



Interacciones de genes con fármacos y alimentos funcionales en enfermedades cardiovasculares

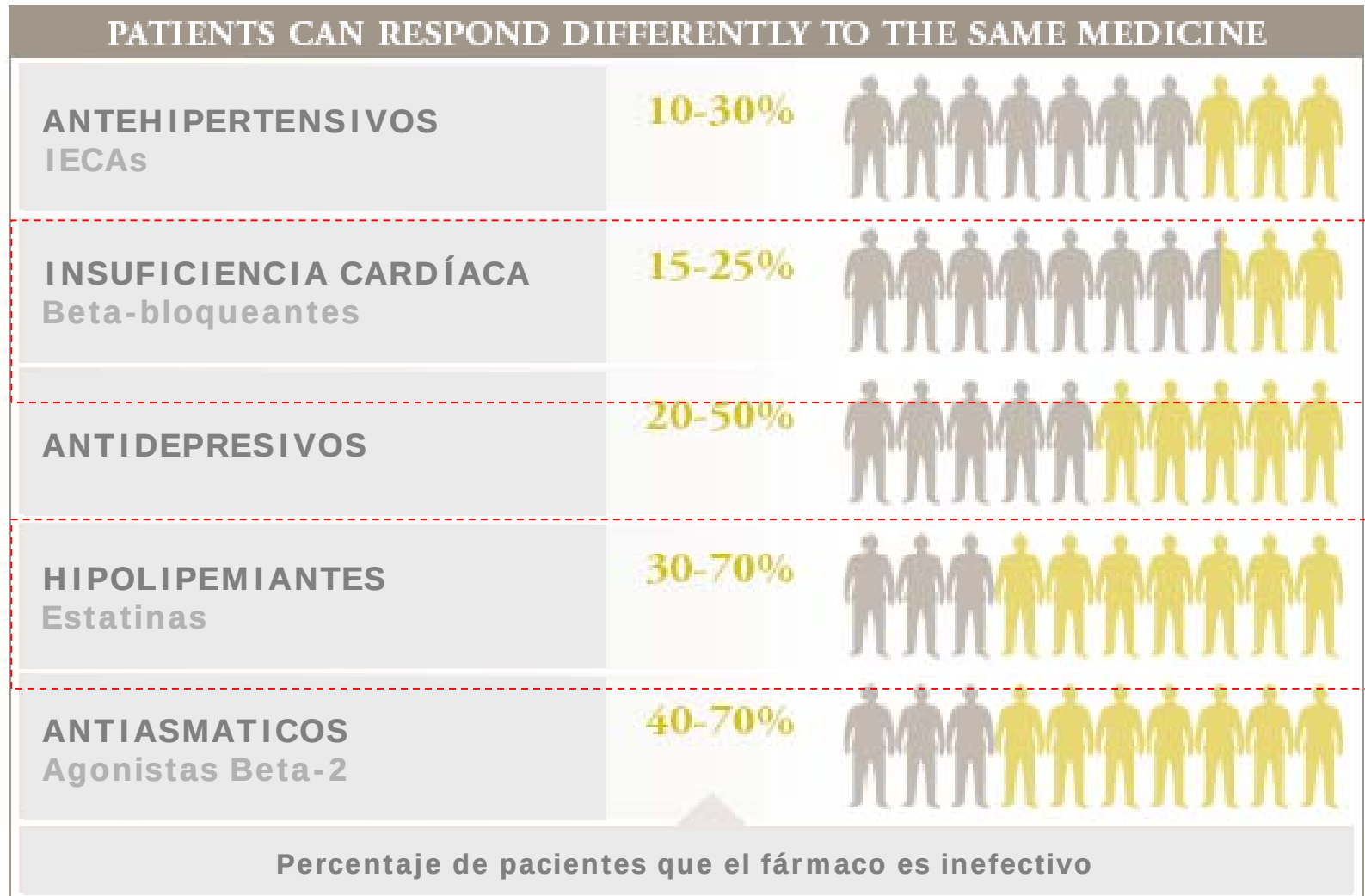
Miguel Pocoví Mieras

Catedrático de Bioquímica y Biología
Molecular

Universidad de Zaragoza

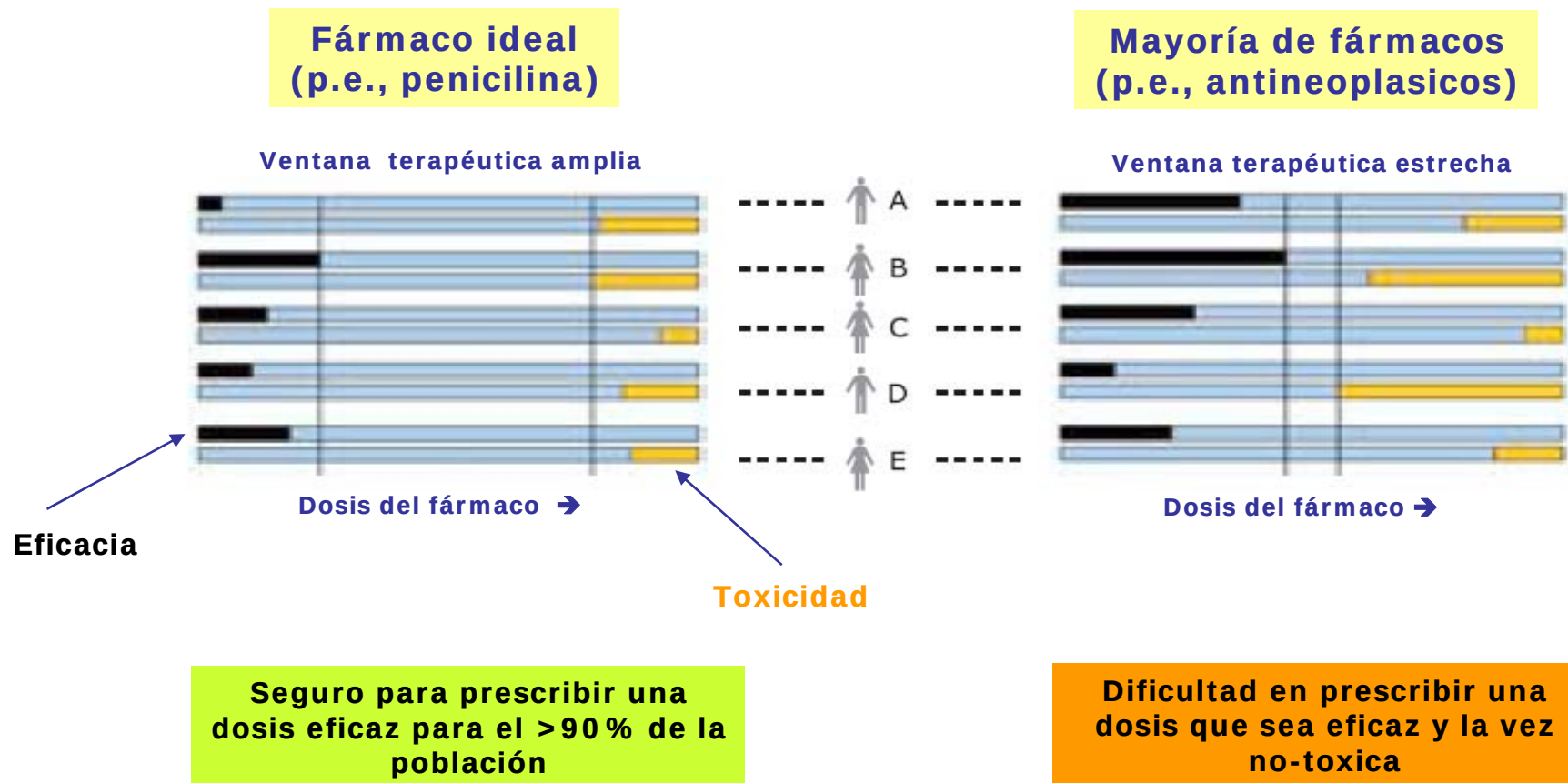
- Por qué respondemos de forma muy diferente al mismo medicamento.
- Variantes genéticas que interfieren en la acción de los fármacos/alimentos funcionales hipolipemiantes.
- Herramientas para identificar las variaciones interindividuales.
- La medicina personalizada vs reactiva y sus beneficios.

Los pacientes responden de forma muy diferente al mismo medicamento



Fuente: The Personalized Medicine Coalition (PMC), 2006

Algunos fármacos tienen una ventana terapéutica en que la individualización de la dosis es importante



Reacciones Adversas a los Fármacos (Reino Unido)

- **1 de cada 15 pacientes son hospitalizados por efectos adversos a fármacos.**
- **10-20 % de estos pacientes, la causa principal es la variación genética.**
- **15-40 % de estos pacientes, la variación genética es un factor subordinado.**

Adverse Drug React Toxicol Rev, 1997

Reacciones Adversas a los Fármacos (USA)

- Constituyen la 5ª causa de muerte (100.000 muertos/año).
- El 32% de los pacientes hospitalizados (6,7% sufren ADRs graves).
- Representan el 5% de casos de admisiones hospitalarias.
- 2.000.000 de hospitalizaciones y un coste de 4 Billones de \$ año.
- Incremento en 2 días la estancia promedio.
- Aumento del costo por paciente hospitalizado en 2.500 \$.

Future Trends Forum, 2005; Ingelman-Sundberg M. Int Med, 2001;
Pirmohamed M, Park, B.K., Trends in Pharmacological Sciences, 2001

Reacciones Adversas a los Fármacos (España)

Anualmente

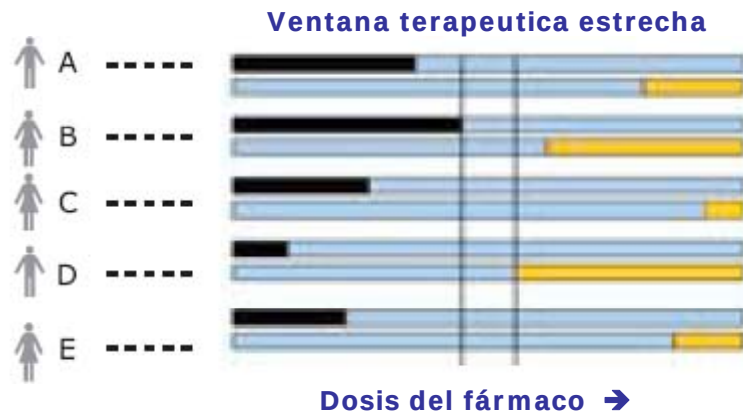
- **25.000 Ingresos hospitalarios.**
- **14.000 muertes.**

Prof. Julio Benitez

Curso UCM El Escorial: “La biotecnología aplicada a la medicina personalizada en los distintos ambitos de la salud”. Julio 2009.

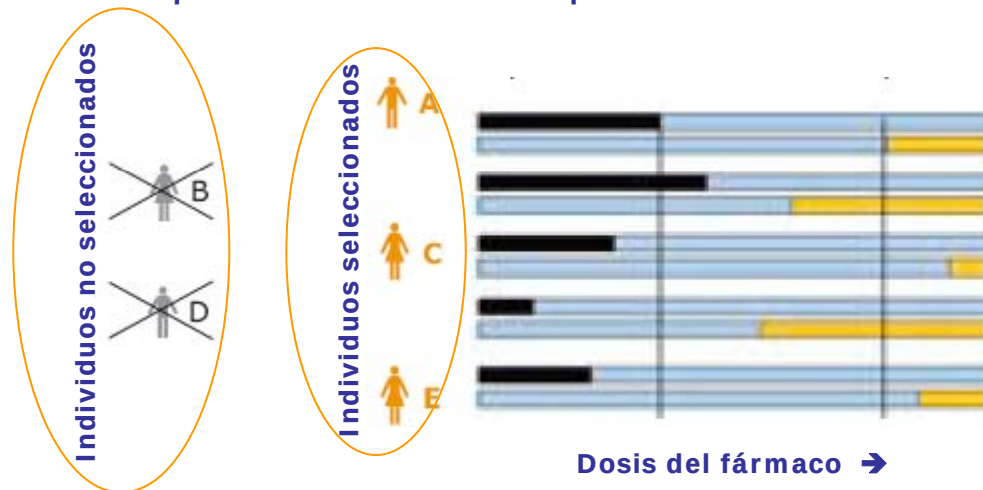
Respuesta a fármacos

Algunos fármacos tienen una ventana terapéutica en que la individualización de la dosis es importante



Dificultad en
prescribir una
dosis eficaz y a
la vez no-tóxica

Ampliación de la ventana terapéutica



Farmacogenómica

No todos somos iguales y por lo tanto no respondemos de forma igual ante un estímulo externo



Diferentes genes



Diferentes proteínas:

- Bombas transportadoras
- Canales iónicos
- Enzimas
- Receptores



Diferentes
factores ambientales



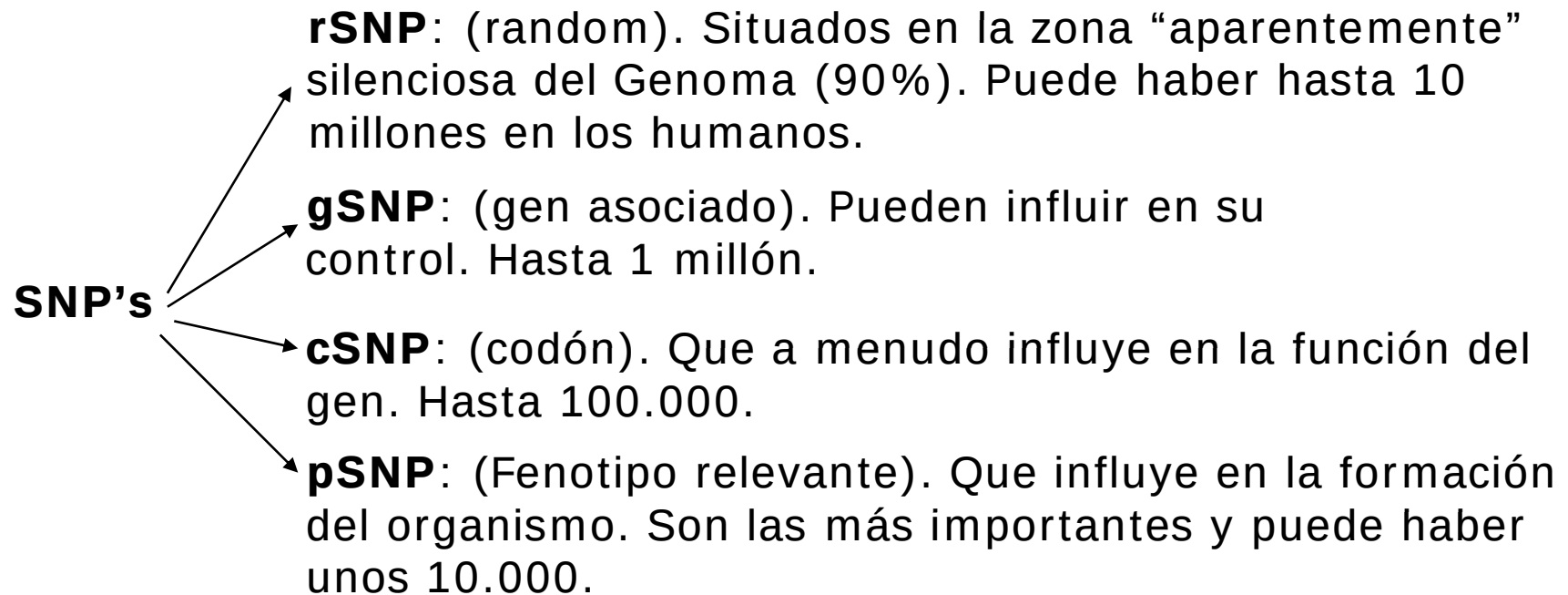
**Tenemos distintas:
Interacciones genes - ambiente**

¿Cómo somos y por qué nos diferenciamos ?

