

Polimorfismo beta2 adrenérgico en mestizos colombianos y respuestas de la variante alélica Gln₂₇Glu al propranolol

•CARLOS A. ISAZAM.

Médico Farmacólogo. Profesor Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Tecnológica de Pereira.

•JULIETA HENAO B.

Médica Genetista. Profesora Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira.

•EDUARDO RAMÍREZ V.

Médico Cardiólogo. Profesor Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira.

•FANNY CUESTA G.

Ingeniera Química Farmacóloga. Profesora Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

Resumen:

Los polimorfismos Arg₁₆Gly, Gln₂₇Glu y Thr₁₆₄Ile del gen que codifica al adrenergico receptor β -2 (ADRB2) se asocian con respuestas alteradas del Sistema Nervioso Simpático. El propósito de este estudio fue: a) determinar las frecuencias de las tres principales variantes alélicas del gen ADRB2 en una muestra de población mestiza colombiana y compararlas con las de otros grupos étnicos; b)

puesto que el receptor ADRB2 regula la movilización de lípidos, evaluar si el polimorfismo Gln₂₇Glu constituye un riesgo para el desarrollo de dislipidemia inducida por propranolol. La genotipificación se realizó con técnicas de PCR-RFLP y se confirmó con secuenciación del DNA de muestras tomadas al azar. Para examinar la asociación entre el genotipo Gln₂₇Glu del gen ADRB2 y dislipidemia secundaria al propranolol, se reclutaron 19 individuos sanos homocigotos para Gln₂₇ (nativo, n=11) o para Glu₂₇ (mutado, n=8). Las frecuencias alélicas son: Arg₁₆ (69.7%), Gly₁₆ (30.3%), Gln₂₇ (68.8%), Glu₂₇ (31.2%), Thr₁₆₄ (99.3) e Ile₁₆₄ (0.7%); los genotipos más frecuentes corresponden a las formas heterocigotas Gln₂₇Glu (48.2%) y Arg₁₆Gly (47.4%). En la fenotipificación con propranolol encontramos que los homocigotos nativos Gln₂₇ disminuyeron las HDL-C (p=0.005), mientras los mutados Glu₂₇ incrementaron los niveles de triglicéridos (p=0.012), lo cual sugiere que el polimorfismo Gln₂₇Glu, en sus formas homocigotas, representa un riesgo para dislipidemia inducida por propranolol. Estos resultados pueden contribuir a un mejor entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la dislipidemia secundaria a β -bloqueadores y a racionalizar el uso del propranolol.

PALABRAS CLAVES: dislipidemia, farmacogenética, polimorfismo ADRB2, propranolol, receptor β -2 adrenérgico.

Recibido para publicación: 03-03-2003

Aceptado para publicación: 06-06-2003

Introducción:

El receptor α -2 adrenérgico, uno de los receptores del Sistema Nervioso Simpático, media respuestas autonómicas fundamentales, tales como aumento del inotropismo y de la frecuencia cardíaca, relajación de músculos lisos (broncodilatación y vasodilatación), uteroinhibición, glucogenólisis con elevación de la glicemia, incremento en la secreción de insulina, lipólisis y degranulación de mastocitos (1).

El adrenergico receptor α -2 es miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G, consiste en una proteína de 64 kd que contiene siete dominios hidrofóbicos transmembranales, una región amino-terminal en la cara extracelular de la membrana y una región carboxilo-terminal en la cara citosólica, donde ocurre la interacción con la proteína G estimulante (Gs) (1,2). Dicho receptor constituye el blanco de un numeroso grupo de medicamentos agonistas y antagonistas adrenérgicos, ampliamente usados en la práctica clínica.

El gen que codifica al adrenergico receptor α -2 ha sido localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q 31-32), carece de intrones y consta de un bloque codificante de 1242 bp (GenBank: *ADRB2*, código de acceso M15169). El gen *ADRB2* es polimórfico con varias sustituciones simples de bases (SNPs: single nucleotide polymorphisms), tres de las cuales son prevalentes en todos los grupos étnicos estudiados: $A_{46}G$ (cambia Arg_{16} por Gly), $C_{79}G$ (cambia Gln_{27} por Glu) y $C_{491}T$ (cambia Thr_{164} por Ile). Las frecuencias con que dichos alelos se distribuyen en la población varían entre los diferentes grupos étnicos, pero tales polimorfismos no han sido investigados en mestizo latinoamericano.

El SNP Gly_{16} es una variante con actividad de "downregulation" ("regulación a la baja") aumentada, en comparación con el tipo nativo Arg_{16} , de modo que cuando el receptor α -2 es sometido a la acción de sustancias agonistas se pone en marcha el mecanismo de "downregulation" acentuado, con menor densidad de receptores α -2

como consecuencia, lo cual se refleja clínicamente en una susceptibilidad aumentada a algunos desórdenes y menor respuesta a medicamentos agonistas α -2, comparado con el tipo nativo (Arg_{16}) (3-14). Por el contrario, el alelo Glu_{27} reduce la "downregulation" inducida por agonistas α -2, lo cual le confiere resistencia a la desensibilización y respuesta incrementada a los agonistas α -2, en relación con el tipo nativo Gln_{27} (4,7,10,15-17). Aún no está esclarecido el mecanismo de la "downregulation" alterada de estos dos polimorfismos, aunque los estudios indican que se modifica la degradación del receptor, después de su internalización (18,19).

El alelo Ile_{164} es mucho menos común (frecuencia alélica: 3-5%, sin que se hayan descubierto personas homocigotas) pero particularmente disfuncional, ya que pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva y portadores de la forma mutada tienen peor pronóstico y progresan más rápidamente hacia la muerte o el trasplante, que aquellos portadores del genotipo nativo Thr_{164} (2,20,21).

Sin embargo, debe destacarse que otros estudios diseñados para evaluar las consecuencias fenotípicas de SNPs aislados no han podido corroborar las correlaciones genotipo-fenotipo ya referidas, al parecer porque existen importantes interacciones entre diferentes SNPs (22-26). En síntesis, la evidencia actual sugiere la importancia de haplotipos específicos del gen *ADRB2*, más que de alelos aislados, como marcadores genéticos de susceptibilidad, pronóstico y respuesta a medicamentos (27,28).

