

T
984

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

81975

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
INVESTIGACIÓN BIOFARMACÉUTICA

DETERMINACIÓN GENOTÍPICA y ALÉLICA DE *CYP2C9* (*2 y *3) y
CYP2C19 (*2 y *3) EN POBLACIÓN INDÍGENA y MESTIZA
MEXICANA

COMUNICACIÓN IDONEA DE RESULTADOS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

P R E S E N T A

AZUCENA MARTÍNEZ DAMIÁN

MATRICULA: 208180806

COMITÉ TUTORIAL:

TUTOR: DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ

ASESOR: DRA. MA. ELISA ALONSO VILATELA

ASESOR: DRA. HELGI JUNG COOK

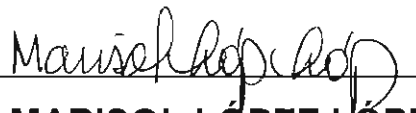
MÉXICO, D.F.

MAYO, 2010

COMITÉ TUTORIAL

Vo Bo

TUTOR



DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ

ASESOR

ASESOR

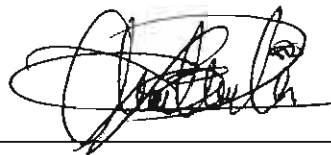


DRA. MA. ELISA ALONSO VILATELA



DRA. HELGI JUNG COOK

SUSTENTANTE



Q.F.B AZUCENA MARTÍNEZ DAMIÁN

JURADO ASIGNADO SEGÚN EL TEMA

Presidente:



Dr. Aurelio Jara Prado

Vocal:



Dra. Petra Yescas Gómez

Secretaria:



Dra. Marisol López López

Comisión de la Maestría:



Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda

Este trabajo se desarrolló bajo el Convenio de Colaboración del Departamento de Sistemas Biológicos de Universidad Nacional Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco y con el Departamento de Neurogenética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez".

México, D.F.

Trabajo apoyado por Conacyt

Proyecto No. 59366

Responsable Dra. Marisol López López

Alumna becaria de Conacyt

No. 252851

AGRADECIMIENTOS

Con todo mi cariño:

A mis padres Armande y Ma. De Jesús: por haberme dado la vida y apoyo incondicional, estando siempre allí cuando los he necesitado tanto en los buenos como en los malos momentos. Gracias por su valioso ejemplo, amor, paciencia, esfuerzo y confianza que siempre me han brindado por que de otro modo yo no sería lo que soy hasta este momento.

A mis hermanas Melissa y Telenne: por todo lo que hemos compartido y porque aunque somos tan diferentes siempre estaremos juntas, las quiero mucho.

A mi sobrina Laura Alejandra: que es una de la integrante de mi familia, más importante y que es una chispa de alegría en mi vida.

A la Dra. Ma. Elisa Menso: por darme la oportunidad de realizar la parte práctica de éste proyecto, en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" y por su calidez como persona, dándome los consejos necesarios y brindándome siempre su apoyo.

A la Dra. Marisol López: por haber despertado el gusto por esta área de investigación, y por guiarme siempre y estar allí cuando la he necesitado, dándome consejos no solo como excelente profesora sino como una excelente amiga.

Al Dr. Alberto Gonzales por cambiar mi vida al poner todo lo que estuve en sus manos para que yo terminara esta maestría brindándome una mejor calidad de vida al igual que la Dra. Elisa Alonso, la Dra. Iris Martínez y al Dr. Sergio Moreno.

A mi querido amigo Jorge Guerrero por enseñarme y apoyarme en todo lo necesario para la realización de éste trabajo, que sin su ayuda no hubiera sido posible que se llevara a cabo y por todos esos buenos momentos que pase durante estos dos años y medio.

A Chayito, Adriana, Leti, Petra, Conchita, Nancy, Aurelio, Hugo y Gabino por hacerme sentir como parte del los integrantes de ese laboratorio, ya que al igual que Jorge siempre fueron muy lindos conmigo, dándome consejos y sugerencias ya sea en el aspecto académico o personal, en verdad agradezco el haberlos conocido y haberme permitido disfrutar de su buen humor.

A Israel mi amigo incondicional que desde que yo llegué, siempre me apoyo y siempre estuvo y seguirá estando allí para animarme cuando este y triste o compartir los momentos felices y de relaxo.

A mis grandes amigos Mareva, Betsabe, Stephania, Normita, Lolita, Irvin, Alfonso, Alberto y a todos aquellos que me brindaron su amistad y confianza incondicional y que estuvieron conmigo a lo largo de estos dos años pasando momentos inolvidables.

Les digo hasta siempre y los llevo en mi corazón

A todos GRACIAS...

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS

1. RESUMEN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Antecedentes	5
2.2 Farmacología	8
2.3 Farmacogenética	9
2.4 Farmacogenómica	11
2.5 Marcadores genéticos	12
2.6 Metabolismo de fármacos	14
2.6.1 Metabolismo	14
2.6.2 Xenobióticos	14
2.6.3 Reacciones de fase I y II	15
2.7 Citocromo P-450	19
2.7.1 Estructura del CYP-450	21
2.7.2 Expresión del CYP-450	22
2.7.3 Mecanismo de acción	23
2.7.4 Nomenclatura	25
2.7.5 Inducción e inhibición metabólica	28
2.7.6 CYP-450 y toxicidad	31
2.7.7 Polimorfismo genético	33
2.8 <i>CYP2C9</i>	36
2.9 <i>CYP2C19</i>	41
3 JUSTIFICACIÓN	44

4	OBJETIVOS	46
4.1	Objetivo general	47
4.2	Objetivos específicos	47
5	HIPÓTESIS	48
6	MATERIAL Y MÉTODOS	50
6.1	Muestras biológicas	51
6.1.1	Poblaciones estudiadas	51
6.2	Toma de muestra	52
6.3	Lisis de glóbulos rojos y obtención de leucocitos	52
6.4	Extracción de DNA genómico (Método TTS)	53
6.5	Cuantificación del DNA genómico	54
6.6	Integridad del DNA genómico	54
6.7	Amplificación mediante	55
6.7.1	PCR convencional	55
6.7.1.1	Restricción enzimática	58
6.7.2	TR-PCR	60
6.8	Análisis estadístico	61
7	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	62
7.1	Análisis electroforético	63
7.2	Análisis espectrofotométrico	63
7.3	Genotipificación	64
7.4	Análisis estadístico	65
7.4.1	Frecuencias genotípicas y alélicas	65
7.4.2	Equilibrio de Hardy-Weinberg	68
7.4.3	Prueba de χ^2	69

8 CONCLUSIONES	76
Perspectivas a futuro	79
9 BIBLIOGRAFÍA	80
10 ANEXOS	97
10.1 Glosario	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.1 Farmacogenética y farmacogenómica.	11
Figura No.2 Variabilidad interindividual en la respuesta a la terapia farmacológica.	12
Figura No.3 Árbol genealógico tomando en cuenta el aporte genético en cada generación.	13
Figura No.4 Forma sencilla en la cual se muestran las diversas reacciones en las que consiste el metabolismo de fase I y II.	16
Figura No.5 Participación relativa de diferentes enzimas de fase I en el metabolismo de xenobióticos.	17
Figura No.6 Enzimas representativas del metabolismo de fase I y II.	17
Figura No.7 Reacciones enzimáticas de oxidación.	20
Figura No.8 A) Estructura básica del citocromo P450 y B) Estructura en el espacio.	21
Figura No.9 Traspaso de electrones desde el NADPH al citocromo P450, catalizado por la enzima de membrana del REL NADPH citocromo P450 reductasa.	22

Figura No.10 La biotransformación de la mayoría de los principios activos, se llevan a cabo principalmente en el hígado gracias a las EMF.	23
Figura No.11 Estructura molecular del grupo hemo del citocromo P450.	24
Figura No.12 Mecanismo de acción del citocromo P450.	25
Figura No.13 Nomenclatura establecida para las enzimas del citocromo P450.	26
Figura No.14 Enzimas CYP-450 identificadas en la especie humana.	27
Figura No.15 Partes de un cromosoma y nomenclatura del locus.	28
Figura No.16 Momento en el cual se produce la regulación enzimática (+): inducción y (-): inhibición.	29
Figura No.17 Polimorfismo de nucleótido único que muestra un genotipo heterocigoto.	34
Figura No.18 Fenotipo dependiente de la actividad enzimática.	35
Figura No.19 Cromosoma No.10 (ubicación exacta del gen <i>CYP2C9</i>).	37
Figura No.20 Gen <i>CYP2C9</i> con los 19 SNPs no sinónimos ubicados en los exones 3,5,7,8 y 9.	37
Figura No.21 Enzima <i>CYP2C9</i> .	38
Figura No.22 Cromosoma No. 10 (ubicación exacta del gen <i>CYP2C19</i>).	41
Figura No.23 Posición de los 26 SNPs no sinónimos presentes en el gen <i>CYP2C19</i> .	42
Figura No.24 Toma de muestra y tubos con anticoagulante ACD.	52
Figura No.25 Transferencia a tubo cónico de 15 mL.	52
Figura No.26 DNA genómico.	53

Figura No.27 Gel de agarosa al 0.8% con las muestras ya cargadas.	54
Figura No.28 Gel de agarosa al 0.8% listo para observarse en el transiluminador de luz UV.	55
Figura No.29 Microtubos dentro del termociclador.	55
Figura No.30 DNA genómico en gel de agarosa al 0.8%.	63
Figura No.31 Genotipos de <i>CYP2C9*2</i> y <i>CYP2C9*3</i> .	64
Figura No.32 Genotipos de <i>CYP2C19*2</i> y <i>CYP2C19*3</i> .	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.1 Total de individuos en cada una de las 11 entidades federativas, la proporción de población indígena y el porcentaje equivalente.	7
Tabla No.2 Clasificación de los fármacos según su efecto sobre <i>CYP2C9</i> y <i>CYP2C19</i> .	30
Tabla No.3 Fármacos metabolizados por <i>CYP2C9</i> .	39
Tabla No.4 Fármacos metabolizados por <i>CYP2C19</i> .	43
Tabla No.5 Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para cada uno de los polimorfismos y la respectiva mezcla de reacción.	56
Tabla No.6 Condiciones de reacción y el tamaño del fragmento amplificado que se obtiene.	57
Tabla No.7 Enzimas de restricción utilizadas en cada caso.	59
Tabla No.8 Mezcla de reacción y la sonda utilizada en cada caso.	60
Tabla No.9 Frecuencias genotípicas y alélicas de (<i>CYP2C9*2</i> y <i>*3</i> y <i>CYP2C19*2</i> y <i>*3</i>) en población indígena y mestiza mexicana, obtenidas en el presente trabajo.	67

Tabla No.10 Equilibrio Hardy-Weinberg de la población indígena y mestiza mexicana.	68
Tabla No.11 Prueba de χ^2 entre ambos grupos del presente trabajo.	69
Tabla No.12 Prueba de χ^2 entre la población nahua y la mestiza.	70
Tabla No.13 Prueba de χ^2 para <i>CYP2C9</i> *1/*2 entre los grupos indígenas.	71
Tabla No.14 Prueba de χ^2 para <i>CYP2C19</i> *1/*2 entre los grupos indígenas.	72
Tabla No. 15 Frecuencias alélicas de <i>CYP2C9</i> *1, *2 y *3 y <i>CYP2C19</i> *1, *2 y *3 en diferentes poblaciones a nivel mundial.	73
Tabla No.16 Prueba de χ^2 para <i>CYP2C9</i> *2 en la población mexicana y en comparación con otras poblaciones.	74
Tabla No.17 Prueba de χ^2 para <i>CYP2C19</i> *2 en la población mexicana y en comparación con otras poblaciones.	75

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema No.1 La farmacología se divide en dos partes importantes, farmacocinética y farmacodinamia.	9
Esquema No.2 Esquema más detallado, que muestra cada paso en del metabolismo de fase I y II.	18

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

EMF: Enzimas metabolizadoras de fármacos.