- **Nuestro genoma tiene:**
 - **Aprox. 30.000 genes.**
 - **3.000.000.000 (3×10^9) pb.**
 - **Unas 100.000 proteínas diferentes.**
- **El 99,9 % del genoma humano es idéntico en todos los individuos.**
- **Sin embargo, una de cada 500 a 1.000 pares de bases, son reemplazados por otras -> lo que explica:**
 - **Las diferencias entre individuos.**
 - **Que cada uno de nosotros seamos únicos y susceptibles de padecer una enfermedad .**
 - **Que un fármaco no actúe adecuadamente.**

**Cuando una variación está
presente en un nucleótido y en al
menos el 1% de la población se
denomina **SNP** (*Single
Nucleotide Polymorfism*)**

Tipos de polimorfismos genéticos



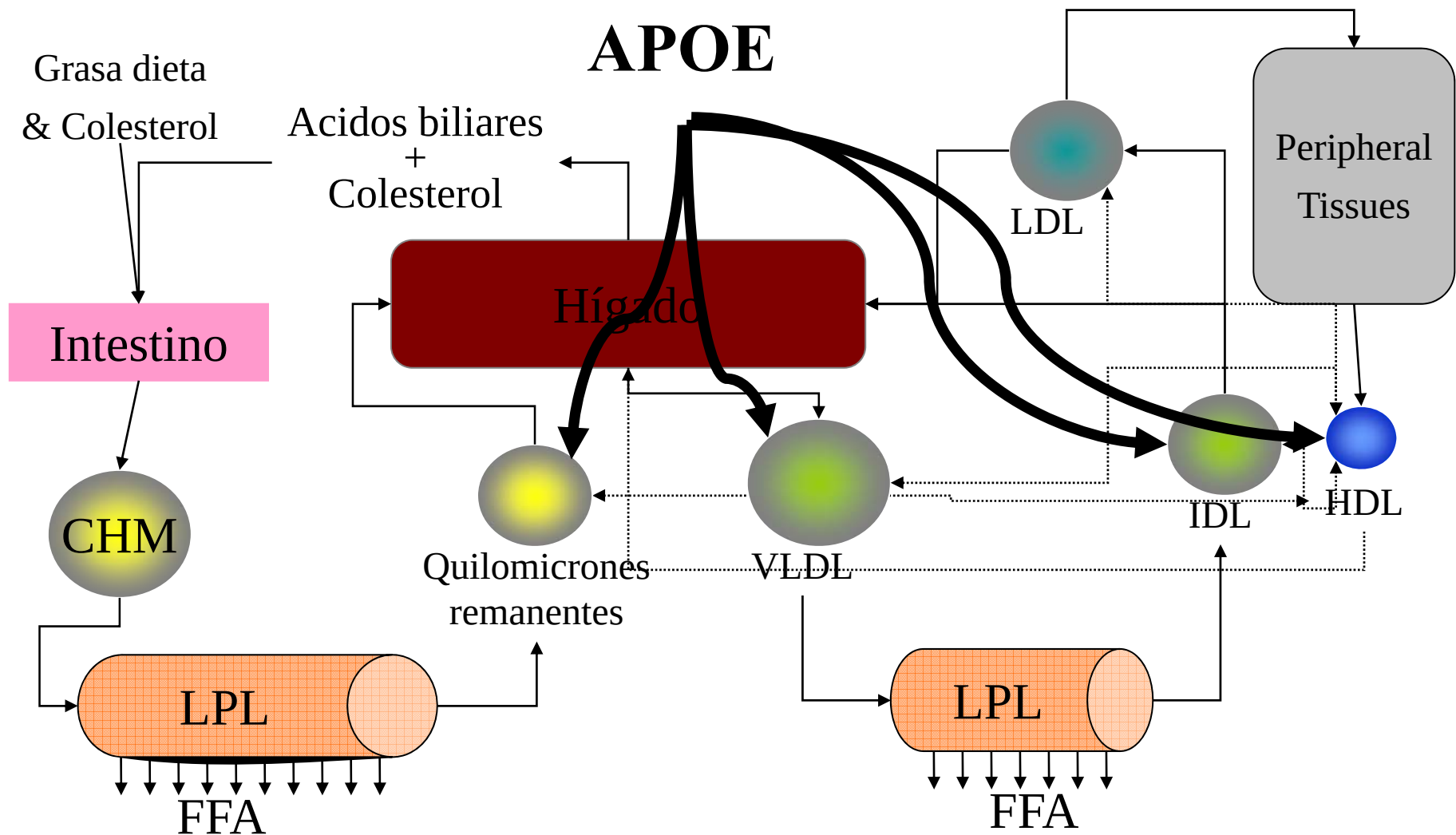
- Efectos
 - Involucración en el desarrollo y progresión de las enfermedades.
 - Interferencia en la acción de los fármacos.

> 10.000.000 variaciones en el genoma humano.

Ejemplos de polimorfismos que interfieren en la acción de los fármacos hipolipemiantes