Como puede verse, todas estas investigaciones se han enfocado en las relaciones existentes entre los polimorfismos mencionados y los medicamentos agonistas α -2 y, aunque desde hace mucho tiempo se conocen las amplias diferencias interindividuales en las dosis útiles y en los efectos indeseables de los beta bloqueantes (1,29,30), aún no se ha investigado la relación que pudiera existir entre el polimorfismo del receptor α -2 y los efectos deseables e indeseables de los fármacos que bloquean dicho receptor.

La dislipidemia representa uno de los efectos indeseables más intrigantes de los α -bloqueadores,

no sólo por lo que significa como factor de riesgo cardiovascular (31) sino porque todavía se desconoce el mecanismo que la induce y qué tipo de paciente está predispuesto a desarrollarla (1). Se sabe que las catecolaminas regulan la lipólisis en el tejido adiposo humano vía sus receptores α y β . La estimulación α inhibe la lipólisis, mientras la estimulación β incrementa la liberación de ácidos grasos libres en la circulación (1,32). Aunque algunos estudios muestran resultados discordantes (22,33), otras investigaciones han encontrado una fuerte asociación entre los polimorfismos genéticos del receptor β -2 y trastornos metabólicos como hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina y obesidad. Por ejemplo, se ha reportado que el índice de masa corporal (IMC) y los niveles séricos de triglicéridos están significativamente incrementados en individuos portadores del alelo Glu₂₇ (7,15,31,34), mientras otro estudio mostró que los individuos homocigotos Gln₂₇ ganaron más peso, más tejido graso subcutáneo y tuvieron mayor resistencia a la insulina cuando fueron sobre-alimentados, en comparación con los heterocigotos y los homocigotos Glu₂₇ (35); el mismo alelo Gln₂₇ parece asociarse con susceptibilidad incrementada a diabetes tipo 2 (36). Por otro lado, el alelo Gly₁₆ se ha relacionado con función lipolítica aumentada en los adipocitos (32), mayores concentraciones de ácidos grasos en ayunas y menor supresión de ácidos grasos después de una carga oral de glucosa, en comparación con el alelo Arg₁₆ (37).

Por último, también se encontró aumento del fibrinógeno (38), así como incremento en los triglicéridos y disminución en las HDL-C en pacientes tratados con α -bloqueantes (39,40). La causa de esta dislipidemia provocada por agentes bloqueadores α no ha sido dilucidada, ni los efectos del polimorfismo β -2 en las respuestas metabólicas a estos agentes han sido explorados. Este estudio fue emprendido con los siguientes objetivos: a) determinar la distribución alélica y genotípica de los polimorfismos Arg₁₆Gly, Gln₂₇Glu y Thr₁₆₄Ile entre mestizos colombianos, y compararlas con las de otros grupos étnicos; b) determinar si existen diferencias en respuestas

hemodinámicas y metabólicas al propranolol (bloqueante α ₁ y α ₂) entre homocigotos para el alelo nativo Gln₂₇ y homocigotos para el alelo mutado Glu₂₇.

Materiales y Métodos

Sujetos

En la fase inicial de caracterización genotípica de los polimorfismos Gln₂₇Glu y Thr₁₆₄Ile participaron 141 voluntarios¹ adultos de ambos sexos, no consanguíneos entre sí y de rasgos fenotípicos mestizos, en tanto que la genotipificación Arg₁₆Gly se realizó en un subgrupo de 76 personas de la misma muestra, asegurando que los 19 individuos que participaron en la segunda fase del estudio fueran genotipificados para los tres polimorfismos estudiados. Cada voluntario firmó su correspondiente consentimiento informado. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética Médica de la Facultad de Ciencias de la Salud UTP, en la categoría de investigación con riesgo mínimo según la resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

Primera fase: Genotipificación

Previa extracción del DNA genómico de leucocitos por el método que utiliza el kit GFX Genomic Blood Purification (Pharmacia Biotech), se procedió a la determinación de los alelos Gly₁₆ y Gln₂₇ de acuerdo con el procedimiento descrito por Aynacioglu *et al.* (41), con algunas modificaciones: los dos sitios de mutación (A₄₆G y C₇₉G) fueron identificados por análisis PCR-RFLP. Las amplificaciones PCR del DNA genómico se realizaron en 50 μ l de reacción, en presencia de 100-200 ng de DNA, 0.2 mM de cada dNTP, 1X de buffer de reacción (50 mM de KCl y 20 mM de tris-HCl, pH 8.4), 1.5 mM de MgCl₂, 1.0 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Life Technology), 10% de DMSO y 200 nM de cada primer, con las siguientes secuencias 5'-GAA CGG CAG CGC CTT CTT

¹ Sobre un estimado de 10% de homocigotos Glu₂₇ y $d=0.05$, se aplicó la fórmula:

$$n = z^2pq/d^2 = (1.96)^2 \times 0.1 \times 0.9/0.05^2 = 138$$

GCT GGC ACC CCA T y 5'-CTG CCA GGC CCA TGA CCA GAT CAG. Se amplificó un fragmento de 242 bp que incluye ambos sitios polimórficos. Para el alelo A₄₆G las reacciones se incubaron por 3 min a 94°C, seguidas por 40 ciclos a 94°C por 45 s, 56°C por 30 s, 72°C por 45 s, con una extensión final a 72°C por 5 min; el producto amplificado fue digerido a 37°C por 2 h con 1.0 U de *Sly* I (New England Biolabs. Ins.). Para el análisis del polimorfismo C₇₉G el procedimiento fue similar y el producto amplificado fue digerido a 37°C por 2 h con 1.0 U de *Fnu*4H I (New England Biolabs. Ins.). Los fragmentos digeridos se separaron en gel de agarosa al 2% y se visualizaron y analizaron en lector de geles. Si la muestra es portadora de la mutación Gly₁₆ se produce un patrón de fragmentos 214/28, y si es de tipo nativo da un fragmento de 242 bp; del mismo modo, si la muestra es portadora del alelo Glu₂₇ se produce un patrón 236/6, y si es nativa el patrón será 181/55/6 bp.