MU: Metabolismo ultrarrápido.

ME: Metabolismo extenso o rápido.

MI: Metabolismo intermedio.

MP: Metabolismo pobre o lento.

CYP: Citocromo P-450.

CYP2C9: Citocromo P-450 de la familia 2, subfamilia C, isoenzima 9.

CYP2C19: Citocromo P-450 de la familia 2, subfamilia C, isoenzima 19.

CYP-450: Familia del citocromo P-450.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

PGH: Proyecto del Genoma Humano.

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

SNPs: Single nucleotide polymorphisms.

AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos.

ISRS: Inhibidores selectivos de la recaptura de la serotonina.

ACD: Ácido cítrico dextrosa.

TTS: Tris tritón sacarosa.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RFLP: Fragmentos de restricción de longitud polimórfica.

TR: Tiempo real.

TBE: Amortiguador tris borato EDTA.

1. RESUMEN

1. RESUMEN

Se ha descrito una gran variabilidad interindividual e interétnica en la respuesta a los fármacos como resultado de factores, ambientales (dieta, uso de algunos fármacos, consumo de alcohol y tabaco, etc.), fisiológicos (funcionamiento hepático, renal, etc.) y genéticos (polimorfismos presentes en genes que codifican para algunos receptores, transportadores y enzimas metabolizadoras de fármacos (EMF o DME, *drug metabolizing enzyme*). Dentro de los factores genéticos, los polimorfismos presentes en enzimas metabolizadoras de fármacos juegan un papel importante en la variabilidad individual de la terapéutica farmacológica, ya que se pueden correlacionar con diferentes fenotipos metabolizadores como son: lentos (MP), intermedios (MI), rápidos (ME) o ultra rápidos (MU). Las EMF de fase I están representadas principalmente por el citocromo P450 que metaboliza fármacos, plaguicidas, algunas drogas, etc. El citocromo P450 se subdivide en varias familias y subfamilias, cada una de ellas metaboliza cierto número de principios activos como es el caso del 1A2 (4%), 2A6 (2%), 2C9 (10%), 2C19 (2%), 2E1 (2%), 2D6 (30%), y 3A4 (50%) que juntos representan más del 90% del metabolismo de los fármacos, en el hígado (sitio en el cual se encuentran en mayor concentración cada una de las enzimas antes mencionadas).

La subfamilia CYP3A representa aproximadamente el 50% del metabolismo de diversos principios activos de uso común en la práctica clínica, ubicándose en el primer lugar, en cuanto al funcionamiento enzimático del citocromo P450. Sin embargo, los genes que codifican para las enzimas de esta subfamilia no son muy polimórficos, a diferencia de CYP2D, donde se han identificado al realizarse múltiples estudios se ha encontrado una gran variedad de polimorfismos presentes en distintos sitios (>70 polimorfismos) y que representa aproximadamente el 30% del metabolismo de fármacos.

La subfamilia CYP2C representa aproximadamente el 20% de enzimas contenidas en el hígado e interviene en el metabolismo de 25% de fármacos.

Dentro de la subfamilia CYP2C los dos genes más representativos son el *CYP2C9* que metaboliza aproximadamente el 15% de fármacos y el *CYP2C19* que contribuye con otro 10% de gran importancia en el ámbito clínico, como es el caso de algunos psicotrópicos, analgésicos no esteroideos (AINEs), hipoglucemiantes, entre otros. Las variantes alélicas de *CYP2C9* y *CYP2C19* presentan frecuencias genotípicas y alélicas específicas para cada población, por lo que es de fundamental importancia contar con bases de datos que muestren como es que se encuentran estas frecuencias en cada población para de esta forma hacer posible una terapia personalizada, obteniendo así un tratamiento eficaz y seguro.

2. MARCO TEÓRICO

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

Como resultado del Proyecto del Genoma Humano (PGH), que concluyó en el 2003, hoy en día sabemos que los seres humanos compartimos el 99.9% de la secuencia del genoma. Es decir, al comparar el ADN de cualquier ser humano, sea un africano, un asiático, un europeo o amerindio, se tiene sólo una diferencia del 0.1% en la secuencia, que aunque parece una cifra pequeña representa las características étnicas y poblacionales que nos hacen diferentes como son: cabello color negro y ojos cafés, cabello rubio y ojos azules, etc. (Noguera S. R. y Ruiz G. R., 2000).

El segundo gran avance en la comprensión de la arquitectura genética de la humanidad se llamó Proyecto Internacional HapMap (mapa de haplotipos del genoma humano) y tuvo como finalidad la elaboración de un catálogo de bloques de haplotipos en el genoma humano, que reveló que aproximadamente cada 1,200 pares de base (pb) difiere entre un ser humano y otro. Estas diferencias son importantes ya que pueden ayudar a identificar la predisposición de un grupo o población a determinadas enfermedades hereditarias, al compararlas con el material genético de otros grupos humanos. El proyecto lo realizó un consorcio de institutos académicos en Japón, Reino Unido, Canadá, China, Estados Unidos y Nigeria llamado *International HapMap Consortium*, que trabajó desde el 2002 analizando las poblaciones más ancestrales (africana, caucásica y asiática) (www.hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/yccr.corieil.org/PDF/NHGRI/Newsletters/hapmav1_es.pdf). La población mexicana (y latinoamericana), que es producto de una reciente mezcla genética, fue excluida de este proyecto, debido a que su composición genética tiene apenas poco más de 500 años, muy inferior a los millones de años de la población africana, los cientos de miles de la asiática y las

decenas de miles de la caucásica (www.cnnexpansion.com/actualidad/2009/06/04/genoma-destapa-diferencias-de-mexicanos).

Es por eso que, en lo que consistió la segunda parte del HapMap fue en la identificación de los haplotipos en el genoma de la población latinoamericana (www.cnnexpansion.com/actualidad/2009/06/04/genoma-destapa-diferencias-de-mexicanos). Para el caso específico de la población mexicana se ha reportado que la composición génica es bastante heterogénea, estando constituida de forma muy general de aproximadamente >56% por genes de origen amerindio, un 40% de genes de población caucásica y la proporción restante (4%) son genes de población negra (Orozco L., et al., 2001 y Vargas A. G., et al., 2002). Estos datos no toman en cuenta que la población indígena que habitaba la región antes de la llegada de los españoles estaba distribuida desigualmente, de manera muy densa en el centro y sur, y más dispersa en el norte, con lo que es de esperarse que en el centro y sur de México se desarrollaran culturas sedentarias que dieron lugar a grandes urbes y complejos sistemas productivos y comerciales, mientras que el norte es una zona desértica y estuvo habitada por grupos de cazadores-recolectores, lo que conlleva a una densidad de la población mucho más baja, y también por otro lado, en cuanto a ésta distribución geográfica, existe mayor carga genética africana en la costa caribeña, donde tuvo lugar la mayor parte del comercio de esclavos de la región a diferencia que en los estados del norte del país como Sonora, que presentan mayor componente genético europeo (principalmente de españoles) (Rubi C. R., et al., 2009 y Tian C., et al., 2007). Debido a esta gran variabilidad genética, es necesario realizar estudios sobre los diversos SNPs presentes en población amerindia, para poder estimar la contribución génica de estos grupos étnicos en la población mestizo mexicana.

En México existen más de 60 grupos etnolingüísticos hasta la fecha, con relativo aislamiento y cierta dispersión específica en el país, ubicando así 11 entidades federativas que son las de mayor presencia de población indígena (Campeche,

Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Veracruz y Yucatán) (tabla No.1) (Proyecciones de indígenas de México y de las entidades federativas 2000-2010, CONAPO). El censo de población indígena que se realizó en el año 2000 reportó que el número aproximado de individuos hablantes de alguna lengua aborígen era de 10,793,126 (Consejo Nacional de Población con base en el XII Censo General de Población y Vivienda, 2000).

Tabla No.1 LAS ENTIDADES FEDERATIVAS CON MAYOR PROPORCIÓN DE POBLACIÓN INDÍGENA			
	P o b l a c i ó n		
Entidad federativa	Total*	Indígena	Porcentaje
República Mexicana	95 753 396	11 897 010	12.4
Yucatán	1 650 438	1 080 733	65.5
Oaxaca	3 429 409	1 911 338	55.7
Quintana Roo	863 651	393 562	45.6
Chiapas	3 785 292	1 170 132	30.9
Campeche	687 157	212 245	30.9
Hidalgo	2 225 059	575 663	25.9
Puebla	4 930 290	1 032 588	20.9
Guerrero	3 054 917	569 639	18.6
Veracruz	6 877 295	1 163 363	16.9
San Luis Potosí	2 288 612	384 159	16.8
Nayarit	917 853	100 034	10.9

Total de individuos en cada una de las 11 entidades federativas, la proporción de población indígena y el porcentaje equivalente (proyecciones de indígenas de México y de las entidades federativas 2000-2010, CONAPO y Consejo Nacional de Población con base en el XII Censo General de Población y Vivienda, 2000). *Se excluyen 1,730,016 personas estimadas por el INEGI para las 425,724 viviendas ocupadas que no fueron censadas.

Las poblaciones indígenas constituyen un grupo fundamental para los estudios genéticos, ya que son grupos muy conservados y debido a ello es posible hacer correlaciones más aproximadas en cuanto a frecuencias de diversos polimorfismos, como es en este trabajo, el cual se enfoca a la población indígena mexicana y lo compara con la mestiza en cuanto a las frecuencias presentes de los alelos *2 y *3 de *CYP2C9* y *CYP2C19* que codifican para enzimas metabolizadoras de fármacos.

2.2 FARMACOLOGÍA

El término farmacología viene del griego, *pharmacon* = fármaco y *logos* = ciencia, siendo así la ciencia que estudia el origen, los efectos, asociaciones y las propiedades (físicas y químicas) que las sustancias ejercen sobre los organismos vivos, para lo cual se siguen muy de cerca los cambios fisiológicos, mecanismos de absorción, distribución, metabolismo (biotransformación) y excreción de los fármacos, ya sea para su uso terapéutico o no. También se puede definir a la farmacología como el estudio de los fármacos, sea que éstos tengan efectos beneficiosos o bien tóxicos. La farmacología tiene aplicaciones clínicas cuando las sustancias son utilizadas en el diagnóstico, prevención, tratamiento y alivio de síntomas de una enfermedad (http://www.med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/clas4to/5_farmacodin.pdf).

En el esquema No.1, se muestran las dos ramas principales en las que se divide la farmacología.

FARMACOLOGÍA

Farmacocinética: Estudia el paso de los fármacos a través del organismo en función del tiempo y de la dosis. Comprende los procesos de absorción, distribución, metabolismo o biotransformación y excreción de fármacos.

Farmacodinamia: Estudia los efectos bioquímicos y fisiológicos de los fármacos, mecanismos de acción y la relación entre la concentración del fármaco y el efecto de éste sobre un organismo. Y también define y clasifica a los fármacos de acuerdo a su afinidad, potencia, eficacia y efectos relativos.

Esquema No.1 La farmacología se divide en dos partes importantes, farmacocinética y farmacodinamia. http://www.med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/clas4to/5_farmacodin.pdf.

2.3 FARMACOGENÉTICA

La genética es una rama de las ciencias biológicas, cuyo objetivo es el estudio de los patrones de herencia, del modo en que los rasgos y las características se transmiten de padres a hijos. La herencia y la variación constituyen la base de la genética.

El término farmacogenética fue acuñado por Friedrich Vogel, de Heidelberg, Alemania en 1959, al asociar las palabras “farmacología”, es decir el estudio del mecanismo de acción de los fármacos en el organismo, y “genética”, que se refiere al estudio de cómo se transmite la herencia genética (Motulsky A. G. y Qi M., 2006). Con lo anterior es fácil entender que la forma en la cual responde un individuo a un medicamento es muy compleja y variada, ya que es influenciado por diversos factores como: el entorno, la dieta, el estado general de salud y en gran parte a la genética, por lo que la *farmacogenética* es el estudio de la influencia de los factores genéticos en la variación individual en la respuesta a los fármacos y en qué grado determinan la eficacia y la probabilidad de presentar algún tipo de efecto secundario o reacción adversa (figura No.2).