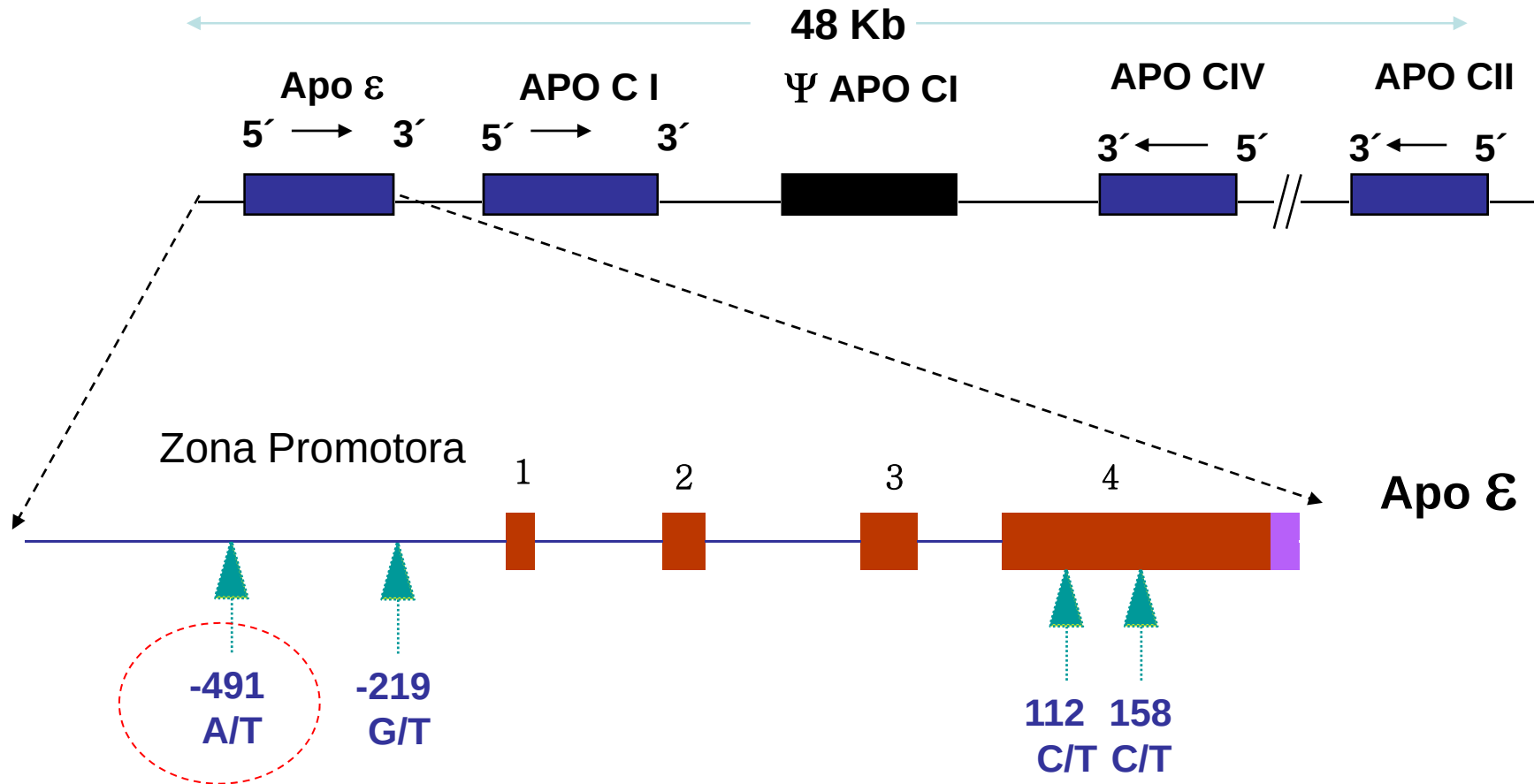
Metabolismo de las lipoproteínas

Exógena ← Ruta --> Endógena



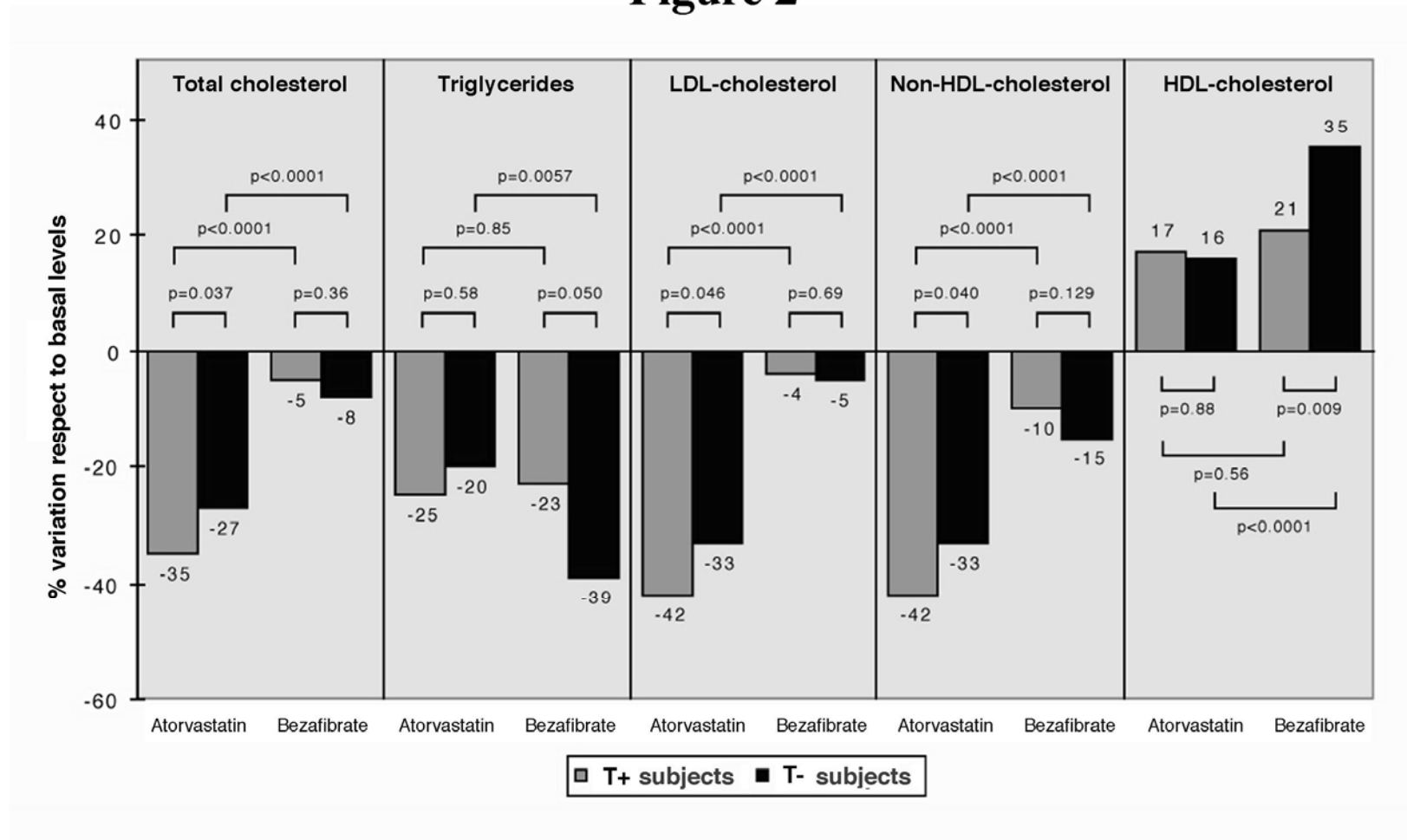
Gen de apoE

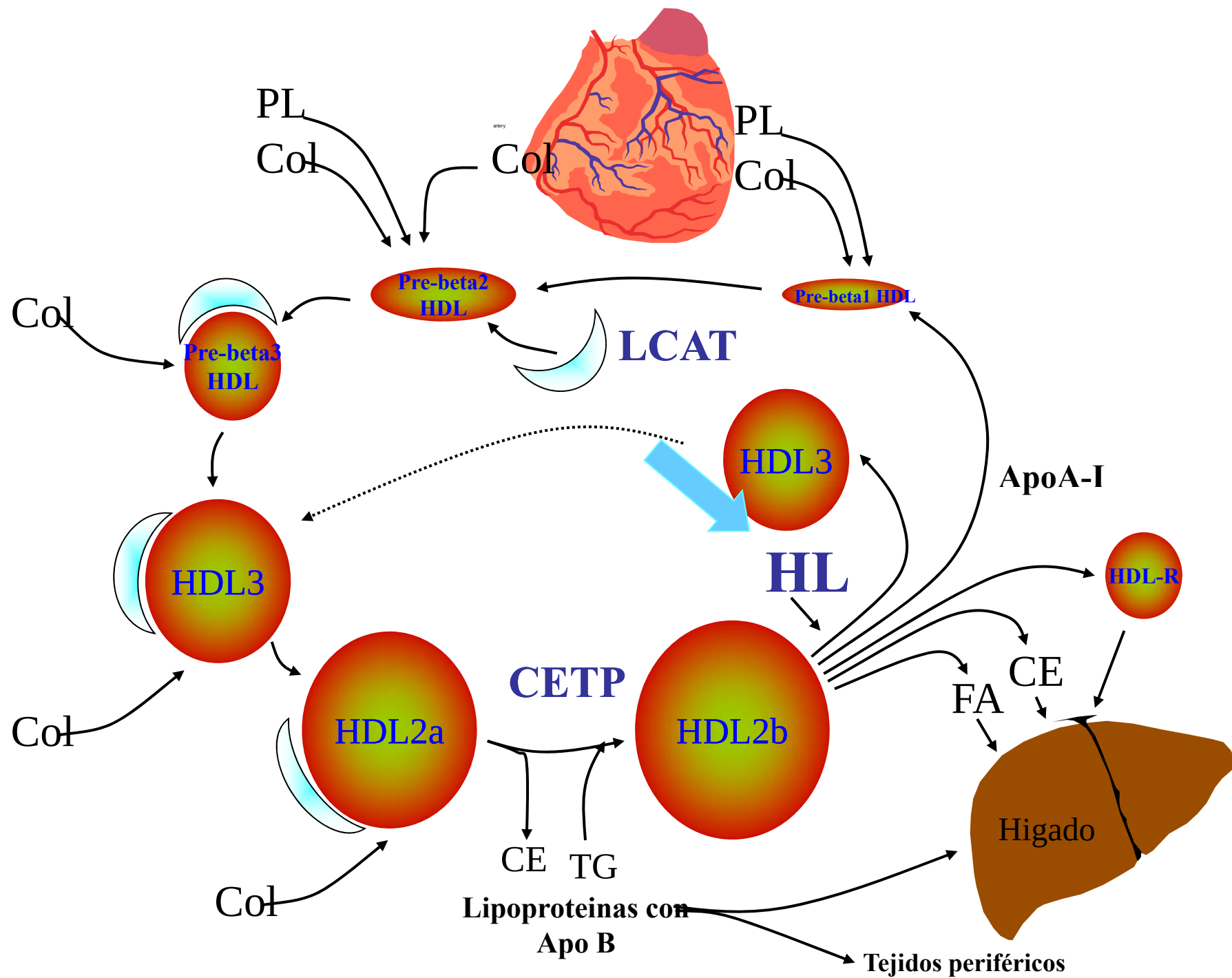
Cromosoma 19 q13.1



Respuesta hipolipemiante a atorvastatina y bezafibrato en pacientes con HLP III

Figure 2





Variantes de la zona 5' del gen LIPC

Se han identificado 4 sitios polimórficos en la zona promotora del gen la enzima lipoprotein lipasa (*LIPC*) que se encuentran en completo desequilibrio de unión. Estos polimorfismos definen el alelo -514T o el alelo -514C

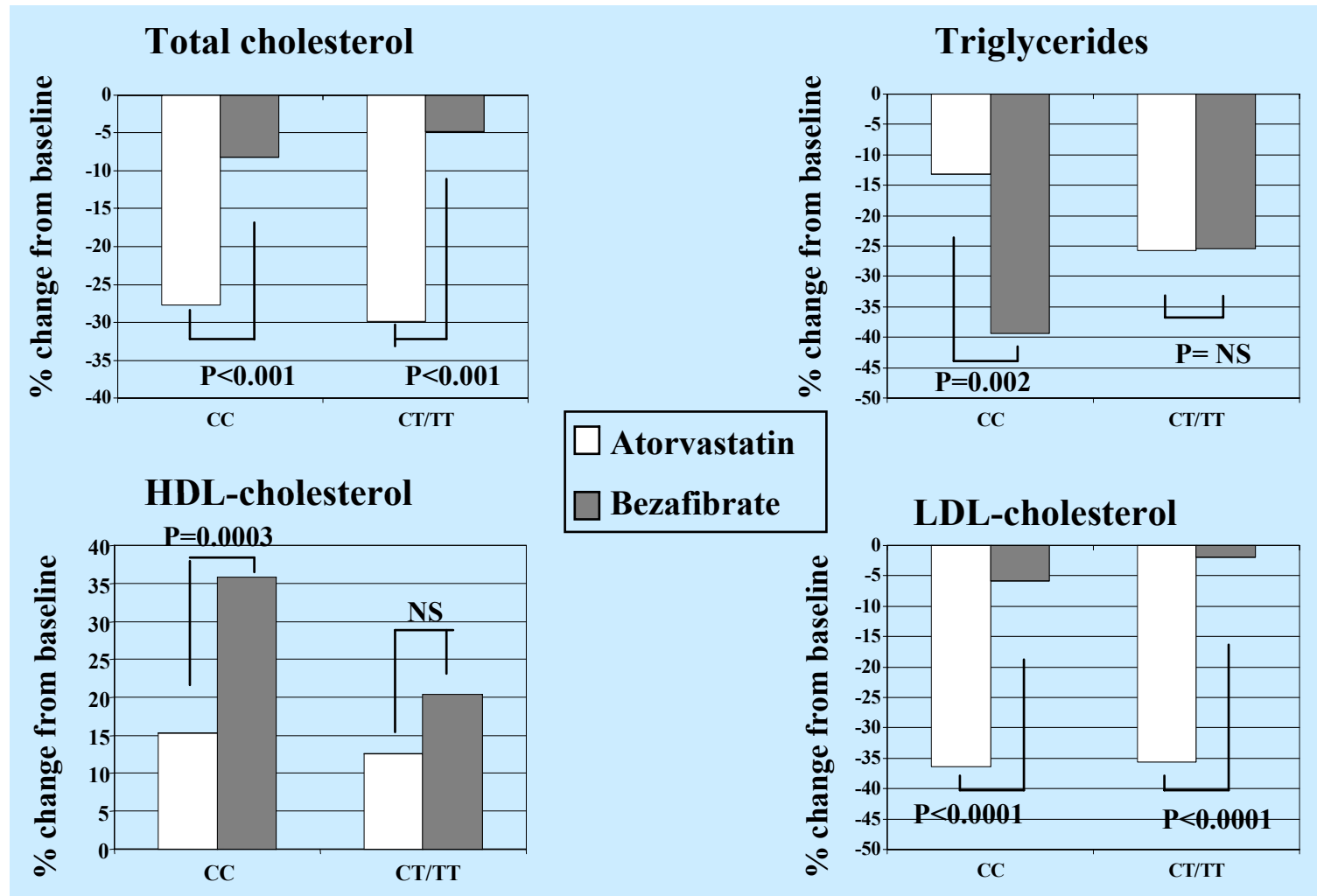


Frecuencias alélicas: alelo -514 T

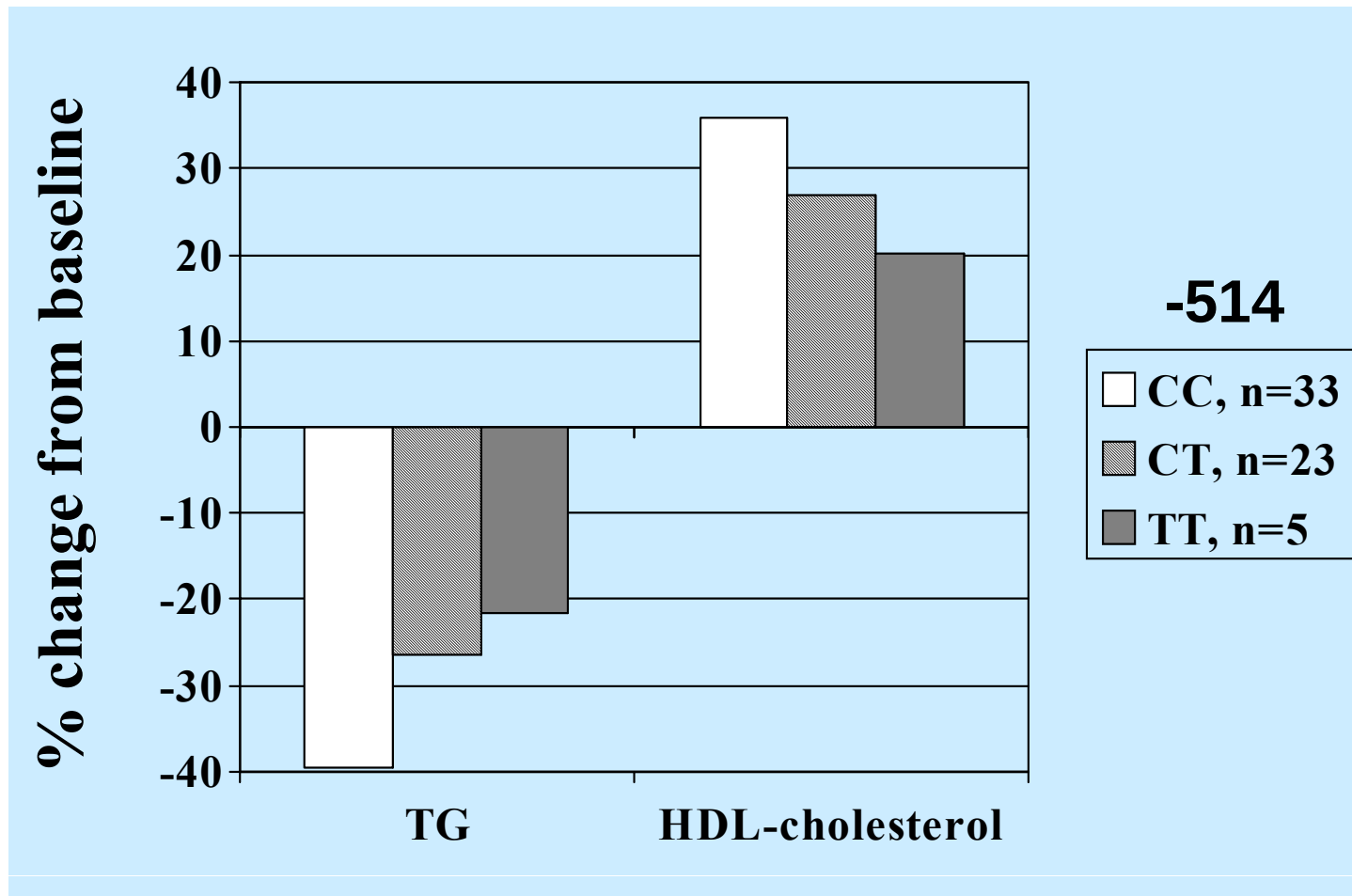
Blancos:	0.20
Negros:	0.50
Americanos nativos:	0.40
Asiáticos:	0.50

El genotipo -514T menor actividad transcripcional que el -514C

Comparison between atorvastatin and bezafibrate in mean percentage change in lipids and lipoprotein cholesterol after 12 months of treatment

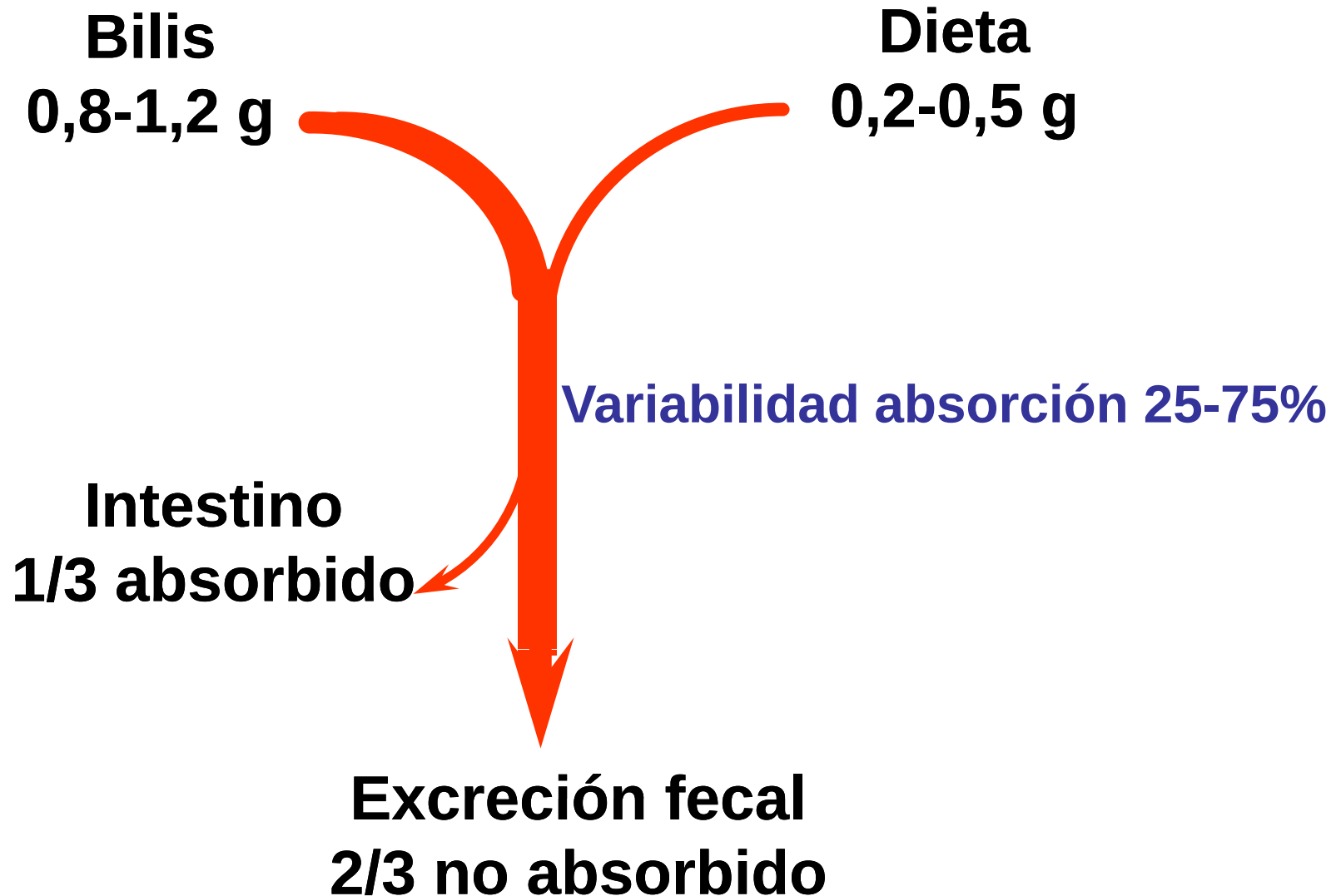


Changes in triglycerides (TG) and HDL-cholesterol after 12 months of treatment with bezafibrate



