



Universidad
Zaragoza



FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, RADIOLOGÍA Y MEDICINA
FÍSICA**

ÁREA PEDIATRÍA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**“PREVALENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE
LOS POLIMORFISMOS DEL
CITOCROMO P450 (CYP2C19) EN EL
SÍNDROME DE CORNELIA DE LANGE”**

Autor: PABLO OLIVER FORNIÉS

Dirigido por: Dr. FELICIANO RAMOS FUENTES

Zaragoza, 2015

INDICE

RESUMEN.....	1
PALABRAS CLAVE	1
ABSTRACT	2
KEYWORDS	2
INTRODUCCIÓN.....	3
SÍNDROME CORNELIA DE LANGE	3
<i>Causas genéticas del SCdL: mutación NIPBL</i>	3
<i>Síntomas clínicos en el SCdL</i>	4
<i>Diagnóstico y manejo del SCdL</i>	8
EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG Y DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO	9
FARMACOGENÉTICA: EL CITOCROMO P450 (CYP2C19)	10
<i>Fenotipo según el genotipo del CYP2C19</i>	11
<i>Polimorfismos CYP2C19 *2, CYP2C19*3 y CYP2C19*17</i>	11
<i>Acción del CYP2C19</i>	12
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
MATERIALES DEL ESTUDIO Y DEL LABORATORIO	14
PACIENTES PARTICIPANTES	14
EVALUACIÓN DE LOS SIGNOS CLÍNICOS: RGE	15
DISEÑO DEL ESTUDIO - INTERVENCIÓN	15
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	15
MÉTODO EN EL LABORATORIO	16
<i>Extracción del ADN y determinación de las variantes alélicas</i>	16
<i>Diseño y elección de oligonucleótidos</i>	16
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	16
<i>Ciclo de amplificación de la PCR</i>	17
<i>Electroforesis en geles de agarosa</i>	17
<i>Purificación de los productos amplificados</i>	17
<i>Secuenciación del ADN</i>	18

RESULTADOS	19
CLÍNICOS: PARTICIPANTES Y DATOS DESCRIPTIVOS	19
GENÉTICOS: PREVALENCIA DE LAS VARIANTES ALÉLICAS CYP2C19*2, *3 Y *17 EN LA POBLACIÓN CON SCdL	20
RESULTADOS PRINCIPALES: DISTRIBUCIÓN DE LOS GENOTIPOS Y FENOTIPOS DEL CYP2C19 EN LA POBLACIÓN CON SCdL	22
<i>Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento</i>	23
DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS Y FENOTÍPICAS DEL CYP2C19*2, CYP2C19*3 Y CYP2C19*17 INTERÉTNICA:	24
DISCUSIÓN	26
AGRADECIMIENTOS	30
BIBLIOGRAFÍA	31
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	36
ANEXOS	38

RESUMEN

Introducción: El citocromo P450 (CYP2C19) presenta una alta tasa de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), siendo los más frecuentes: CYP2C19*1 (alelo normal); CYP2C19*17; CYP2C19*2 y CYP2C19*3. Estas variantes alélicas provocan alteraciones en el metabolismo de fármacos como los inhibidores de la bomba de protones y generan diferentes fenotipos metabolizadores (ultrarápidos, rápidos, intermedios y lentos). Existen diferencias poblacionales en cuanto a la distribución de los polimorfismos del CYP2C19, cuya identificación es de vital importancia en el manejo farmacológico óptimo. El Síndrome de Cornelia de Lange (SCdL) es una cohesinopatía rara de causa genética que origina un trastorno heterogéneo, congénito y multisistémico del desarrollo. El reflujo gastroesofágico es una patología prevalente en estos pacientes, una de las causas más importante de mortalidad y se asocia al desarrollo de patología psiquiátrica en estos individuos.

Objetivos: Determinar las prevalencias y las distribuciones alélicas, genotípicas y fenotípicas de los polimorfismos CYP2C19*2, *3 y *17 en la población con SCdL en España; y comparar su distribución con poblaciones de diferente origen étnico.

Material y métodos: En este estudio observacional de tipo transversal se eligió por muestreo de conveniencia a toda la población con SCdL (mutación NIPBL+) disponible en el Centro Nacional de Referencia del SCdL (n=23). Para el análisis de los SNPs se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación Sanger. Los datos se analizaron por medio del programa SPSS.

Resultados: El CYP2C19*17 es el SNP más frecuente (21,7%), el único alelo deficitario observado es el CYP2C19*2 (15,2%) ya que el polimorfismo CYP2C19*3 está ausente (0,0%). Un 8,7% son CYP2C19*2/*17. Observamos diferencias genotípicas interétnicas significativas para los CYP2C19*1/*1 y *1/*17.

Discusión y conclusiones: Según nuestros resultados, este estudio demuestra que la prevalencia de los polimorfismos alélicos del CYP2C19 en individuos con SCdL son similares a los de la población general. Aunque sí, observamos un aumento de la frecuencia de genotipos asociados a fenotipos metabolizadores rápidos por lo que sugerimos que el genotipado del CYP2C19 debería ser una herramienta imprescindible en el manejo terapéutico adecuado de pacientes con SCdL.

Palabras clave

Síndrome Cornelia de Lange; CYP2C19; polimorfismo; reflujo gastroesofágico.

ABSTRACT

Background: The cytochrome P450 2C19 (CYP2C19) shows a high rate of single nucleotide polymorphisms (SNPs), being the most common ones: CYP2C19*1 (normal allele); CYP2C19*17; CYP2C19*2 y CYP2C19*3. These allelic polymorphisms cause variations in the metabolism of drugs like the proton pump inhibitors and create different metabolic phenotypes (ultrarapid, extensive, intermediate and poor metabolizer). There are population differences, related to the polymorphism distribution of CYP2C19, and identify them is essential to achieve an optimum pharmacological management. Cornelia de Lange Syndrome (CdLS) is a rare human genetic cohesinopathy that causes a congenital, heterogeneous and multisystemic development disorder. Among these patients, gastroesophageal reflux is a prevalent disease, one of the most important death causes and it's linked to the development of psychiatric disorders.

Purpose: To determine the prevalence and the distribution of allele, genotype and phenotype frequencies of polymorphisms CYP2C19*2, *3 y *17 in the population with SCdL in Spain; and to compare its distribution against other population with different ethnic origins

Methods: In this observational and transversal study, all the population with CdLS (NIPBL+ mutation), available in the National Reference Center for CdLS (n=23), was chosen by convenience sampling. The PCR technique and the Sanger sequencing method has been used for the analysis of the SNPs. Data was analyzed using the SPSS software.

Results: CYP2C19*17 is the most common SNP (21,7%), the only defective allele that has been observed is the CYP2C1*2 (15,2%), since polymorphism CYP2C19*3 is not present (0,0%). There are 8.7% of CYP2C19*2/*17. Significant differences are observed in CYP2C19*1/*1 y *1/*17 among interethnic groups.

Conclusion: According to our results, the prevalence of genetic polymorphisms of CYP2C19 in individuals diagnosed of CdLS is similar to the general population. However, there is an increase of genotypes associated to an extensive metabolizer phenotype. Therefore, we suggest that the genotyping of CYP2C19 should be taken into consideration for a suitable treatment of CdLS patients.

Keywords

Cornelia de Lange syndrome; CYP2C19; polymorphism; gastroesophageal reflux.

INTRODUCCIÓN

Síndrome Cornelia de Lange

El Síndrome de Cornelia de Lange (SCdL; OMIM #122470, #300590, #300882, #610759, #614701, sinónimo del Síndrome Brachmann-de Lange) es un trastorno heterogéneo de origen genético, congénito y multisistémico con una prevalencia variable de 1.6-10 por cada 100,000 nacimientos vivos (1). Posiblemente, la prevalencia real del SCdL sea superior, debido al probable infradiagnóstico de aquellos casos con una gravedad leve (2,3). Se caracteriza por un retraso psicomotor e intelectual variable, una facies dismórfica característica, un retraso del crecimiento prenatal y postnatal, hirsutismo y malformaciones estructurales, especialmente en las extremidades (4). Hasta el momento actual, han sido descritas cinco mutaciones genéticas, implicadas en el funcionamiento del complejo de cohesinas, relacionadas con el 65% de los pacientes diagnosticados de SCdL: NIPBL, HDAC8, SMC1A, SMC3 y RAD21 (5,6). Recientes estudios sobre el transcriptoma, sugieren que esta cohesinopatía, relacionada con el Síndrome de Roberts (OMIM #268300), también podría guardar relación con el Síndrome KGB (OMIM #148050) y ser causada por defectos en la maquinaria de transcripción, catalogándose de manera más apropiada como una transcriptosomopatía (7).

Este síndrome fue catalogado por Brachmann en 1916 y descrito formalmente por Cornelia de Lange en 1933, en el contexto de dos casos con discapacidad intelectual, retraso mental, anomalías en las extremidades y alteraciones faciales. Por lo que se propuso su denominación actual de Síndrome de Brachmann-de Lange, conociéndose indistintamente también por su otro sinónimo, el Síndrome de Cornelia de Lange(4).

Causas genéticas del SCdL: mutación NIPBL

En la actualidad, el SCdL se considera una cohesinopatía ya que se altera el funcionamiento del complejo de cohesinas, con un efecto mínimo compatible con la vida (6). El complejo de cohesinas es un anillo multifuncional proteico, que se encarga del proceso de cohesión-separación de las cromátidas hermanas, durante la segregación cromosómica en la división celular. Igualmente, actúa sobre la duplicación y reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN), la formación de la heterocromatina, y el control de la expresión génica, lo que podría catalogarlo en un futuro como transcriptosomopatía (7,8).

El gen NIPBL y HDAC8 (histona deacetilasa 8 de SMC3) actúan a nivel de las proteínas reguladoras de las cohesinas. SMC1A y SMC3 (proteínas mantenedoras estructurales del cromosoma 1 y 3) y RAD21 (fosfoproteína nuclear reparadora del DNA) son subunidades nucleares de las cohesinas (1,9,10). La mayoría de mutaciones originarias de esta cohesinopatía son esporádicas aunque se han documentado casos familiares y de consanguinidad parental (1). Estos pueden mostrar una herencia autosómica dominante: el NIPBL con locus (posición concreta del genoma con variabilidad interindividual) en 5p13; SMC3, en 10q25.2 y RAD21, en 8q24.11; o bien, ligada al cromosoma X dominante (SMC1A en Xp11.22 y HDAC8 en Xq13.1). Del mismo modo, se han descrito alrededor del 4% de casos de mosaicismo

somático y germinal (23% con mutación de NIPBL) donde sólo se encuentran mutaciones en el análisis genético celular de la mucosa yugal o de la saliva (1,11,12).

Existe una correlación genotipo-fenotipo demostrada que permite clasificar al SCdL en cinco subtipos diferentes. El tipo de mutación, su locus, así como la cantidad de gen alterado, condicionan las manifestaciones físicas, los trastornos del comportamiento y la gravedad del síndrome (8,13).

El gen NIPBL/SCC2 (OMIM# *608667) es la principal mutación encontrada, hasta en el 60% de los casos, y da lugar al SCdL tipo 1 (OMIM# #122470) de mayor severidad (13,14,5). Está compuesto por 47 exones codificantes de dos isoformas proteicas e interactúa de forma directa con la cohesina (heterodímero estructural SMC1A-SMC3), modificándola mediante el reclutamiento del HDAC8 (1,6,9). La mayoría de sus mutaciones se producen de novo con un patrón muy heterogéneo de hasta 278 mutaciones descritas. Las traslocaciones o grandes deleciones del gen NIPBL, que originan una proteína truncada y afuncional, provocan los fenotipos más severos (8). Aquellas sin sentido (non sense), de sitio de splicing (splicing site) o con desplazamiento del marco de lectura (frame shift) se asocian a fenotipos graves con una gran afectación del desarrollo psicomotor y cognitivo y presentan malformaciones estructurales mayores (10). Por otro lado, las mutaciones con cambio de sentido (misense) están relacionadas con manifestaciones más leves del desarrollo y del crecimiento, sin malformaciones (5,9). En general, los fenotipos NIPBL+ leves, se identifican por sinofridia, cejas arqueadas o largas pestañas (2).

El segundo gen que se relaciona a una mayor gravedad es el gen HDAC8 (OMIM# *300269). Su mutación origina el SCdL-5 (OMIM# 300882), causa un fallo en la deacetilación de la cohesina que disminuye su unión con la cromatina. Se manifiesta en el 5% de los individuos con fenotipos clásicos de SCdL (1,9).

En cuanto al SMC1A (OMIM# *300040), prevalente en el 5% de los casos, provoca el SCdL-2 (OMIM ##300590), y el SMC3 (OMIM# *606062) el subtipo SCdL-3 (OMIM# 610759) teniendo una frecuencia inferior al 1%. Suelen relacionarse con fenotipos leves, una menor frecuencia de malformaciones mayores en las extremidades y unos rasgos faciales característicos: nariz prominente y cejas finas (2,12). Así, las mutaciones de sentido erróneo o las deleciones sin interrupción del marco de lectura de los genes SMC1A y SMC3 están vinculadas a las formas clínicas moderadas (8,9). Por último, alteraciones en el gen RAD21 (OMIM# *606462), catalogado en menos del 1% de casos, originan el SCdL-4 (OMIM# 614701), cuyos signos más marcados son el retraso del crecimiento, las anomalías esqueléticas menores y unos rasgos faciales extras superpuestos a los clásicos.

Se debe destacar que hay fenotipos discordantes originados por mutaciones similares, lo que sugiere la influencia concomitante de factores medioambientales y otros genéticos, aún no descubiertos.

Síntomas clínicos en el SCdL

El espectro fenotípico clásico del SCdL muestra una elevada variabilidad donde predomina una facies dismórfica típica acompañada de unos signos clínicos constantes, como el retraso del crecimiento, el desarrollo psicomotor alterado y los trastornos del comportamiento (Ver Figura 3, Anexos). Igualmente, se puede

acompañar de otros signos como malformaciones musculoesqueléticas, alteraciones multisistémicas, neurosensoriales y de la piel, con una menor prevalencia.

Entre los rasgos faciales característicos, persistentes en el 84-99% de los pacientes, destacamos: cejas arqueadas; sinofridia; pestañas finas y largas; puente nasal deprimido con narinas antevertidas; surco subnasal largo y prominente; labio superior fino; boca en carpa con los bordes bucales infradesnivelados; paladar alto y hendido; diastema dental o micrognatia (12). Además, se puede constatar microbraquicefalia; baja implantación del cuero cabelludo frontal y occipital; y cuello corto. Estos rasgos faciales suelen evolucionar conforme el desarrollo puberal y en casos leves, pueden pasar desapercibidos cuando llega la edad adulta (4).

En cuanto al desarrollo y crecimiento, muestran un retraso prenatal y postnatal continuo que ocasiona bajo peso y una talla baja final media de 156 cm en varones, y 131 cm en mujeres (12). Este trastorno general del desarrollo se origina durante el embarazo, detectándose habitualmente desde el segundo trimestre. La mortalidad perinatal y neonatal registradas en estos sujetos es baja: 2,8 y 8,6%, respectivamente (3). Los parámetros de talla, peso y perímetro cefálico, al nacimiento, suelen estar por debajo del percentil 10, manteniéndose en torno al percentil 3 por lo que se han elaborado curvas de crecimiento específicas para pacientes con SCdL. La pubertad se inicia a la edad adecuada o ligeramente retrasada, las mujeres en torno a los 13 años, y los varones a los 15 años (4,12).

En el 73,1% de los casos, podemos localizar defectos a nivel de las extremidades más comunes en varones, destacando el tamaño reducido de manos y pies. Predominan las malformaciones en los miembros superiores, catalogadas en un 35,5% de los casos, e inferiores con un rango disfuncional variable que comprende desde ejemplos de oligodactilia; sindactilia parcial del segundo y tercer dedo del pie; clinodactilia del quinto dedo; implantación proximal del dedo pulgar o dislocación de la cabeza radial con sinostosis radiocubital; hasta la ausencia total del antebrazo. Si bien la prevalencia de la afectación de extremidades es elevada, varía según los estudios consultados al respecto, sugiriéndose que la interacción del NIPBL-deacetilasa ejerce un rol menor (3,12,5). Alrededor del 40% de los pacientes manifiesta alteraciones neurológicas, como microbraquicefalia (33,3%) e hipoacusia de conducción y de percepción, sinérgica a la estenosis del conducto auditivo externo y a otitis media y sinusitis de repetición (3,4,11). Las orejas se disponen en rotación posterior, con una baja implantación, el antehélix serpiginoso y reducido y el lóbulo pequeño(11). Como signos oftalmológicos, encontramos pigmentación peripapilar en la mayoría de los pacientes junto a casos de ptosis; blefaritis; miopía magna; nistagmo; y obstrucción del canal lagrimonasal. Se han descritos casos de epilepsia, en un 20%, y neuropatía periférica sensitiva(4). Así mismo, se describen casos de hirsutismo generalizado especialmente en el rostro, la espalda y las extremidades; y el cutis marmorata en el 60% de los pacientes. Igualmente, muestran signos de envejecimiento prematuro como pelo canoso y arrugas (4,12,15). En más del 40%, presentan alteraciones estructurales y funcionales del aparato genitourinario, en especial por reflujo vesicoureteral. La criptorquidia, junto con la hipoplasia genital, son los hallazgos más comunes datados en el 73% y 57% de los varones (4,15). Se objetivan cardiopatías congénitas en el 30-45% aproximadamente (4,11). Estas prevalencias oscilan según los estudios realizados en sujetos europeos (3).