A finales de 1960, Vesell reportó la existencia de notables similitudes en el metabolismo y eliminación de varios fármacos en gemelos idénticos (100% de sus genes) en contraste con gemelos que sólo compartían el 50% (Vesell E. S. y Page J. G., 1968). Estos resultados apoyaron lo antes mencionado por Vogel.

El desarrollo de la farmacogenética en los años siguientes fue lento, ya que la respuesta a los fármacos presentaba relativamente pocas reacciones adversas, y principalmente aquellos que estaban bajo el control de un solo gen. Por otro lado los estudios de familias fueron difíciles y un estudio de ADN directamente de la respuesta del fármaco todavía no era posible con lo que hubo poco o ningún impacto en la farmacología clínica, desarrollo de fármacos y la medicina clínica (Evans W. E. y Relling M.V., 1999, McLeod H. L., 2001 y Zhou S. F., 2008).

Sin embargo la creciente disponibilidad de la tecnología de ADN y en pruebas moleculares *in vitro*, gracias al Proyecto del Genoma Humano hizo posible que el estudio de éste fuera posible. Justo con el avance tecnológico también se establecieron nuevos términos como *farmacogenómica* en el año de 1990 (Motulsky A. G. y Qi M., 2006).

Se ha sugerido que en el futuro, los avances de la investigación farmacogenética proporcionarán información para guiar a los médicos a encontrar la dosis justa del fármaco apropiada para cada persona a lo que se le llama terapia personalizada (McLeod H. L. y Evans W. E., 2001, Weinshilboum R., 2003 y Raisman J. S. y González A. M., 2006).

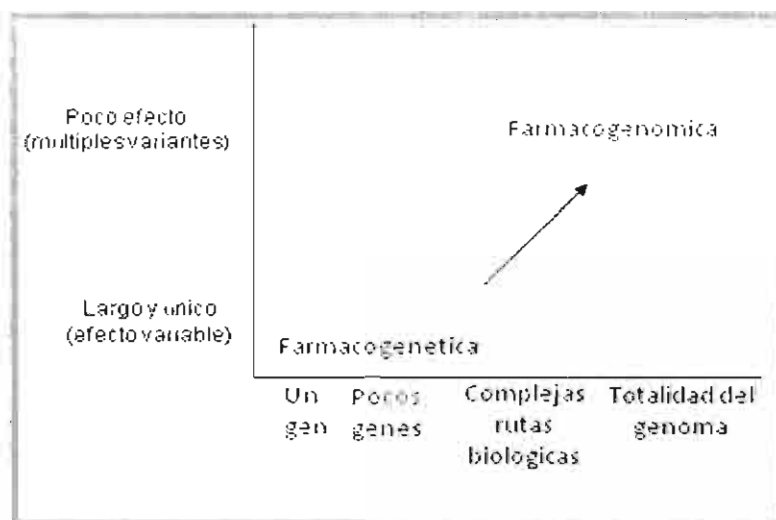


Figura No.1 Farmacogenética y farmacogenómica (Lin H. y Lu A., 1998).

2.4 FARMACOGENÓMICA

El término farmacogenómica se introdujo en la década de 1990, como su nombre lo dice es más global a diferencia de la farmacogenética ya que se enfoca al estudio de los genes y su contribución a la variabilidad en la eficacia de los medicamentos y la toxicidad (figura No.2) en base al *genoma* (todo el material genético contenido dentro de una célula) no solo a un gen o un grupo pequeño de genes (figura No.1) (Motulsky A. G. y Qi M., 2006, Evans W. E. y Relling M. V., 1999 y McLeod H. L. y Evans W. E., 2001).

Con ello se puede ayudar de una forma ilimitada para obtener los efectos deseados de una terapia farmacológica de una forma segura y eficaz, al prevenir efectos adversos. Y también de esta manera hacer posible el descubrimiento de nuevas dianas ("blancos") terapéuticas para el desarrollo de fármacos (Roden D. M., et al., 2006).

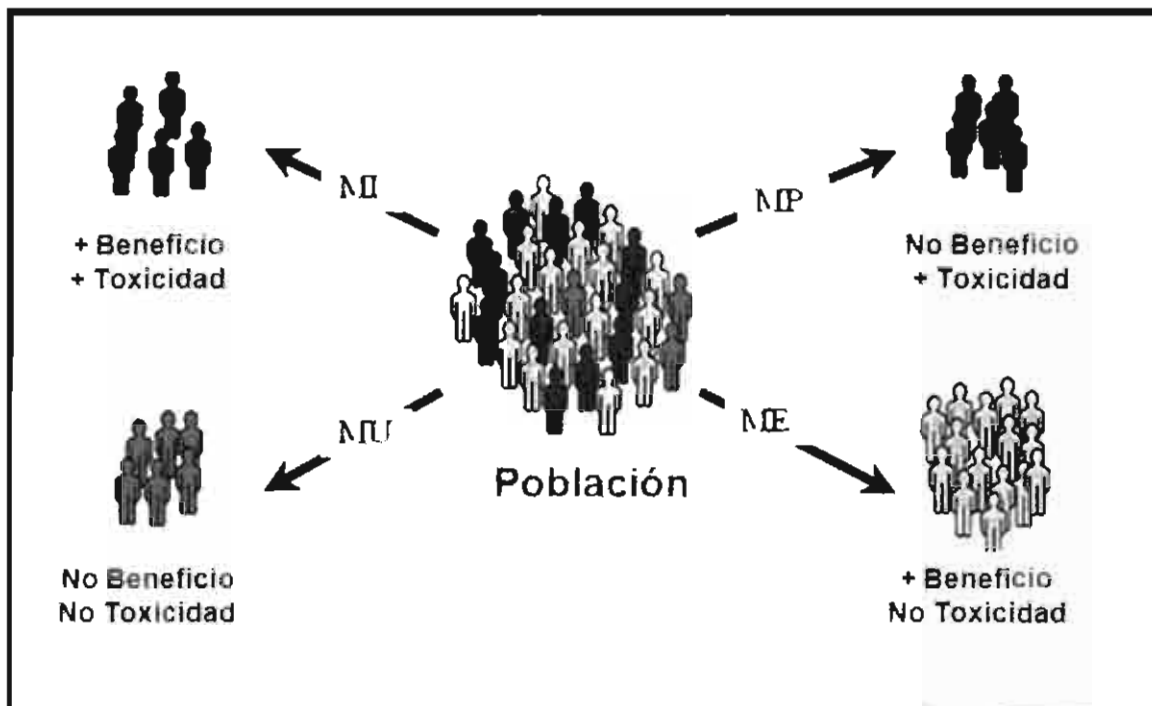


Figura No.2 Variabilidad Interindividual en la respuesta a la terapia farmacológica. Ya que en una sola población puede existir tal diferencia en los diversos fenotipos como se muestra aquí. ■ Metabolizador lento, ■ Metabolizador intermedio, ■ Metabolizador extenso (más frecuente) y ■ Metabolizador ultrarrápido. (www.hmg.oxfordjournals.org/content/vol15/suppl_1/images/figure/figure108701.jpeg).

Para poder analizar una población adecuadamente, se tiene que tener bien delimitada, y más aun para un estudio genético siendo necesario conocer parte de la ascendencia genética de la cual proviene para que de esta forma resulte más fácil comprender los resultados obtenidos. Para ello se utilizan algunos marcadores genéticos (Buentello M. L., 2008).

2.5 MARCADORES GENÉTICOS

Un marcador genético es un segmento de ADN con un *locus* y cuya herencia se puede rastrear. Un marcador puede ser un gen, o puede ser alguna sección del ADN sin función conocida (figura No.3). Los marcadores permiten conocer el origen y la proporción del aporte genético de las distintas poblaciones a la mezcla étnica inicial, la influencia de factores geográficos y culturales sobre la variación

genética de cada grupo, sus migraciones, así como los fenómenos de cambio que se acentuaron en el siglo pasado, y que son tan determinantes y complejos como las migraciones mismas (Raisman J. S. y González A. M., 2006).

El análisis de las distribuciones de las frecuencias de diferentes marcadores genéticos se inició con la determinación de los grupos sanguíneos y se ha ampliado a un extenso espectro de sistemas como: enzimas, proteínas, sistema HLA (Antígeno Leucocitario Humano) y, actualmente, con marcadores moleculares. De esta manera, se analizan sistemas genéticos polimórficos (con productos génicos diversos) con los que se distinguen tanto a los individuos como a las poblaciones, según las diferentes frecuencias presentes en los distintos alelos (Raisman J. S. y González A. M., 2006 y Buentello M. L., 2008).

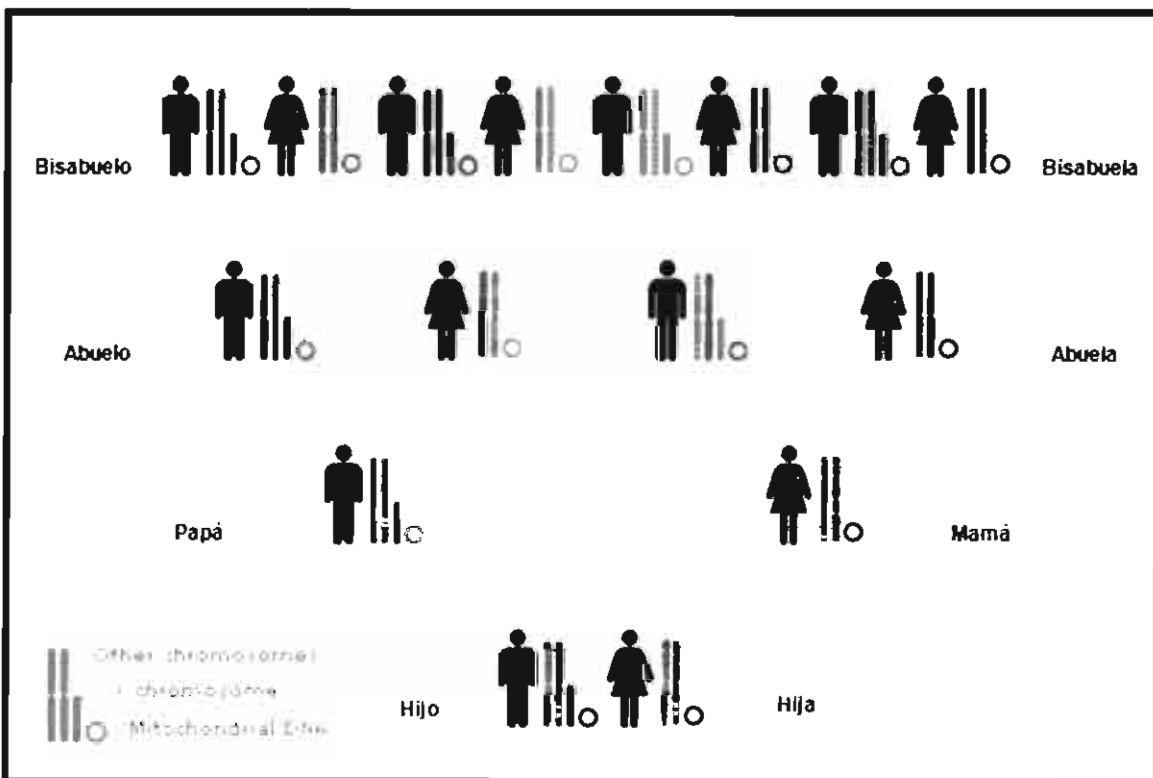


Figura No.3 Árbol genealógico tomando en cuenta el aporte genético en cada generación (http://1.bp.blogspot.com/_W7tnZE1tW6A/SKfgmM3XaqI/AAAAAAAAAYI/8pG5tp4dOw/s400/gene+shuffle.jpg).