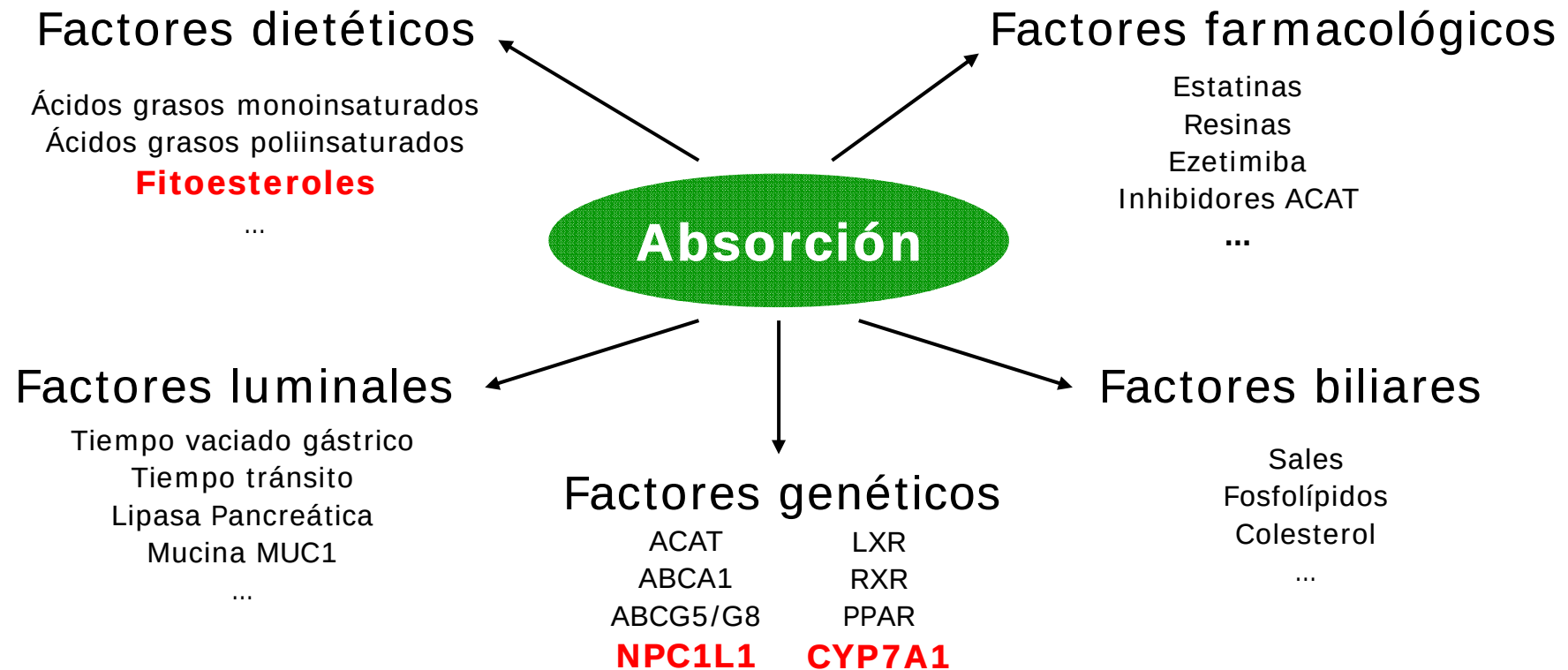
**Ejemplos de polimorfismos que
interfieren en la acción de
alimentos funcionales
hipocolesterolemiantes**

Absorción intestinal del colesterol

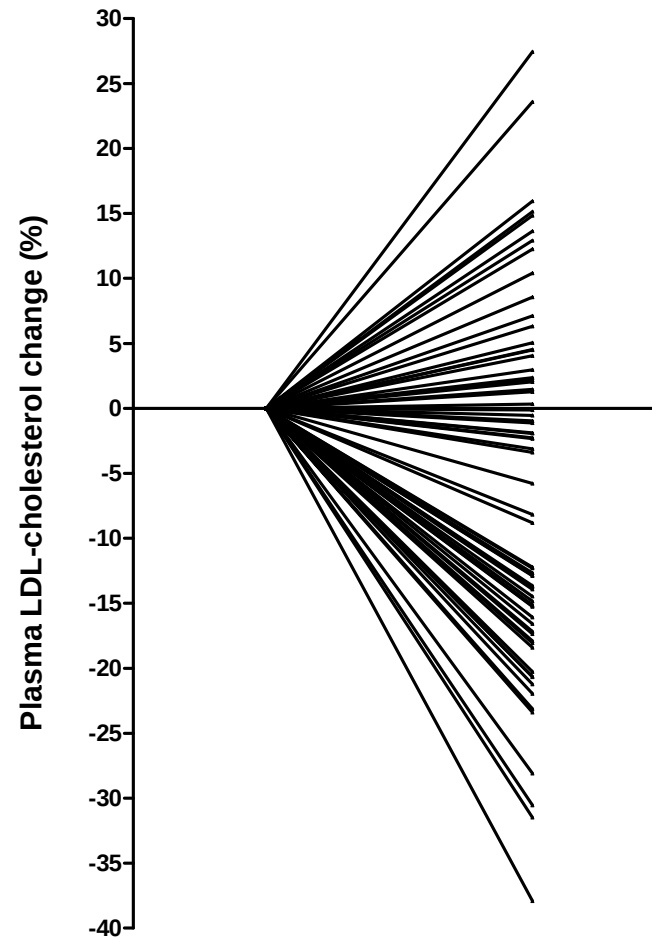


Factores que afectan la absorción intestinal de colesterol

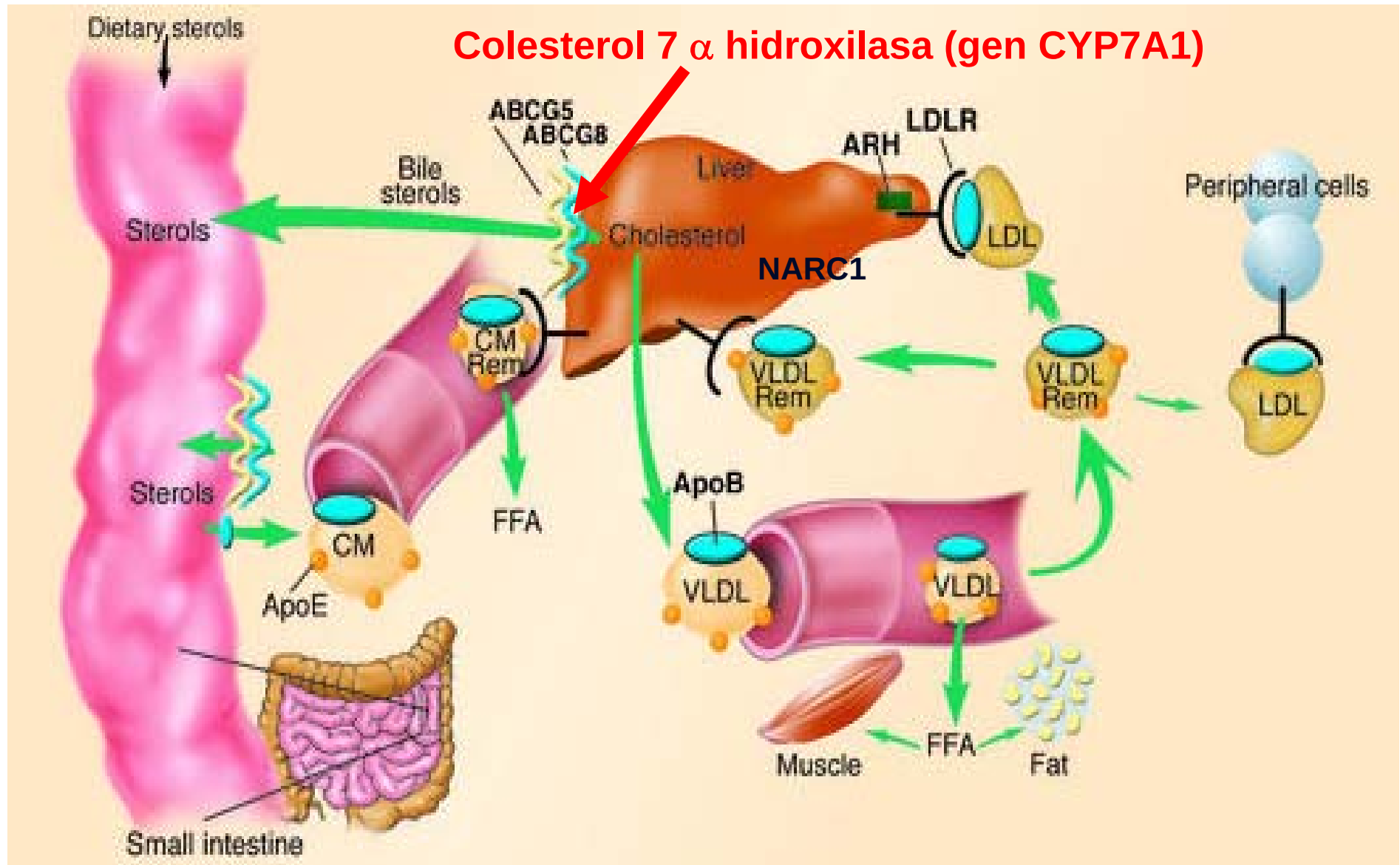
- La absorción es un proceso complejo, con múltiples pasos en la que influyen muchos factores.



Individual variability of LDL-cholesterol responses after intervention with plant sterols



Biosíntesis de ácidos biliares



SINTESIS DE ACIDOS BILIARES

Main pathway

Cholesterol

CYP7A1

7 α -hydroxycholesterol

Cholic acid

Alternate pathways

Cholesterol

25-hydroxycholesterol 27-hydroxycholesterol 24-hydroxycholesterol

CYP7B1

CYP39A1

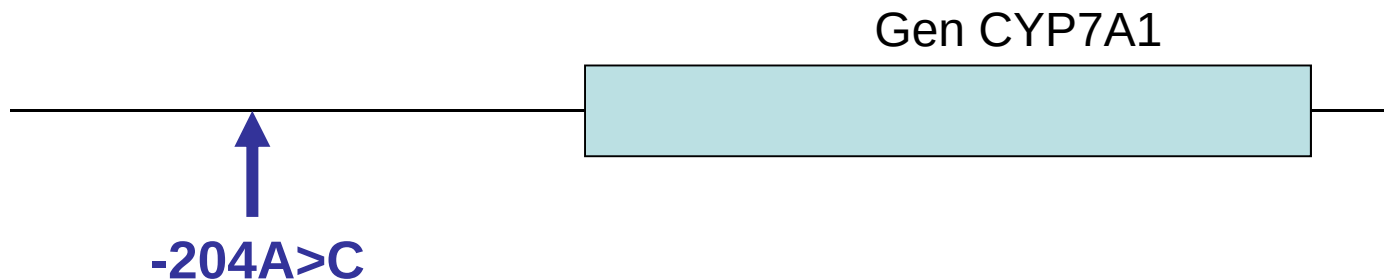
7 α -hydroxylated
oxysterols

Chenodeoxycholic acid

La enzima colesterol 7 α -hidroxilasa es el paso limitante en la transformación de colesterol en ácidos biliares

Hipótesis

- La variabilidad en la respuesta lipídica a los esteroides vegetales está asociada a la variante -204A>C del promotor del gen CYP7A1

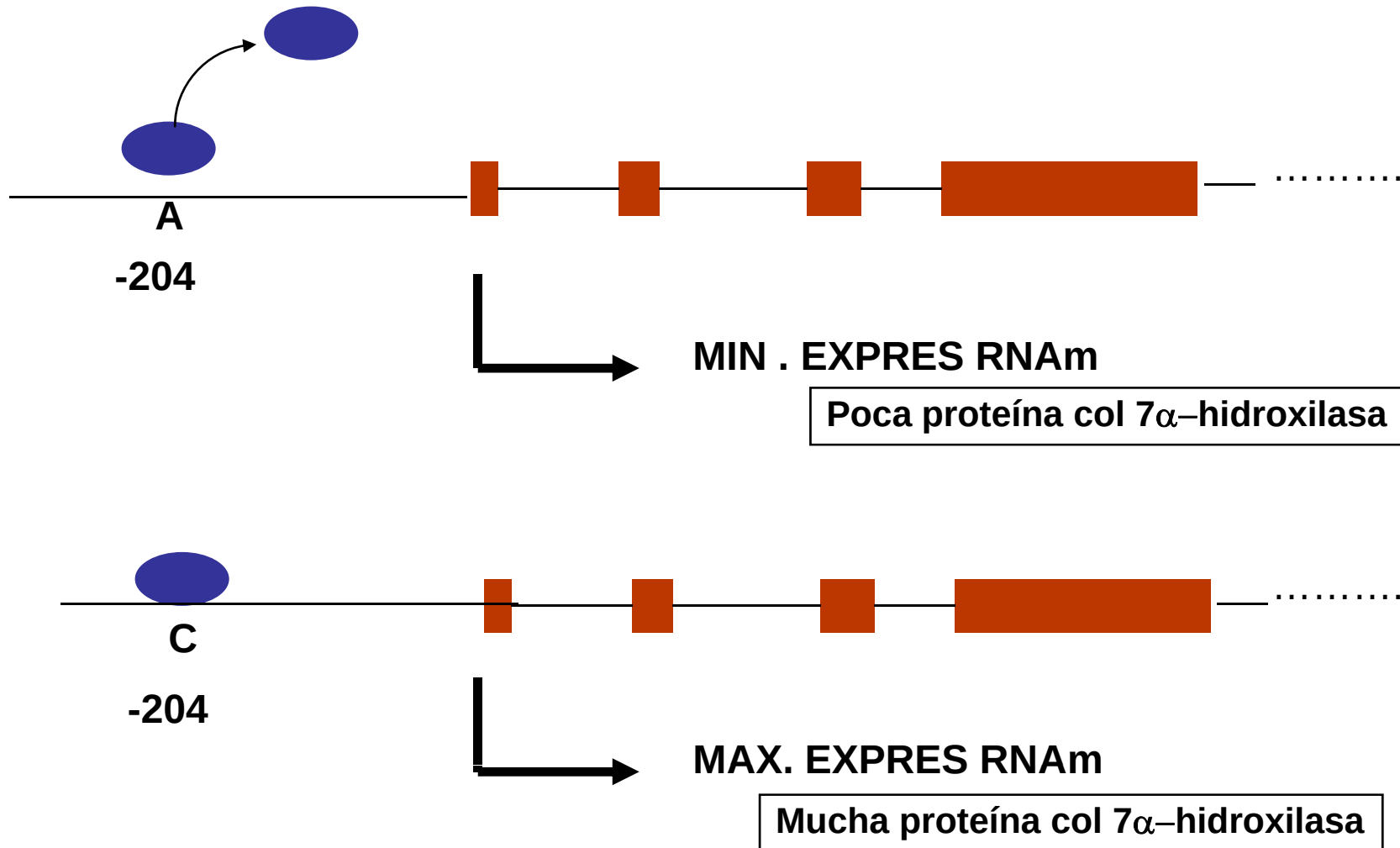


CYP7A1 -204A>C variants and plasma lipid and non cholesterol sterol responses to plant sterol treatment.