Para el estudio del alelo Thr₁₆₄Ile también se empleó el procedimiento PCR-RFLP propuesto por Aynacioglu *et al.* (41), que genera un fragmento de 280 bp con los primers 5'-GTG ATC GCA GTG GAT CGC TAC T y 5'-AGA CGA AGA CCA TGA TCA CCA G, en las mismas condiciones ya descritas, excepto que se emplean 58°C para el annealing. 10 ul del producto PCR se sometieron a digestión con 1.25 U de *Mn*II (New England Biolabs). Todos los fragmentos RFLP fueron separados en agarosa al 3% y visualizados por tinción con bromuro de etidio. Si la muestra es portadora de la mutación C₄₉₁T se produce un patrón de fragmentos 230/50, y si es de tipo nativo da un fragmento de 116/114/50 bp.

Con el propósito de confirmar resultados se hicieron secuenciaciones de muestras nativas y mutadas elegidas al azar, las cuales además se incluyeron como controles positivos. El procedimiento de secuenciación se realizó según el método didedoxi de Sanger, empleando el kit de secuenciación Thermosequenase Primer Cycle (Amersham Pharmacia Biotech), siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de las secuencias nucleotídicas se hizo en el equipo secuenciador automatizado de

DNA ALFexpress (software ALFWIN evaluation).

Segunda fase: Expresión fenotípica (respuestas al propranolol)

Una vez concluida la tipificación del gen *ADRB2* se pasó a la segunda fase que consistió en examinar la relación entre el tipo de respuesta al propranolol y la homocigosidad para el polimorfismo Gln₂₇Glu del gen. Para ello se reclutaron 11 individuos homocigotos nativos (Gln₂₇Gln) y 8 homocigotos mutados (Glu₂₇Glu), clínicamente sanos, que no tuvieran antecedentes de asma o alergia al propranolol y que no hubieran consumido medicamentos por lo menos una semana antes de la prueba.

En un diseño doble ciego respecto al genotipo, los 19 voluntarios fueron sometidos a evaluación por el cardiólogo, con registro electrocardiográfico, frecuencia cardíaca (FC), presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) e índice de masa corporal (IMC); si no existía impedimento a cada voluntario se le tomaba muestra de sangre para la medición de fibrinógeno, colesterol total (CT), colesterol HDL (HDL-C) y triglicéridos (TG) y se le entregaban las tabletas de propranolol (Artensol®, tab. de 40 mg, Lab. Ayerst-Hormona, Colombia) para que tomara 20 mg cada 12 horas durante 7 días. A todo momento los participantes tuvieron la posibilidad de contactarse con los médicos tratantes para consultar posibles reacciones adversas y aclarar inquietudes, y se les recomendó que no modificaran su estilo de vida ni sus hábitos alimentarios durante la toma del fármaco. 3 a 4 horas después de la última dosis del séptimo día cada individuo fue nuevamente evaluado por el cardiólogo y se le midieron las mismas variables cardiovasculares (FC, PAS y PAD) en reposo e inmediatamente después de un régimen de ejercicio por 5 min en banda sinfin, similar al empleado por Zhou (30), que es una modificación al protocolo de Bruce: 1 min a 1.7 millas por hora (2.7 km/h) a 10° de inclinación, 1 min a 2.5 millas por hora (4 km/h) a 12°, 1 min

a 3.4 millas por hora (5.4 km/h) a 14°, y 2 min a 4.5 millas por hora (7.2 km/h) a 16°. Nuevamente se tomaron muestras de sangre para la determinación de los niveles séricos post-tratamiento de CT, HDL-C, TG y fibrinógeno. En esta oportunidad también se tomó muestra de sangre en forma aleatoria a 10 participantes, a fin de determinar la concentración plasmática de propranolol, como prueba de control de cumplimiento de la prescripción y para efectos de comparabilidad entre los grupos.

Determinación de los niveles séricos de propranolol

El procedimiento se apoyó en los métodos propuestos por Achari R *et al* (43) y Braza AJ *et al* (44). El propranolol (Sigma-Aldrich) en plasma fue medido en el equipo HPLC (Hewlett Packard modelo 1100, acoplado a detector de fluorescencia). A 1 ml de plasma se le agregaron 10 ml de diclorometano y 100 µl de agua. La mezcla fue agitada por 10 min y centrifugada luego a 2500 rpm por 15 min. La capa orgánica superior fue recolectada en 1 ml de KH₂PO₄ 0.1 M (pH=2.8), agitada por 15 min y luego centrifugada otros 15 min a 2500 rpm. La capa acuosa (500 µl) fue entonces separada e inyectada en el HPLC (volumen= 100 µl).

Todos los reactivos fueron de grado analítico. Los solventes usados en la separación cromatográfica fueron de grado HPLC. El agua fue desionizada y filtrada en el sistema Mill-Q. La separación se realizó en una columna ciano propil de fase reversa (Supelco), conservando la columna a una temperatura constante de 40°C. La composición de la fase móvil fue acetonitrilo:agua ácida 30:70 (trietilamina 1.2%, pH=3.0 con 85% de ácido fosfórico). El procedimiento se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 1 ml/min durante 8 minutos, monitorizando el efluente en el detector de fluorescencia, con ondas de excitación y emisión de 315 y 350 nm, respectivamente. Bajo las condiciones arriba mencionadas el tiempo de retención del propranolol fue de 4.9 min. Los ensayos inter-día e intra-día para la estandarización de las curvas de propranolol en plasma (n=6) tuvieron un coeficiente de correlación mayor de 0.99, y el coeficiente de variación fue menor del 20% para todas las concentraciones. La recuperación de propranolol en plasma fue de 77.38%. Las curvas fueron lineales en un rango de 7.81 a 500 ng/ml, por lo que consideramos el límite de cuantificación en 7.81 ng/ml para propranolol en plasma. Puesto que la codeína mostró mucha variabilidad, los resultados se estimaron sólo con estándar externo.

Tabla 1. Distribución alélica y genotípica de los polimorfismos en los codones 16 y 27 del gen *ADRB2* en mestizos colombianos y en otros grupos étnicos¹.