2.6 METABOLISMO DE FÁRMACOS

2.6.1 METABOLISMO

El metabolismo (biotransformación) es el conjunto de reacciones bioquímicas que producen modificaciones sobre la estructura química de un sustrato ya sean xenobióticos o sustancias endógenas.

2.6.2 XENOBIÓTICOS

Los xenobióticos son compuestos químicos que no forman parte de la composición habitual del cuerpo humano, pero que son capaces de acceder a su interior. Se trata de compuestos de naturaleza química muy variada, algunos de los cuales son de origen natural, entre los que destacan las micotoxinas o los alcaloides, si bien la inmensa mayoría son productos originados por la propia actividad humana, como los contaminantes ambientales o los compuestos químicos de síntesis (Donato M. T., 2003).

El vertiginoso desarrollo de la industria química en las últimas décadas ha hecho posible el aumento incontrolado de varios miles de moléculas nuevas introducidas cada año, junto con el correspondiente aumento del riesgo de contacto con los mismos.

Estos compuestos pueden acceder a nuestro organismo mediante ingestión, inhalación, por vía parenteral, a través de la piel, etc. Entre los mismos se incluyen **fármacos**, cosméticos, aditivos alimentarios, pesticidas, productos de uso doméstico, derivados de la combustión de carburantes, residuos procedentes de la industria química, etc.

Los xenobióticos no son utilizados como nutrientes, por lo que no se incorporan a las rutas bioquímicas del metabolismo intermediario y no son degradados a través de estas vías metabólicas. Y en general son compuestos de naturaleza lipofílica por lo que pueden atravesar con relativa facilidad las membranas biológicas, acceder al interior de las células y unirse a estructuras celulares de carácter lipofílico. Al mismo tiempo, su eliminación del organismo es dificultosa, dado que la excreción de compuestos no volátiles se realiza a través de fluidos de naturaleza acuosa, principalmente la orina (Donato M. T., 2003).

Ante esta situación, los organismos vivos han desarrollado sistemas metabólicos alternativos para acelerar la eliminación de estos compuestos. Se trata de una serie de enzimas no integradas en las vías del metabolismo energético o intermediario del organismo y cuyos substratos son los xenobióticos. Su función es la de convertir los xenobióticos en moléculas más polares, más hidrosolubles y, por tanto, más fácilmente excretables. El papel de estas enzimas es clave para la supervivencia celular ya que de no existir tales vías metabólicas, una vez en el interior del organismo estas sustancias tenderían a acumularse alterando el equilibrio celular y provocando alteraciones funcionales e incluso la muerte celular.

Estos cambios metabólicos se producen mediante dos tipos de reacciones que frecuentemente son secuenciales, y que se conocen como reacciones de fase I y reacciones de fase II, gracias a la clasificación de las EMFs realizada por R. T. Williams en los años cuarenta (Nebert D. W., 1999).

2.6.3 REACCIONES DE FASE I Y II

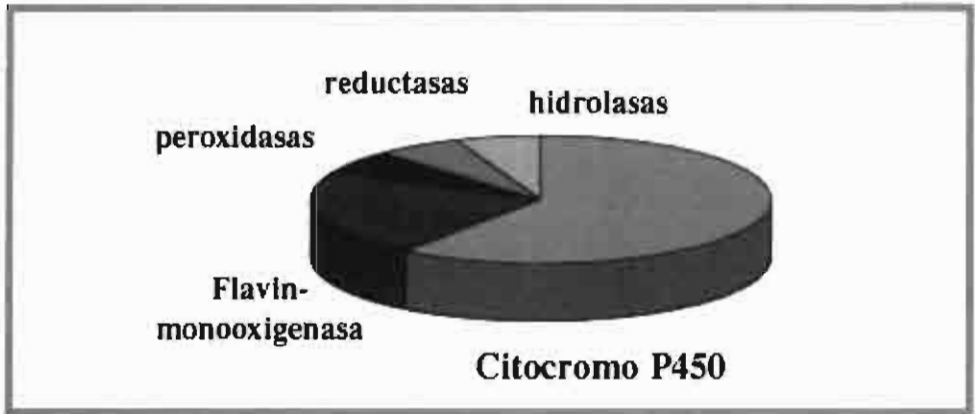
En la fase I los xenobióticos son modificados mediante reacciones de oxidación (hidroxilaciones, N y O-desalquilaciones) reducción o hidrólisis (figura No.4) con lo que suelen transformar los productos químicos relativamente hidrofóbicos en productos intermedios que son más hidrofílicos, por medio de la introducción de grupos funcionales de carácter polar (hidroxilo, amino, carboxilo, epóxido y los

grupos de óxido, así como la generación de nitróxidos y sulfóxidos en la estructura del fármaco convirtiéndolo en un metabolito inactivo, metabolito activo o en un producto metabólico con actividad farmacológica distinta a la del fármaco original lo que ya es bien sabido desde los años 60s como es el caso de la activación de profármacos, procancerígenos, promutágenos a reactivos intermediarios que son genotóxicos (dañan el ácido desoxirribonucleico (DNA) (Nebert D. W., 1999 y Nebert D. W. y Russell D. W., 2002), por eso es que esta primera etapa, también es llamada de funcionalización.

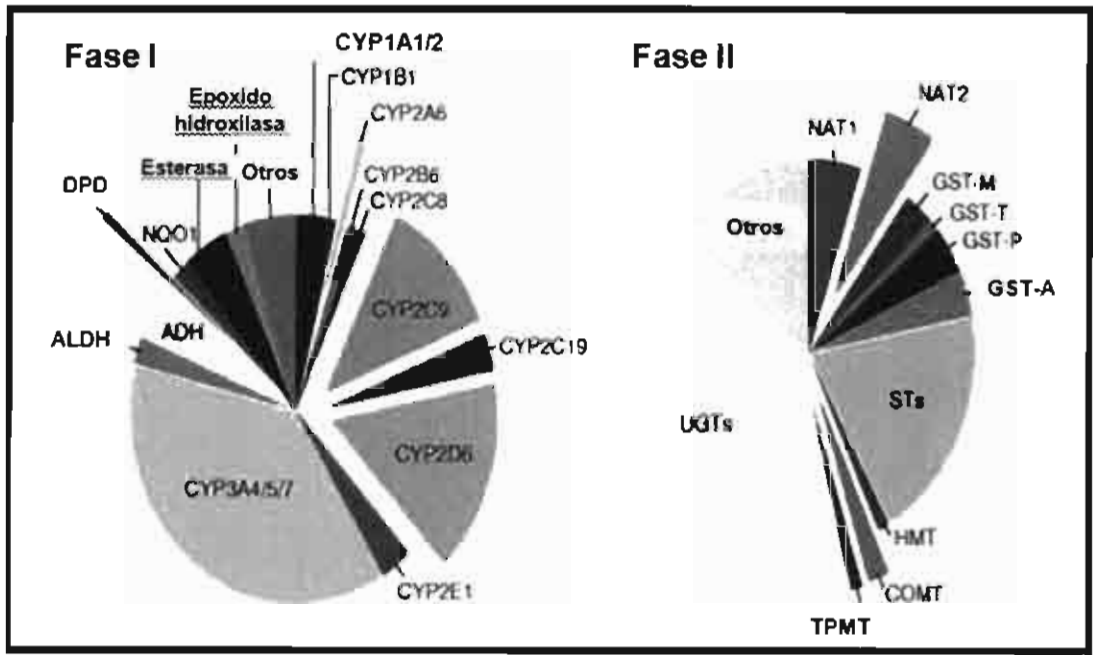


Figura No.4 Forma sencilla en la cual se muestran las diversas reacciones en las que consiste el metabolismo de fase I y fase II (www.med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/clas4to/5_farmacodin.pdf).

Las reacciones de fase I más frecuentes son las oxidaciones, que son catalizadas por un sistema enzimático (proteínas catalíticas) complejo conocido como sistema de oxigenasas de función mixta, dentro de las que se incluyen enzimas con actividad monooxigenasa, diversas oxidasas (alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, amino oxidasas, aromatasas), la epóxido hidrolasa o esterasas y amidasas hepáticas y plasmáticas.

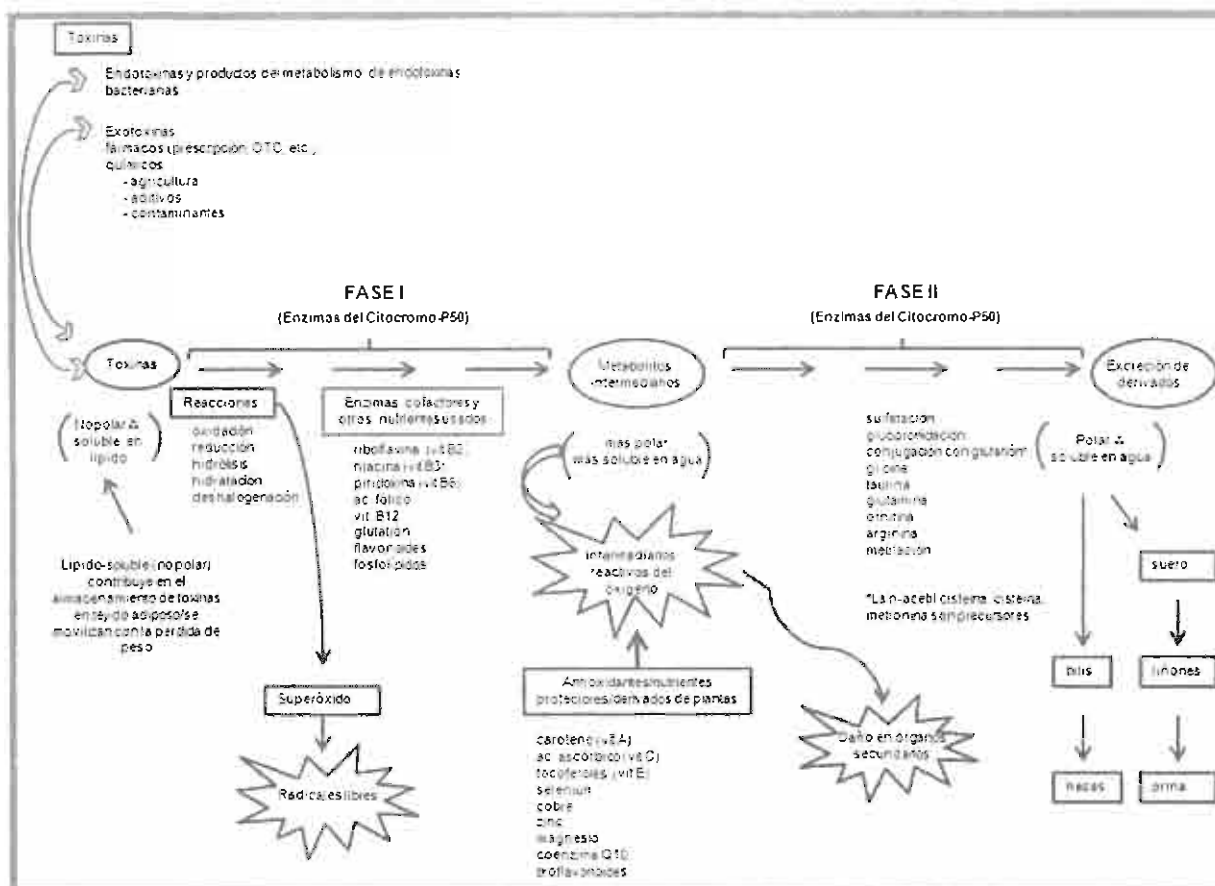


El citocromo P-450 (CYP450) es sin duda el miembro más destacado de este grupo de enzimas (figura No.5) y el que ha sido más ampliamente estudiado.