	Response per CYP7A1 genotype		
	AA (n=31)	AC + CC (N=36)	P*
Plasma lipids (mmol/L)			
Total cholesterol	-0.14 (-0.34 to 0.05)	-0.43 (-0.61 to -0.24)	0.042
LDL-cholesterol	-0.15 (-0.32 to 0.03)	-0.32 (-0.48 to -0.16)	0.148
HDL-cholesterol	0.06 (0.01 to 0.12)	0.01 (-0.03 to 0.06)	0.192
Triglycerides	-0.15 (-0.27 to -0.03)	-0.24 (-0.35 to -0.13)	0.275
Plasma ratios of non cholesterol sterols to cholesterol (μmol/mmol)			
Lathosterol	0.10 (-0.28 to 0.47)	0.75 (0.41 to 1.09)	0.013
Campesterol	2.01 (1.56 to 2.64)	2.51 (2.01 to 3.00)	0.275
Sitosterol	1.50 (1.04 to 1.96)	2.02 (1.59 to 2.45)	0.108

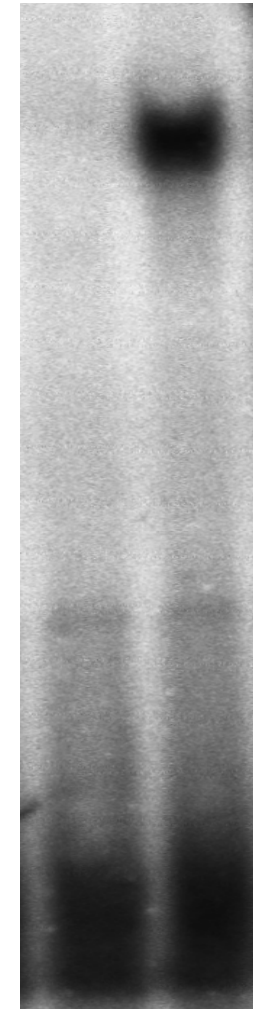
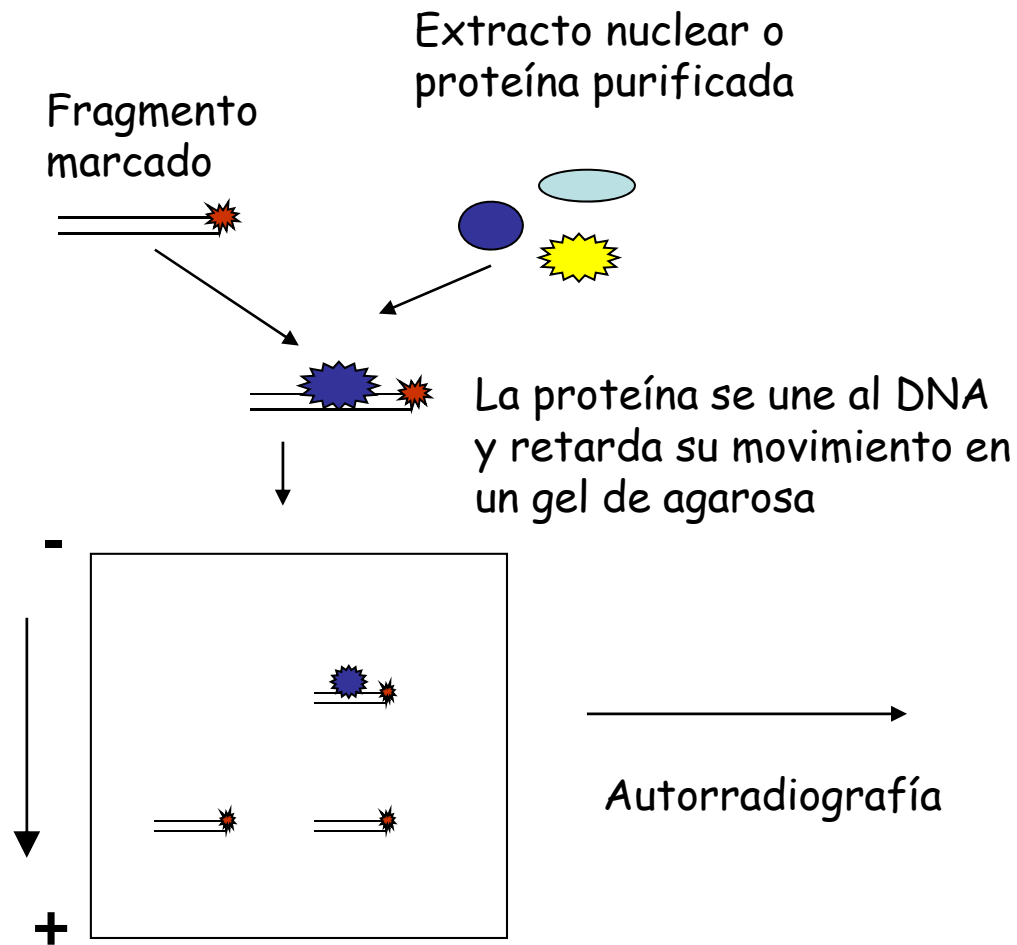
de Castro et al (Submitted)

¿Por qué les baja mas el colesterol a los portadores de -204C?

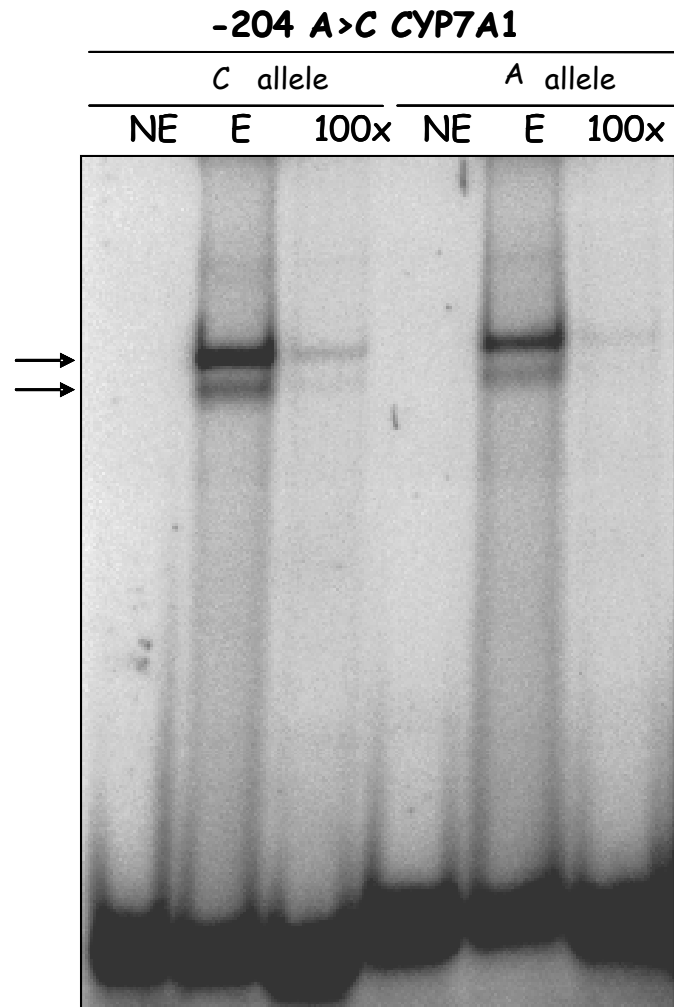


¿Cómo podemos saber si existe una proteína del núcleo que se une a un fragmento de DNA?

Ensayo de retardo en gel (EMSA)

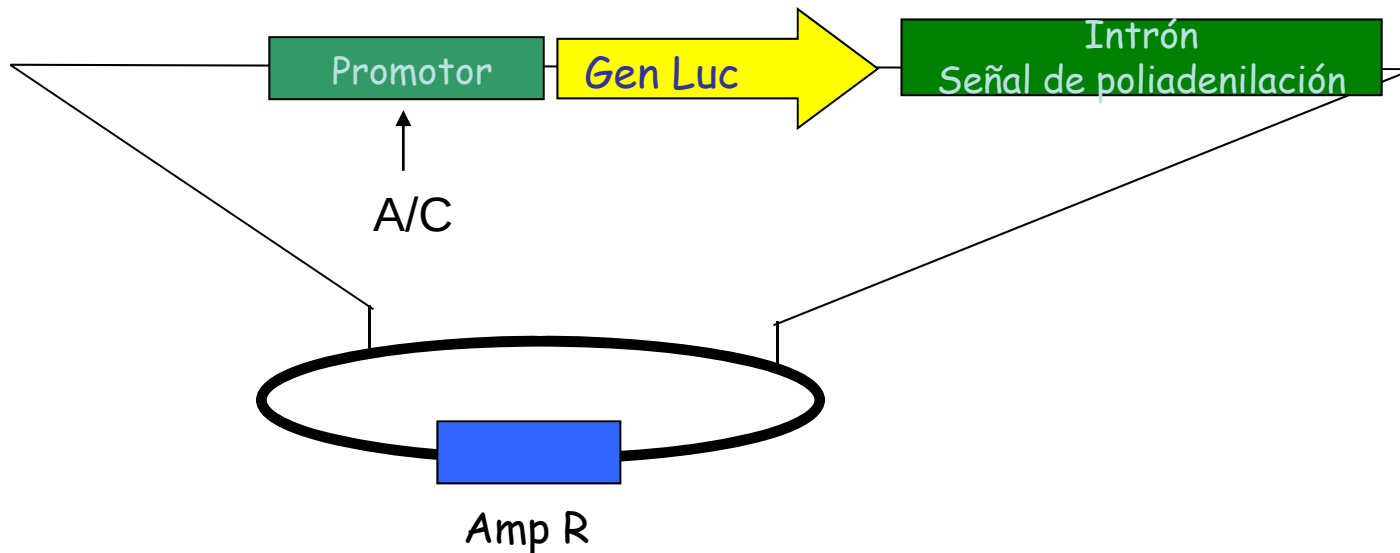


**EMSA assay carried out with probes
containing the A or C allele for the -204A>C
SNP in the CYP7A1 gene**

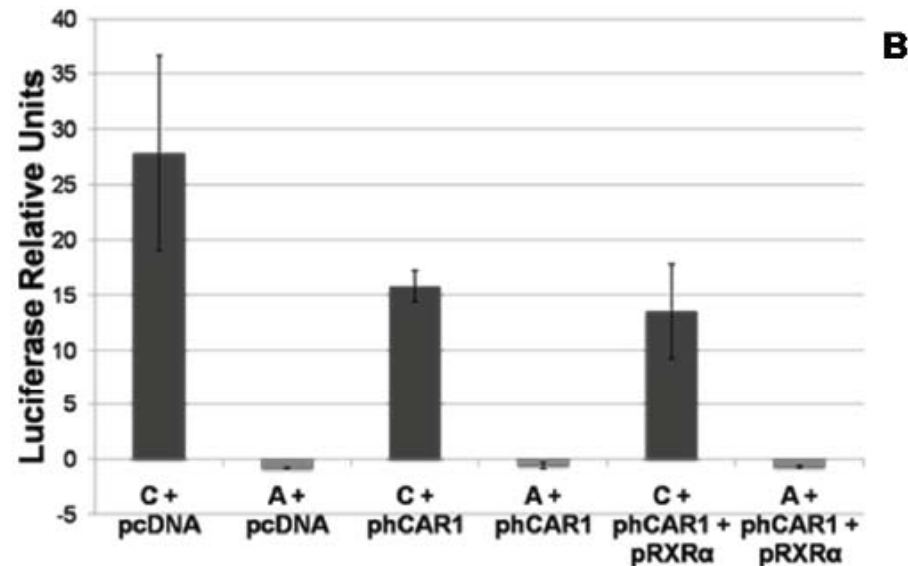
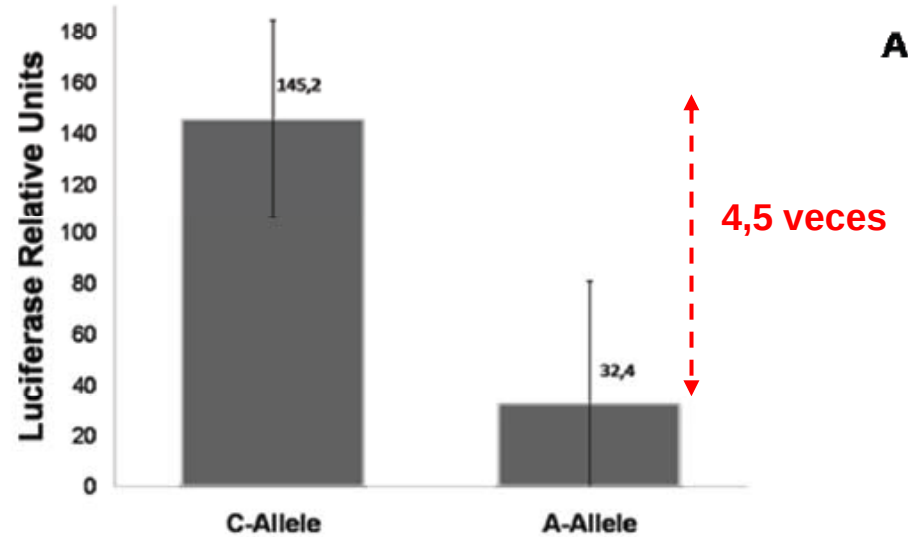


¿Cómo podemos cuantificar el cambio la potencia del promotor?