Grupo étnico	Arg16/Arg16	Arg16/Gly16	Gly16/Gly16	Arg16	Gly16	Ref.
Colombianos	46	47.4	6.6	69.7	30.3	(este estudio)
Caucásico-Americanos	26.6	38.3	35.1	45.7	54.3	(45)
Caucásico-Europeos	13.4	45.6	41	36.2	63.8	(12)
Afro-Americanos	23.6	50.4	26	48.8	51.2	(45)
Chinos	35.6	46.2	18.3	58.7	41.3	(45)
Turcos	15.4	50	34.6	40.4	59.6	(41)
	Gln27/Gln27	Gln27/Glu27	Glu27/Glu27	Gln27	Glu27	
Colombianos	44.7	48.2	7.1	68.8	31.2	(este estudio)
Caucásico-Americanos	45.7	38.8	15.4	65.2	34.8	(45)
Caucásico-Europeos	30.1	48.5	21.3	54.4	45.6	(12)
Afro-Americanos	63.4	31.7	4.9	79.3	20.7	(45)
Japoneses	84	15	1	92	8	(46)
Chinos	85.6	14.4	1.5	92.8	7.2	(3,45)
Turcos	47.1	42.3	10.6	68.3	31.7	(41)

¹ los números son porcentajes.

Perfil Lipídico y Fibrinógeno

El CT, las HDL-C, los triglicéridos y el fibrinógeno se determinaron por los métodos enzimáticos estándares.

Manejo Estadístico

Todos los análisis se realizaron en el software SPSS 10.0 para Windows. Las frecuencias alélicas se calcularon con base en el número observado de cada alelo y en el número de cromosomas examinados por PCR-RFLP y secuenciación del DNA. El equilibrio de Hardy-Weinberg fue establecido mediante la prueba de Chi cuadrado. Las diferencias entre individuos homocigotos nativos y mutados se compararon con el test de Mann-Whitney; las diferencias intraindividuales (pre-tratamiento vs post-tratamiento) fueron comparadas con el test de Wilcoxon. Todas las pruebas estadísticas se hicieron de dos colas, y se consideraron significativos valores de $p < 0.05$.

Resultados

En la tabla 1 se muestran la distribución alélica y las frecuencias de los genotipos en las posiciones 16 y 27 del gen *ADRB2*. El polimorfismo Thr₁₆₄Ile se encontró en una sola persona heterocigota para la variante isoleucina. Las forma heterocigotas 16 y 27 fueron los genotipos más prevalentes. El equilibrio de Hardy-Weinberg se confirmó tanto para el genotipo Arg₁₆Gly (Chi=0.88, p=0.64) como para Gln₂₇Glu (Chi=2.45, p=0.3). La figura 1 muestra los electroferogramas de un individuo doblemente mutado y de otro doblemente nativo en los loci 16 y 27.

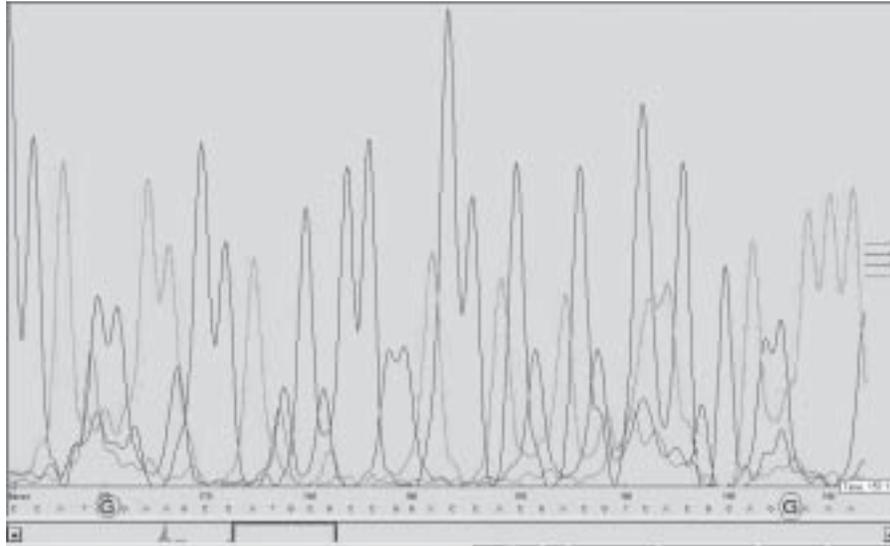
Influencia del polimorfismo Gln₂₇Glu en las variables hemodinámicas y metabólicas en estado basal y post-tratamiento. 19 individuos del grupo de genotipados, 11 homocigotos nativos (Gln₂₇) y 8 homocigotos mutados (Glu₂₇), fueron enrolados para participar en la exploración de los efectos fenotípicos del polimorfismo Gln₂₇Glu; no se

Tabla 2. Características clínicas y bioquímicas de mestizos colombianos homocigotos nativos y mutados en el locus 27 del gen *ADRB2*, en condiciones basales (pre-tratamiento) y después del consumo de propranolol.

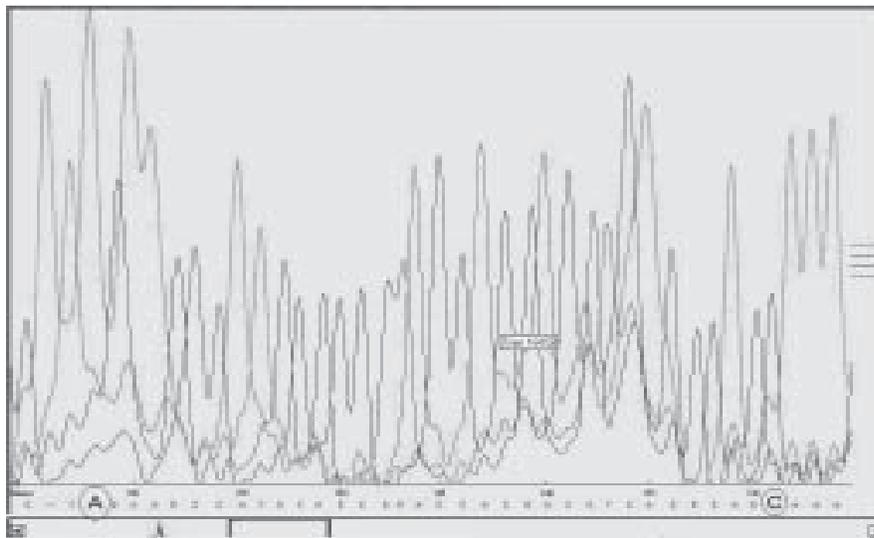
	Gln ₂₇ Gln (n=11)			Glu ₂₇ Glu (n=8)		
	Pre-propranolol	postpropranolol	P	Pre-propranolol	postpropranolol	P
Edad (años)	27.2±11.7			29.4±10*		
Género (M/F)	5/6			4/4*		
IMC (kg/m ²)	23.7±4.5			23.2±1.5*		
FC (latidos/min)	74.2±9.1	62.5±7.8	0.003	75.4±9.6*	65.4±10	0.018
PAS (mm Hg)	119.6±9.9	105.7±10.3	0.005	121.3±12.5*	106.9±10.3	0.016
PAD (mm Hg)	76.1±7.2	66.4±9.5	0.002	75.4±7.2*	65±7.6	0.017
CT (mg/dl)	161.6±36.1	156.6±37.3	0.97	158.4±25.2*	160.6±31.4	0.87
HDL-C (mg/dl)	37.8±4.4	31.4±6.2	0.005	42.3±18.9*	40±19.3	0.33
TG (mg/dl)	173±105.6	169.1±97.3	0.66	119.8±85.9*	242.3±179.8	0.012
Fibrinógeno (mg/dl)	188.3±34.6	184.2±59.5	0.29	171.9±29.6*	193.4±53.6	0.16
Prop. sérico (ng/ml)	10.7±4.4			7.4±6.6*		