Son seis (1A2, 3A4, 2C9, 2C19, 2D6, 2E121) las enzimas de mayor relevancia en el metabolismo de fase I (figura No.6) que metabolizan una serie de sustancias exógenas incluyendo más del 90% de todos los medicamentos de uso clínico (Nebert D. W. y Russell D. W., 2002) y otras familias de CYPs (por ejemplo, CYP

4, 7, 11, 17, 19 y 21) participan en el "mantenimiento" por medio del metabolismo de moléculas endógenas, como los esteroides, ácidos biliares, los leucotrienos y los eicosanoides, principalmente (López L. M., et al., 2004).



Esquema No.2 Esquema que muestra cada paso en del metabolismo de fase I y II (Liska D. A., 1998).

Por otra parte las reacciones de fase II suelen ser reacciones de conjugación, que por regla general, inactivan el fármaco. En términos generales estas reacciones actúan sobre el grupo reactivo introducido en las reacciones de fase I, añadiendo un sustituyente más grande (grupos polares ya existentes o formados a partir del sustrato obtenido después de la primera fase), por ejemplo: glucurónido, sulfato, acetato, metil o aminoácidos que disminuyen la liposolubilidad y favorecen la eliminación renal o biliar (esquema No.2). La mayoría, aunque no todas, de las reacciones de conjugación del organismo tienen lugar en el hígado (www.uv.es/jcastell/Metabolismo_de_xenobioticos.pdf).

2.7 CITOCROMO P-450

Es difícil precisar la fecha concreta en que fue descubierto el citocromo P450 (CYP450). Los primeros conocimientos sobre el mismo se remontan aproximadamente en los años 50 en estudios realizados a partir de tejido hepático de mamíferos, y a partir de allí hasta el año de 1964 Omura y Sato (Omura T. y Sato R., 1964) identificaron la naturaleza hemoproteica de un pigmento presente en los microsomas hepáticos de diferentes especies, con la capacidad de unirse al CO tras ser reducido por NADPH. Esta proteína recibió el nombre de citocromo P-450 (P de pigmento y 450 al ser la longitud de onda a la cual presenta la máxima absorbancia (pico de Soret) el complejo enzima-CO, aunque a pesar de que, como se comprobó posteriormente, estas hemoproteínas no son citocromos, en el sentido estricto de la palabra (Donato M. T., 2003).

Posteriormente su función catalítica se relacionó con el metabolismo de algunos fármacos y compuestos tóxicos lo que despertó un considerable interés entre la comunidad científica. En un principio los resultados obtenidos en diferentes laboratorios no coincidían y se creó cierta confusión con respecto a las funciones y características del citocromo P450. Esto fue aclarado hasta que se comprobó que existían varios tipos de moléculas del citocromos P450, incluso en individuos de una misma especie (Omura T., 1999) y que se encuentran presentes en hongos, bacterias, mamíferos, etc. Hasta que se realizó la primera clasificación de los miembros de la superfamilia de enzimas en 1987, se describieron 30 genes diferentes que se agruparon en 10 familias (Nebert D. W., et al., 1989 y Nelson D. R., et al., 1993). En poco más de 15 años el número de CYP450 conocidos ha aumentado de forma extraordinaria y en la actualidad ya asciende a más de 2000, incluidos en 200 familias diferentes. En el caso concreto del hombre se han secuenciado 57 genes funcionales y 58 (www.drnelson.utmem.edu/CytochromeP-450.html) pseudogenes pertenecientes a 18 familias (figura No.15). Los pseudogenes son genes defectuosos que no originan proteínas funcionales y que

se consideran como una reminiscencia de duplicaciones de genes en los que una de las copias ha degenerado y perdido su función (Guengerich F. P., 1992 y González F. J., 1992).

El citocromo P450 presenta una enorme versatilidad funcional que se refleja tanto en la gran variedad de procesos que puede catalizar, como en el elevado número de sustratos que es capaz de metabolizar. Si bien el citocromo P450 interviene fundamentalmente en reacciones de oxidación, también es capaz de catalizar reducciones, hidrataciones o hidrólisis. Salvo contadas excepciones, el CYP-450 requiere oxígeno molecular (O₂) y NADPH para oxidar el sustrato dándose reacciones de mono oxigenación en las que sólo uno de los átomos de oxígeno es incorporado en la molécula del sustrato, mientras que el otro es reducido hasta agua (figura No.7).

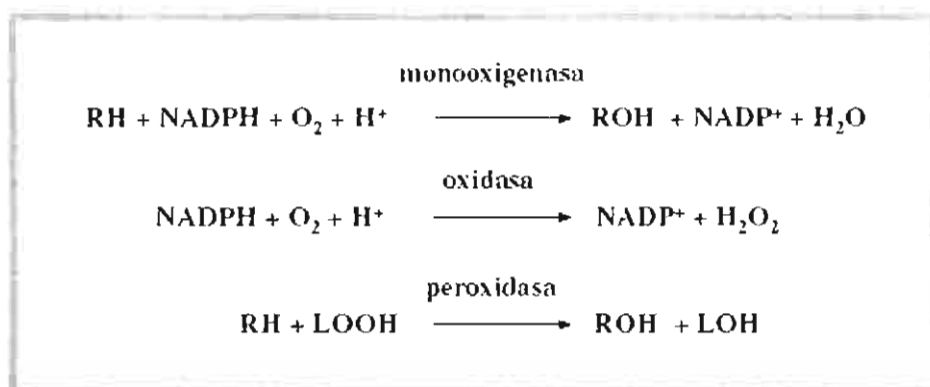


Figura No.7
Reacciones
enzimáticas de
oxidación
(Donato M. T.,
2003).

Entre sus sustratos se incluyen tanto moléculas pequeñas como otras mucho mayores (40 a 1203 D), de diversas formas (lineales y aromáticas), etc. Esto es debido a su baja especificidad y a la existencia de múltiples formas de enzimas, cada una de las cuales se ha adaptado para el metabolismo de grupos de compuestos relacionados estructuralmente.

Por otra parte, otro aspecto sobresaliente es la inducibilidad, por los propios xenobióticos ya que existen algunos tipos de inductores que actúan de forma

selectiva sobre diferentes enzimas del citocromo (Okey A. B., 1990 y Conney A. H., 1986).

2.7.1 ESTRUCTURA DEL CYP-450

La molécula de la enzima está constituida por una combinación de regiones α -hélice y de hojas fundamentalmente en la región de la proteína que rodea al grupo hemo, mientras que las regiones más variables son las que constituyen los lugares de anclaje a la membrana o de unión y reconocimiento de substratos (Gotoh O., 1992). La alta conservación de la región del hemo, corresponde con el centro catalítico de la enzima, refleja un mecanismo común de transferencia de electrones y de protones, y de activación de oxígeno (Williams P. A., et al., 2000) (figura No.8).

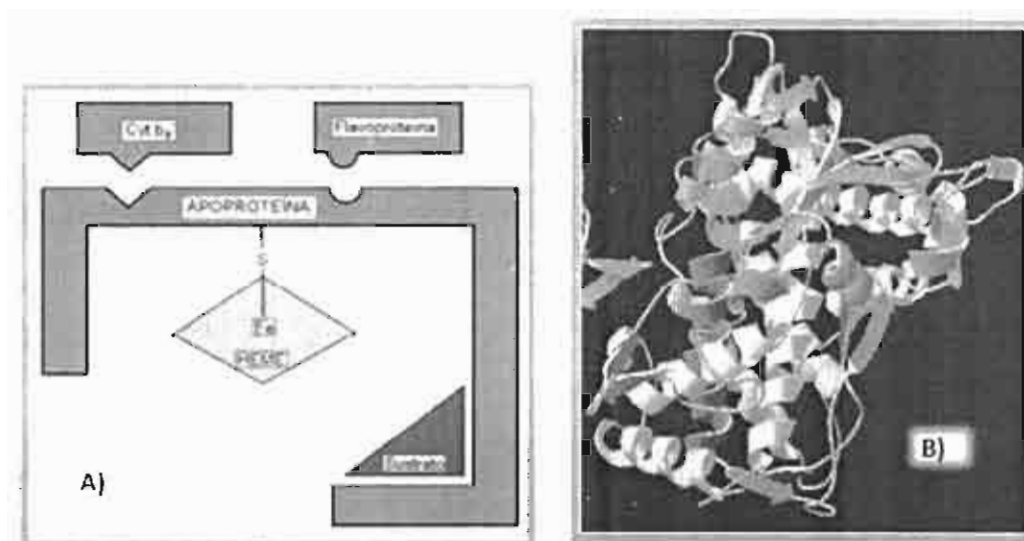


Figura No.8 A) Estructura básica del citocromo P450 y B) Estructura en el espacio (Fossi M. C., et al., 1994).

La enzima permanece anclada a la membrana a través de una hélice hidrofóbica cercana al extremo N-terminal (figura No.9), por lo que la mayor parte de la proteína se sitúa en la cara citosólica de la membrana (Chapple C., 1998). Esta hélice transmembrana está seguida, por una serie de aminoácidos básicos cuyos residuos interaccionan con las cargas negativas de los lípidos de la membrana.

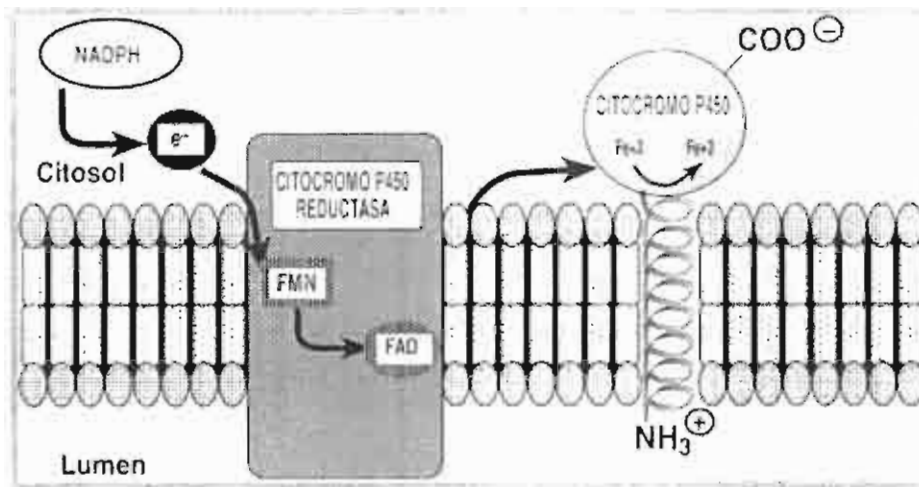


Figura No.9
Traspaso de electrones desde el NADPH al citocromo P450, catalizado por la enzima de membrana del REL NADPH citocromo P450 reductasa (Orellana B. M. y Guajardo T. V., 2004).

2.7.2 EXPRESIÓN DEL CYP-450

En el ser humano la concentración del CYP-450 se encuentra en mayor abundancia en el hígado siendo aproximadamente: CYP1A2 (13%), 2A6 (4%), 2C (20%), 2D6 (2%), 2E1 (7%) y 3A4 (30%) (Shimada T., et al., 1994 y Rendic S. y Di Carlo F. J., 1997), sin olvidar que además del hígado, los CYPs se expresan de manera apreciable en tejidos extrahepáticos (figura No.10), incluyendo la mucosa el intestino delgado, pulmón, riñón, cerebro, la placenta, la mucosa olfativa, y la piel, con la mucosa intestinal, siendo probablemente el sitio extra hepático más importante de la biotransformación de medicamentos y se localizan en las mitocondrias y en el retículo endoplásmico liso (REL) (Lin H. y Li A., 1998 y Brosen K., 1993).