Construcción con gen reportero: Vector para análisis de funcionalidad de promotores



Relative luciferase activity standardized with renilla activity performed with -204C and A alleles construct.

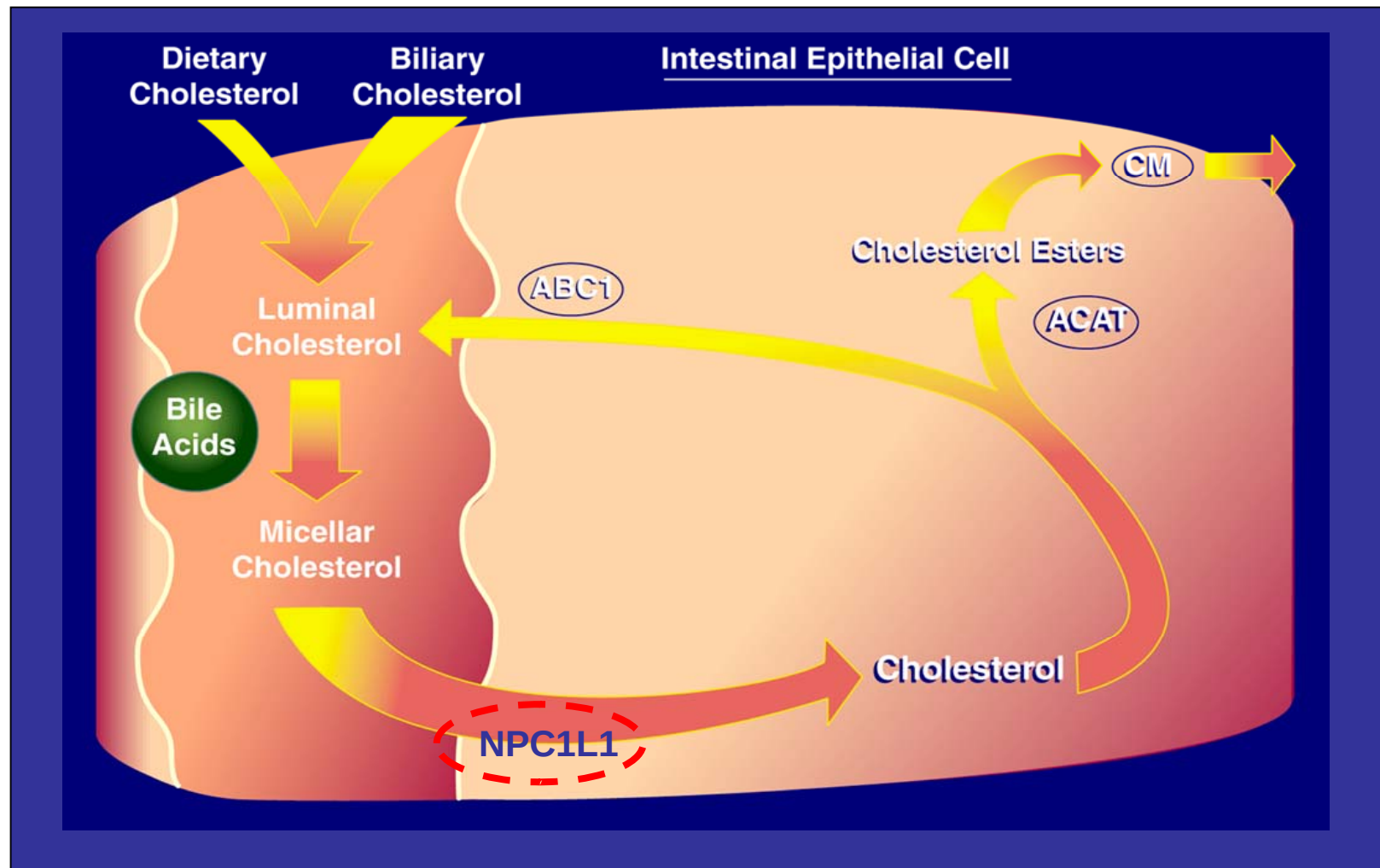


de Castro et al (Submitted)

CYP7A1 -204A>C variants and plasma lipid and non cholesterol sterol responses to plant sterol treatment.

Response per CYP7A1 genotype			
	AA (n=31)	AC + CC (N=36)	P*
Plasma lipids (mmol/L)			
Total cholesterol	-0.14 (-0.34 to 0.05)	-0.43 (-0.61 to -0.24)	0.042
LDL-cholesterol	-0.15 (-0.32 to 0.03)	-0.32 (-0.48 to -0.16)	0.148
HDL-cholesterol	0.06 (0.01 to 0.12)	0.01 (-0.03 to 0.06)	0.192
Triglycerides	-0.15 (-0.27 to -0.03)	-0.24 (-0.35 to -0.13)	0.275

Absorción intestinal de colesterol



Efecto de los polimorfismos -1473T>C, -1128A>G, -18C>A del gen NPC1L1

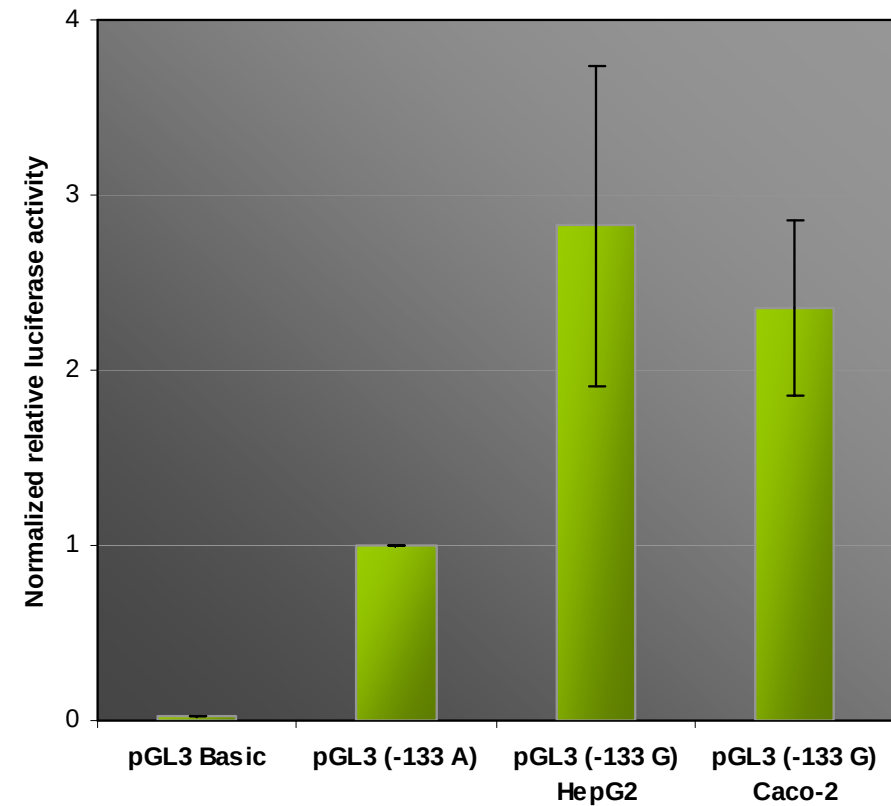
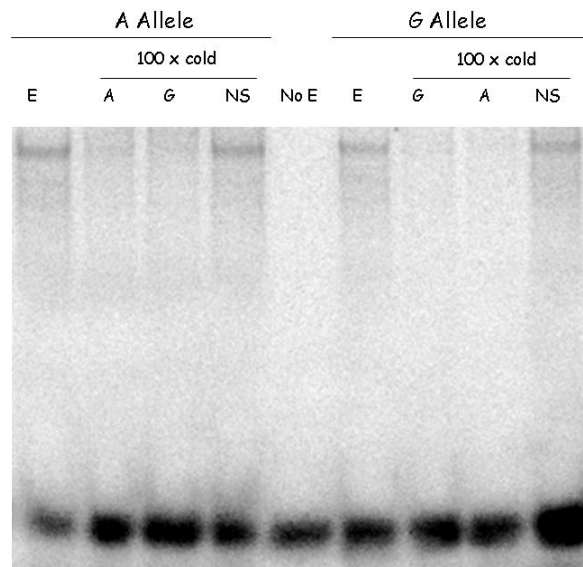
n	pp 40	pq + qq 25
Desmosterol		
Basal	1,0±0,25	1,0±0,42
Final	1,2±0,33	1,1±0,43
Cambio	0,2±0,29	0,05±0,37
Latosterol		
Basal	1,8±0,77	2,3±1,56
Final	2,6±1,38	2,2±1,40
Cambio	0,8±1,05	-0,04±1,10 **
Campesterol		
Basal	2,0±0,76	1,9±0,81
Final	4,6±1,58	4,1±1,81
Cambio	2,5±1,57	2,1±1,65
Sitosterol		
Basal	1,9±0,76	1,7±0,57
Final	3,7±1,86	3,4±1,90
Cambio	1,8±1,39	1,7±1,60

(μmol / mmol colesterol)

* p<0,05

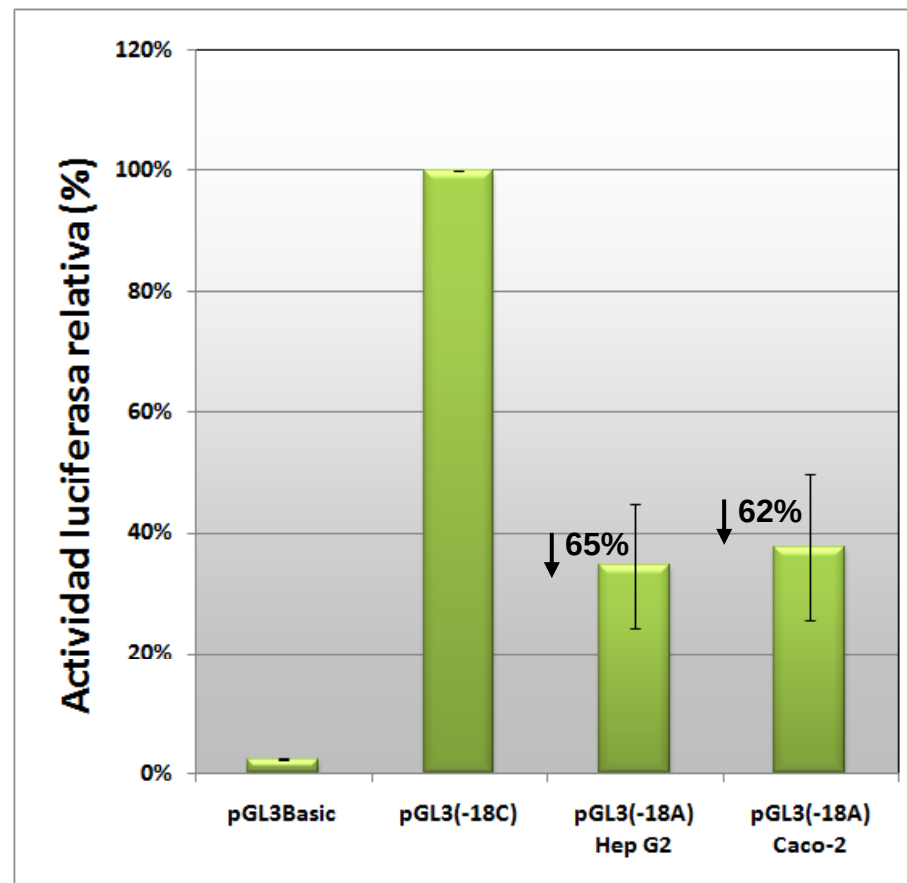
** p<0,01

Efecto del polimorfismo -133A>G en la actividad transcripcional del gen NPC1L1



Efecto del polimorfismo -18C>A en la actividad transcripcional del gen NPC1L1

- Existen diferencias en la actividad transcripcional del promotor del gen NPC1L1 en función del polimorfismo -18C>A.



Martín B. et al Nutr Metab Cardiovas Res 2009

GENES RELACIONADOS CON ABSORCIÓN DE ESTEROLES Y CIRCULACION ENTEROHEPÁTICA

CYP7A1 -> (-204A>C)

NPC1L1 -> -18 C>A, -133 A>G

ABCG5 -> (1950 C>G , Q604E)

ABCG8 -> (-19T>G; 55G>C , D19H)

ABCA1 -> (R219K)

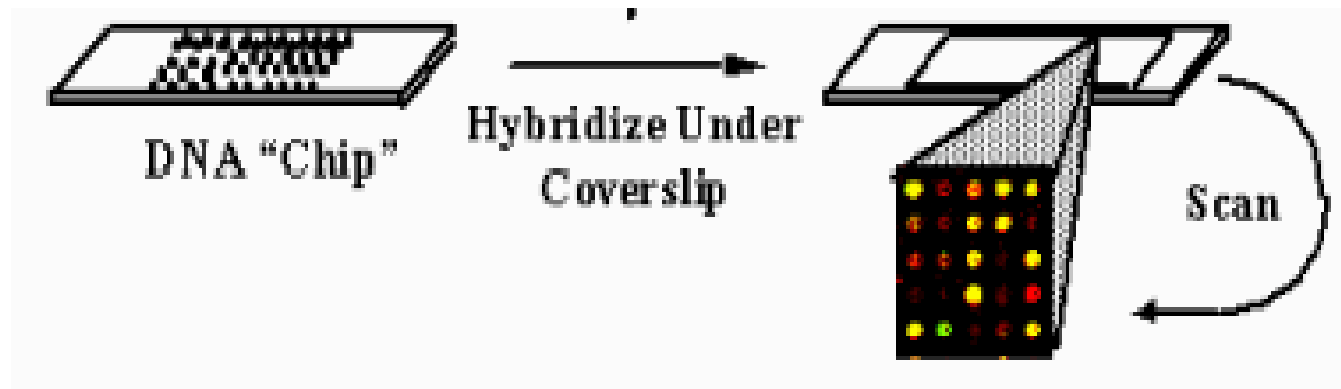
AIV -> (E360H; T347S)

LXR α -> (S99S C>T; V378V A>G; P436P A>C)