Las infecciones respiratorias recurrentes son frecuentes en pacientes con SCdL. De hecho, la insuficiencia respiratoria secundaria a infección es uno de los motivos de mortalidad más comunes en dicha población. En los últimos años, se han asociado con un aumento de la prevalencia de inmunodeficiencia celular relacionado con la disminución de la transcripción del gen NFATc2 (OMIM *600490; factor nuclear de activación de los linfocitos T, calcineurina dependiente tipo 2) dentro del espectro de la transcriptosomopatía (4,7,16).

Desarrollo psicomotor y trastornos del comportamiento

La discapacidad intelectual y los problemas de la conducta asociados a un retraso psicomotor global moderado-severo, con mayor depresión del lenguaje y del habla tienen una prevalencia constante. Las alteraciones del comportamiento catalogadas se relacionan con un estado de hiperquinesia, con un ánimo inestable, y con trastornos del espectro autista (TEA), registrado en un 74% de los casos (13). Este comportamiento tan heterogéneo en el SCdL oscila según la función cognitiva, verbal y adaptativa alcanzadas por estos pacientes, pudiendo llegar incluso hasta la normalidad funcional (4,11,13,17). Si bien las capacidades funcionales diarias de autocuidado suelen estar relativamente preservadas, estos niños presentan dificultades ante los cambios diarios y ambientales (11). El aprendizaje alternativo, psicoterapia deportiva y neuroestimulación vestibular son técnicas satisfactorias en su desarrollo socio-cognitivo (18).

A pesar de no haberse demostrado una relación significativa entre el SCdL y un patrón de comportamiento patológico, las conductas autoagresivas, como morderse las uñas, se observan en el 55,6% de los pacientes (13,19). En los últimos estudios, se sugiere que la hiperactividad, las estereotipias y el comportamiento compulsivo con vínculos con el espectro autista son predictivos de desarrollar autoagresividad. Se ha identificado una correlación directamente proporcional entre la edad, el aumento del umbral del dolor debido a la neuropatía periférica sensitiva; el menor desarrollo del lenguaje; el insomnio; a comportamientos obsesivos o de tipo autista y a la discapacidad intelectual con la gravedad de estas conductas (13,17,19). Así mismo, podemos encontrar conductas estereotipadas, como arqueamiento de la espalda, relacionadas con el RGE (19).

Hasta en un 80%, muestran alteraciones del estado de ánimo y problemas de conducta las cuales es muy probable que sean consecuencia o estén exacerbadas, por las complicaciones físicas propias de este síndrome, en especial por el RGE, y por la falta de comunicación (1,4,12,19,20). Otro de los elementos de influencia en el estado de irritación, que fomenta este tipo de comportamientos, es el estrés parental (13).

Reflujo Gastroesofágico

El RGE es el paso retrógrado fisiológico, crónico, de contenido gástrico por el esófago, con o sin regurgitación gástrica o intestinal, y vómitos, que requiere normalmente de medidas higiénico-dietéticas conservadoras. De manera espontánea, suele ser postprandial, sin esfuerzo y ocurre varias veces al día, con una duración de varios minutos. Se presenta en el 75% de los lactantes de 1 a 4 meses, siendo sintomático hasta los 15 meses. Sin embargo, la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) se define por un conjunto de síntomas persistentes y/o lesiones esofágicas

histológicas condicionadas por el RGE. En 2006, el consenso internacional de Montreal definió la identidad patológica y el manejo de la ERGE. Tiene una prevalencia del 8%, resolviéndose hacia el segundo año de vida aunque el 50% de los casos persiste en la edad adulta (21). Particularmente en el SCdL, el RGE es uno de los signos fenotípicos más prevalentes y severos, independientemente del tipo clásico (93%) o leve (82%)(11).

Entre sus síntomas clínicos principales destacan la pirosis y las regurgitaciones, así como el rechazo de la ingesta; irritabilidad; vómitos recurrentes o retraso ponderal. En casos de mayor edad, pueden manifestar disfagia o dolor toraco-abdominal difuso. Se ha demostrado una correlación fuerte entre el grado de daño esofágico con el fenotipo psiquiátrico expresado y su severidad (20). Puede relacionarse con el asma nocturna; con infecciones de las vías respiratorias recurrentes; con episodios de apnea o eventos aparentemente amenazadores a la vida. Es una de las causas de mortalidad más comunes de este síndrome por la neumonitis por aspiración secundaria, junto a las malformaciones cardíacas y la apnea (12). Los signos de alarma a tener en cuenta en la exploración son: sangrado; fiebre; disminución del nivel de conciencia; afectación de las vías respiratorias superiores; síndrome genético; etc (21). La complicación más frecuente es la úlcera esofágica, seguida de la estenosis esofágica secundaria (15%) y el esófago de Barret, 5% (22). Este último obliga a un seguimiento endoscópico, con IBPs a dosis altas, debido al riesgo anual de 0,5% de evolución a adenocarcinoma de esófago o a síndrome de Sandifer (4,15).

En la mayoría de casos pediátricos de RGE y ERGE y en ausencia de signos de alarma, el diagnóstico se basa en una historia clínica y anamnesis adecuadas. Las guías pediátricas actuales recomiendan el uso conjunto de la pHmetría esofágica y la Impedanciometría intraluminal multicanal esofágica para el estudio del RGE en toda la población con SCdL, independientemente de su pH o sus características físicas y químicas (21,23). Aunque la pHmetría permite evaluar la respuesta al tratamiento antiácido, su severidad no se correlaciona con la sintomatología presentada. El parámetro más importante a considerar es el índice del registro (IR) o fracción de tiempo del registro con un pH inferior a 4 (IR>10% es un resultado positivo); junto al número y duración, mayor de cinco minutos, de RGE (corresponde, por convención, a un pH inferior a 4,0); y al episodio de reflujo más prolongado (21). La endoscopia con biopsia esofágica está indicada en pacientes con ERGE refractaria al tratamiento farmacológico. Además de estas técnicas, se dispone de la ecografía esofágica. La manometría esofágica y el diagnóstico empírico mediante la pauta de IBPs se realiza en caso de adolescentes (21,23).

En primer lugar, aquellos casos con RGE leve se abordan mediante medidas higiénico-dietéticas conservadoras, que modifican la dieta y los hábitos posturales del niño, que previenen la exposición excesiva a fármacos, sus posibles efectos secundarios y reducen costes sanitarios. No obstante, en casos de síntomas persistentes es necesario proceder al inicio de tratamiento farmacológico con IBPs, de forma adyuvante a las medidas higiénico-dietéticas, con un nivel de evidencia A (21). El uso crónico de IBPs está justificado en pacientes con SCdL debido a su alta prevalencia sindrómica y a la evolución paralela de la curación esofágica con la mejoría de los trastornos de conducta (20). Igualmente, se podrían usar fármacos menos eficaces como los antagonistas de la histamina (H₂) y no tienen indicación los

agentes procinéticos o inhibidores de la secreción ácida, como los antiácidos hidróxido de magnesio o de aluminio (21). No está indicada la erradicación de *Helicobacter pylori*, por no ser causa de acidez, sino que puede ser beneficioso la alcalinización bacteriana por el amonio producido. En casos de ineficacia terapéutica y mala evolución, está recomendado la funduplicatura laparoscópica de tipo Nissen con gastrostomía concomitante (posterior y total o de 360 grados) y ocasionalmente, en ausencia de resultados positivos, la disociación esófago-gástrica total con elevada recurrencia postoperatoria (21,22,24). La técnica quirúrgica no difiere de la población general, sólo hay que vigilar de manera más exhaustiva el periodo preoperatorio y anestésico de los pacientes con SCdL(24).

De este modo, el seguimiento diagnóstico y el control terapéutico, médico o quirúrgico, adecuados del RGE se establecen, como dos pilares fundamentales en el seguimiento de los pacientes con SCdL, para conseguir un desarrollo psicomotor óptimo y una mejora de la calidad de vida propia y del entorno.

Diagnóstico y manejo del SCdL

En la actualidad, no existen pruebas de diagnóstico prenatal suficientemente sensibles, y solo se ha podido estimar durante la gestación una disminución de la proteína-A plasmática (PAPP-A) (4,12). La edad parental no está relacionada con la incidencia del síndrome y el riesgo de recurrencia se estima en un 1,5% (12). Por lo tanto, el seguimiento del crecimiento intrauterino y por ecografía son la única detección prenatal posible (11,12). Si bien es posible el análisis genético de sangre fetal, por medio de amniocentesis o de biopsia de vellosidades coriales. El diagnóstico genético preimplantación puede ser una opción en casos de mutaciones previamente identificadas.

Por definición, el diagnóstico de SCdL se establece, mediante la identificación bioquímica de una mutación de los cinco genes causantes catalogados hasta la actualidad. Igualmente, a pesar de la gran heterogeneidad clínica del SCdL, su diagnóstico se basa en el hallazgo de una serie de criterios diagnósticos establecidos por Kline et al. [2007] (ver en Figura 4, Anexos) (12). Actualmente, se sugiere la necesidad de revisar los criterios diagnósticos clínicos, para que sean concordantes con los avances logrados en el diagnóstico molecular del síndrome y que permitan un diagnóstico más sensible de aquellos fenotipos con menor severidad (2).

Del mismo modo, Kline et al. [2007] definió una clasificación de la severidad sindrómica, que predice la evolución clínica y el objetivo madurativo que alcanzarán los pacientes. Consiste en la asignación cuantitativa de 1 a 5 puntos de diversas alteraciones del desarrollo psicomotor del niño: peso al nacimiento, malformación de extremidades, hipoacusia y la edad de consecución de ciertos hitos del desarrollo (12,14). Por su parte, Van Allen et al. [1993] también estableció una clasificación de diagnóstico clínico, que se correlaciona directamente con la severidad en el pronóstico y el inicio de los síntomas, siendo máximo en el tipo I. El trastorno clásico (tipo I) es el más grave y ocasiona una disfuncionalidad severa o la muerte. El tipo II se define por una afectación moderada con trastornos del comportamiento. Por último, el tipo III (fenocopias) se encuentra relacionado con aneuploidias cromosómicas y exposición a teratógenos (alcohol o ácido valproico), puede ser diagnosticado en adultos con funcionalidad borderline y se suele describir en casos familiares (11,14,18).

El diagnóstico diferencial de este síndrome comprende al síndrome de Fryns; al síndrome alcohólico fetal; a la duplicación parcial de 3q; al síndrome de Coffin-Siris; al síndrome Rubinstein-Taybi; al síndrome de rotura cromosómica de Varsovia; al síndrome KBG; y a otras cohesinopatías, como el síndrome de Roberts (1,4).

Una vez establecido el diagnóstico de SCdL se recomienda el seguimiento de estos pacientes, en la infancia, mediante el control anual del crecimiento con tablas específicas del SCdL; ecocardiograma; evaluación oftalmológica anual y auditiva bianual; monitorización del RGE por medio de pHmetría-impedanciometría o endoscopía; atención psiquiátrica; cuidado dentario; y la estimulación cognitiva. En la adolescencia, se recomienda la evolución puberal y consejo sobre la actividad sexual. Llegados a la edad adulta, se debe seguir un control médico rutinario que comprenda la toma de la tensión arterial; un electrocardiograma; una examinación mamaria, de la próstata y los testículos; y consejo sobre los estilos de vida saludables, buena alimentación y ejercicio, y sobre la inserción laboral (12,15).

Existen diversas organizaciones (Asociación Española Síndrome Cornelia de Lange y la CdLS Foundation, USA) y asociaciones familiares de apoyo a estos pacientes que completan este seguimiento continuo.

Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento

El equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) establece que las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes, de una generación a otra, una vez alcanzado el estado de equilibrio de los locus autosómicos, tras una generación (25). Se dice que una población está en equilibrio cuando los alelos de los sistemas polimórficos, mantienen su frecuencia en la población a través de las generaciones. Toda demostración del EHW sigue el principio básico de la teoría de la probabilidad. Es decir, la probabilidad de ocurrencia simultánea (p) de dos o más eventos independientes (q y r) es igual al producto de las probabilidades de cada evento ($p=q.r$)(25,26). Normalmente, la frecuencia de cada alelo representa su probabilidad de ocurrencia.

Esta constante genética nos permite estudiar la descripción dinámica poblacional, en caso de seguir un patrón de herencia mendeliano, para estimar la composición de los acervos genéticos que definen la población, en un instante futuro en función de su situación inicial. De acuerdo con Dobzhansky (1950), una población mendeliana se define por un grupo de individuos, que comparten un acervo genético común en el tiempo y en el espacio. En función del concepto genético de referencia (alelos, gametos o genotipos), originan diferentes patrimonios genéticos (acervos): alélico (el conjunto y frecuencias de los alelos presentes en cada uno de los locus observados en la población); gamético (aquellos de los grupos de alelos, a razón de un alelo por locus); y cigótico (aquellos de los grupos de parejas de alelos, a razón de una pareja por locus) (25).

Para lograr el equilibrio genético de acuerdo con el EHW, se deben cumplir unos requisitos: que la población sea panmíctica, infinitamente grande para que sus apareamientos sean aleatorios; que no exista selección natural, ni deriva génica, ni

mortalidad diferencial, ni reproducción diferencial; que la población sea cerrada (sin flujo génico); y no debe haber mutaciones, a excepción que la mutación se produzca en sentido inverso con frecuencias equivalentes. Por lo tanto, se resume en que las frecuencias alélicas y genotípicas, en un locus de una población diploide panmíctica, se repetirán de generación en generación en ausencia de factores disruptivos (mutación, flujo génico desbalanceado, selección natural y deriva génica). En caso de producirse una alteración de las frecuencias, éstas restablecerán el equilibrio tras una generación de cruzamientos al azar.

Respecto al desequilibrio de ligamiento, es la desviación de la independencia interalélica de dos locus genéticos diferentes en una población. En general, los alelos no ligados en su locus se transmiten conjuntamente el 50% de las veces pero si presentan ligamiento incrementan su tendencia a segregarse de manera conjunta. Esta correlación disminuye con la distancia interlocus heterogéneamente (27).

Se analiza mediante gráficos LD y los siguientes parámetros: el coeficiente de ligamiento normalizado o coeficiente de ligamiento de Lewontin (D'), el coeficiente de correlación (r^2) y el logaritmo de odds ratio (LOD). Los dos primeros coeficientes oscilan entre 0 y 1, siendo directamente proporcionales al desequilibrio de ligamiento del locus: $D'=1$ indica dependencia total de la herencia entre los locus (27). Ambas medidas reflejan diferencias en las frecuencias haplotípicas observadas y esperadas. El coeficiente D' es la razón de las frecuencias alélicas observadas entre la prevalencia teórica máxima. Por su parte, el LOD se define como el logaritmo de la probabilidad de que hubiera un desequilibrio de ligamiento ($L1$) entre aquel caso de que se produjera dicho equilibrio ($L0$) en los datos analizados: $\log_{10} L1/L0$ (27).

La importancia del desequilibrio de ligamiento reside en que estos genes requieren más de una ronda de apareamiento al azar, para alcanzar frecuencias consistentes con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Se debe a la disminución que producen en la recombinación génica.

Farmacogenética: el citocromo P450 (CYP2C19)

El CYP2C19 es una enzima metabolizadora hepática de fase I con, al menos 8 familias (CYP1, 2, 3, 4, 11, 17, 19 y 21) que incluyen, al menos, 17 y 2 subfamilias catalogadas en las familias CYP2 y 11. La subfamilia CYP2C, que incluye al CYP2C19 (OMIM *124020), incluye 9 exones y 8 intrones constitutivos, localizados en el cromosoma 10q23.33 y causantes, de manera principal o parcial, de diferencias en la farmacocinética de abundantes sustancias endógenas y fármacos, incluyendo a todos los IBPs, amitriptilina, diazepam, clopidogrel, etc (28). El CYP2C19 tiene actividad S/R-mefenitoina 4-hidroxilasa y presenta una fuerte correlación entre su actividad y su expresión génica órgano-específica. La cual puede estar aumentada por causas genéticas o por inducción farmacológica (ácido acetilsalicílico, rifampicina, etc.), y disminuida en caso de inflamación, como cáncer o citoquinas proinflamatorias (TNF- α , Interleucina-1 β y 6) (28,29).