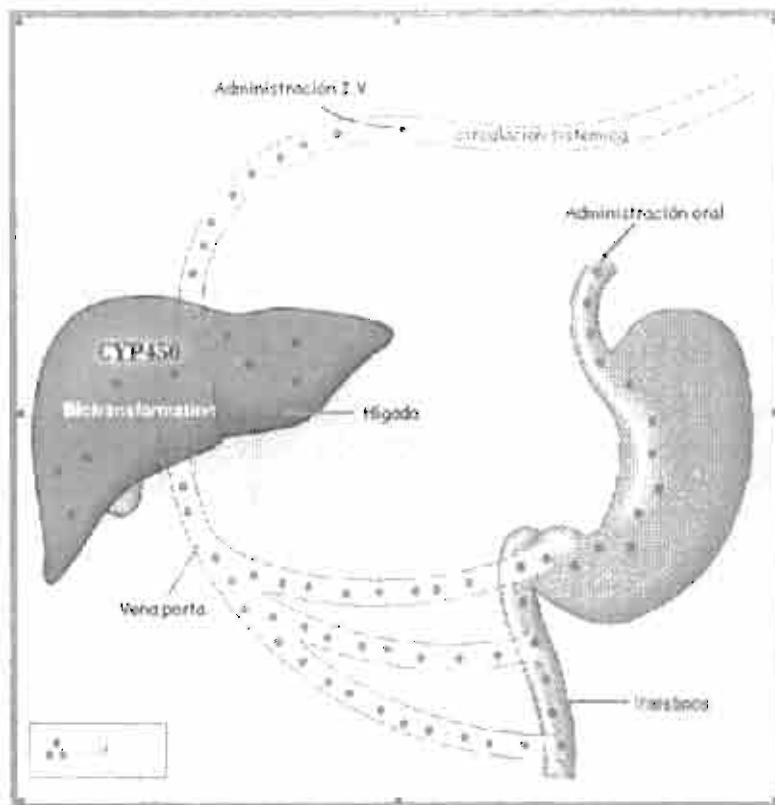


Figura No.10 La biotransformación de la mayoría de los principios activos, se llevan a cabo principalmente en el hígado gracias a las EMF (http://www.med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/clas4to/5_farmacodin.pdf).

Las isoenzimas más importantes para el metabolismo de fármacos en los seres humanos son CYP 3A4, 2D6 y 2C19 (www.uam.es/departamentos/medicina/farmacologia/especifica/Enfermeria/Enf_T3.pdf).

2.7.3 MECANISMO DE ACCIÓN

El monóxido de carbono puede unirse al hierro ferroso (forma reducida de la hemoproteína) del CYP450 para formar un complejo $Fe^{2+}-CO$.

La activación del oxígeno es similar en todos los CYP450 (Ortiz de Montellano P. R. y De Voss J. J., 2002). El centro catalítico de los CYP-450 es el átomo de hierro hexa coordinado (figura No.11).

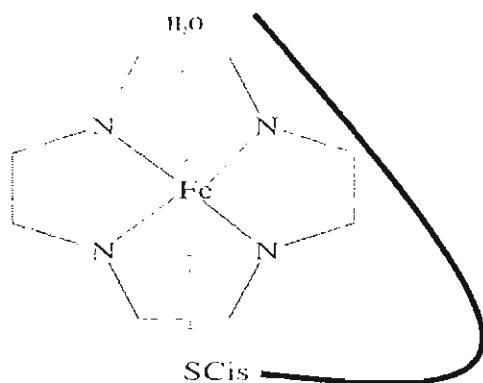


Figura No.11 Estructura molecular del grupo hemo del citocromo P450 donde se observan los 4 anillos de la protoporfirina IX, con el grupo tiol de un residuo de cisteína de la cadena polipeptídica y con el solvente (comúnmente agua).

1° Unión del sustrato y el desplazamiento del solvente en la sexta posición de coordinación del átomo de hierro. Como consecuencia de ello se originan cambios en el estado de spin, en el potencial redox y en el máximo de absorbancia de la hemoproteína.

2° Se produce la reducción del complejo hemoproteína-sustrato al estado ferroso (el Fe^{3+} del grupo hemo pasa a Fe^{2+}) gracias al aporte de un e^- y al aumento en el potencial redox originado en el paso anterior.

3° Unión del oxígeno molecular para formar un complejo superóxido.

4° Se produce el aporte de un segundo electrón con la formación de una especie activada de oxígeno.

*Nota: A partir de este punto el mecanismo no se conoce con certeza. La naturaleza de la especie activada de oxígeno es desconocida (Schlichting I., et al., 2000).

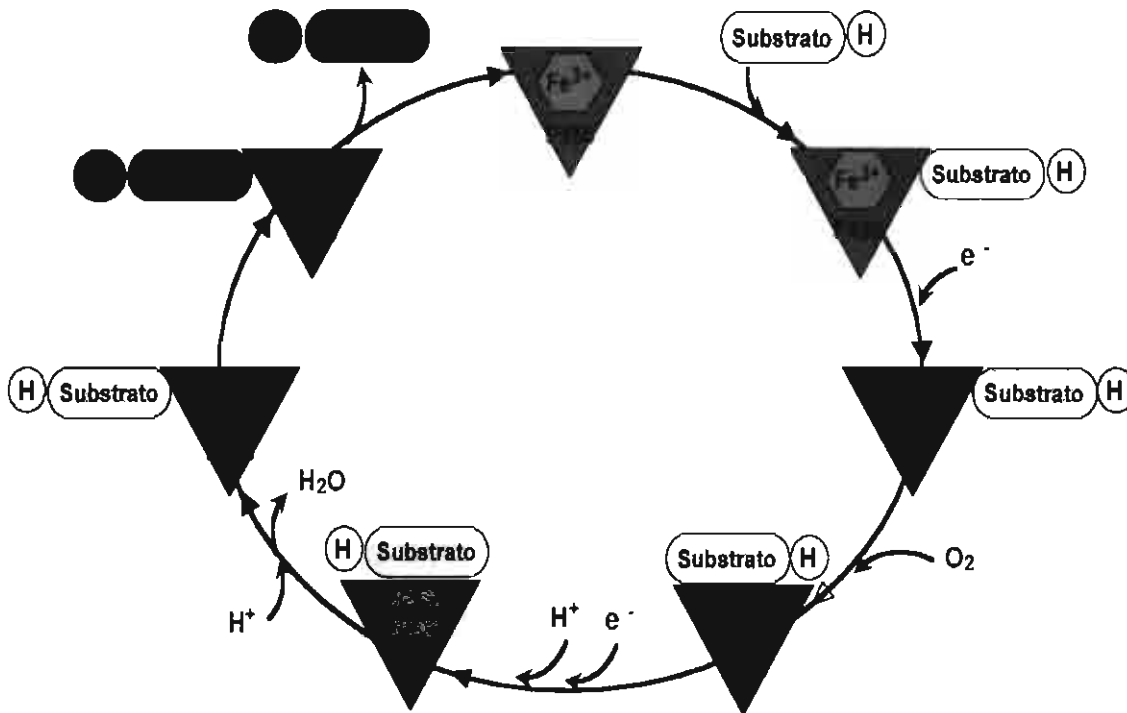


Figura No.12 Mecanismo de acción del citocromo P450. Este esquema es una simplificación del mecanismo de acción del citocromo P450 (CYP) propuesto por Coon (Graham S. E. y Peterson J. A., 1999). En él, el Fe^{3+} representa al hierro del grupo hemo del CYP oxidado, RH y ROH a los sustratos y productos respectivamente. En este ciclo de óxido-reducción se liberan anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Finalmente se obtendría la liberación de uno de los átomos de oxígeno en forma de una molécula de H_2O y la incorporación del otro en el sustrato (figura No.12).

2.7.4 NOMENCLATURA

Desde el momento del descubrimiento del CYP450 la purificación e identificación de nuevas isoenzimas ha sido una constante (Omura T., 1999). En un principio se nombraban en función de la reacción que catalizaban o de su inducibilidad, lo que motivó que un mismo CYP450 recibiera nombres diferentes en cada uno de los laboratorios donde había sido caracterizado. A finales de los años 80 el elevado número de CYP450 conocidos hizo que la comunidad científica se planteara la necesidad de establecer criterios de nomenclatura que evitara posibles

ambigüedades. En 1987 se establecieron los principios del sistema de nomenclatura y clasificación que se utiliza hoy en día, el cual obedece a criterios filogenéticos y se basa en la identidad de la secuencia de aminoácidos en las cadenas polipeptídicas de las diferentes enzimas (Nebert D. W., et al., 1989 y Waterman M. R., 1987). Con lo que se estableció que el primer número arábigo designa a la familia, la subfamilia es designada por una letra del alfabeto y el último número arábigo designa el gen que codifica una enzima específica (figura No.13) (Galli E. y Feijoo L., 2002 y González H. M., et al., 2003).

Por ejemplo:

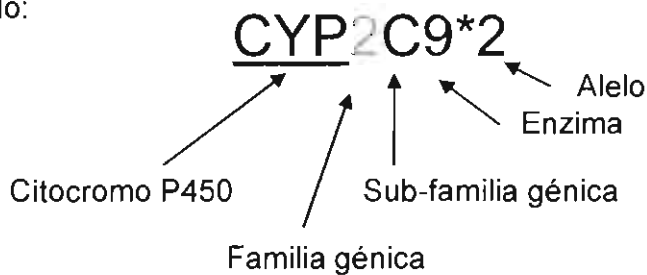


Figura No.13 Nomenclatura establecida para las enzimas del citocromo P450 (González H. M., et al., 2003).

Quedando así totalmente identificados todos los CYP450s (procariontes y eucariotas). Ahora tomando en cuenta que la función sigue a la estructura, las enzimas se clasifican en familias, subfamilias y enzimas específicas de acuerdo al grado de similitud en la secuencia de aminoácidos (figura No.14). Las enzimas de una misma familia son homólogas en 40% al 55% de la secuencia y, las enzimas de una subfamilia en más del 55% y por último, dentro de la misma subfamilia, las enzimas individuales se designan según números empezando siempre por el 1, teniendo en cuenta que dos CYP450 se consideran como diferentes siempre y cuando sus respectivas secuencias difieran en más de un 3% (Galli E. y Feijoo L., 2002 y González H. M., et al., 2003).

CLASIFICACIÓN LA SÚPER FAMILIA CYP-450

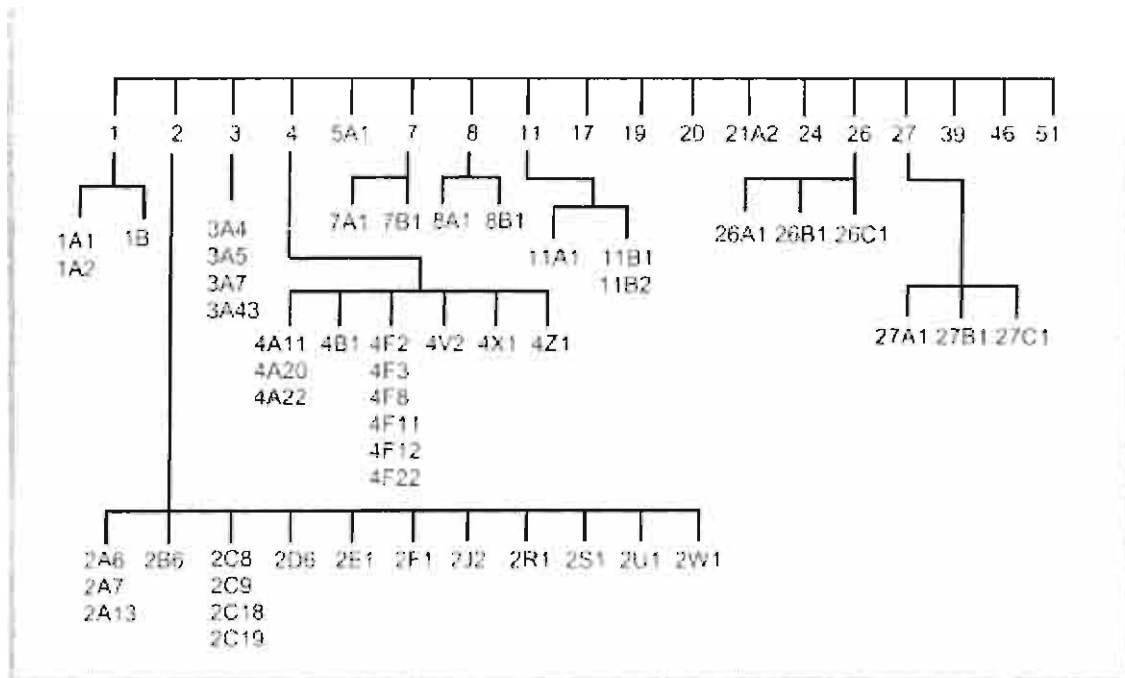


Figura No.14 Enzimas CYP-450 Identificadas en la especie humana (Donato M. T., 2003).