Excepto donde se indica, los datos se expresan como media±DE. Abreviaturas: M: masculino, F: femenino, IMC: índice de masa corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, FC: frecuencia cardíaca, CT: colesterol total, HDL-C: lipoproteínas de alta densidad, TG: triglicéridos, Prop: propranolol.

*P no significativas para Gln₂₇Gln vs Glu₂₇Glu en el estado basal pre-tratamiento.



A



B

Figura 1. Fragmentos del gen *ADRB2* correspondientes a un individuo doblemente nativo (A) y otro doblemente mutado (B) en las posiciones $A_{46}G$ y $C_{79}G$.

incluyeron heterocigotos por considerar que pudieran mostrar efectos intermedios que dificultaran el análisis. En la tabla 2 se muestran las variables demográficas (edad, género), fisiológicas (IMC, FC, PAS, PAD) y bioquímicas (CT, HDL-C, TG, fibrinógeno y niveles séricos de propranolol) de los 19 individuos estratificados por genotipo Gln₂₇Glu. No hubo diferencias significativas en las características basales pre-tratamiento de los 8 homocigotos para el alelo Glu₂₇, comparados con los 11 homocigotos nativo en el mismo sitio.

Por otro lado, al comparar los cambios provocados por el tratamiento con propranolol (20 mg dos veces al día por 7 días) en el grupo completo de nativos y mutados encontramos que se modificaron significativamente la FC (p=0.00), PAS (p=0.00), PAD (p=0.00), HDL-C (p=0.014) y TG (0.036); no se modificaron las variables CT (p=1.0) y fibrinógeno (p=0.78). Sin embargo, al analizar por separado (tabla 2) los cambios causados por el propranolol hallamos que tanto en el subgrupo de los nativos como en el de los mutados se modificaron significativamente las variables fisiológicas (FC, PAS y PAD), pero disminuyó la HDL-C (p=0.005) únicamente en el subgrupo de los homocigotos nativos (Gln₂₇Gln), mientras se incrementaron en forma significativa los triglicéridos (p=0.012) solamente en el subgrupo de los mutados (Glu₂₇Glu). El CT y el fibrinógeno se mantuvieron inalterados en ambos subgrupos.

Finalmente, no encontramos diferencias entre los dos subgrupos en las respuestas hemodinámicas después del test de ejercicio submáximo (datos no mostrados).

Discusión

Existe considerable variación en las frecuencias de alelos y genotipos *ADRB2* entre diferentes grupos étnicos (tabla 1). Tales cambios son importantes porque pueden contribuir a las diferencias inter-étnicas en la prevalencia, severidad o respuesta al tratamiento de algunas enfermedades (45-48). Este estudio es el primero en describir las variantes alélicas del gen *ADRB2* en una muestra de

población colombiana, en la cual es prevalente el mestizo con ancestros de blanco español, negro africano e indígena americano; consecuentemente, se esperaba encontrar una distribución alélica correspondiente con nuestro origen tri-étnico. En efecto, las distribuciones del alelo Glu₂₇ y del genotipo Glu₂₇Glu en este estudio (0.31 y 0.071, respectivamente) se sitúan en un lugar intermedio entre el caucásico (~0.40 y ~0.18) y el afro-americano (0.21 y 0.05) (tabla 1); sin embargo, con los polimorfismos Arg₁₆Gly y Thr₁₆₄Ile encontramos las más bajas prevalencias de mutados hasta ahora reportadas.

Como se mencionó al principio, algunos pacientes tratados con bloqueantes α -adrenérgicos muestran incremento en los triglicéridos y disminución de las HDL-C y, dado que el *ADRB2* es un importante regulador de la lipólisis en el tejido adiposo (1,32) y que el alelo Gln₂₇Glu está asociado con el metabolismo de los triglicéridos (7,15,31,34), nosotros enfocamos nuestro interés en evaluar si dicho polimorfismo en el codón 27 se asocia con dislipidemia por propranolol. Con tal propósito comparamos algunas respuestas cardiovasculares y metabólicas de homocigotos nativos y mutados a la administración de dosis relativamente bajas de propranolol por una semana (tabla 2). El hallazgo de que la homocigosidad Gln₂₇ del gen *ADRB2* se asocia con reducción significativa de las HDL-C (p=0.005) y la homocigosidad Glu₂₇ con incremento significativo de los triglicéridos (p=0.012), sugiere que el polimorfismo Gln₂₇Glu representa un factor de riesgo para dislipidemia inducida por propranolol.

Nuestro estudio es el primero en relacionar un polimorfismo específico del gen *ADRB2* (Gln₂₇Glu) con un efecto indeseable específico al propranolol (dislipidemia). Debe advertirse que las conclusiones de estudios diseñados para evaluar consecuencias fenotípicas de un SNP aislado, sin considerar sus potenciales interacciones con otros SNPs, deben ser tomadas con reservas, especialmente cuando el fenotipo de interés es frecuente y puede resultar de múltiples factores genéticos y ambientales (49). Sin embargo, todos los sujetos de este estudio fenotipificados con propranolol tenían perfiles lipídicos en rangos

normales antes de la exposición al medicamento (tabla 2), pero posteriormente reaccionaron de manera diferente los nativos y los mutados, en lo que a HDL-C y triglicéridos se refiere, en sólo una semana y sin que se hayan dado cambios en sus hábitos dietéticos o estilo de vida.