Se ha demostrado científicamente, que el polimorfismo genético del CYP2C19 es una de las causas primarias de la variabilidad interindividual, en la respuesta a los

sustratos del CYP2C19. Los principales alelos asociados en la efectividad terapéutica de los IBPs en la RGE son: CYP2C19*2, CYP2C19*3 y CYP2C19*17, que condicionan también la resolución de la clínica y la regresión de las lesiones esofágicas en la endoscopia (30,31).

Fenotipo según el genotipo del CYP2C19

Se establece una clasificación de los individuos en metabolizadores ultrarápidos (MUR), homocigotos para CYP2C19*17; metabolizadores rápidos (MR) portadores de dos alelos funcionantes o normales y del alelo*17 en heterocigosis; metabolizadores intermedios (MI), alelos heterocigóticos para las variantes hipofuncionantes o CYP2C19*2*17; y metabolizadores lentos (ML), subdivididos en homocigotos y heterocigotos compuestos (dos alelos diferentes y anormales) (31,32). La mayor actividad enzimática, que corresponde a la menor acción terapéutica de los IBPs, la encontramos en un MUR homocigoto y el fenotipo ML produce la máxima efectividad del IBP. El CYP2C19 muestra una amplia variabilidad interétnica siendo en la población caucásica el fenotipo ML menos prevalente y el fenotipo MUR más prevalente (31). En España, se calculó la población con fenotipo ML en un 1,3% (33). Es probable la existencia de nuevos alelos debido a la alta heterogeneidad genética para el CYP2C19. En un estudio comparativo, las dosis plasmáticas de IBP varían hasta un 70% según el fenotipo MUR con respecto al fenotipo ML de los pacientes(34).

Polimorfismos CYP2C19 *2, CYP2C19*3 y CYP2C19*17

Mediante técnicas de hibridación fluorescente in situ, se ha determinado el espectro alélico de CYP2C19 causado por hasta diecinueve mutaciones de polimorfismo de nucleótido simple (SNP). La variante alélica más frecuente en la población es el CYP2C19*17 (rs12248560), superior al 20% excepto en la población japonesa (31,34,35). Este alelo es el único que incrementa la transcripción génica del CYP2C19 debido a un SNP, por cambio de isoleucina por valina (efecto I331V), en la región promotora 5' [-806C por timina (T)] (30,36). Se ha relacionado con un riesgo elevado de úlcera péptica, mayor incidencia de hemorragias por clopidogrel; un riesgo disminuido de cáncer de pecho y mejor respuesta al tamoxifeno (28,37)

Por otro lado, el polimorfismo hipofuncionante del CYP2C19 más prevalente es el alelo CYP2C19*2 (rs4244285, 681G>A). Está presente en alrededor del 17% en la población mundial: hasta el 30% en las etnias africana y americana y sólo un 15% en la caucásica y la china (34,37). Esta causado por una transgresión de splicing aberrante de guanina (G) por adenosina (A), en la posición 681 del exón 5. El alelo CYP2C19*3 (rs4986893, 636G>A) es no funcionante por una mutación G por A, se produce por un codón de parada prematura en la posición 636 del exón 4, efecto W212X, en el lugar del aminoácido triptófano (37). Esta variación alélica germinal se manifiesta en el 5% de la población asiática y es extremadamente poco frecuente en la raza negra (0,4%) y la caucásica (0,04%)(33,34). Estos dos polimorfismos genéticos, que producen el 100% de los fenotipos ML en Asia y el 87% en la etnia caucásica, disminuyen la actividad enzimática, lo que aumenta el efecto terapéutico del IBP al frenar el metabolismo farmacológico, y se correlaciona con una evolución positiva clínica y endoscópica de la ERGE (34). Ambos alelos, aumentan la eficacia de los IBPs, disminuyen el efecto anticoagulante del clopidogrel, aumentan los eventos cardiovasculares, aumentan el riesgo de interacciones medicamentosas e

intoxicaciones a ciertos antidepresivos (Amitriptilina, Citalopram, Clomipramina, Moclobemide), antimaláricos (Proguanil) y antifúngicos (29,34).

En homocigosis, CYP2C19*2 (casi exclusivo de la raza caucásica) y CYP2C19*3 (predominante en asiáticos) están presentes en el 3-5% de los caucásicos y en un 12-23% de los asiáticos (28,31). Sin embargo, en la raza caucásica el genotipo CYP2C19*17*17 se manifiesta un 18-26%, y sólo en un 0,4-1,4% en China, ocasionando el fenotipo MUR solo posible en homocigosis (31,32,34). La presentación simultánea de los alelos *2 y *3 puede generar una supresión secretoria ácida del estómago. Ante una presencia heterocigótica conjunta (CYP2C19*2*17), se piensa que la acción supresora del CYP2C19 predomina sobre el alelo hiperfuncionante, dando lugar a un fenotipo MR-MI (31,34,38,39). Otros factores importantes en la actividad del CYP2C19 son el sexo, las influencias ambientales, la dieta y las diferencias étnicas.

Acción del CYP2C19

Estas tres variantes alélicas del CYP2C19 influyen en la farmacocinética de Esomeprazol, Lansoprazol, Omeprazol y Pantoprazol (Ver Figura 5, Anexos), siendo este último el más determinado (34,40). Alrededor del 80% de dosis de estos fármacos, es metabolizada por el CYP2C19 (33,40). Durante los 2-5 primeros meses de vida, hay una relación lineal y directa de la actividad enzimática con la edad, aumentando progresivamente hasta alcanzar la actividad adulta a los 6-12 meses de vida. En este momento, se pone de manifiesto la concordancia genotipo-fenotipo que estaba ausente durante el periodo neonatal.

El CYP2C19 actúa sobre los residuos sulfuro asimétricos de los IBPs. A nivel del Omeprazol y Esomeprazol realiza una 5-OH hidroxilación formando por tres vías diferentes: 5-O-Desmetilomeprazol, 5-Hidroxiomeprazol y a partir de Omeprazol sulfona, 5-hidroxiomeprazol sulfona. Igualmente, mediante una 5-OH Hidroxilación, el Lansoprazol se convierte en 5-hidroxilansoprazol, 5-hidroxilansoprazolsulfona y 5-hidroxilansoprazol sulfito. En cuanto a Pantoprazol, se produce una O-demetilación que origina 5-hidroxipantoprazol (33,40).

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El reflujo gastroesofágico es una de las complicaciones sistémicas más prevalente (90% de los casos) y severa en el SCdL, constituyendo una de las causas de mortalidad más comunes. Se ha demostrado una fuerte correlación entre el grado de daño esofágico con el fenotipo clínico expresado: hiperactividad, trastornos de la conducta y alteraciones del estado de ánimo (20). Se sugiere que la ausencia de lenguaje y de comunicación de estos pacientes explica la elevada prevalencia de clínica psiquiátrica en el SCdL, hasta el 80% (4). Además, puede ocasionar el desarrollo de esofagitis por reflujo, estenosis esofágica o neumonitis por aspiración, requiriendo tratamiento higiénico-dietético, médico mediante IBPs o incluso, quirúrgico.

Los IBPs constituyen el tratamiento farmacológico de primera elección para el RGE infantil. Estos son metabolizados por la vía del CYP2C19 por lo que la expresión de variantes alélicas mutadas (CYP2C19*2, *3 y *17) acelera o enlentece el metabolismo del citocromo P450. Esta variabilidad en la degradación del fármaco, dificulta conseguir la concentración plasmática terapéutica del IBP y conlleva al fracaso de la pauta farmacológica estándar, adecuada para el resto de la población infantil. De esta manera, estamos ante una patología de difícil control clínico, que acarrea graves consecuencias físicas y psíquicas en el paciente con SCdL.

Así, el control individualizado adecuado del tratamiento del RGE, mediante los IBPs, se establece como uno de los pilares fundamentales en la evolución de los pacientes con SCdL para reducir su incidencia de morbilidad sistémica y psiquiátrica, su mortalidad y para maximizar el desarrollo potencial y la calidad de vida óptima de estos pacientes. Por ello, el genotipado del CYP2C19 se erige como una herramienta diagnóstica clave para la optimización del seguimiento del RGE en el SCdL.

Objetivos específicos

El propósito principal de este trabajo es evaluar la prevalencia de los polimorfismos del CYP2C19 (*2, *3 y *17) existentes en la población española con diagnóstico molecular de SCdL (NIPBL+). Así como examinar la expresión genotípica resultante, de las frecuencias observadas, que nos permita estimar el grado de actividad enzimática metabólica del CYP2C19 en la muestra poblacional estudiada.

Además, este estudio pretende comparar los resultados obtenidos en la muestra poblacional, con respecto a la distribución interétnica de los polimorfismos alélicos, genotípicos y fenotípicos del CYP2C19 en diversas poblaciones, registradas previamente en la literatura.

El objetivo secundario planteado, es observar la relación de los polimorfismos del CYP2C19, con los antecedentes o la presencia actual de RGE activo, refractario al tratamiento farmacológico mediante IBPs, y la correspondencia con otras comorbilidades físicas y psiquiátricas, con relación causa-efecto documentada con el RGE, presentes en nuestros pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se ha llevado a cabo con la colaboración del equipo y personal del Laboratorio de Genética Clínica y Genómica Funcional de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Zaragoza. Ha sido aprobado por el comité de ética de investigación local. La redacción de este trabajo se realiza de acuerdo con la declaración STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) (41).

Materiales del estudio y del laboratorio

- Historia clínica hospitalaria de cada paciente estudiado.
- Informático: SPSS v.22; software informático GeneSnap 7.2®.
- Medidas físicas de protección: bata y guantes de látex.
- Accesorios de laboratorio: pipetas Gilson p20 y p2; puntas Fisherbrand Fisher Scientific; tubos Falcón de 50 ml; recipientes Eppendorf.
- Componentes de extracción de ADN: Tritón Sacarosa (Tritón X-100; Sacarosa; Tris HCl y MgCl₂); tampón SE (SDS; NaCl; Solución de tris-borato-EDTA; agua destilada); Proteinasa K; Cloroformo; Isopropanol 1:1; Etanol 70% y Buffer TE.
- Componentes de la PCR: dos cebadores, Master mix y ADN biológico.
- ExoSAP-IT®.
- Gel de agarosa 1,5%: agarosa en polvo y bromuro de etidio.
- Portapeines de 35 ml y de 50 ml.
- Cubeta de electroforesis horizontal Ecogen®
- Centrifugadora Centrifuge® 5415D.
- Termociclador GeneAmp® PCR System 9700.
- Espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 Thermo Fisher Scientific®.
- Kit EZ1® DSP DNA.
- Sistema de documentación de geles por fluoresceína G:BOX-E®.
- Otros materiales de laboratorio usado durante el estudio: gravillas, nevera, congelador, estufa, etc.

Todo el material de laboratorio se encontraba en condiciones estériles por autoclavado.

Pacientes participantes

Un total de 23 individuos (9 varones y 14 mujeres) han participado en el estudio. Los criterios de inclusión del estudio han sido todos aquellos pacientes con diagnóstico clínico y molecular de SCdL, con mutación positiva documentada para el gen NIPBL, disponibles en la base de datos del Centro Nacional de Referencia del SCdL (H.C.U. Lozano Blesa, Zaragoza, España), de un volumen total de 264 pacientes. Este estudio ha tenido lugar desde Enero 2015 a Mayo 2015 en el Laboratorio de Genética Clínica y Genómica Funcional de la Universidad de Zaragoza (España). Todos los pacientes firmaron los consentimientos escritos pertinentes para el estudio.

Evaluación de los signos clínicos: RGE

Se realizó un seguimiento retrospectivo a los 23 individuos con una anamnesis, mediante la consulta de sus historias clínicas o por contacto electrónico o telefónico, con el envío de un formulario que recogía las siguientes preguntas: fenotipo de SCdL; edad de aparición, gravedad y síntomas del RGE; método de diagnóstico (clínico, pHmetría o manometría del esfínter esofágico inferior); tratamiento pautado: tipo (medidas higiénico-dietéticas, farmacológico o quirúrgico), tiempo de adhesión a la terapia y respuesta y evolución clínica al tratamiento. Dada la asociación del RGE y de conductas autoagresivas con el SCdL muy bien documentada en la literatura, analizamos la posible asociación entre dichas patologías y la exposición a una elevada actividad metabolizadora del CYP2C19 en nuestros pacientes.

Diseño del estudio - Intervención

Este trabajo es un estudio observacional de tipo transversal, cuyo objetivo es observar la prevalencia puntual de los polimorfismos del CYP2C19 y su correlación genotipo-fenotipo, en una muestra poblacional elegida por conveniencia, a partir de la base de datos del Centro Nacional de Referencia del SCdL.

Con estos propósitos, se revisaron las historias clínicas correspondientes y se procedió al estudio del ADN mediante la extracción de sangre periférica, de todos los pacientes de la muestra. Posteriormente, se realizó la determinación de las variantes alélicas por PCR y se secuenciaron para poder interpretar la existencia de las variaciones genotípicas en estudio del CYP2C19.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante SPSS Versión 22 para Windows [San Diego, CA, Estados Unidos (USA)], siguiendo manual del producto (42). Para todos los análisis se asume significación estadística con $p < 0,05$. Se establecen las frecuencias alélicas mediante SNP-tools para el programa Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Se comparan dichas frecuencias observadas con los valores predecibles, de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg por medio del test de Fisher. Ante la proximidad de los locus analizados, verificamos que nuestra población no presenta un desequilibrio de ligamiento en la herencia de los CYP2C19*2,*3 y *17, gracias a Haploview 4.2 (Broad Institute of MIT and Harvard, Massachusetts, USA), de acuerdo con el tutorial del creador (43), y siguiendo el protocolo establecido por Wigginton JE et al. [2005] para la descripción dinámica de poblaciones mendelianas (44).

Se analizaron las siguientes variables cualitativas y cuantitativas: sexo; edad; etnia; gravedad clínica del SCdL; variante alélica CYP2C19*1, *2, *3 y *17; genotipo del CYP2C19; fenotipo metabolizador; presencia de RGE; presencia de patología psiquiátrica; y frecuencias interétnicas de 6 poblaciones diferentes. Se calculan las razones de prevalencias entre las variables, fenotipo metabolizador observado en nuestra población, la presencia de RGE y la de patología psiquiátrica.

Los individuos observados en este estudio fueron escogidos por un muestreo no probabilístico de conveniencia

MÉTODO EN EL LABORATORIO

Extracción del ADN y determinación de las variantes alélicas

Se extrajeron muestras de 12 µl de sangre venosa periférica con anticoagulante (EDTA), de cada paciente, por medio del kit de extracción disponible (kit EZ1® DSP DNA, Qiagen, Hilden, Alemania), según las instrucciones del fabricante y el protocolo actual de Navarrete et al. [2009] (45). A partir del ADN genómico aislado de linfocitos de las muestras obtenidas de acuerdo con el protocolo de Lazalde B. [2012] (46), se realizaron las determinaciones por PCR de las variantes alélicas del CYP2C19 deseadas: CYP2C19*2, *3 y *17, descrito por Goldstein y Blaisdel [1996] (47).

Diseño y elección de oligonucleótidos

Se procede al diseño de los cebadores o primers (Isogen Life Science, Maarsen, Holanda), de forma manual según protocolo (Universidad de Wisconsin, 2008)(48). Los puntos guía más importantes son: cada cebador debe tener una longitud óptima de 20 nucleótidos; la relación de bases GC y AT del cebador debe de ser próxima a 1:1; así como, que las temperaturas de disociación o melting (T_m) de ambos cebadores sean similares. Esta temperatura es aquella a la que se lleva a cabo la disociación de la mitad del cebador y se calcula: $T_m = 4^{\circ}\text{C} (\text{G}+\text{C}) + 2^{\circ}\text{C} (\text{A}+\text{T})$. Conviene evitar las secuencias de bases muy repetidas y la inclusión de delecciones en la secuencia que corresponde al cebador para conseguir una replicación idónea de la polimerasa. Aquí, elegimos usar cebadores tipo forward (marco de lectura de 5' a 3') y reverse (de 3' a 5') para facilitar la lectura de las secuencias. Los cebadores utilizados en este estudio se especifican, a continuación, en la Tabla 1.