**Herramientas que nos permiten
identificar estas variaciones
interindividuales en paralelo**

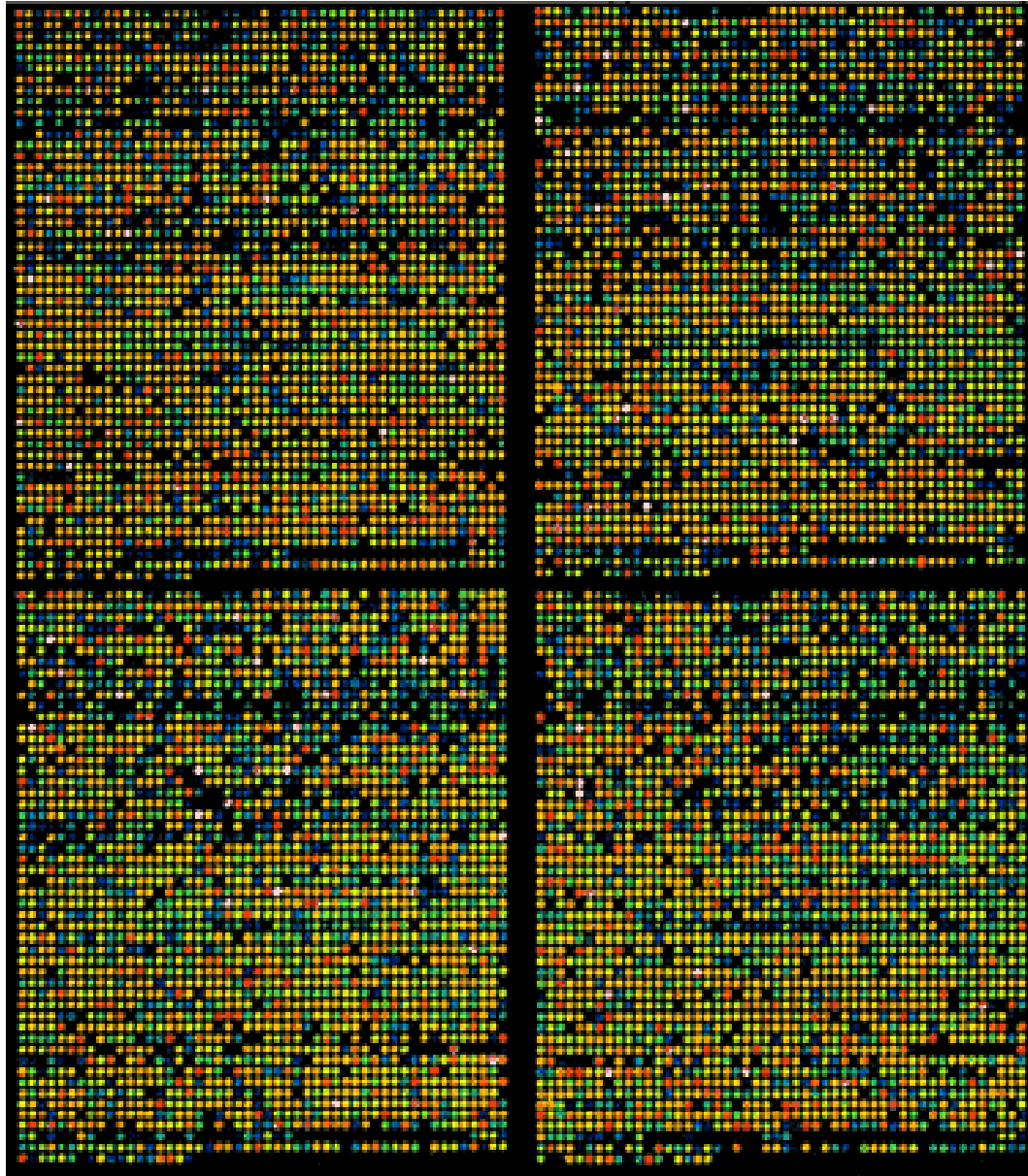
Chip de DNA

Un biochip, microarray o chip de DNA es una colección de fragmentos de ácidos nucleicos (sondas) anclados en un soporte de tamaño pequeño y parecido a un porta de microscopio



Microarrays

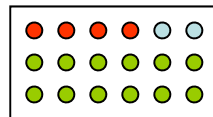
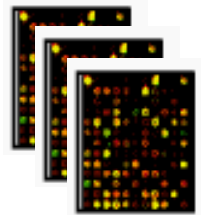
Análisis en paralelo
de cientos SNPs



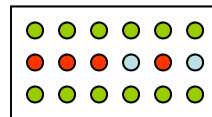
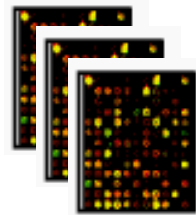
Identificación de respuesta a tratamiento

SNPs CONOCIDOS EN BASES DE DATOS

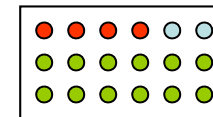
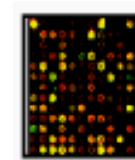
Pacientes respondedores



Pacientes no respondedores



Nuevo Paciente

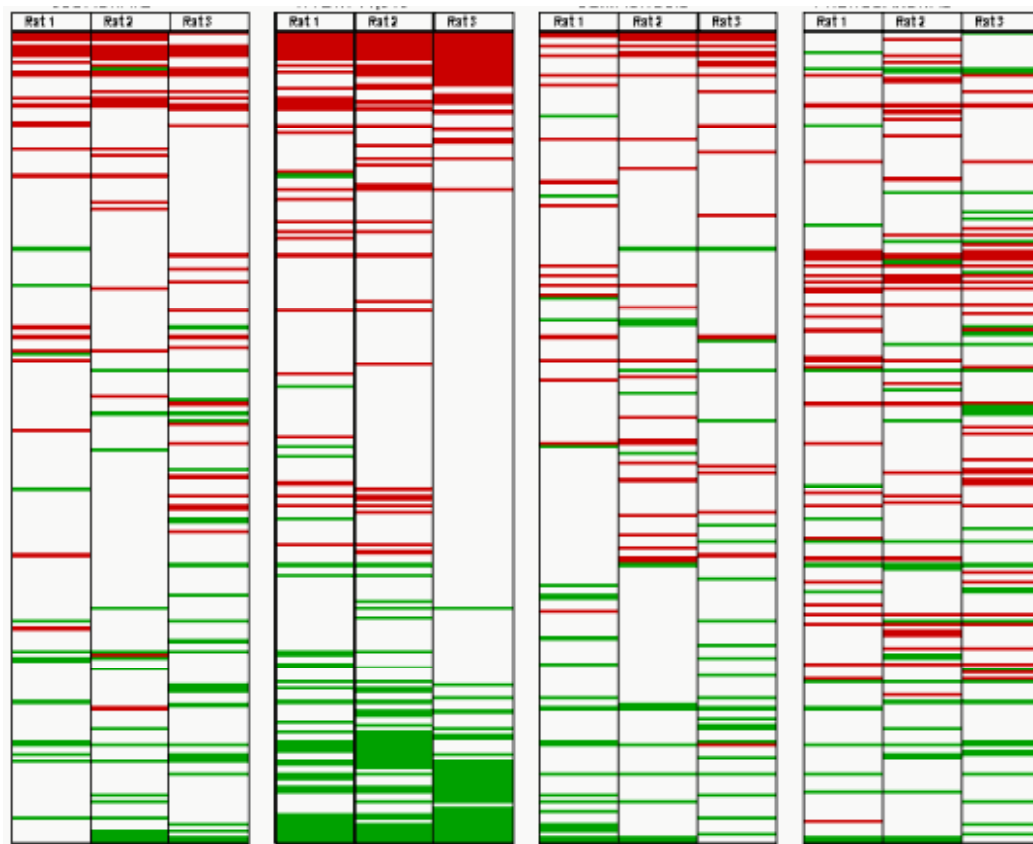


NO

SI

(Rosenwald y cols., 2002)

Identificación de respuesta a tratamiento



Estudio de un panel de Polimorfismos: → Código de barras

Algunos test farmacogenéticos (I)

Test farmacogenética	Genes que analiza	Consecuencia clínica
AmpliChip	2 genes (CYP2D6 / CYP2C19)	Determina los polimorfismos implicados en la dosificación de fármacos antidepresivos y antipsicóticos (atomoxetina).
UGT1A1 Invader	1 gen (UGT1A1)	Determina la toxicidad del irinotecan en cáncer de colon
PGxPredict	2 genes (CYP2C9 / VCORC1)	Orienta la dosificación de la warfarina y evita efectos tóxicos.
PRO-PredictRx	1 gen (TPMT)	Determina la toxicidad de antineoplásicos (6-MP y azatioprina)
CodeLink P450 Tag-It Mutation kit	9 genes (CYP450) 3 genes (CYP450)	Determina los polimorfismos implicados en la dosificación de diversos fármacos lipofílicos. En función del contenido del biochip, determina la selección del fármaco y/o dosis para diversas áreas terapéuticas: SNC (antidepresivos, antipsicóticos), inmunosupresores (transplantes), antineoplásicos, cardiovasculares (antihipertensivos, estatinas,...)
DrugMEt Genotyping test	7 genes (CYP450 / TPMT / NAT2 / MDR1)	
Drug inCode	33 genes	

Algunos test farmacogenéticos (II)

Test farmacogenética	Genes que analiza	Consecuencia clínica
Oncotype DX MammaPrint	21 genes 71 genes	Determina el riesgo de metastasis en cáncer de mama y la magnitud del beneficio del tratamiento hormonal o quimioterapia.
CupPrint	500 genes	Determina el origen de cáncer de origen desconocido para aplicar la terapia adecuada.
TruGene-HIV 1	HIV	Orienta en la selección de la terapia antiretroviral.
BCR-ABL C-KIT	BCR / ABL CD117	Selecciona a pacientes tributarios de imatinib.
Familion	5 genes (LQTS)	Orienta en la prevención para pacientes con alteraciones cardíacas arritmogénicas.
BRCA 1,2	BRCA	Orienta en el tratamiento en pacientes con riesgo de cáncer mama y ovario
HercepTest	HER2	HER+ posibilita el tratamiento con trastuzumab en cáncer de mama

Ejemplos de biochips
análisis genético:
“test farmacogenético”

Contenido del biochip Drug inCode (I)

33 genes: 120 variaciones

CITOCROMO P450

GEN		ALELOS ANALIZADOS
CYP1A1	Citocromo P450 1A1	*1, *2B, *2C
CYP1A2	Citocromo P450 1A2	*1, *1C, *1F, *7, *11
CYP2B6	Citocromo P450 2B6	G516T
CYP2C19	Citocromo P450 2C19	*1, *2, *3, *4, *5, *7, *8, *9, *10
CYP2C8	Citocromo P450 2C8	*1, *2, *3, *4
CYP2C9	Citocromo P450 2C9	*1, *2, *3, *4, *5, *6
CYP2D6	Citocromo P450 2D6	*1, *2, *3, *4, *5 (delección), *6, *7, *8, *9, *10, *11, *14A, *14B, *15, *17, *19, *20, *25, *26, *29, *30, *31, *35, *40, *41, duplicación *1XN, *2XN, *4XN, *10XN, *17XN, *35XN, *41XN
CYP3A4	Citocromo P450 3A4	*1, *1B
CYP3A5	Citocromo P450 3A5	*1, *3, *6, *8, *9, *10

ENZIMAS DE FASE II

GEN		ALELOS ANALIZADOS
GSTM1	Glutation transferasa M1	Presente/Nulo
GSTM3	Glutation transferasa M3	*A, *B
GSTP1	Glutation transferasa-P1	*A, *B
GSTT1	Glutation transferasa-T1	Presente/Nulo
NAT2	N-acetiltransferasa 2	*4, *5A, *5B, *5C, *6A, *7B, *12A, *12B, *13, *14A, *14B
TPMT	Tiopurina metiltransferasa	*1, *2, *3A, *3B, *3C, *3D
UGT1A1	UDP-glucuronosiltransferasa 1	*1, *28

Contenido del biochip Drug inCode (y II)

PROTEINAS TRANSPORTADORAS

GEN		ALELOS ANALIZADOS
MDR1	Glicoproteína P1	C3435T
SLC6A4	Transportador de serotonina	Delección 44 pb

RECEPTORES

GEN		ALELOS ANALIZADOS
ADRB1	Receptor adrenérgico beta 1	Arg389Gly
ADRB2	Receptor adrenérgico beta 2	Arg16Gly , Gln27Glu
AGTR1	Receptor angiotensinógeno	A1166C
BDKRB2	Receptor bradiquinina B2	C-58T
DRD3	Receptor dopaminérgico D3	Ser9Gly
GRIN2B	Receptor glutamatérgico NMDA 2B	C2664T
HTR2A	Receptor serotoninérgico 5HT2A	His452Tyr, T102C

VARIOS

GEN		ALELOS ANALIZADOS
ADD1	Aducina 1 (alfa)	Gly460Trp
AGT	Angiotensinógeno	Met235Thr
BCHE	Butirilcolinesterasa	Asp70Gly , Ala539Thr
COMT	Catecol O metiltransferasa	Val108Met
DPYD	Dihidropirimidina deshidrogenasa	IVS14+1 G>A
ERCC2	Proteína reparadora de DNA ERCC2	Lys751Gln
IL10	Interleucina 10	G-1082A
MTHFR	5,10-Metilentetrahidrofolato reductasa	C677T
TNF	Factor de necrosis tumoral TNF	G-308A
TYMS	Timidilato sintetasa	Delección 3'-UTR 6 pb , 2R/3R
VKORC1	Vitamina K epóxido reductasa complejo 1	G-1639A

Algunas utilidades de Drug inCode

- Tratamiento con antineoplásicos
- Tratamiento y profilaxis con inmunosupresores en transplante de órganos.

HercepTest

Posibilita el tratamiento con trastuzumab
en cáncer de mama

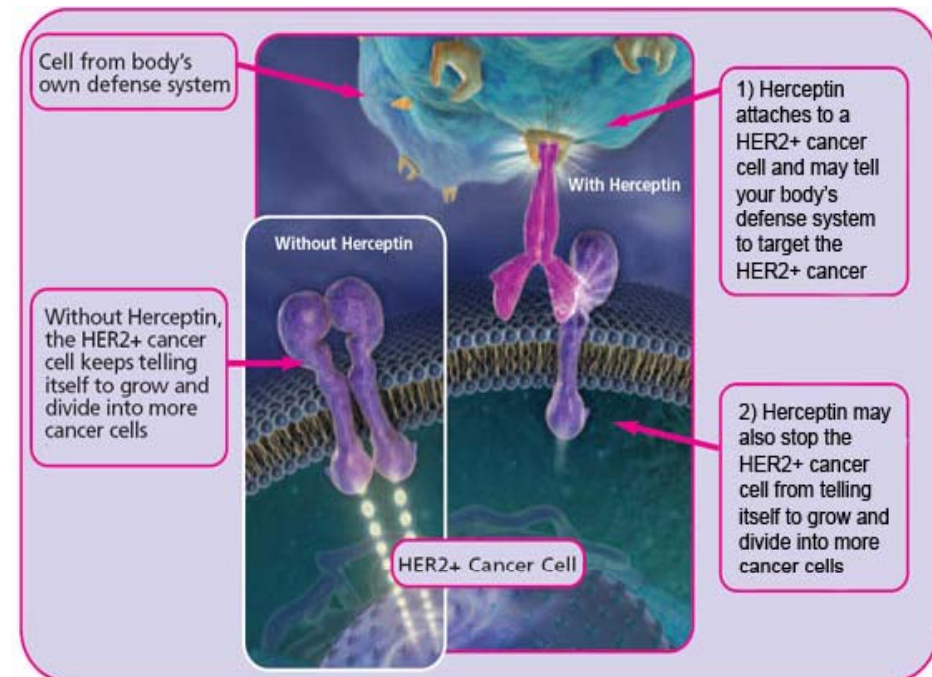
Un medicamento *genómico*: Herceptin

■ Herceptin (trastuzumab)

- Es el caso del primer fármaco desarrollado para un perfil genético determinado:
 - Destinado al 30% de mujeres con cáncer de mama metastático que presentan una sobreexpresión del gen HER2.
 - La sobreexpresión de este gen está relacionada con un mal pronóstico.
 - La proteína asociada al gen está involucrada en el crecimiento y división celular del tumor.