Por otra parte, también es importante conocer la nomenclatura que se refiere al *locus* (figura No.15) ya que es necesario para poder ubicar algún gen que codifique para cualquiera de las enzimas, mencionadas anteriormente. Primero se coloca el número del cromosoma en cual se encuentra localizado el gen, seguido de una letra *q* (*queue = brazo largo del cromosoma*) o *p* (*petit en francés = brazo corto*), posteriormente se coloca un número que se refiere a la banda* del cromosoma en el que se encuentra el gen, cada banda se numera empezando por 1 a partir de la más cercana al centrómero, el siguiente número es para ubicar la sub-banda y se coloca un punto, finalmente se coloca otro número que es la sub-sub-banda (Brosen K., 1993). *(Nota: Las bandas del cromosoma se hacen visible bajo el microscopio cuando el cromosoma se encuentra teñido y la sub-sub-banda se observa solo a altas resoluciones).

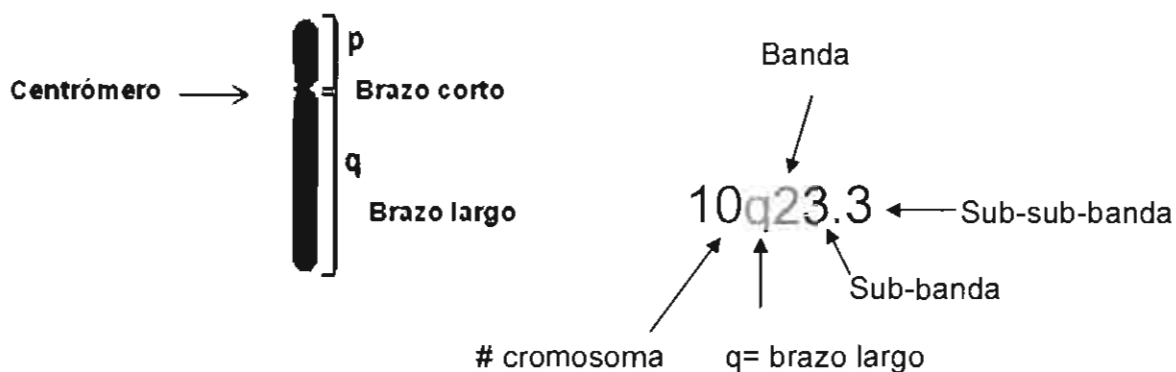


Figura No.15 Partes de un cromosoma y nomenclatura del locus (Brosen K., 1993)

2.7.5 INDUCCIÓN E INHIBICIÓN METABÓLICA

La expresión de las EMFs está regulada por factores genéticos (algunos presentan polimorfismos genéticos), fisiopatológicos (regulación hormonal, enfermedades) o ambientales (factores nutricionales, inducción, inhibición) (Donato M. T, 2003).

La mayoría de los CYPs están regulados mediante la inhibición e inducción enzimática (figura No.16) y un gran número de fármacos tienen ésta propiedad de aumentar o de frenar la capacidad enzimática hepática, pero también hay que tomar en cuenta que existen algunos alimentos como: jugo de toronja, nicotina, repollo, carne asada a la parrilla, brócoli, hierba de San Juan, etc. que son potentes inhibidores o inductores de las diferentes EMFs.

La inducción metabólica actúa incrementando la síntesis proteica de la enzima, aumentando su actividad funcional causando una reducción de la concentración del fármaco similar al de una reducción de la dosis (Nebert D. W., 1999, Liska D. A., 1998 y www.elergonomista.com/farmacologia/metab.html).

La inhibición de la enzima se lleva a cabo por competencia reversible del sitio de unión, como consecuencia disminuye su actividad funcional causando una disminución de la eliminación del fármaco aumentando aún en dosis terapéuticas, la biodisponibilidad, la concentración, su vida media y los efectos secundarios (Miners J. O. y Birkett D. J., 1998, Miller S. A., et al., 1988 y Maniatis F., et al., 1982).

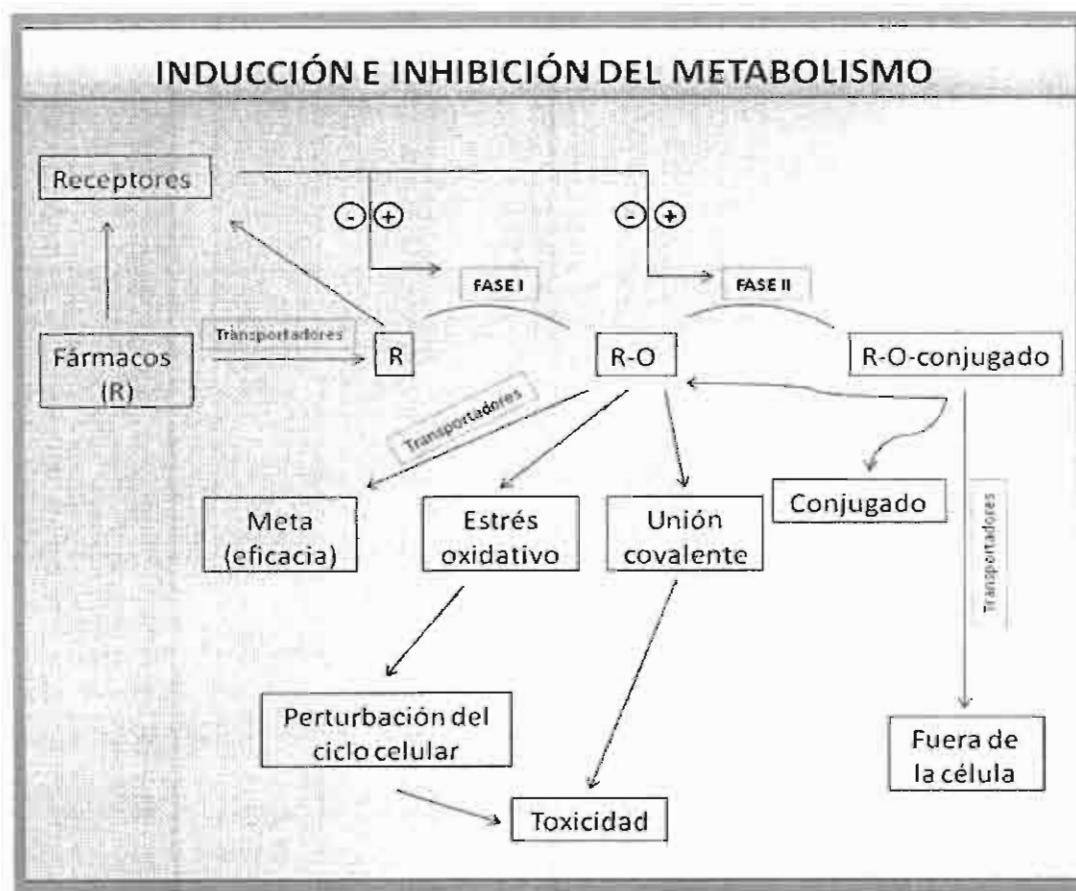


Figura No.16 Momento en el cual se produce la regulación enzimática (+): inducción y (-): inhibición (Nebert D. W., 1999).

Estos efectos de algunos fármacos pueden ser importantes en la clínica, al ser responsables de interacciones farmacológicas.

En la tabla No.2 se muestran algunos inductores e inhibidores tanto para CYP2C9 como para CYP2C19.

Tabla No. 2 CLASIFICACIÓN DE ALGUNOS DE LOS FÁRMACOS QUE INTERACTUAN CON CYP2C9 Y CYP2C19				
CYP-450	SUBSTRATOS		INHIBIDOR	INDUCTOR
C9	Tolbutamida	Piroxicam Lomoxicam Meloxicam Tenoxicam Ibuprofeno Suprofen Ketoprofeno Indometacina Diclofenaco Aceclofenaco Flurbiprofeno Naproxeno Celecoxib Lumiracoxib Etoricoxib Valdecoxib Tolbutamida Clorpropamida Glipizida Glimepirida Gliburida Nateglinida Rosiglitazona Ciclofosfamida Tamoxifeno S-warfarina Fenprocoumon S-acenocumarol Irbesartan Losartan Candesartan Bosentan Carvedilol Verapamilo Torsemida Sulfonilpirazona Fenitoína Fenobarbital Fluoxetina Sertralina Ac. valproico Tetrahydrocannabinol (THC) Fluvastatina Glimepirida Nateglinida Dextrometorfan Metronidazol Omeprazol Montelukast	Fluconazol Miconazol Ketoconazol Voriconazol Itraconazol Amiodarona Fenilbutazona Sulfipirazona Leflunomida Ritonavir Delavirdina Efavirenz Fluvoxamina Ácido valproico Sulfonamidas Metronidazol Anastrozole Isoniazida Sulfametoxazol Fenofibrato Fluvastatina Tamoxifeno Teniposide 5-fluorouracilo Cimetidina	Rifampicina Fenobarbital Secobarbital Carbamacepina Fenitoína Bosentan Ritonavir Hierba de San Juan

2C19	S-mefenitoina	Hexobarbital Dextrometorfano Aminopirina Amitriptilina Citalopram Clomipramina Imipramina Desipramina Micllobemida Trimipramina Fluvoxamina Fluoxetina Paroxemida Diazepam Sertralina S-mefenitoina Fenitoína Carbamazepina Fenobarbital Mefobarbital Fenilhidantoina Rifampicina Pentamidina Omeprazol Lanzoprezol Pantoprezol S-warfarina S-acenocumarol Propanolol Propanodol Ciclofosfamida Progesterona Proguanil Diclofenaco Ibuprofeno Flurbiprofeno	Fluvoxamina Paroxetina Fluoxetina Fluoxetina Tranilcipromina Modafinilo Ritonavir Delavirdina Efavirenz Artemisinina Cloramfenicol Oxcarbazepina Felbamato Topiramato Indometacina Omeprazol Esomeprazol Ticlopidina Voriconazol Sulfafenazol	Rifampicina Ginkobiloba Fenobarbital Hierba de San Juan
------	---------------	--	--	--

Clasificación de los fármacos según su efecto sobre CYP2C9 y CYP2C19 (www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP2C9&search=CYP2, Libro J. M., et al., 2002, Wilkinson G. R., 2005 y Flockhart D. A., 2007).

2.7.6 CYP-450 Y TOXICIDAD

Como ya se mencionó en un principio el objetivo principal del CYP450, y del resto de enzimas implicados en el metabolismo de xenobióticos, es evitar la acumulación de las sustancias exógenas dentro del organismo (detoxificación), mediante ciertas modificaciones en la estructura química del compuesto, con lo que no sólo se convierte en una molécula más polar, sino que además lo inactiva y lo convierte en un metabolito sin actividad farmacológica e inocuo desde el punto de vista toxicológico.

Pero desgraciadamente esto no ocurre en todos los casos ya que se sabe de numerosos ejemplos de xenobióticos que se convierten en moléculas tóxicas tras su metabolización (Welch R. M., 1979, Gelboin H. V., 1980 y Rodríguez A. C., et al., 2010). Esta desafortunada circunstancia se produce cuando los metabolitos formados son especies reactivas que interaccionan con elementos o procesos celulares. Se forman radicales libres y otros metabolitos electrofílicos (epóxidos alifáticos o aromáticos, quinonaimidas) capaces de modificar covalentemente macromoléculas (proteínas, DNA) o de producir interacciones no covalentes (por ejemplo: estrés oxidativo) (González F. J., 1998). Los mecanismos de defensa celular tratarán de neutralizar el metabolito lo más rápidamente posible.