Tabla 1. Primers utilizados para determinar los polimorfismos del citocromo P450 2C19 (CYP2C19) y fragmentos generados por cada reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Secuencia del Primer	Tipo de primer	Producto de PCR (pb ^A)	Referencia
Análisis de CYP2C19*2			
5'-CAGAGCTTGGCATATTGTATC-3'	Forward	249	Cunningham et al. 2014 (49)
5'-GGAAGAGGTAAACTAGTCC-3'	Reverse		
Análisis de CYP2C19*3			
5'-GTGATCCCACCTTTCATCCTG-3'	Forward	274	Cunningham et al. 2014 (49)
5'-GACAGATCCGTTCTGACATC-3'	Reverse		
Análisis de CYP2C19*17			
5'-ATGAACAGGATGAATGTGG-3'	Forward	288	Cunningham et al. 2014 (49)
5'-TGCACCTCCGTCCTTAAC-3'	Reverse		
^A pb=pares de bases.			

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las PCRs tienen un volumen total de 20 µl formado por: 8,5 µl de H₂O libre de nucleasas; 10 µl de preparación Master Mix (Promega Biotech®, Wisconsin, USA) [compuesto formado por Taq ADN-polimerasa 5U/µl (Bioline®, Tauton, USA), los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (0,5 mM), cloruro de magnesio (50mM) y una solución tampón o buffer de reacción (10x)]; 0,5 µl de primer forward (20pmol/µl); 0,5 µl de primer reverse (20 pmol/µl) y 0,5 µl de ADN del paciente (100 ng/µl). Nos

interesa conseguir un fragmento de 249 pares de bases (pb) en reverse, del CYP2C19*2; de 274 pb en forward, del CYP2C19*3 y de 288 pb en reverse, del CYP2C19*17.

Ciclo de amplificación de la PCR

La amplificación de las PCRs se realizó mediante un termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, USA) con las siguientes variaciones de temperatura de hibridación: en la inicialización, 3 minutos a 98°C debido al uso de una ADN polimerasa termoestable externa, que necesita activarse por calor; la desnaturalización del ADN, durante 30 segundos (s) a 96°C; el alineamiento o hibridación del cebador, durante 30 s a 55°C para el CYP2C19*2 y el CYP2C19*3, y a 53°C para el CYP2C19*17; la extensión de la cadena de ADN, durante 40s a 72°C; y la extensión final durante 5 minutos (min) a 72°C (Figura 6, en Anexos). Por último, la conservación de la reacción a corto plazo se consigue a 4°C durante un tiempo indefinido. En total, se produjeron 35 ciclos de reacción con tres pasos de temperatura, precedidos y finalizados por un choque térmico (hold) a alta temperatura (90°C). Al final, obtenemos más de 34.000 millones de copias de ADN de cada paciente (2^{35} ciclos = 34.359.738.368 copias).

Electroforesis en geles de agarosa

Una vez realizada la PCR, los productos del material genético resultantes son separados por su tamaño, mediante el proceso de electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, según protocolo correspondiente [OMS, 2015] (50). Este gel está compuesto de 0,525 y 0,75 gramos (gr.), según la capacidad de 35 ml o 50 ml del portapeines, de agarosa en polvo y se le añade 1,5 µl de bromuro de etidio, para visualizar el ADN. La mezcla se añade a varios portapeines, de 35 y 50 ml, para que solidifiquen. Después, se sumerge el portapeines con el gel de agarosa en una solución de tris-borato-EDTA (TBE 1X: 500 ml con 5 litros de H₂O destilada), mezclando las muestras con el tampón de carga (glicerol al 10%, TBE 1X al 90% y azul de bromofenol) con una proporción 1:1. Posteriormente, se obtienen imágenes por fluorescencia de los geles de electroforesis gracias al sistema de documentación de geles G BOX-E® y se interpretan por medio del software informático GeneSnap 7.2® (Syngene, UK), ver Figura 7, Anexos.

Purificación de los productos amplificados

Los fragmentos de ADN son purificados, directamente de los productos de la reacción de PCR gracias a ExoSAP-IT® (GE Healthcare, UK). Este producto permite tratar los fragmentos de nuestros productos de PCR, con un tamaño intermedio entre 100 pb y 20kb. Para ello, elimina los primers y los dNTPs mediante la degradación enzimática con Exonucleasa I y Shrimp Alkaline fosfatasa respectivamente, siguiendo el protocolo de la casa comercial: mezclar 15 µl de H₂O; 3,5 µl de primer y 0,5 µl de producto de PCR con el ExoSAP-IT®. La mezcla obtenida se amplifica la mezcla en el termociclador primero, a 37°C durante 45 min para degradar los primers y nucleótidos; y después, a 80°C durante 15 min, para inactivar la enzima ExoSAP-IT®. El resultado del producto de PCR purificado se guarda en el congelador a -20°C para la secuenciación final.

Secuenciación del ADN

Se envían los productos de PCR a un centro externo (Sistemas Genómicos, Valencia, España) donde son procesadas mediante la secuenciación Sanger, de acuerdo a Frederick Sanger et al. [1977]. Esta reacción consiste en el tipado de didesoxinucleótidos añadidos a los productos y marcados con fluoróforos en un secuenciador. Por convención internacional, se asigna el color verde a la base de adenosina; el negro a la guanina; el rojo a la timina y el azul a la citosina. A continuación, se llevan a cabo el procesamiento de las muestras mediante electroforesis capilar y se analizan los datos por cromatografía y programas informáticos (37).

RESULTADOS

CLÍNICOS: Participantes y datos descriptivos

El estudio de la población elegida contempló a 23 pacientes con SCdL: 9 varones (39,1%) y 14 mujeres (60,9%). La edad media [desviación estándar (DE)] de la muestra poblacional es de 11,0 (5,950) (rango 1-27) años. Entre los grupos de edad observados encontramos a: 1 infante (4,8%), 3 preescolares (14,3%), 6 escolares (28,6%), 5 adolescentes (23,8%), 3 adultos (14,3%) y 3 han fallecido (14,3%). De dos de ellos, no constan datos de filiación registrados. Incluimos 5 casos con mutación NIPBL+ de carácter familiar (21,7%) y 18 esporádicos (78,3%). Se han catalogado mutaciones del gen NIPBL: 4 missense; 3 stops; 2 splicing site; 1 salto, 1 truncada, 1 frameshift y 1 puntual. De acuerdo con la clasificación de severidad clínica de Kline para el SCdL: 6 pacientes presentan un grado leve; 2, un grado moderado; y 7, un grado severo. 20 de los pacientes son de etnia caucásica y de origen español (87,0%), 1 individuo de origen polaco (4,35%), 1 de origen italiano (4,35%) y otro de origen marroquí (4,35%). Se analizó la base de datos del Centro de Referencia Nacional del SCdL con la obtención de este tamaño muestral. No se produjo ninguna pérdida individual durante la realización del estudio:

Después de analizar las historias clínicas de todos los pacientes, la distribución de las principales características clínicas de interés (sexo, edad, prevalencia de RGE y de patología psiquiátrica) en nuestra muestra poblacional se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Características descriptivas de los pacientes con NIPBL+ según los grupos fenotípicos de citocromo P450 CYP2C19 (CYP2C19)				
	MR-Hetero ^A n (fenotipo%)	MR-Homo ^B n (fenotipo%)	MI-Hetero ^C n (fenotipo%)	MI-Heterocomp ^D N (fenotipo%)
Sexo				
Varón	3 (37.5)	3 (37.5)	3 (60.0)	0 (0.0)
Mujer	5 (62.5)	5 (62.5)	2 (40.0)	2 (100.0)
Edad (años)				
Media +/- DT	11±5 (6-16)	9±5 (4-14)	17±7 (10-24)	7±2 (5-9)
RGE^E				
Negativo	3 (37.5)	5 (62.5)	4 (80.0)	1 (50.0)
Positivo	5 (62.5)	3 (37.5)	1 (20.0)	1 (50.0)
Patología Psiquiátrica				
Ausente	6 (75.0)	7 (87.5)	3 (60.0)	1 (50.0)
Presente	2 (25.0)	1 (12.5)	2 (40.0)	1 (50.0)

^AMR-Hetero=Metabolizadores rápidos heterocigotos (*1/*17); ^BMR-Homo=Metabolizadores rápidos homocigotos (*1/*1); ^CMI-Hetero=Metabolizadores intermedios heterocigotos (*1/*2); ^DMI-Heterocomp=Metabolizadores intermedios heterocigotos compuesto (*2/*17); ^ERGE = Reflujo gastroesofágico.

No hay diferencias significativas en las variables de edad, sexo, prevalencia de RGE y patología psiquiátrica, entre los diferentes grupos de fenotipo metabolizador. Las variables cualitativas dicotómicas estudiadas siguen una distribución normal en

nuestra muestra, ya que podemos aceptar la hipótesis nula de que sus valores presentan probabilidades semejantes.

Hemos analizado la asociación de presentar RGE y patología psiquiátrica en función del fenotipo del CYP2C19 expresado y entre sí mismas. A priori, podemos afirmar que las tres variables son independientes ($p > 0,05$: 0.91, 0.226 y 0.183, respectivamente). De acuerdo con nuestras observaciones, un individuo con fenotipo MR tiene un riesgo 1,75 mayor de presentar RGE que otro con fenotipo MI sin ser estadísticamente significativo [Intervalo de confianza del 95%(IC 95%): 0.492-6.229]. Igualmente, tiene una prevalencia 0,438 mayor con respecto al fenotipo MI (IC 95%: 0.116-1.656). En cuanto a ambos signos clínicos, tampoco observamos una asociación representativa entre la existencia de patología psiquiátrica con la exposición al RGE (IC 95%: 0.590-11.464), lo que corrobora la afirmación anterior de independencia intervariables. No se observaron factores de confusión que pudiesen influir los resultados del presente estudio.

GENÉTICOS: Prevalencia de las variantes alélicas CYP2C19*2, *3 y *17 en la población con SCdL

Mediante análisis informático y manual, se buscan mutaciones en los productos de secuenciación Sanger por comparación con las secuencias de referencia de los tres polimorfismos del CYP2C19*2, *3 y *17: NM_000769.1:c.681G>A en el CYP2C19*2, NM_000769.1:c.636G>A en el CYP2C19*3 y la NM_000769.2: c.-806C>T en el CYP2C19*17 (Ver Figura 1).

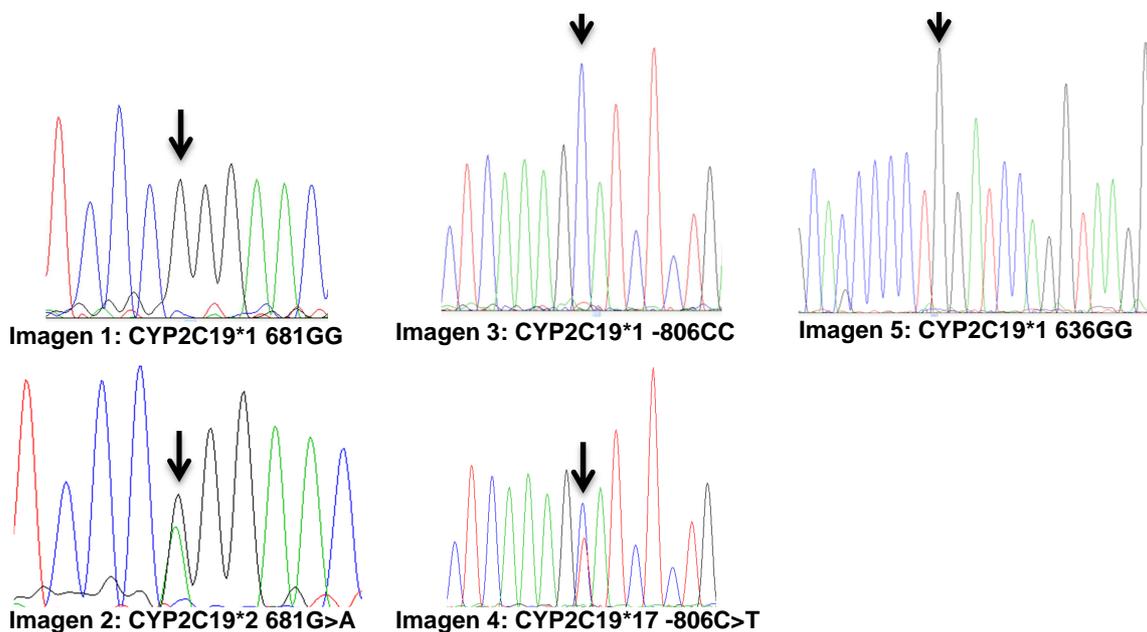


Figura 1. Resultados de la secuenciación Sanger de los polimorfismos del citocromo P450 (CYP2C19) en las muestras obtenidas por PCR. Se adjuntan los polimorfismos observados en nuestro estudio: CYP2C19*2 (Imagen 2: CYP2C19*2 681G>A); CYP2C19*17 (Imagen 4: CYP2C19*17 -806C>T); y los alelos normales para los locus del CYP2C19*2 (Imagen 1: CYP2C19*1 681GG), del CYP2C19*3 (Imagen 5: CYP2C19*1 636GG) y del CYP2C19*17 (Imagen 3: CYP2C19*1 -806CC). No se observa la variante CYP2C19*3 (636G>A).

Describimos las variaciones alélicas del CYP2C19 en la población diagnosticada molecularmente de SCdL en la Tabla 3. Aunque, estudios similares ya han sido reportados en la literatura, este es el primer análisis de la prevalencia de los polimorfismos del CYP2C19 (CYP2C19*2, CYP2C19*3 y CYP2C19*17), en una población española con diagnóstico molecular de SCdL.

Tabla 3. Distribución de los polimorfismos alélicos del CYP2C19 ^A : *2, *3 y *17, obtenidos mediante la técnica de PCR, en pacientes diagnosticados de SCdL ^B con mutación NIPBL ^C :					
n ^D	CYP2C19*2 681G>A	CYP2C19*3 636G>A	CYP2C19*17 -806C>T	Genotipo CYP2C19	Fenotipo Metabolismo
1	GA	GG	CC	*1/*2	Intermedio
2	GG	GG	CC	*1/*1	Rápido
3	GG	GG	CT	*1/*17	Rápido
4	GG	GG	CC	*1/*1	Rápido
5	GG	GG	CC	*1/*1	Rápido
6	GG	GG	CC	*1/*1	Rápido
7	GA	GG	CC	*1/*2	Intermedio
8	GA	GG	CC	*1/*2	Intermedio
9	GG	GG	CT	*1/*17	Rápido
10	GG	GG	CT	*1/*17	Rápido
11	GA	GG	CT	*2/*17	Intermedio
12	GA	GG	CC	*1/*2	Intermedio
13	GG	GG	CT	*1/*17	Rápido
14	GG	GG	CT	*1/*17	Rápido
15	GG	GG	CC	*1/*1	Rápido
16	GG	GG	CT	*1/*17	Rápido
17	GA	GG	CT	*2/*17	Intermedio
18	GG	GG	CT	*1/*17	Rápido
19	GG	GG	CT	*1/*17	Rápido
20	GA	GG	CC	*1/*2	Intermedio
21	GG	GG	CC	*1/*1	Rápido
22	GG	GG	CC	*1/*1	Rápido
23	GG	GG	CC	*1/*1	Rápido

^ACYP2C19: citocromo P450 CYP2C19; ^BSCdL: Síndrome de Cornelia de Lange; ^CNIPBL: gen NIPBL/SCC2/Nipped-B homólogo/Delangina; ^Dn: número de paciente del estudio.

Para este análisis estadístico del CYP2C19 partimos de la premisa, que todos los pacientes de nuestra muestra poblacional no presentan relaciones de parentesco paterno, luego no siguen una herencia genotípica por endogamia. En nuestro caso, estudiamos el locus del CYP2C19 que corresponde a un cromosoma autosómico (10q23.33). Como los objetos a estudio son las variantes: CYP2C19 *2; *3 y *17 (SNPs), cada individuo es portador de dos alelos, uno en cada copia del cromosoma heredados por vía paterna y materna de manera independiente. En concreto, hemos observado dos SNPs: G>A y C>T en nuestra población. Existen tres posibilidades de parejas de alelos para el genotipo con el SNP C>T: CC, CT y TT. Los individuos con los 2 alelos idénticos, sean CC o TT, se denominan homocigotos y los que tienen

diferentes alelos (CT), heterocigotos. En general se considera variante al alelo menos frecuente, pero esto puede diferir de una población a otra.

