of HLA-DRB chain contributing to rheumatoid arthritis susceptibility. J EXP MED 1989; 169: 2263 - 2268.

Watkinson G. Sulphasalazine: A review of 40 years' experience. Drugs 1986; 32 (Suppl 1): 1-11

Weber WW. The acetylator genes and drug response. Oxford University Press, NEW YORK 1987.

White DG, Woolf AD, Mortimer PP et al. Human parvovirus arthropathy. LANCET 1985; 1: 419-421.

William WV, Mickelson E, Mazewicz S, Eric CBM, Hansen J, Gerald TN. Polymorphic DQalpha and DQbeta interactions dictate HLA class II . Determinants of allo-Recognition . J EXP MED 1990; 171: 85-95.

Willkens RF, Hansen JA, Malmgren JA, Nisperors B, Mickelson EM, Watson MA. HLA antigens in Yakima Indians with rheumatoid arthritis; lack of association with HLA-Dw4 and HLA-Dr4. ARTHRITIS RHEUM 1982; 25: 1435 - 1439.

Woodhouse K.W, Adams PC, Clothier A, Mucklow JC, Rawlins MD. N-acetylation phenotype in bladder cancer. HUMAN TOXICOL 1982; 1: 443-445.

Woodsley RL, Drayer DE, Reidenberg MM, Nies AR, Carr K, Oates JA. Effect of acetylator phenotype on the rate at which procainamide induces antinuclear antibodies and the lupus syndrome. N ENG J MED 1978; 298: 1157-1159.

Wright JM, Wall RA, Perry TL, Paty DW. Chronic parkinsonism secondary to intranasal administration of a product of meperidine-analogue synthesis. NEW ENG J MED 1984; 310: 325.

Yue QY, Bertilsson L, Dahl-Puustinen ML et al. Dissociation between debrisoquine hydroxylation phenotype and genotype among Chinese. LANCET 1989; II: 870.

Zanger UM, Hauri H-P, Loeper J, Homberg J-C, Meyer UA. Antibodies against human cytochrome P-450 db1 in autoimmune hepatitis type II. PROC NATL ACAD SCI 1988; 85: 8256 - 8260.

Zhou H-H, Wilkinson GR, Wood AJJ. Phenotypic effects on the ability to induce debrisoquine (DBQ) metabolism. CLIN PHARM THER 1991; 48: 174 (abstr).

Zidek Z, Kanku I. Estrogen-dependent differences in the acetylation of sulfadimidine in the rat. PHARMACOLOGY 1979; 19: 209 - 214.