Si bien esta investigación no fue diseñada para explicar los mecanismos fisiopatológicos de la hipertrigliceridemia y del descenso en las HDL-C causados por propranolol, nosotros creemos que de alguna manera tales hallazgos pueden estar relacionados con una alteración en los mecanismos de “up-regulation” inducida por α -bloqueadores, como una posible extensión a la alteración que el polimorfismo Gln₂₇Glu tiene con respecto a la “down-regulation” (7,10,15,19), hipótesis que será objeto de un estudio posterior de nuestro grupo. De acuerdo con la evidencia actual los α -bloqueadores pueden alterar el perfil lipídico directamente modificando el metabolismo de los triglicéridos y de las HDL-C, e indirectamente provocando un estado de hiperinsulinemia/resistencia a la insulina (50). Dicho síndrome de hiperinsulinemia/resistencia a la insulina ha sido reportado en individuos portadores del genotipo Gln₂₇Gln bajo ciertas circunstancias (35,36). En consonancia con estos hechos nosotros esperábamos que las modificaciones de las dos fracciones lipídicas (TG y HDL-C) se dieran en las mismas personas, y no que se disociaran entre nativas Gln₂₇ (descenso de HDL-C) y mutadas Glu₂₇ (ascenso de TG). No podemos por tanto excluir la posibilidad de un mecanismo totalmente independiente del fenómeno de la up-regulation de receptores inducida por bloqueantes α .

La acción de los α -bloqueadores sobre el perfil lipídico debe ser una importante consideración en el uso de tales agentes. Puesto que nuestros resultados sugieren que la homocigosidad Gln₂₇Glu confiere susceptibilidad a la dislipidemia causada por propranolol, se abre la posibilidad de utilizar los recursos de la farmacogenética para la selección de pacientes en quienes el propranolol, y quizás otros α -bloqueantes, deben manejarse con precaución o pudieran estar contraindicados.

El poder de la presente investigación es necesariamente limitado y debe tenerse

precaución en la interpretación de los datos, dado el pequeño número de sujetos estudiados. Se requieren estudios con mayor número de personas y rasgos fenotípicos diversos, que incluyan otros polimorfismos y haplotipos y que evalúen otros medicamentos, para precisar mejor el rol del polimorfismo del gen *ADRB2* en la dislipidemia secundaria a α -bloqueantes. Por último, hacemos notar que este estudio solamente evaluó voluntarios sanos, de modo que no conocemos los efectos en población enferma, tales como los hipertensos y diabéticos, en quienes la dislipidemia quizás tenga implicaciones clínicas más profundas.

Abstract

Polymorphisms of the gene that encoding to adrenoceptor α -2 (*ADRB2*) are associated with changes in a variety of responses of the Sympathetic Nervous System. The aims of this study were: i) to determine the frequencies of the allelic variants Arg₁₆Gly, Gln₂₇Glu and Thr₁₆₄Ile of the *ADRB2* in the Colombian population and compare them with the frequencies in other ethnic groups; ii) Due to the *ADRB2* gene regulates lipid mobilization, to investigate whether the polymorphism Gln₂₇Glu is a risk for the development of dyslipidemia following propranolol use. Genotyping was performed in unrelated Colombian volunteers using PCR-RFLP methods. To examine the association between the Gln₂₇Glu polymorphism of the *ADRB2* gene and dyslipidemia induced by propranolol we recruited 19 healthy individuals who were homozygous for either the Gln₂₇ (wild-type, n=11) or the Glu₂₇ (homozygous mutated, n=8) genotype. The electrocardiography, heart rate (HR), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), body mass index (BMI), serum lipids (TC, HDL-C, TG), and fibrinogen were determined before and after propranolol intake. Genotypic and allelic frequencies were (%): Arg₁₆Arg₁₆ (46), Arg₁₆Gly₁₆ (47.4), Gly₁₆Gly₁₆ (6.6), Arg₁₆ (69.7), Gly₁₆ (30.3); Gln₂₇Gln₂₇ (44.7), Gln₂₇Glu₂₇ (48.2), Glu₂₇Glu₂₇ (7.1), Gln₂₇ (68.8), Glu₂₇ (31.2). The Thr₁₆₄Ile polymorphism was found only in one subject, who was

heterozygous for the isoleucine variant. Furthermore, we found that as much in native sub-group as in the mutated sub-group the physiological variables were modified significantly (HR, SBP and DBP), but HDL-C diminished ($p=0.005$) solely in the sub-group of the native homocytous (Gln₂₇Gln), while TG were increased ($p=0.012$) only in the sub-group of homocytous mutated (Glu₂₇Glu). TC and fibrinogen stayed inalterable in both sub-groups. The finding that the homocytosity Gln₂₇ of the *ADRB2* gene is associated with significant reduction of HDL-C, and the homocytosity Glu₂₇ with significant increase of TG, suggests that Gln₂₇Glu polymorphism represents a risk for dyslipidemia induced by

propranolol. These results may contribute to better understanding of the mechanisms of the dyslipidemia induced by α -2 adrenergic receptor antagonists.

Key words: α -2 adrenergic receptor, *ADRB2* polymorphisms, dyslipidemia, pharmacogenetics, propranolol.

Agradecimientos

Esta investigación se realizó con el aval y apoyo económico de COLCIENCIAS y de las universidades Tecnológica de Pereira y de Antioquia.