RESULTADOS PRINCIPALES: Distribución de los genotipos y fenotipos del CYP2C19 en la población con SCdL

Las frecuencias de los genotipos encontrados para el CYP2C19 se exponen en la Tabla 4. En nuestro estudio de una muestra de 23 individuos, las frecuencias alélicas del CYP2C19*2 y del CYP2C19*17 fueron 15.2% (IC 95%: 3.8-36.2) y 21.7% (IC 95%: 7.4-43.7), respectivamente. No se registró ninguna variación alélica para CYP2C19*3. Se aceptó la ausencia de cualquier polimorfismo alélico CYP2C19*2, *3 y *17 como la expresión del alelo normal (CYP2C19*1). La prevalencia del genotipo CYP2C19*1 fue del 63.0% (IC 95%: 40.6-81.9). No se registraron pacientes homocigotos para el CYP2C19*2 ni CYP2C19*17. Sólo se catalogaron dos pacientes heterocigotos compuestos (8.7%, IC 95%: 1.1-28.0) para CYP2C19*2*17.

Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas, y comparación de las frecuencias genotípicas observadas y esperadas según el Equilibrio de Hardy-Weinberg, del citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en una muestra de 23 individuos con SCdL*:			
CYP2C19 Alelos y Genotipo	Frecuencia Observada n (%)	CI 95% de la Incidencia	Frecuencia Esperada n (%)
Alelo *1	29 (63.0)	40.6-81.9	-
Alelo *2	7 (15.2)	3.8-36.2	-
Alelo *3	- (0.0)	0-14.8	-
Alelo *17	10 (21.7)	7.4-43.7	-
*1/*1	8 (34,8)	16.4-57.3	9 (39.7)
*1/*2	5 (21,7)	7.4-43.7	4 (19.2)
*1/*3	- (0.0)	0-16.0	0 (0.0)
*1/*17	8 (34,8)	16.4-57.3	6 (27.4)
*2/*2	- (0.0)	0-14.8	1 (6.6)
*2/*3	- (0.0)	0-14.8	0 (0,0)
*2/*17	2 (8,7)	1.1-28.0	2 (5,7)
*3/*3	- (0.0)	0-14.8	0 (0.0)
*3/*17	- (0.0)	0-14.8	0 (0.0)
*17/*17	- (0.0)	0-14.8	1 (4,7)
Homocigotos	8 (34.8)	16.4-57.3	-
Heterocigoto	13 (56.5)	34.5-96.8	-
Heterocigoto compuesto	2 (8,7)	1.1-28.0	-

*SCdL=Síndrome de Cornelia de Lange.

La nomenclatura farmacogenética consensuada para definir los fenotipos predecibles del CYP2C19 es la siguiente: los individuos que expresan la variante normal homocigota (CYP2C19*1/*1) se definen como MRs; aquellos que son heterocigotos para el CYP2C19*1 y presenta un alelo deficiente (CYP2C19*2 o CYP2C19*3) o heterocigotos compuestos corresponden a MIs; y los homocigotos para los alelos deficientes (CYP2C19*2/*2 y CYP2C19*3/*3) se expresan como MLs. De acuerdo con

las frecuencias alélicas observadas, se predijeron las frecuencias fenotípicas del CYP2C19 (Tabla 5). 16 pacientes (69.6%) presentan un fenotipo metabolizador rápido heterocigoto, de los cuales 8 (34,8%) son heterocigotos CYP2C19*1/*17 (MR-Hetero) y 8 pacientes (34,8%) son homocigotos normales CYP2C19*1/*1(MR-homo). El resto de individuos, 7 (30.4%) son metabolizadores intermedios, 5 de ellos (21,7%), heterocigotos CYP2C19*1/*2 (MI-Hetero) y 2 (8.7%), heterocigotos compuestos CYP2C19*2/*17.

Tabla 5. Frecuencias fenotípicas del citocromo P450 2C19 (CYP2C19) predichas para una muestra de 23 individuos del Hospital Clínico Universitario-Lozano Blesa diagnosticados de SCdL*:

Frecuencia fenotipo CYP2C19	Genotipo CYP2C19	Variaciones alélicas	Frecuencia genotipo: n (%)	IC ⁺ 95%
Metabolizador Ultrarápido - homocigoto	*17/*17	GG – GG – TT	- (0.0)	-
Metabolizador Rápido - heterocigoto	*1/*17	GG – GG – CT	16 (69.6)	16.4-57.3
- homocigoto	*1/*1	GG – GG – CC	8 (34.8)	16.4-57.3
Metabolizador Intermedio - heterocigoto compuesto	*2/*17	GA – GG – CT	7 (30.4)	1.1-28.0-
- heterocigoto	*1/*3	GG – GA – CC	2 (8.7)	-
- heterocigoto	*1/*2	GA – GG – CC	5 (21.7)	7.1-50.7
Metabolizador Lento - heterocigoto compuesto	*2/*3	GA – GA – CC	- (0.0)	-
- homocigoto	*2/*2	AA – GG – CC	- (0.0)	-
- homocigoto	*3/*3	GG – AA – CC	- (0.0)	-
Total población			23 (100.0)	

*SCdL=Síndrome de Cornelia de Lange; *IC = Intervalo de confianza para la frecuencia del genotipo CYP2C19.

Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento

Nuestra población sigue un patrón de cruzamiento polihíbrido bialélico de tres locus diferentes (CYP2C19*2, *3 y *17) que tratamos simultáneamente (AABBCC). Al determinar el EHW, no encontramos diferencias significativas entre las frecuencias alélicas, CYP2C19*2 y *17, observadas en nuestra población y las esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg (test chi cuadrado (χ^2): $p > 0,05$). La comparación de las frecuencias observadas y esperadas, para los dos polimorfismos del CYP2C19 observados, se detalla en la Tabla 4. Se calcularon los intervalos de confianza del 95% para dichas frecuencias observadas usando los límites de las frecuencias esperadas. Así, podemos aceptar la hipótesis nula con una $p > 0,05$ de que nuestra población, se encuentra en equilibrio para los polimorfismos CYP2C19*2, CYP2C19*17, tanto si los consideramos de forma individual como multialélica (valores de χ^2 : 0.737, 1.78 y 2.447, respectivamente) (51). Todos los valores de χ^2 calculados son inferiores al valor teórico de χ^2 ($\chi^2=11,070$) lo que no nos permite rechazar la hipótesis nula, que determina que nuestra población se encuentra en equilibrio.

A continuación, verificamos que no haya un desequilibrio de ligamiento en la herencia de los CYP2C19*2,*3 y *17 en nuestra población, debido a su proximidad de locus en

el cromosoma 10. Esto podría ocasionar una segregación conjunta y un rechazo del EHW en nuestra muestra. A pesar del resultado concordante con el EHW, el análisis del desequilibrio de ligamiento de los dos alelos catalogados en nuestra población, (CYP2C19*2 y *17) expresa un coeficiente de ligamiento normalizado (D') igual a 1, con un logaritmo de odds ratio (LOD) menor de 2 (Figura 2 y 8). Este dato nos sugiere una dependencia total en la herencia de estos dos alelos, pero debido al escaso tamaño de nuestra muestra es probable que tenga poca significación.

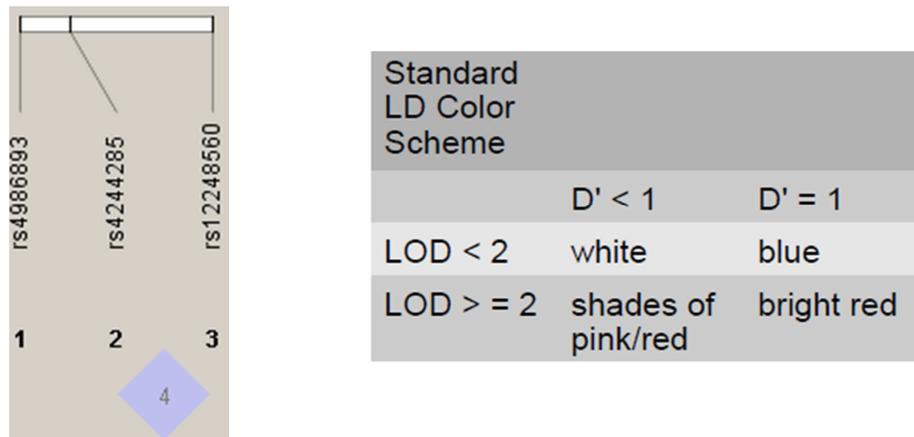


Figura 2 y 8. Resultado del análisis del equilibrio de ligamiento alélico del citocromo P450 CYP2C19 (CYP2C19*2 y CYP2C19*17) en Haploview, que sugiere una dependencia total interalélica en su herencia.

Al relacionar el locus del CYP2C19*2, Rs4244285 (2), y el locus del CYP2C19*17, Rs12248560 (3), observamos que el coeficiente de ligamiento normalizado (D') es igual a 1, figura romboide de color azul, y que la calificación de LOD (LOD) es inferior a 2. El valor del interior de la figura romboide (4) corresponde al valor de D' .

Distribución de las frecuencias alélicas, genotípicas y fenotípicas del CYP2C19*2, CYP2C19*3 y CYP2C19*17 interétnica:

Una vez establecido el EHW en nuestra población, podemos comparar las frecuencias alélicas observadas en nuestro estudio, con respecto a la distribución poblacional estudiada previamente en la literatura, referente a los tres polimorfismos del CYP2C19: CYP2C19*2, *3 y *17. Las Tabla 6 y Tabla resumen las comparaciones en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas interétnicas, de las variantes alélicas y del genotipo (CYP2C19*1/*1, *1/*2, *1/*17 y *2/*17) observadas en nuestro estudio. Aquí, examinamos nuestros datos referentes a la distribución del CYP2C19 con aquellos publicados con anterioridad, en diversas poblaciones de origen caucásico (español, polaco y residentes en USA); turco; iraní; hispano, de ascendencia mexicana y residentes en USA; indígena sudamericano, de origen brasileño; mulato, de procedencia brasileña; nativo americano; africano, de origen brasileño y residentes en USA; y judío ashkenazi, residentes en USA.

Todas ellas, se caracterizan por la prevalencia nula del CYP2C19*3 ($\leq 0,1\%$). La frecuencia estimada del CYP2C19*2 es similar, a todas aquellas registradas en estudios previos en las seis poblaciones comparadas ($\chi^2=0.001-0.723$; $p=0.222-0.981$). Igualmente, la prevalencia del CYP2C19*17 no presenta diferencias significativas con respecto a las mismas seis poblaciones ($\chi^2=0.031-3.440$; $p=0.0636-0.861$). Finalmente, la comparación global para el polimorfismo CYP2C19*2 y el CYP2C19*17 demuestra una homogeneidad en la distribución alélica de estas seis poblaciones estudiadas ($p>0,05$). No obstante, hemos encontrado diferencias significativas para la prevalencia del alelo normal CYP2C19*1 observada con respecto al trabajo en nativos norteamericanos.

En cuanto a la prevalencia del genotipo del CYP2C19, podemos afirmar que nuestra población presenta diferencias significativas ($p<0,05$), con respecto a la frecuencia de los genotipos homocigoto normal y heterocigoto hiperfuncionante: CYP2C19*1/*1 y CYP2C19*1/*17. En el primer caso, las divergencias se encontraron con respecto a la población mexicana; la brasileña de origen indígena; y la norteamericana nativa. Respecto al segundo genotipo, se evidencian diferencias en la población de origen hispano, residente en USA; la brasileña de origen indígena y la norteamericana nativa. En el segundo caso, nuestra población difiere con respecto a los grupos norteamericanos hispano y nativo. Para las demás variantes del genotipo CYP2C19 observadas en nuestra población (CYP2C19*1/*2 y *2/*17), podemos aceptar que no hay diferencias en su distribución con respecto a las seis poblaciones analizadas.

En relación a la expresión del genotipo en la actividad enzimática del CYP2C19, aceptamos que los fenotipos MR y ML expresados en nuestra población, tienen lugar en proporción semejante a tres de las cinco poblaciones comparadas, con excepción de la población turca para el fenotipo ML, y los cuatro subgrupos de la población brasileña (Tabla 8). Aquí, remitimos a nuestro apartado de discusión donde se abordan las divergencias en la nomenclatura farmacogenética del CYP2C19 en la literatura consultada.

No se efectuaron otros análisis de los descritos en este apartado.

DISCUSIÓN

Los resultados clave de este estudio evidencian claramente una prevalencia elevada del CYP2C19*17 (21,7%), relacionado con el fenotipo MR, y la ausencia total de la variante alélica CYP2C19*3 (0,0%), que expresa el fenotipo ML, en pacientes diagnosticados de SCdL de etnia caucásica, en España. El alelo deficitario registrado con una mayor prevalencia es el CYP2C19*2(15,2%). No se observaron diferencias representativas de sexo en las distribuciones alélica y genotípica en nuestra población. La muestra poblacional escogida mantiene el EHW para los polimorfismos del CYP2C19 analizados.

En este análisis se pone de manifiesto que existe una diferencia genotípica interétnica significativa para las variantes normal (CYP2C19*1/*1) y heterocigota hiperfuncionante (CYP2C19*1/*17) entre los individuos estudiados con respecto a las poblaciones comparadas, de diferente procedencia. Igualmente, encontramos divergencias representativas en la prevalencia del fenotipo MUR y MR con respecto a un estudio, y del fenotipo MI con respecto a otro trabajo.

No podemos demostrar la asociación entre la prevalencia del RGE o las conductas autoagresivas por un aumento de la actividad metabolizadora del CYP2C19 (fenotipo MR).

La principal limitación de este trabajo ha sido el tamaño muestral reducido del que hemos dispuesto. Principalmente, se ha debido a que nuestro estudio versa sobre una enfermedad rara (el SCdL) con un prevalencia superior a 1:10.000 individuos. Esta restricción puede condicionar los resultados estadísticos publicados, debido al reducido peso que tienen los datos observados en nuestra población, con respecto a los artículos publicados hasta la fecha.

Nuestro trabajo, por ser un estudio transversal, es el estudio observacional individual más eficiente, para poder estimar la prevalencia de los polimorfismos del CYP2C19 en la población con SCdL. Este tipo de análisis elegido, nos permite estudiar de una manera rápida, económica y fácilmente reproducible la razón de prevalencias del CYP2C19 que nos interesan, ya que nos hemos limitado a analizar nuestro objeto de estudio en un momento puntual, prescindiendo del seguimiento continuado de nuestros pacientes.

No obstante, este tipo de análisis es muy sensible a posibles sesgos que puedan aparecer. Entre ellos, destacamos la existencia de un sesgo de memoria, debido a la falta de datos en las historias clínicas de los pacientes observados, lo que nos hubiera permitido analizar la exposición a los IBPs y comparar su respuesta farmacológica con los polimorfismos del CYP2C19 observados. Para solucionarlo, intentamos recopilar sin éxito, información clínica adicional de la muestra elegida de los centros hospitalarios respectivos. También, podría encontrarse un sesgo de autoselección, al haber reclutado a pacientes voluntarios a partir de la base de datos nacional del SCdL, por lo que la gravedad del síndrome estaba preestablecida. Sin embargo, como demuestran los resultados publicados, a priori no existían diferencias representativas en las características del grupo en estudio, que pudieran influir en los resultados posteriores. Del mismo modo, podríamos haber incurrido en un sesgo de clasificación

incorrecta diferencial en caso de correlacionar incorrectamente el genotipo observado en nuestros pacientes con el fenotipo metabolizador predicho, ya que existe controversia en la literatura consultada al respecto. En este punto, queremos resaltar que se decidió clasificar los fenotipos metabolizadores, de acuerdo con los artículos publicados más recientemente con evidencia científica contrastada, después de consultar la bibliografía disponible hasta el momento actual. Las observaciones realizadas a este respecto, se discuten en profundidad más adelante. A priori, no se observan otros sesgos en nuestro estudio.

Igualmente, debido al carácter puntual de nuestras observaciones, no podemos valorar secuencias temporales lo que, a su vez, no nos permite demostrar hipótesis de causalidad. Por lo tanto, en nuestro trabajo únicamente hemos podido generar nuevas hipótesis, de las cuales destacamos: a) el polimorfismo del CYP2C19 hiperfuncionante (*17) podría presentarse más frecuentemente en la población caucásica con SCdL; b) el genotipo CYP2C19*1/*17 y *2/17 se podrían correlacionar con el fenotipo MR y MI, respectivamente, según las prevalencias observadas en nuestros pacientes; c) la alta prevalencia del CYP2C19*17 en individuos con SCdL podría estar asociada a la elevada prevalencia de RGE y de patología psiquiátrica presente en los individuos observados. Se necesitarían estudios adicionales con muestras más numerosas que apoyen estadísticamente las teorías aquí planteadas.

Las frecuencias alélicas observadas en nuestra población caucásica, se corresponden con las publicadas en la literatura, hasta el momento actual (Tabla 6). Como cabría esperar, el alelo CYP2C19*3 no se contempla en nuestros individuos ya que está prácticamente ausente en la población no asiática, como así queda demostrado en las otras seis poblaciones de diversos orígenes no asiáticos comparadas (34).