– Que actúa sobre una línea específica a nivel molecular:

- Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal que está diseñado específicamente para reconocer y unirse a la proteína HER2, impidiendo el crecimiento del tumor y ayudando al sistema inmunológico a combatir el cáncer.



Test para conocer intolerancia a Lactosa



Ingestión de pequeñas dosis un análogo de lactosa: 4- Galactosil-Xilosa y la posterior medición en orina o sangre de los subproductos de hidrólisis por la lactasa.

Medicina Personalizada

Medicina Personalizada

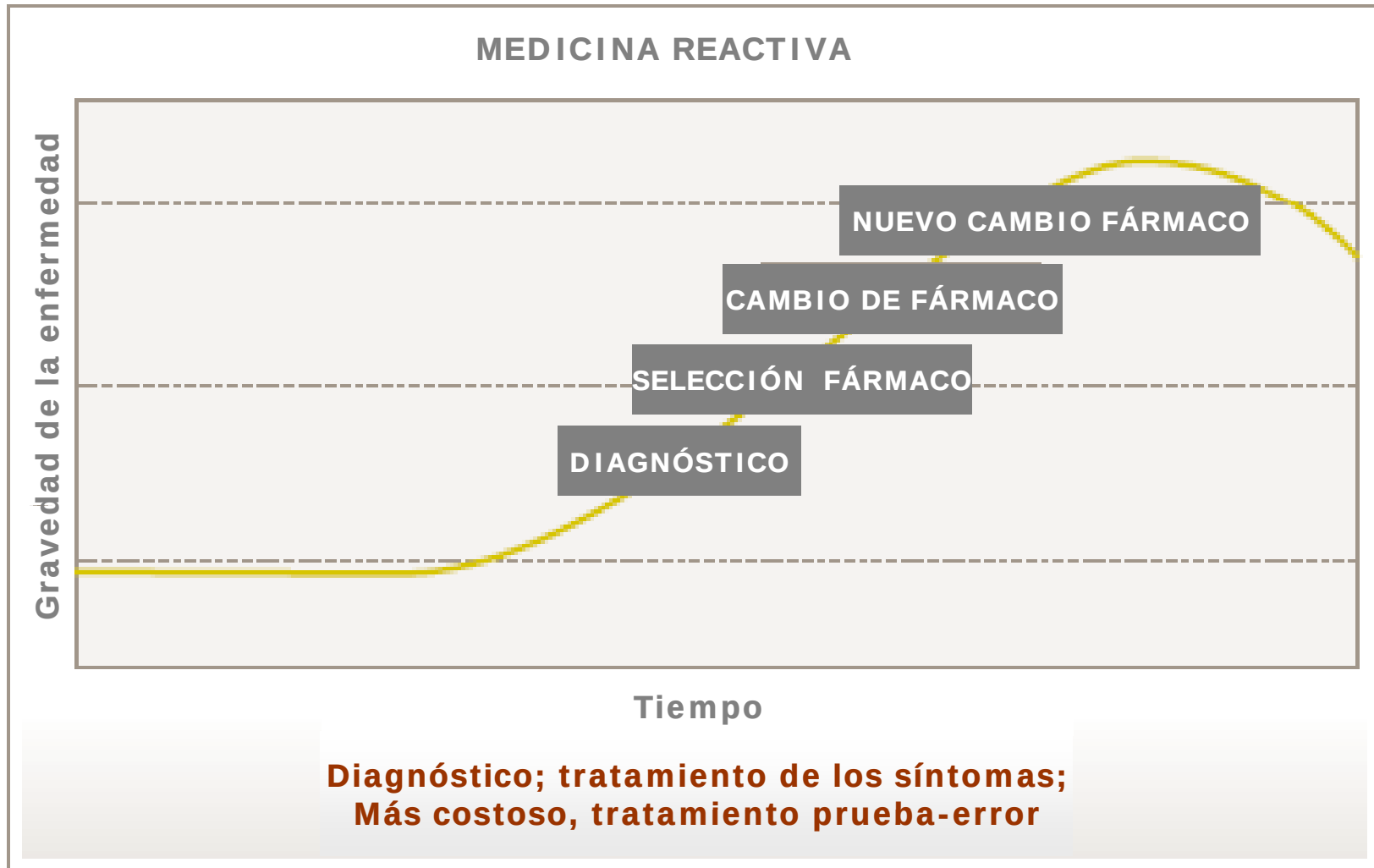
Una buena terapia empieza por un buen diagnóstico

NO significa la aplicación de tratamientos preventivos o curativos a medida de cada paciente.

SI la aplicación de tratamientos mas adecuados a un determinado segmento de la población que presenta características genéticas comunes.

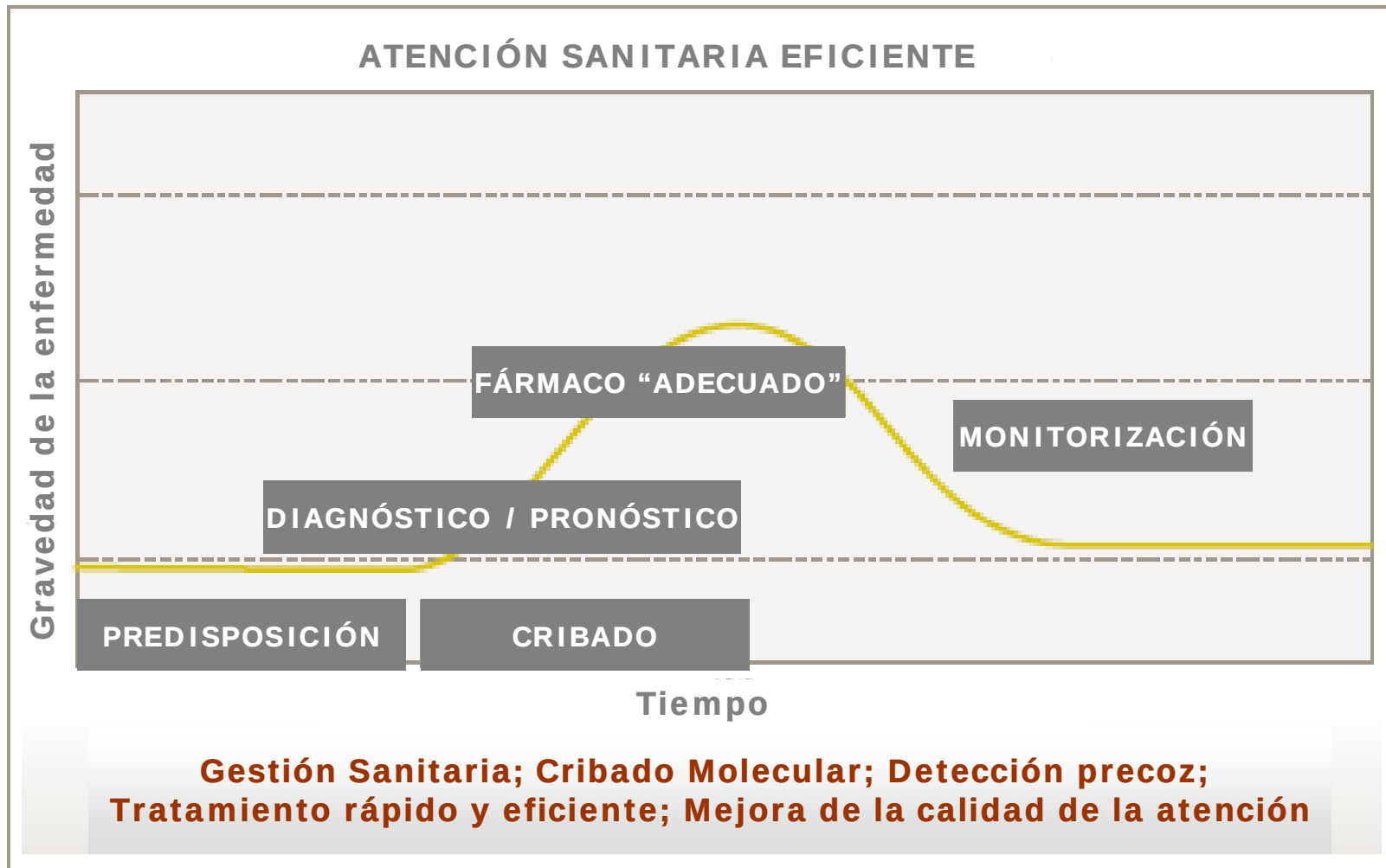


Cambio en el modelo: de medicina reactiva a preventiva (I)



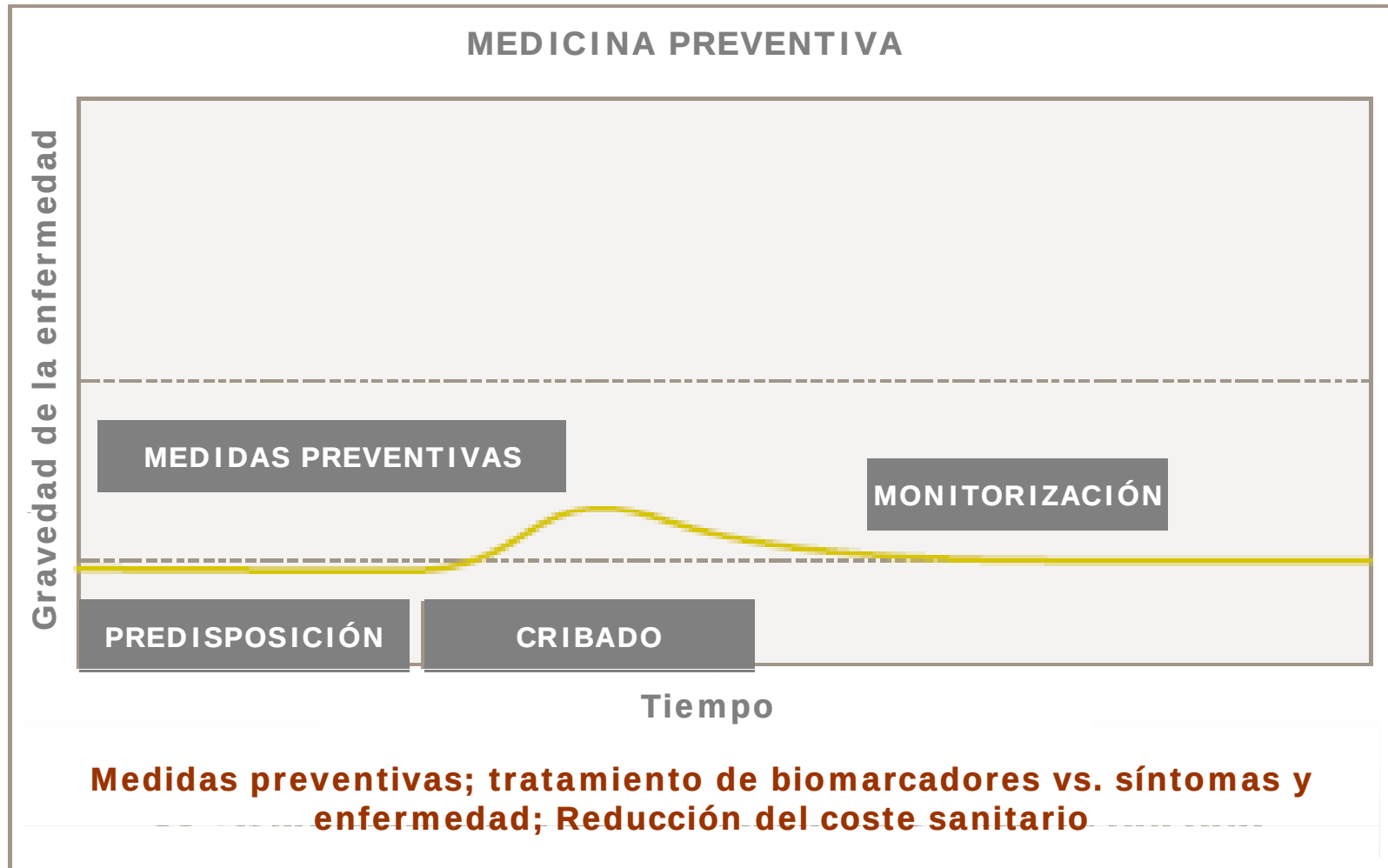
Fuente: The Personalized Medicine Coalition (PMC), 2006

Cambio en el modelo: de medicina reactiva a preventiva (II)



Fuente: The Personalized Medicine Coalition (PMC), 2006

Cambio en el modelo: de medicina reactiva a preventiva (y III)



Fuente: The Personalized Medicine Coalition (PMC), 2006

Beneficios de la medicina personalizada

- Los beneficios de la medicina personalizada se centran en:
 - Detectar la enfermedad en un estadio precoz, cuando todavía es fácil tratar de forma efectiva.
 - Permitir la selección de la terapia óptima disponible y reducir la práctica de prueba-error.
 - Reducir las reacciones adversas a fármacos.
 - Incrementar el cumplimiento terapéutico por parte del paciente
 - Modificar el principio de la medicina “reactiva” a la medicina “preventiva”.



Reduce el coste global de la asistencia sanitaria e incrementa a la vez la calidad de vida de las personas



Interacciones de genes con fármacos y alimentos funcionales en enfermedades cardiovasculares

Miguel Pocoví Mieras

Catedrático de Bioquímica y Biología
Molecular

Universidad de Zaragoza