Referencias bibliográficas

- Hoffman BB. Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. In: Hardman JG, Limbird LE, editors. *Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10 ed. International edition, Mc.Graw-Hill; 2001. p. 215-268.
- Liggett SB. α -Adrenergic Receptor Pharmacogenetics. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:S197-S201.
- Ranade K, Shue WHH, Hung YJ, Hsuing CA, Chiang FT, Pesich R, Hebert J, et al. The Glycine Allele of a Glycine/Arginine Polymorphism in the α -Adrenergic Receptor Gene Is Associated With Essential Hypertension in a Population of Chinese Origin. *Am J Heart* 2001; 14:1196-1200.
- Bray MS, Krushkal J, Li L, Ferrell R, Kardia S, Sing CF, Turner ST, et al. Positional Genomic Analysis Identifies the α -Adrenergic Receptor Gene as a Susceptibility locus for Human Hypertension; *Circulation* 2000; 101:2877-82.
- Israel E, Drazen JM, Liggett SB, Boushey HA, Cherniack RM, Chinchilli VM, Cooper DM, et al. The Effect of Polymorphisms of the α -Adrenergic Receptor on the Response to Regular Use of Albuterol in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:75-80.
- Taylor DR, Drazen JM, Herbison GP, Yandava CN, Hancox RJ, Town GI. Asthma exacerbations during long term beta agonist use: influence of α adrenoceptor polymorphism. *Thorax* 2000; 55:762-7.
- Large V, Hellstrom L, Reynisdottir S, Lonqvist F, Eriksson P, Lanfelt L, Arner P. Human Beta-2 Adrenoceptor Gene Polymorphisms Are Highly Frequent in Obesity and Associate with Altered Adipocyte Beta-2 Adrenoceptor Function. *J Clin Invest* 1997; 100(12):3005-13.
- Busjahn A, Li GH, Faulhaber HD, Rosenthal M, Becker A, Jeschke E, Schuster H, et al. Beta-2 Adrenergic Receptor Gene Variations, Blood Pressure, and Heart Size in Normal Twins. *Hypertension* 2000; 35(2):555-60.
- Gratze G, Fortin J, Labugger R, Rinder A, Kotanko P, Timmermann B, Luft FC, et al. α -Adrenergic Receptor Variants Affect Resting Blood Pressure and Agonist-induced Vasodilation in Young Adult Caucasians. *Hypertension* 1999; 33(6):1425-30.
- Wagoner LE, Craft LL, Singh B, Suresh DP, Zengel PW, McGuire N, Abraham WT, et al. Polymorphisms of the α -Adrenergic Receptor Determine Exercise Capacity in Patients with Heart Failure. *Circ Res* 2000; 86(8):834-40.
- Wang Z, Chen C, Niu T, Wu D, Yang J, Wang B, Fang Z, et al. Association of Asthma with α -Adrenergic Receptor Gene Polymorphism and Cigarette Smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(6):1404-9.
- Bengtsson K, Orho-Melander M, Melander O, Lindblad U, Ranstam J, Rastam L, Groop L. α -Adrenergic Receptor Gene Variation and Hypertension in Subjects with Type 2 Diabetes. *Hypertension* 2001; 37:1303-8.
- Hoit BD, Suresh DP, Crafy L, Walsh RA, Liggett SB. α -Adrenergic receptor polymorphisms at amino acid 16 differentially influence agonist-stimulated blood pressure and peripheral blood flow in normal individuals. *Am Heart J* 2000; 139:537-42.
- Garovic VD, Joyner MJ, Dietz NM, Boerwinkle E, Turner ST. α -Adrenergic Receptor Polymorphism and Nitric Oxide-dependent Forearm Blood Flow Responses to Isoproterenol in Humans. *J Physiol* 2003; 546(Pt 2):583-9.
- Ehrenborg E, Skogsberg J, Ruotolo G, Large V, Eriksson P, Arner P, et al. The Q/E27 polymorphism in the α -adrenoceptor gene is associated with increased body weight and dyslipoproteinaemia involving triglyceride-rich lipoproteins. *J Intern Med* 2000; 247(6):651-6.