La variante alélica normal (CYP2C19*1) es la que observamos más frecuentemente, en un 63,0% de nuestros casos, lo que es concordante con la población general. Sin embargo, encontramos diferencias representativas con la prevalencia del alelo normal, en la población norteamericana nativa, donde alcanza el 80%. Su alta prevalencia encontrada en nuestra muestra, junto con el pequeño tamaño muestral, puede explicar que sólo encontremos los fenotipos MR y MI, donde este alelo está presente. Observamos el genotipo normal homocigoto en un número significativamente inferior de casos con respecto a los trabajos en México, Brasil y Norteamérica.

En referencia a la frecuencia percibida del alelo CYP2C19*17 (21,7%), es semejante a todas las poblaciones comparadas. Esta es muy similar al grupo de individuos iraníes, superior a la mayoría de poblaciones e inferior a la población turca y africana de origen brasileño. Con relación a los diversos genotipos que origina, a pesar del reducido tamaño muestral, nuestros datos confirman que la prevalencia del CYP2C19*1/*17 es significativamente mayor ($p < 0,05$) que en la población hispana de USA, la nativa americana y las indígena y caucásica brasileñas (52–54). Del mismo modo, su prevalencia es inferior, aunque no representativa, en el resto de los grupos poblaciones. Observamos diferentes genotipos de esta variante alélica en heterocigosis (*1/*17) y en heterocigosis compuesta (*2/*17).

Como podíamos esperar de acuerdo con las frecuencias alélicas estimadas en la población española, los dos principales genotipos observados son el CYP2C19*1/*17

(34,8%) junto al CYP2C19*1/*1 (34,8%), asociados ambos al fenotipo MR. Estas dos frecuencias genotípicas concuerdan con nuestra observación de fenotipos mayoritariamente MRs. De acuerdo con estudios recientes [Favela-Mendoza et al., 2015], únicamente los sujetos homocigotos para la variante CYP2C19*17 se consideran MURs por lo que los individuos heterocigotos (CYP2C19*1/*17) son tratados como MRs. Para ratificar esta hipótesis, comparamos nuestras observaciones con las frecuencias fenotípicas de MURs y MRs publicadas en el pasado, en torno al 5% y al 74% respectivamente (Tabla 8). Nuestros resultados (0% y 69,6%, $p > 0,05$) apoyarían la hipótesis de que el fenotipo MUR sólo se expresa en caso del genotipo *17/*17, y no en el caso de *1/*17. Precisamente, por asignar el fenotipo MR al genotipo CYP2C19*1/*17 podemos explicar las diferencias significativas que encontramos con el trabajo de Santos et al. [2011], quien lo considera como MUR.

Con respecto a la variante heterocigosis compuesta (CYP2C19*2/*17), esta se ha examinado en el 8.7% de los casos con una distribución homogénea con respecto a todas las poblaciones analizadas. Observamos una prevalencia superior, no estadísticamente significativa, a todos los grupos poblacionales, con excepción del africano-brasileño. A pesar de que el consenso general declara que su mecanismo metabolizador es desconocido, Payan et al. [2014] concluye que no difiere del CYP2C19*1/*2, en una población adulta, por lo que lo clasifica dentro del fenotipo MI. Ese estudio sugiere que el efecto del alelo *2, deficitario, suprime la respuesta hipermetabólica del alelo funcionante, *17. Igualmente, Gurbel et al. [2011] reafirma su clasificación como MI. Por otro lado, Gumus et al. [2012] concluye que este genotipo corresponde a un fenotipo MR porque observa la misma actividad enzimática que los CYP2C19*1/*1 y *1/*17 y diferente al *1/*2, en niños. De la misma manera, otros autores [Sanford et al., 2014 y Sugimoto et al., 2008] lo consideran un fenotipo MR ya que no estima diferencias entre la actividad enzimática para los genotipos CYP2C19*1/*1, *1/*17, *2/*17 y *1/*2. Ante esta controversia y después de revisar la literatura, observamos que la diferencia de edad entre las diversas poblaciones estudiadas podría explicar estos resultados divergentes. Para nuestro estudio, hemos considerado que el genotipo CYP2C19*2/*17 corresponde al fenotipo MI.

A la hora de sugerir nuestra hipótesis al respecto, analizamos conjuntamente las prevalencias de este genotipo (8.7%) con el fenotipo MR (69,6%) y MI (30.4%) observados en nuestra muestra, con respecto a los estudios que difieren en la nomenclatura farmacogenética [Gumus et al., 2012 y Payan et al., 2014]. En nuestro trabajo, existe una concordancia total en la prevalencia de estos tres elementos con el estudio de Payan et al. [2014] ($p > 0,05$). Comparándonos con el estudio de Gumus et al. [2012] no encontramos diferencias representativas en cuanto a la frecuencia del genotipo en cuestión, ni del fenotipo MR. Sin embargo, sí que estimamos diferencias relevantes en la prevalencia del fenotipo MI ($p = 0.037$), lo que apoyaría nuestra teoría de que el genotipo CYP2C19*2/*17 corresponde al fenotipo MI. Para reafirmar esta suposición, hemos comparado nuestros datos con otros tres estudios, que establecen un fenotipo metabolizador desconocido para el CYP2C19*2/*17. Si asociamos las frecuencias del fenotipo MI y desconocido, establecidos por estos tres trabajos, podemos afirmar, que no existen diferencias representativas ($p > 0,05$) con la prevalencia del fenotipo MI en nuestra población. A pesar de que aportamos dos argumentos a favor de esta hipótesis, en nuestro caso, las conclusiones al respecto

podrían tener un mayor peso estadístico, si contáramos con un tamaño muestral superior y pudiéramos analizar la respuesta farmacológica de estos individuos.

La tercera variante alélica observada, el CYP2C19*2, con un 15.2% de los casos, se contempla en nuestro estudio en proporción similar a la población general. Esta se manifiesta en una cuantía superior que en la población turca, la iraní, la mexicana, la norteamericana y la brasileña de origen indígena. Aunque, es inferior a la población brasileña de origen caucásico, mulato y africano. La manifestación de este alelo deficitario ocasiona una prevalencia del genotipo CYP2C19*1/*2 del 21,7%, la cual no presenta discrepancias representativas con el resto de poblaciones, aunque es superior a todas ellas, con excepción de los judíos ashkenazi residentes en USA.

Por último lugar, como hemos mencionado anteriormente, la distribución de los fenotipos MR y MI observados en nuestra muestra es homogénea, en referencia a los estudios analizados, que comparten la misma nomenclatura farmacogenética [Payan et al., 2014]. En nuestro estudio, el fenotipo MR (69.6%) y el MI (30,4%) se distribuyen de la misma forma homogénea que en las poblaciones comparadas de Irán, México y USA. Sin embargo, la frecuencia del fenotipo MR difiere significativamente, en comparación con la población brasileña de origen caucásico, mulato o africano. De la misma forma que el fenotipo MI con respecto a la población de Turquía, por los motivos explicados previamente. En este estudio, no hemos observado los genotipos CYP2C19*17/*17, *2/*2, *3/*3 y *2/*3 relacionados tanto con el MUR como con el ML.

Respecto a la distribución interpoblacional del CYP2C19, hemos puesto de manifiesto, que el CYP2C19 presenta diferencias interétnicas, después de comparar seis trabajos de poblaciones con un origen étnico diferente (caucásico español; turco; persa; sudamericano, indígena, mulato e hispano; africano; judío ashkenazi y norteamericano nativo). Nuestras aportaciones pueden ayudar a la estratificación de la prevalencia étnica, de acuerdo con los fenotipos metabolizadores predecibles del CYP2C19, por lo que se deben planear más estudios con este mismo objetivo en el futuro.

Gracias a los datos registrados, podríamos considerar que la población diagnosticada de SCdL tiende a expresar una actividad enzimática elevada del CYP2C19 debido a los fenotipos MUR y MR. Argumentos a favor de esta premisa, son la alta prevalencia de los alelos hiperfuncionantes, *1 y *17, y la nula presencia de uno de los alelos deficitarios, CYP2C19*3, así como de los genotipos responsables del fenotipo ML observadas en nuestro trabajo. Estos resultados están en consonancia con la falta de respuesta, al tratamiento farmacológico con IBPs documentada en la literatura científica. Aunque estas sugerencias no pueden ser ratificadas en este estudio, ya que no encontramos diferencias significativas en las distribuciones de este alelo hiperfuncionante, con respecto a las poblaciones tomadas como referencia.

Según nuestro conocimiento, no existe la implementación de ningún programa de prescripción médica, basado en pruebas farmacogenéticas que determinen el CYP2C19, en el Sistema Nacional Español de Salud. Por lo que, los pacientes estudiados que sigan un tratamiento para el RGE o psiquiátrico, podrían beneficiarse de un ajuste de la dosis en función del genotipado del CYP2C19. De hecho, varios trabajos concluyen que el genotipo de los polimorfismo del CYP2C19 ayudarían a optimizar e individualizar el tratamiento farmacológico en los pacientes (53).

Del mismo modo, a pesar de no haber podido demostrar la dependencia con padecer RGE y conductas autoagresivas, creemos conveniente que el abordaje precoz y continuado de la patología psiquiátrica primaria, así como de las posibles causas físicas exacerbadoras de la misma, son de gran importancia para optimizar el desarrollo psicomotor del niño. Igualmente, tiene gran relevancia constatar el grado de implicación de la familia y de estrés del cuidador, generado en el círculo cercano de cada paciente, pues son soportes clave en el desarrollo psicomotor adecuado del niño.

Con respecto a la validez externa de nuestro estudio, la muestra analizada podría no ser representativa de la población española, diagnosticada molecularmente de SCdL por la mutación NIPBL+. Nos fundamentamos en los pocos individuos estudiados, en el carácter de enfermedad rara del SCdL y en el elevado infradiagnóstico del mismo. No obstante, de acuerdo con nuestros criterios de inclusión, hemos observado a todos los pacientes registrados en el Centro Nacional de Referencia del SCdL. Por lo tanto, estamos asegurando haber analizado al mayor número posible de casos de la población de interés. De todas maneras, una posible solución sería aumentar el tamaño muestral estudiado con todos aquellos nuevos pacientes que sean diagnosticados en el futuro.

Para concluir, este estudio muestra que la frecuencia de los polimorfismos alélicos del CYP2C19, presentes en la población con SCdL, es estadísticamente similar a la distribución previamente reportada en la población no asiática. Se demuestra una elevada prevalencia de la variante genotípica CYP2C19*1/*17, que corresponde al fenotipo MR del CYP2C19, con respecto a la población general. Así como, descartamos la herencia dominante de la variante CYP2C19*17. Por otro lado, los resultados de este trabajo sugiere que el CYP2C19*2/*17 corresponde a un fenotipo MI. De la misma manera, no observamos que la expresión del fenotipo MR predisponga a desarrollar RGE o patología psiquiátrica.

Si consideramos la mayor prevalencia del fenotipo MR observada, valoramos que el genotipado del CYP2C19 debería cobrar una gran importancia, en la determinación de la actividad enzimática dentro del marco del tratamiento terapéutico individualizado del RGE, en pacientes con SCdL. Esta meta conseguiría una mejoría costo-efectiva en el manejo de la patología digestiva y psiquiátrica en la población diagnosticada de SCdL.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido apoyado, económicamente y en el ámbito de infraestructuras, por el Laboratorio de Genética Clínica y Genómica Funcional; por el departamento de Pediatría, Radiología y Medicina Física; y por el departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza (Zaragoza, España). Agradezco la inestimable ayuda de Dr. Ramos Fuentes; Dr. Pié Juste; Dra. María Luisa Bernal; María Hernández, Esperanza Teresa y Sheila López quienes han participado también en este estudio.

El autor declara no tener conflicto de intereses.

11. OMIM: Victor A. McKusick CLK. OMIM Entry - # 122470 - Cornelia de Lange Syndrome 1; CDLS1 [Internet]. 2013 [cited 2015 Apr 14]. Available from: [http://www.omim.org/entry/122470?search=Syndrome cornelia&highlight=syndromic syndrome cornelia](http://www.omim.org/entry/122470?search=Syndrome%20cornelia&highlight=syndromic%20syndrome%20cornelia)
12. Kline AD, Krantz ID, Sommer A, Kliewer M, Jackson LG, FitzPatrick DR, et al. Cornelia de Lange syndrome: Clinical review, diagnostic and scoring systems, and anticipatory guidance. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2007 Jun 15 [cited 2015 Apr 20];143A(12):1287–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17508425>
13. Wulffaert J, van Berckelaer-Onnes I, Kroonenberg P, Scholte E, Bhuiyan Z, Hennekam R. Simultaneous analysis of the behavioural phenotype, physical factors, and parenting stress in people with Cornelia de Lange syndrome. *J Intellect Disabil Res*. 2009;53(7):604–19.
14. Selicorni a., Russo S, Gervasini C, Castronovo P, Milani D, Cavalleri F, et al. Clinical score of 62 Italian patients with Cornelia de Lange syndrome and correlations with the presence and type of NIPBL mutation. *Clin Genet*. 2007;72(2):98–108.
15. Kline AD, Grados M, Sponseller P, Levy HP, Blagowidow N, Schoedel C, et al. Natural history of aging in Cornelia de Lange syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* [Internet]. 2007 Aug 15 [cited 2015 Apr 22];145C(3):248–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17640042>
16. Jyonouchi S, Orange J, Sullivan KE, Krantz I, Deardorff M. Immunologic Features of Cornelia de Lange Syndrome. *Pediatr* [Internet]. 2013 Aug 1;132 (2):e484–9. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/content/132/2/e484.abstract>
17. Basile E, Villa L, Selicorni a., Molteni M. The behavioural phenotype of Cornelia de Lange Syndrome: A study of 56 individuals. *J Intellect Disabil Res*. 2007;51(9):671–81.
18. Van Allen MI, Filippi G, Siegel-Bartelt J, Yong SL, McGillivray B, Zuker RM, et al. Clinical variability within Brachmann-de Lange syndrome: a proposed classification system. *Am J Med Genet* [Internet]. 1993 Nov 15 [cited 2015 Apr 20];47(7):947–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8291538>
19. Oliver C, Sloneem J, Hall S, Arron K. Self-injurious behaviour in Cornelia de Lange syndrome: 1. Prevalence and phenomenology. *J Intellect Disabil Res*. 2009;53(7):575–89.
20. Luzzani S, Macchini F, Valadè A, Milani D, Selicorni A. Gastroesophageal reflux and Cornelia de Lange syndrome: typical and atypical symptoms. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2003 Jun 15 [cited 2015 Apr 20];119A(3):283–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12784293>
21. Vandenplas Y, Rudolph CD, Di Lorenzo C, Hassall E, Liptak G, Mazur L, et al. Pediatric gastroesophageal reflux clinical practice guidelines: joint recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (NASPGHAN) and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, a. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet].

- 2009;49(4):498–547. Available from: papers://6d7233c7-0c7f-43d7-b776-a2bbe7398ece/Paper/p1161
22. Vincent M V, Duncan ND. Gastroesophageal reflux and reflux oesophageal strictures in children with Cornelia de Lange syndrome. *West Indian Med J* [Internet]. 2013;62(2):161–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24564071>
 23. Ferreira CT, Carvalho E De, Sdepanian VL, Morais MB De, Vieira MC, Silva LR. Gastroesophageal reflux disease: Exaggerations, evidence and clinical practice. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. Sociedade Brasileira de Pediatria; 2014;90(2):105–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2013.05.009>
 24. Szyca R, Leksowski K. Cornelia de Lange syndrome - characteristics and laparoscopic treatment modalities of reflux based on own material. *Wideochirurgia i inne Tech mało inwazyjne = Videosurgery other miniinvasive Tech / Kwart Pod patronatem Sekc Wideochirurgii TChP oraz Sekc Chir Bariatrycznej TChP* [Internet]. 2011 Sep [cited 2015 Apr 15];6(3):173–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3516936&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 25. Mayo O. A century of Hardy-Weinberg equilibrium. *Twin Res Hum Genet* [Internet]. 2008 Jun [cited 2015 May 26];11(3):249–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18498203>
 26. Bosco F, Castro D, Briones MRS. Neutral and stable equilibria of genetic systems and the hardy-weinberg principle: limitations of the chi-square test and advantages of auto-correlation functions of allele frequencies. *Front Genet* [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 May 26];3:276. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3525838&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 27. Suárez CC, Jesús M, Gómez S. Métodos de selección de variables en estudios de asociación genética . Aplicación a un estudio de genes candidatos en Enfermedad de Parkinson. 2011;
 28. OMIM: Victor A. McKusick CLK. OMIM Entry - * 124020 - Cytochrome P450, subfamily 11c, polypeptide 19; CYP2C19 [Internet]. 2010 [cited 2015 Apr 14]. Available from: [http://www.omim.org/entry/124020?search=Syndrome cornelia cyp2C19&highlight=syndromic cyp2c19 syndrome cornelia](http://www.omim.org/entry/124020?search=Syndrome%20cornelia%20cyp2c19&highlight=syndromic%20cyp2c19%20syndrome%20cornelia)
 29. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2013 Apr [cited 2014 Jul 18];138(1):103–41. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725813000065>
 30. Zendejdel N, Biramijamal F, Hossein-Nezhad A, Zendejdel N, Sarie H, Doughaiemoghaddam M, et al. Role of cytochrome P450 2C19 genetic polymorphisms in the therapeutic efficacy of omeprazole in iranian patients with erosive reflux esophagitis. *Arch Iran Med*. 2010;13(5):406–12.