16. Moore PE, Laporte JD, Abraham JH, Schwartzman IN, Yandava CN, Silverman ES, Drazen JM, *et al.* Polymorphism of the $\hat{\alpha}_2$ -Adrenergic Receptor Gene and Desensitization in Human Airway Smooth Muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:2117-24.
17. Cockcroft JR, Gazis AG, Cross DJ, Wheatley A, Dewar J, Hall IP, Noon JP. $\hat{\alpha}_2$ -Adrenoceptor Polymorphism Determines Vascular Reactivity in Humans. *Hypertension* 2000; 36(3):371-5.
18. Joos L, Paré PD, Sandford AJ. $\hat{\alpha}_2$ -Adrenergic Receptor Polymorphisms and Asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2001; 7:69-74.
19. Liggett SB. Molecular and genetic basis of $\hat{\alpha}_2$ -Adrenergic Receptor function. *J Allergy Clin Immunol* 1999 Aug;104(2 Pt 2):S42-6.
20. Liggett SB, Wagoner LE, Craft LL, Hornung RW, Hoit BD, McIntosh TC, Walsh RA. The Ile 164 beta2-adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. *J Clin Invest* 1998; 102:1534-39.
21. Brodde OE, Buscher R, Tellkamp R, Radke J, Dhein S, Insel PA. Blunted cardiac responses to receptor activation in subjects with Thr164Ile $\hat{\alpha}_2$ -Adrenoceptors. *Circulation* 2001; 103:1048-50.
22. Tilburg JH, Wijmenga C, Bakel H, Rozeman L, Pearson PL, Haeflén TW. Relationship of $\hat{\alpha}_2$ -Adrenergic Receptor Polymorphism With Obesity in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26(1):251-2.
23. Herrmann SM, Nicaud V, Tiret L, Evans A, Kee F, Ruidavets JB, Arveiler D, *et al.* Polymorphisms of the $\hat{\alpha}_2$ -adrenoceptor (ADRB2) gene and essential hypertension: the ECTIM and PEGASE studies. *J Hypertens* 2002; 20:229-35.
24. Ulbrecht M, Hergeth MT, Wjst M, Heinrich J, Bickeboller H, Wichmann HE, Weiss EH. Association of $\hat{\alpha}_2$ -Adrenoceptor Variants with Bronchial Hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(2 Pt 1):469-74.
25. Holloway JW, Dunbar PR, Riley GA, Sawyer GM, Fitzharris PF, Pearce N, Le Gros GS, *et al.* Association of $\hat{\alpha}_2$ -Adrenergic Receptor Polymorphisms with Severe Asthma. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(8):1097-103.
26. Candy G, Samani N, Norton G, Woodiwiss A, Radevski I, Wheatley A, Cockcroft J, Hall P. Association analysis of $\hat{\alpha}_2$ -adrenoceptor polymorphisms with hypertension in a Black African population. *J Hypertens* 2000; 18:167-72.
27. Tomaszewski M, Brain NJR, Charchar FJ, Wang WYS, Lacka B, Padmanabahn S, Clark JS, *et al.* Essential Hypertension and $\hat{\alpha}_2$ -Adrenergic Receptor Gene. Linkage and Association Analysis. *Hypertension* 2002; 40:286-91.
28. Drysdale CM, McGraw DW, Stack CB, Stephens JC, Judson RS, Nandabalan K, Arnold K, *et al.* Complex promoter and coding region $\hat{\alpha}_2$ -adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict *in vivo* responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(19):10483-8.
29. Rasool AH, Rahman AR, Ismail R, Hatim S, Abdullah AR, Singh R. Ethnic Differences in Response to Non-selective Beta-blockade Among Racial Groups in Malaysia. *Int j Clin Pharmacol* 2000; 38(5):260-9.
30. Zhou HH, Koshakji RP, Silberstein DJ, Wilkinson GR, Wood AJJ. Racial Differences in Drug Response. Altered Sensitivity to and Clearance of Propranolol in Men of Chinese Descent as Compared with American Whites. *N Engl J Med* 1989; 320(9):565-70.
31. Rosmond R, Ukkola O, Chagnon M, Bouchard C, Bjorntorp P. Polymorphisms of the $\hat{\alpha}_2$ -adrenergic receptor gene (ADRB2) in relation to cardiovascular risk factors in men. *J Intern Med* 2000; 248:239-44.
32. Hoffstedt J, Iliadou A, Pedersen NL, Schalling M, Arner P. The effect of the beta₂ adrenoceptor gene Thr164Ile polymorphism on human adipose tissue lipolytic function. *Br J Pharmacol* 2001; 133:708-12.
33. Kim SH, Kim DJ, Seo IA, Min YK, Lee MS, Kim KW, Lee MK. Significance of $\hat{\alpha}_2$ -adrenergic Receptor Gene Polymorphism in Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus in Korean Subjects. *Metabolism* 2002; 51(7):833-7.
34. Corbalan MS, Marti A, Forga L, Martinez-Gonzalez MA, Martinez JA. $\hat{\alpha}_2$ -Adrenergic Receptor mutation and abdominal obesity risk: effect modification by gender and HDL-cholesterol. *Eur J Nutr* 2002;41(3):114-8
35. Ukkola O, Tremblay A, Bouchard C. Beta-2 adrenergic receptor variants are associated with subcutaneous fat accumulation in response to long-term overfeeding. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25(11):1604-8.
36. Carlsson M, Orho-Melander M, Hedenbro J, Groop LC. Common variants in the $\hat{\alpha}2$ -(Gln27Glu) and $\hat{\alpha}3$ -(Trp64Arg)—adrenoceptor genes are associated with elevated serum NEFA concentrations and type II diabetes. *Diabetologia* 2001;44(5):629-36.
37. Meirhaeghe A, Luan J, Selberg-Franks P, Hennings S, Mitchell J, Halsall D, O'rahilly S, *et al.* The Effect of the Gly16Arg Polymorphism of the $\hat{\alpha}_2$ -Adrenergic Receptor Gene on Plasma Free Fatty Acid Levels is Modulated by Physical Activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(12):5881-7.
38. Papadakis JA, Ganotakis ES, Jagroop IA, Mikhailidis DP, Winder AF. Effect of Hypertension and its Treatment on Lipid, Lipoprotein(a), Fibrinogen, and Bilirubin Levels in Patients Referred for Dyslipidemia. *Am J Hypertens* 1999; 12:673-681.
39. Fogari R, Zoppi A, Tettamanti F, Poletti L, Lazzari P, Pasotti C, Corradi L. Beta-blocker Effects on Plasma Lipids in Antihypertensive Therapy: Importance of the Duration of Treatment and the Lipid Status Before Treatment. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990;16 Suppl 5:S76-80.
40. Durrington PN, Brownlee WC, Large DM. Short-term effects of $\hat{\alpha}$ -adrenoceptor blocking drugs with and without cardioselectivity and intrinsic sympathomimetic activity on lipoprotein metabolism in hypertriglyceridaemic patients and in normal men. *Clinical Science* 1985; 69:713-19.
41. Aynacioglu AS, Cascorbi I, Gungor K, Oskur M, Bekir N, *et al.* Population frequency, mutation linkage and analytical methodology for the Arg16Gly, Gln27Glu and Thr164Ile polymorphisms in the beta2-adrenergic receptor among Turks. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 48(5):761-4.

42. Ho LI, Harn HJ, Chen CJ, TsaiNM. Polymorphism of the α_2 -Adrenoceptor in COPD in Chinese Subjects. *CHEST* 2001; 120(5):1493-99.
43. Achari R, Drissel D, Thomas D, Shin K, Look Z. Analysis of esmolol in human blood by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetic studies. *J Chromatogr* 1988;424(2):430-4.
44. Braza AJ, Modamio P, Marino EL. Two reproducible and sensitive liquid chromatographic methods to quantify atenolol and propranolol in human plasma and determination of their associated analytical error functions. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;738(2):225-31.
45. Xie HG, Stein CM, Kim RB, Xiao ZS, He N, Wood AJJ. Frequency of functionally important beta-2 adrenoceptor polymorphisms varies markedly among African-American, Caucasian and Chinese individuals. *Pharmacogenetics* 1999; 9:511-516.
46. Huang XE, Hamajima N, Saito T, Matsuo K, Mizutani M, Iwata H, Iwase T, *et al.* Possible Association of α_2 - and α_3 -Adrenergic Receptor Gene Polymorphisms with Susceptibility to Breast Cancer. *Breast Cancer Res* 2001; 3(4):264-9.
47. Feldman RD (editorial). Adrenergic Receptor Polymorphisms and Cardiac Function (and Dysfunction). *Circulation* 2001; 103:1042.
48. Rioux PP. Clinical trials in pharmacogenetics and pharmacogenomics: Methods and applications. *Am J Health-Syst Pharm* 2000; 57:887-901.
49. Kirk BW, Feinsod M, Favis R, Kliman RM, Barany F. Survey and summary: Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease. *Nucleic Acids Res* 2002; 30 (15) 3295 - 3311.
50. Brook RD. Mechanism of Differential Effects of Antihypertensive Agents on Serum Lipids. *Curr Hypertens Reports* 2000; 2:370-377.