31. Payan M, Rouini MR, Tajik N, Ghahremani MH, Tahvilian R. Hydroxylation index of omeprazole in relation to CYP2C19 polymorphism and sex in a healthy Iranian population. 2014;1–9.
32. Favela-mendoza AF, Martinez-cortes G, Hernandez-Zaragoza M, Salazar-flores J, Muñoz-valle JF, Martinez-sevilla VM, et al. Genetic variability of CYP2C19 in a Mexican population : contribution to the knowledge of the inheritance pattern of CYP2C19 * 17 to develop the ultrarapid metabolizer phenotype. 2015;94(1):3–7.
33. Desta Z, Zhao X, Shin J-G, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. Clin Pharmacokinet [Internet]. 2002 Jan [cited 2015 Mar 17];41(12):913–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12222994>
34. Gumus E, Karaca O, Babaoglu MO, Baysoy G, Balamtekin N, Demir H, et al. Evaluation of lansoprazole as a probe for assessing cytochrome P450 2C19 activity and genotype-phenotype correlation in childhood. Eur J Clin Pharmacol. 2012;68(5):629–36.
35. Sugimoto K, Uno T, Yamazaki H, Tateishi T. Limited frequency of the CYP2C19*17 allele and its minor role in a Japanese population. Br J Clin Pharmacol [Internet]. 2008 Mar [cited 2015 May 25];65(3):437–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2291245&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
36. Baldwin RM, Ohlsson S, Pedersen RS, Mwinyi J, Ingelman-Sundberg M, Eliasson E, et al. Increased omeprazole metabolism in carriers of the CYP2C19*17 allele; a pharmacokinetic study in healthy volunteers. Br J Clin Pharmacol. 2008;65(5):767–74.
37. NCBI. dbSNP: Short Genetic Variations [Internet]. 2015. [cited 2015 May 7]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4986893
38. Sanford JC, Guo Y, Sadee W, Wang D. Regulatory polymorphisms in CYP2C19 affecting hepatic expression. Drug Metabol Drug Interact. 2013;28(1):23–30.
39. Gurbel PA, Shuldiner AR, Bliden KP, Ryan K, Pakyz RE, Tantry US. The relation between CYP2C19 genotype and phenotype in stented patients on maintenance dual antiplatelet therapy. Am Heart J [Internet]. 2011 Mar [cited 2015 May 25];161(3):598–604. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3061841&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
40. Ward RM, Kearns GL. Proton Pump Inhibitors in Pediatrics. Pediatr Drugs [Internet]. 2013 Mar 20 [cited 2015 Mar 12];15(2):119–31. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3616221&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
41. Von Elm E, Altman G. D, Egger M, Pocock J. S, Gotsche C. P VPJ. Declaración de la Iniciativa STROBE para la comunicación de estudios observacionales. Gac Sanit. 2008;22(2):144–50.
42. IBM. IBM SPSS Statistics Base 22. Armonk, NY 10504-1785; 212 p.

43. Chen B, Wilkening S, Drechsel M, Hemminki K. SNP_tools: A compact tool package for analysis and conversion of genotype data for MS-Excel. *BMC Res Notes* [Internet]. 2009 Jan [cited 2015 May 8];2(1):214. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/2/214>
44. Wigginton JE, Cutler DJ AG. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet.* 76(5):887–93.
45. Navarrete S, Paneque P, Infantes R, Alcántara MV. Manual de calidad Laboratorio clínico: Protocolo de extracción venosa. Málaga; 2009.
46. Ramos bpl. Polimorfismos de relevancia farmacogenética de las familias 1A2, 2C y 3A en población indígena del noroeste de México [Internet]. Universidad de Extremadura; 2012. Available from: http://dehesa.unex.es:8080/xmlui/bitstream/handle/10662/527/TDUEX_2012_Lazalde_Ramos.pdf?sequence=1
47. Goldstein JA BJ. Genetic tests which identify the principal defects in CYP2C19 responsible for the polymorphism in mephenytoin metabolism. *Methods Enzym.* 1996;272:210–21.
48. Wisconsin U of. Primers design [Internet]. Bioweb: University of Wisconsin System universities and centers. 2008 [cited 2015 May 7]. Available from: https://bioweb.uwlax.edu/GenWeb/Molecular/seq_anal/primer_design/primer_design.htm
49. Cunningham F, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, et al. Ensembl 2015. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014;43(D1):D662–9. Available from: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gku1010>
50. Organización Mundial de la Salud (OMS). Electroforesis en gel de agarosa [Internet]. Comisión Europea. 2015 [cited 2015 May 1]. Available from: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/ManualES/Sesi%C3%B3n5.pdf>
51. Rodriguez S, Gaunt TR, Day INM. OEGE - Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies: Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies [Internet]. *American Journal of Epidemiology.* [cited 2015 May 17]. Available from: <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>
52. Oestreich JH, Best LG, Dobesh PP. Prevalence of CYP2C19 variant alleles and pharmacodynamic variability of aspirin and clopidogrel in Native Americans. *Am Heart J* [Internet]. Mosby, Inc.; 2014;167(3):413–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ahj.2013.10.028>
53. Santos PCJL, Soares R a G, Santos DBG, Nascimento RM, Coelho GLLM, Nicolau JC, et al. CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population. *BMC Med Genet* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011;12(1):13. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/12/13>
54. Strom CM, Goos D, Crossley B, Zhang K, Buller-Burkle A, Jarvis M, et al. Testing for variants in CYP2C19: population frequencies and testing experience in a clinical laboratory. *Genet Med.* 2012;14(1):95–100.

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1. PRIMERS UTILIZADOS PARA DETERMINAR LOS POLIMORFISMOS DEL CITOCROMO P450 2C19 (CYP2C19) Y FRAGMENTOS GENERADOS POR CADA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	16
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LOS PACIENTES CON NIPBL+ SEGÚN LOS GRUPOS FENOTÍPICOS DE CITOCROMO P450 CYP2C19 (CYP2C19)	19
TABLA 3. DISTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS ALÉLICOS DEL CYP2C19 ^A : *2, *3 Y *17, OBTENIDOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR, EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE SCDL ^B CON MUTACIÓN NIPBL+ ^C :.....	21
TABLA 4. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS, Y COMPARACIÓN DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS OBSERVADAS Y ESPERADAS SEGÚN EL EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG, DEL CITOCROMO P450 2C19 (CYP2C19) EN UNA MUESTRA DE 23 INDIVIDUOS CON SCDL*:	22
TABLA 5. FRECUENCIAS FENOTÍPICAS DEL CITOCROMO P450 2C19 (CYP2C19) PREDICHAS PARA UNA MUESTRA DE 23 INDIVIDUOS DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO-LOZANO BLESIA DIAGNOSTICADOS DE SCDL*:	23
TABLA 6. COMPARACIÓN DE LA FRECUENCIA ALÉLICA DEL CITOCROMO P450 CYP2C19 (CYP2C19) SEGÚN GRUPOS ÉTNICOS EN LA LITERATURA REPORTADA PREVIAMENTE [(30, 31, 33, 49-51) Y REFERENCIAS INCLUIDAS].....	42
TABLA 7. COMPARACIÓN DE LA FRECUENCIA GENOTÍPICA DEL CITOCROMO P450 CYP2C19 (CYP2C19) SEGÚN GRUPOS ÉTNICOS EN LA LITERATURA REPORTADA PREVIAMENTE [(30, 31, 33, 49-51)(1-3) Y REFERENCIAS INCLUIDAS]	43
TABLA 8. COMPARACIÓN DE LAS FRECUENCIAS FENOTÍPICAS OBSERVADAS DEL METABOLISMO DEL CITOCROMO P450 CYP2C19 (CYP2C19) SEGÚN GRUPOS ÉTNICOS EN LA LITERATURA REPORTADA PREVIAMENTE [(30, 31, 33, 49-51) Y REFERENCIAS INCLUIDAS].....	44
FIGURA 1. FENOTIPOS DE PACIENTES CON SÍNDROME CORNELIA DE LANGE CON MUTACIÓN EN EL GEN NIPBL ^C DE EDADES DIVERSAS SIMILARES A LA POBLACIÓN ESTUDIADA.....	38
FIGURA 2. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DEL SÍNDROME DE CORNELIA DE LANGE ESTABLECIDOS POR KLINE ET AL. [2007]. EDITADA CON PERMISO DE KLINE A ET AL. [2007] (10).	39

FIGURA 3. MECANISMO DEL METABOLISMO DEL CITOCROMO P450 CYP2C19 PARA LOS INHIBIDORES DE LA BOMBA DE PROTONES. EDITADO CON PERMISO DE: KEARNS G. ET AL. [2013].(40)..... 40

FIGURA 4. CICLO DE AMPLIFICACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR): DESNATURALIZACIÓN (SEPARACIÓN DE LAS HEBRAS DE ADN), HIBRIDAMIENTO (ALINEACIÓN DE LOS CEBADORES, PRIMER 1 Y 2, CON LAS HEBRAS DE ADN); EXTENSIÓN DE LAS HEBRAS DE ADN POR LA ADN POLIMERASA..... 40

FIGURA 5. IMÁGENES DE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DONDE SE APRECIA LA MIGRACIÓN DIFERENTE DEL ADN ANALIZADO EN FUNCIÓN INVERSAMENTE PROPORCIONAL AL TAMAÑO DE PARES DE BASES (PB) DE LOS FRAGMENTOS DE PCR PARA CYP2C19*2 (249 PB), *3 (274 PB) Y *17 (288 PB)..... 41

FIGURA 6. RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN SANGER DE LOS POLIMORFISMOS DEL CITOCROMO P450 (CYP2C19) EN LAS MUESTRAS OBTENIDAS POR PCR..... 20

FIGURA 7 Y 8. RESULTADO DEL ANÁLISIS DEL EQUILIBRIO DE LIGAMIENTO ALÉLICO DEL CITOCROMO P450 CYP2C19 (CYP2C19*2 Y CYP2C19*17) EN HAPLOVIEW, QUE SUGIERE UNA DEPENDENCIA TOTAL INTERALÉLICA EN SU HERENCIA. 24

ANEXOS

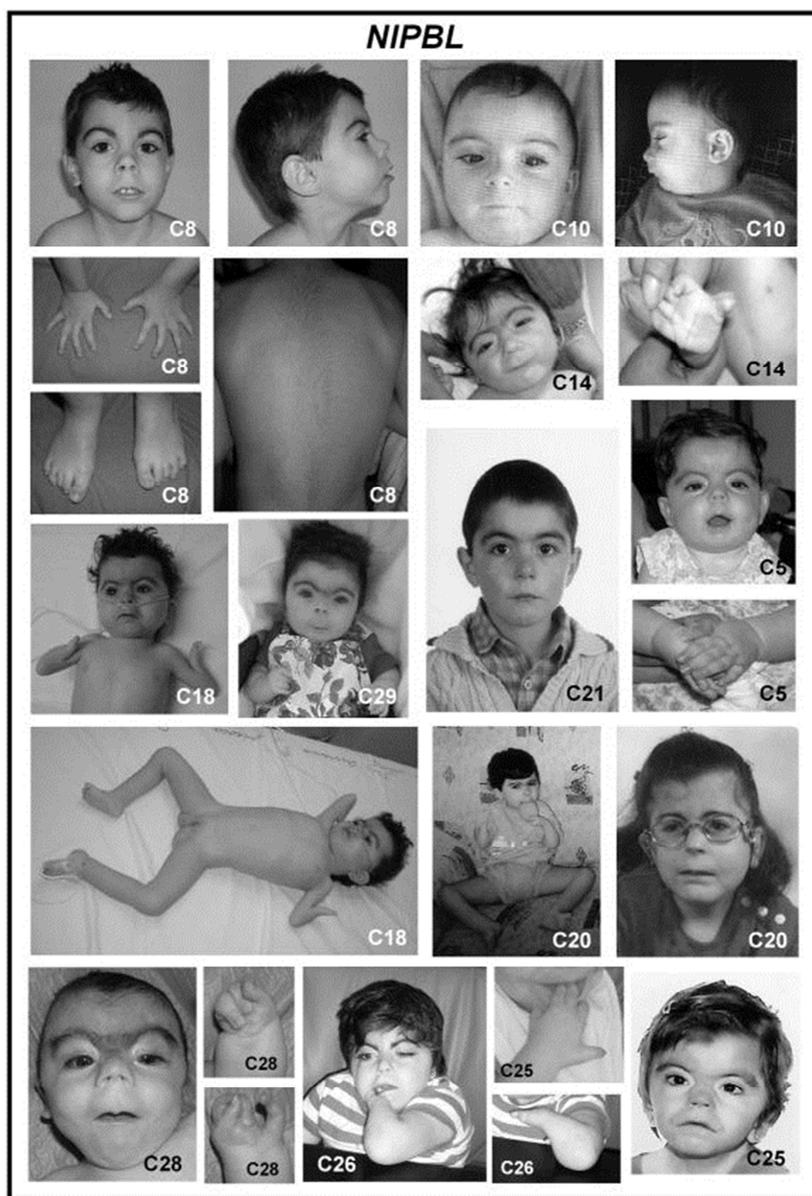


Figura 3. Fenotipos de pacientes con Síndrome Cornelia de Lange con mutación en el gen NIPBL de edades diversas similares a la población estudiada. Editada con permiso de Pié et al. [2010] (5).

TABLE I. Diagnostic Criteria for Cornelia de Lange Syndrome

Body category	No.	Main criteria	With	Secondary criteria
(1) Facial		Synophrys (arched, fine eyebrows)	and ≥ 3 of	Long eyelashes Short nose, anteverted nares Long, prominent philtrum Broad or depressed nasal bridge Small or square chin Thin lips, down-turned corners High palate Widely spaced or absent teeth
(2) Growth	≥ 2 of	Weight below 5th centile for age Height or length below 5th centile for age OFC below 2nd centile for age		
(3) Development	≥ 1 of	Developmental delays or mental retardation Learning disabilities		
(4) Behavior	≥ 2 of	Attention deficit disorder \pm hyperactivity Obsessive-compulsive characteristics Anxiety Constant roaming Aggression Self-injurious behavior Extreme shyness or withdrawal Autistic-like features		
(5) Musculoskeletal	OR OR	Reduction defects with absent forearms Small hands and/or feet (below 3rd centile) or Oligodactyly None of these	alone and ≥ 2 of and ≥ 3 of	5th finger clinodactyly Abnormal palmar crease Radial head dislocation/abnormal elbow extension Short 1st metacarpal/proximally placed thumb Bunion Partial 2,3 syndactyly toes Scoliosis Pectus excavatum Hip dislocation or dysplasia
(6) Neurosensory/Skin	≥ 3 of	Ptosis Tear duct malformation or blepharitis Myopia ≥ -6.00 D Major eye malformation or peripapillary pigmentation Deafness or hearing loss Seizures Cutis marmorata Hirsutism, generalized Small nipples and/or umbilicus		
(7) Other major systems	≥ 3 of	Gastrointestinal malformation/malrotation Diaphragmatic hernia Gastroesophageal reflux disease Cleft palate or submucous cleft palate Congenital heart defect Micropenis Hypospadias Cryptorchidism Renal or urinary tract malformation		

OFC = head circumference.

Diagnosis: (1) Positive mutation on CdLS gene testing; or (2) Facial findings and meet criteria from two of the growth, development or behavior categories; or (3) Facial findings and meet criteria for three other categories, including one from growth, development or behavior, and two from the other categories (see notes).

Notes:

Examples of usage:

(1) Synophrys and three of the facial features, normal growth, learning disabilities, gastroesophageal reflux, cryptorchidism and submucous cleft palate would meet criteria.

(2) Synophrys and three of the facial features, mental retardation, small hands and feet, bunion and scoliosis would meet the criteria.

(3) Synophrys and two of the facial features, small stature, mental retardation would not meet the criteria.

Figura 4. Criterios diagn3sticos del S3ndrome de Cornelia de Lange establecidos por Kline et al. [2007]. Editada con permiso de Kline A et al. [2007] (12).

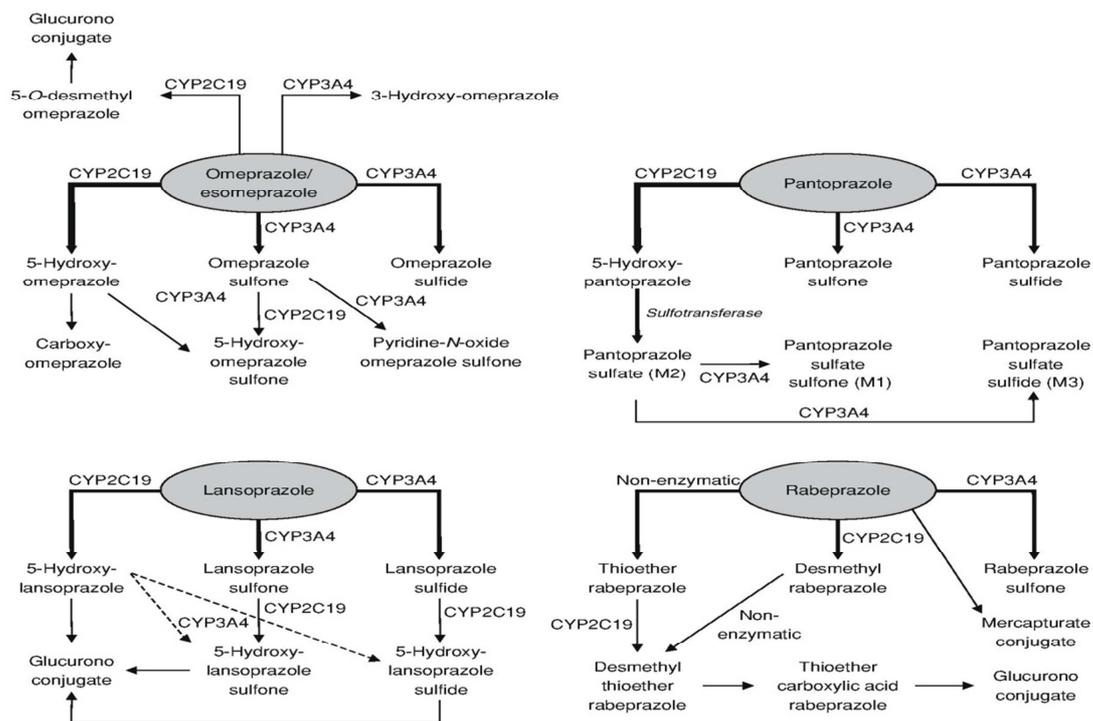


Figura 5. Mecanismo del metabolismo del citocromo P450 CYP2C19 para los inhibidores de la bomba de protones. Editado con permiso de: Kearns G. et al. [2013].(40)

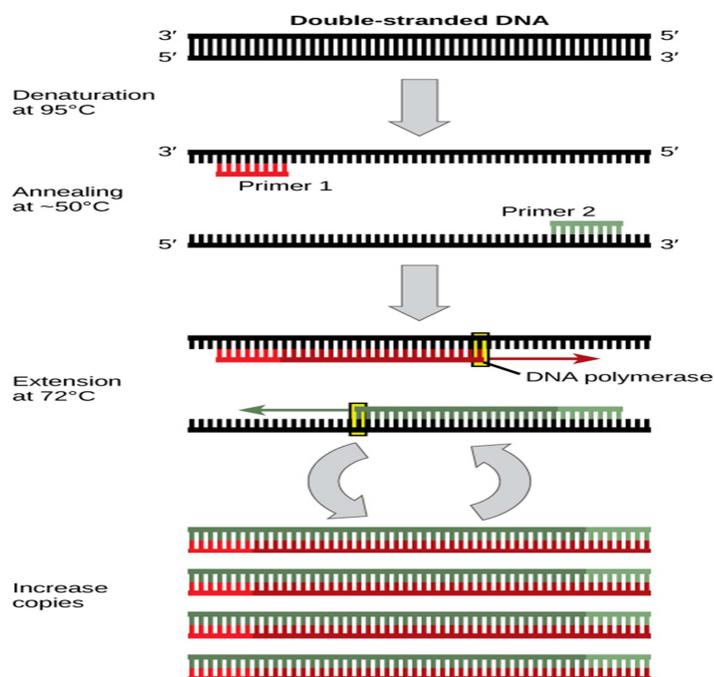


Figura 6. Ciclo de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): desnaturalización (separación de las hebras de ADN), hibridamiento (alineación de los cebadores, Primer 1 y 2, con las hebras de ADN); extensión de las hebras de ADN por la ADN polimerasa. Editada de “Biotechnology-Cloning and Genetic Engineering (GPC)” de OpenStax CNX, Rice University © 1999-2015.

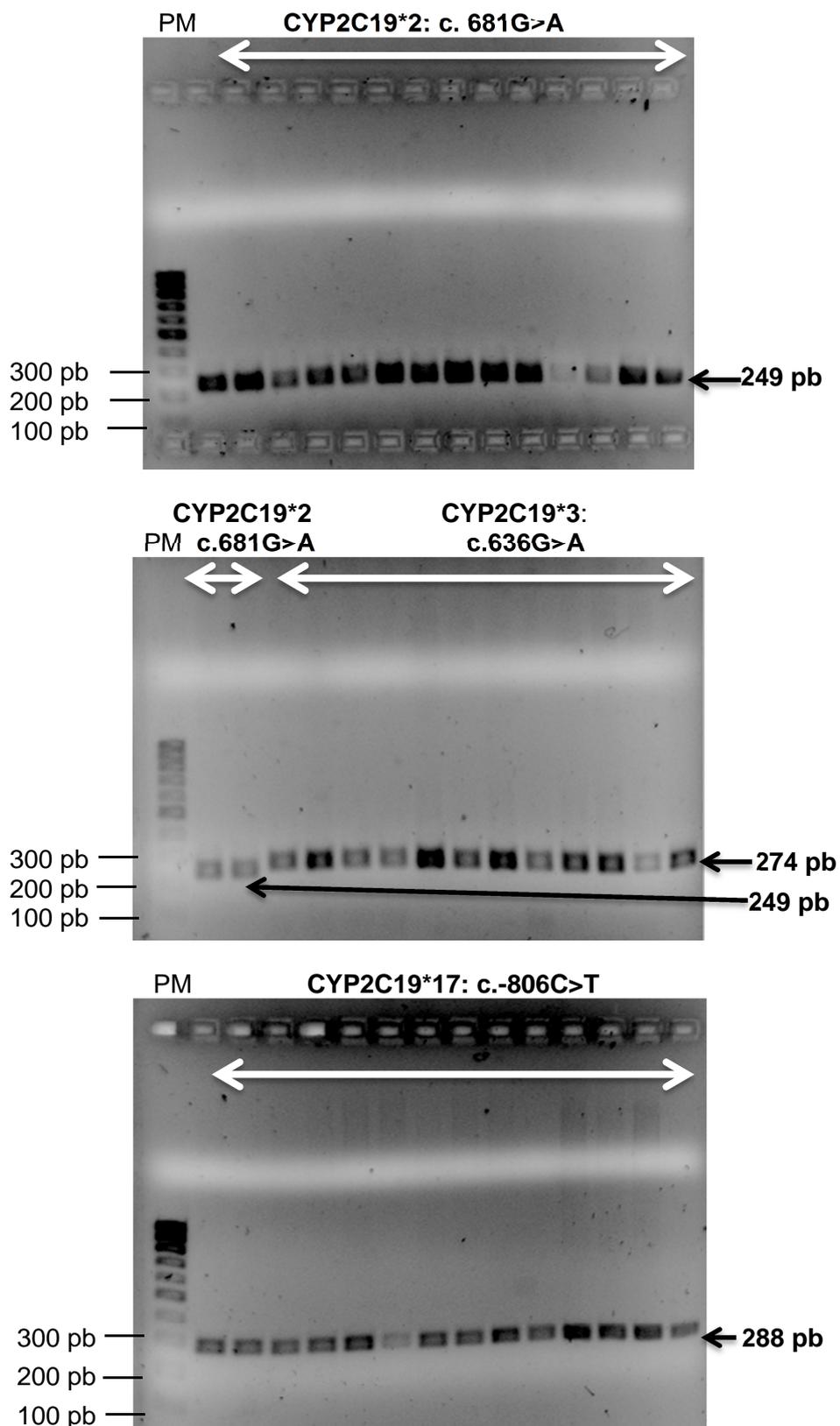


Figura 7. Imágenes de electroforesis en gel de agarosa donde se aprecia la migración diferente del ADN analizado en función inversamente proporcional al tamaño de pares de bases (pb) de los fragmentos de PCR para CYP2C19*2 (249 pb), *3 (274 pb) y *17 (288 pb).

Tabla 6. Comparación de la frecuencia alélica del citocromo P450 CYP2C19 (CYP2C19) según grupos étnicos en la literatura reportada previamente [(30, 31, 33, 49-51) y referencias incluidas]

Grupo étnico	2n	Frecuencia alélica del CYP2C19								Comparación χ^2 ; valor de P	Referencia
		*1		*2		*3		*17			
		n	%	n	%	n	%	n	%		
Español	46	29	63.0	7	15.2	-	0.0	10	21.7	-	Este estudio
Turco	488	320	65.6	49	10	-	0.0	119	24.4	*2=0.723; 0.400 *17=0.052; 0.819	Gumus et al. 2012 (34)
Iraní	360	235	65.3	47	13.1	-	0.0	78	21.6	*2=0.027; 0.870 *17=0.031; 0.861	Payan et al. 2014 (31)
Mexicano	476	367	77.1	41	8.6	-	0.0	68	14.3	*1=3.816; 0.051 *2=1.471; 0.225	Faviola et al. 2015 (32)
Interétnico de USA	2792	1641	58.8	247	8.9	-	0.0	347	12.4	*2=1.491; 0.222 *17=2.769; 0.096	Strom et al. 2012 (54)
Brasileño:										*1=1.884; 0.170	Santos et al. 2011 (53)
-Amerindio	366	270	73.8	38	10.4	-	0.0	58	15.8	*17=0.650; 0.420	
-Caucásico	1230	NA ^A	NA ^A	208	16.9	-	0.0	222	18.0	*2=0.010; 0.919 *17=0.198; 0.657	
-Mulato	630	NA ^A	NA ^A	104	16.5	-	0.0	134	21.3	*2=0.001; 0.981 *17=0.015; 0.903	
-Africano	198	NA ^A	NA ^A	40	20.2	-	0.0	52	26.3	*2=0.322; 0.571 *17=0.209; 0.647	
Nativos americanos	100	80	80	11	11	-	0.0	9	9	*1=3.955; 0.0467 *2=0.199; 0.655 *17=3.440; 0.064	Oestreich et al. 2014 (52)

En la columna de "Comparación de chi cuadrado (χ^2)" se adjuntan sólo aquellos valores de p que han mostrado diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), o en caso de que no se observe ningún valor de $p < 0.05$, se indica los dos valores más próximos y todos aquellos cercanos a la significación estadística $p < 0.15$.

^ANA: No analizado

Tabla 7. Comparación de la frecuencia genotípica del citocromo P450 CYP2C19 (CYP2C19) según grupos étnicos en la literatura reportada previamente [(30, 31, 33, 49-51)(32,34,54) y referencias incluidas]

Grupo étnico	n	Frecuencia genotípica del CYP2C19								Comparación χ^2 ; valor de P	Referencia
		*1/*1		*1/*2		*1/*17		*2/*17			
		n	%	n	%	n	%	n	%		
Español	23	8	34.8	5	21.7	8	34.8	2	8.7	-	Este estudio
Turco	244	108	44.3	30	12.3	74	30.3	13	5.3	*1/*2=0.91; 0.340	Gumus et al. 2012 (34)
Iraní	180	75	41.7	33	18.3	52	28.9	6	3.3	*2/*17=0.472; 0.492	Payan et al. 2014 (31)
Mexicano	238	143	60.1	31	13.0	50	21.0	8	3,4	*1/*1=4.52; 0.034	Favela-Mendoza et al. 2015 (32)
Interétnico de USA:											Strom et al. 2012 (54)
-Caucásico	357	149	41.7	69	19.3	97	27.2	NA ^A	NA ^A	*1/*17=0.302; 0.583	
-Africano	149	58	38.9	23	15.4	46	30.9	NA ^A	NA ^A	*1/*2=0.21; 0.646	
-Hispano	346	200	57.8	68	19.7	56	16.2	NA ^A	NA ^A	*1/*1=3.75; 0.0528	
-Judío ashkenazi	342	159	46.5	76	22.2	74	21.6	NA ^A	NA ^A	*1/*17=3.985; 0.046	
Brasileño:											
-Amerindio	183	114	62.3	16	8.8	29	15.8	8	4.4	*1/*1=5.31; 0.021	Santos et al. 2011 (53)
-Caucásico	615	289	47.0	110	17.9	118	19.2	34	5.5	*1/*17=3.806; 0.0511	
-Mulato	315	128	40.6	63	20.1	74	23.5	19	6.0	*1/*17=2.490; 0.115	
-Africano	99	33	33.3	19	19.2	24	24.2	9	9.1	*1/*17=0.938; 0.333	
Nativos americanos	98	62	63.3	20	20.4	13	13.3	2	2.0	*1/*17=0.606; 0.436	Oestreich et al. 2014 (52)
										*1/*1=5.09; 0.024	
										*1/*17=4.591; 0.032	

En la columna de “Comparación de chi cuadrado (χ^2)” se adjuntan sólo aquellos valores de p que han mostrado diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), o en caso de que no se observe ningún valor de $p < 0.05$, se indica el valor más próximo y todos aquellos cercanos a la significación estadística $p < 0.15$.

^ANA: No analizado.

Tabla 8. Comparación de las frecuencias fenotípicas observadas del metabolismo del citocromo P450 CYP2C19 (CYP2C19) según grupos étnicos en la literatura reportada previamente [(30, 31, 33, 49-51) y referencias incluidas]

Grupo étnico	n	Frecuencia fenotípica del metabolismo del CYP2C19										Comparación χ^2 ; valor de P	Referencia
		MUR ^A		MR ^B		MI ^C		ML ^D		Desc. ^E			
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
Español	23	-	0,0	16	69,6	7	30,4	-	0,0	NA ^E	NA ^E	-	Este estudio
Turco	244	16	6.6	195	79.9	30	12.3	3	1.2	NA ^E	NA ^E	MR=0.795; 0.3725 MI=4,351; 0.037	Gumus et al. 2012 (34)
Iraní	180	10	5.5	127	70.6	39	21.7	4	2.2	NA ^E	NA ^E	MR=0.021; 0.886 MI=0.454; 0.501	Payan et al. 2014 (31)
Mexicano	238	5	4.0	193	81.1	31	13.0	1	0.0	8	0.0	MR=1.093; 0.300 MI=3.807; 0.051	Faviola et al. 2015 (32)
Interétnico de USA	1396	53	3.8	912	65.3	293	21.0	49	3.5	89	6.4	MR=0.044; 0.835 MI=0.701; 0.402	Strom et al. 2012 (54)
Brasileño: -Amerindio	183	38	20.8	114	62.3	16	8.8	7	3.7	8	4.4	MUR=4.569; 0.033 MR=0.207; 0.649 MI=7.529; 0.006	Santos et al. 2011 (53)
-Caucásico	615	150	24.4	289	47.0	110	17.9	32	5.2	34	5.5	MUR=6.044; 0.014 MR=3.678; 0.055 MI=1.553; 0.213	
-Mulato	315	94	29.8	128	40.6	63	20.1	11	3.5	19	6.0	MUR=8.062; 0.004 MR=6.235; 0.013 MI=0.826; 0.363	
-Africano	99	32	32.3	33	33.3	19	19.2	6	6.1	9	9.1	MUR=8.467; 0.004 MR=8.780; 0.003 MI=0.808; 0.369	

^AMUR: Metabolizador ultrarápido del CYP2C19; ^BMR: Metabolizador rápido del CYP2C19; ^CMI: Metabolizador intermedio del CYP2C19; ^DML: Metabolizador lento del CYP2C19; ^FNA: No analizados; ^EDesc.: Mecanismo desconocido, los estudios lo asocian al genotipo CYP2C19*2/*17. Aquí, se compara con el genotipo CYP2C19*2/*17 observado en nuestra muestra. Se ruega ver discusión.