- *Vida media de la especie reactiva es **extremadamente corta***: Sólo afectará a la propia enzima que lo ha generado produciendo la inactivación de la misma (inhibidores conocidos como sustratos suicidas del CYP450) (Kent U. M., et al., 2001).
- *Vida del metabolito es un **poco más larga***: Podrá afectar a otras macromoléculas, pero será neutralizada antes de salir de la célula o del tejido donde se ha formado produciendo únicamente toxicidad local.
- *Metabolitos **más estables***: Pueden llegar a actuar sobre otros tejidos del organismo por lo que sus efectos tóxicos serán generalizados.

En última instancia es el balance entre las reacciones de activación metabólica y los procesos de neutralización-eliminación (inactivación) los que determina la severidad y el alcance de la toxicidad. Este balance depende de múltiples factores (polimorfismos genéticos, inducción, inhibición, factores dietéticos, interacciones entre fármacos, etc.) y puede mostrar notables diferencias a nivel individual (González F. J., 1998, Pelkonen O. y Raunio H., 1997 y Klassen C. y Curtis D., 1999).

La bioactivación afecta tanto a fármacos como a otros xenobióticos. Entre los primeros el ejemplo mejor conocido es el del paracetamol. Este fármaco puede ser metabolizado por enzimas de fase 2 con formación de conjugados con glucurónido o con sulfato, los cuales son fácilmente eliminados, o puede ser oxidado por el CYP450 (CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4) produciéndose una quinonaimina altamente reactiva capaz de interaccionar con las proteínas celulares (Manyike P. T., et al., 2000 y Sheweita S. A., 2000).

Los procesos de activación también conducen a la conversión de procarcinógenos en carcinógenos. Estas reacciones están catalizadas por diferentes CYP450, si bien las enzimas de la subfamilia CYP1A juegan un papel muy destacado por su capacidad de activar gran número de procarcinógenos procedentes de la combustión de diferentes hidrocarburos y que pueden acceder al organismo (principalmente por inhalación).

La existencia de algunos polimorfismos en los genes que codifican para estas enzimas puede producir múltiples cambios en el metabolismo como es el caso de los individuos con metabolismo lento, que no alcanzan a biotransformar el fármaco por lo que se acumula en el cuerpo hasta llegar a niveles tóxicos o finalmente a la muerte, esto es más común en los fármacos que presentan una ventana terapéutica muy estrecha, como es el caso de la Warfarina, fenitoína, etc. (Donato M. T., 2003).

2.7.7 POLIMORFISMO GENÉTICO

Un polimorfismo genético se define como una variación estable en un determinado lugar de la secuencia genética (*locus*), que se presenta en más del 1% de una población específica, este tipo de mutación genética es muy común en los genes humanos del citocromo P450 y (figura No.17) principalmente son polimorfismos de nucleótido único (*single nucleotide polymorphisms* o *SNPs*).

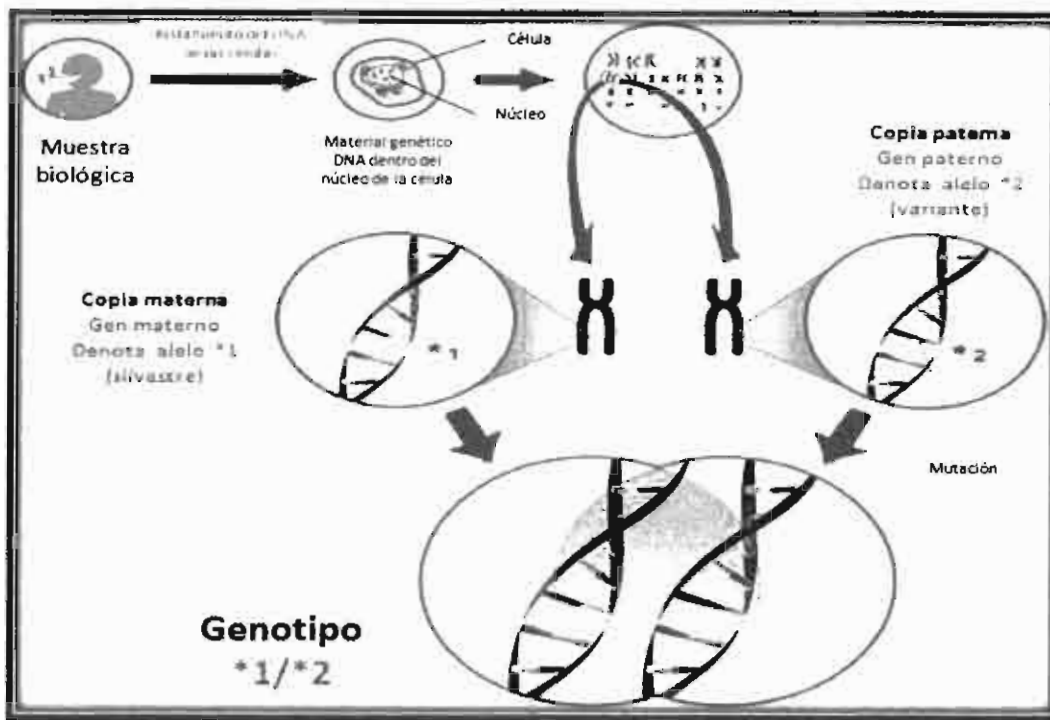


Figura No. 17 Polimorfismo de nucleótido único que muestra un genotipo heterocigoto (www.signaturegenetics.com/public/gifs/img_226_02.jpg&imgrefurl=).

De forma general representan hasta el 90% de todas las variaciones genómicas humanas, y aparecen cada 100 a 300 bases en promedio, a lo largo del genoma humano. Dos tercios de los SNP corresponden a la sustitución de una citosina (C) por una timina (T). Existen dos tipos, los llamados sinónimos y los no sinónimos siendo estos últimos funcionalmente importantes, si es que se producen en una región codificante ya que pueden provocar el cambio de un aminoácido, modificando o alterando la funcionalidad de la proteína, pero si dicho polimorfismo se encuentran en una región no codificante, podrían no ser importante.

Recientemente se reportó que cada ser humano contiene una media de 14.6 polimorfismos no sinónimos en genes del citocromo P450 y muchos de ellos están relacionados con el metabolismo de fármacos o la susceptibilidad a ciertas enfermedades (Wang L. L., et al., 2009).

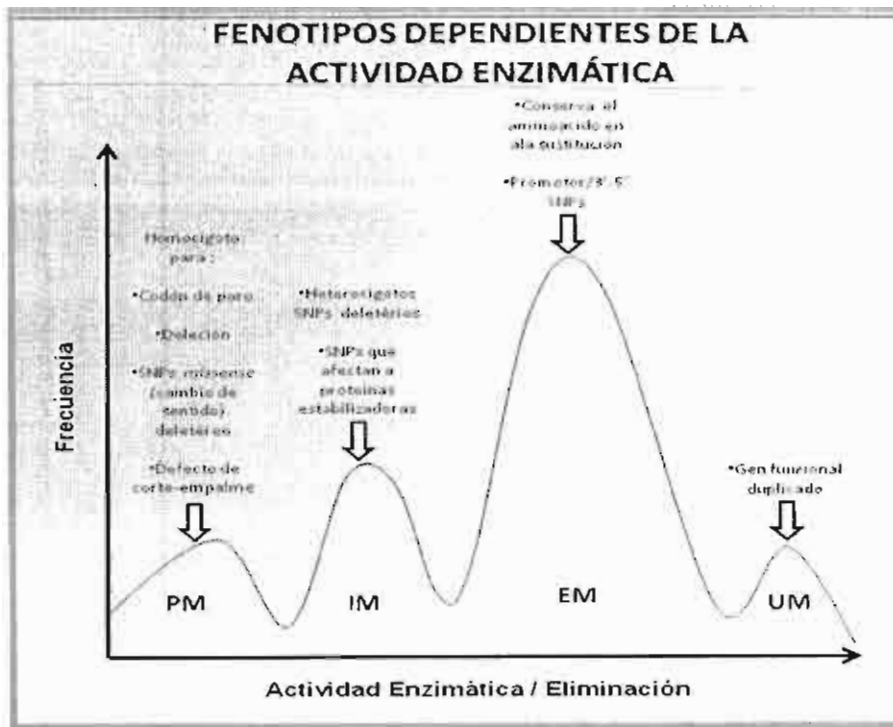


Figura No.18 Fenotipo dependiente de la actividad enzimática. Donde se observan las enzimas metabolizadoras de drogas (CYP450) en función de la variación genética. PM: metabolizadores lentos, IM: metabolizadores intermedios, EM: metabolizadores eficientes o extensos y UM: metabolizadores ultrarápidos (Ingelman S. M., 2005).

La figura No.18 muestra la relación entre la frecuencia vs actividad enzimática (habilidad de metabolizar fármacos en diversos grados debido a diferencias en la capacidad y función enzimáticas programadas genéticamente) (Ingelman S. M., 2005).

Algunos individuos son considerados metabolizadores pobres (PM) cuando su metabolismo es lento o es menos capaz de biotransformar un compuesto en comparación con el resto de la población. Los metabolizadores ultra-rápidos son los que necesitan una dosis mayor ya que el metabolismo del sustrato está acelerado y el efecto terapéutico esta disminuido a tal grado que en ocasiones no se llega a niveles terapéuticos. Los metabolizadores promedio son llamados metabolizadores rápidos (Rendic S. y Di Carlo F. J., 1997, Rettie A. E. y Jones J. P., 2005 y Wei L., et al., 2007).

En 1969, Alexanderson (Alexanderson B., et al., 1969), propone la primera evidencia directa de un estudio de gemelos, en el que el metabolismo de la nortriptilina fue influenciado por factores genéticos, posteriormente Mahgoub et al. (1977) y Eichelbaum et al. (1979) de forma independiente descubrieron que el metabolismo de debrisoquina y esparteína, respectivamente, es polimórfica y más tarde se demostró que estos fármacos son metabolizado por una enzima en común (CYP2D6, cuya actividad está determinada por los rasgos genéticos). Fenotípicamente una población específica puede estar compuesta por UM, RM, IM y PM (Itagaki F., et al., 2004). La distribución de las variaciones genéticas y los fenotipos es dependiente de la etnicidad (Chowbay B., et al., 2005). El individuo con fenotipo PM es debido a la presencia de dos alelos no funcionales o supresión de un gen entero, mientras que el fenotipo del EM es debido a uno o dos alelos con la función normal. El fenotipo de IM se encuentra generalmente en los individuos que presenten un alelo nulo y otro alelo con función normal, mientras que los UM suelen presentar más de un gen funcional extra , figura No.18 (Ingelman S. M., 2005).

2.8 CYP2C9

El gen *CYP2C9* se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 10 (q23.3-q24.1) (figura No.19), está compuesto por 9 exones, presenta hasta 34 variantes alélicas (www.cypalleles.ki.se), pero de éstas sólo los alelos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* son los más frecuentes reportadas en otras poblaciones (http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/posters/chromosome/omim.shtml#GeneMap y Hamdy S. I., et al., 2002). El polimorfismo *CYP2C9*2* se encuentra en el exón 3, donde existe un cambio de una C en lugar de una T en la posición 430 produciendo el cambio del aminoácido 144 (arginina por cisteína) mientras que *CYP2C9*3* se encuentra en el exón 7 y consta de la sustitución de una A por una C en la posición 1075 que genera el cambio del aminoácido 359 (isoleucina por leucina) figura No.20 y en ambos casos estos cambios generan una disminución en la actividad enzimática, ya que este gen codifica para la

enzima con el mismo nombre (figura No.21) (www.uv.es/jcastell/Metabolismo_de_xenobioticos.pdf, Wedlund P., 2000, Nagata K. y Yamazoe Y., 2002, Takada K., et al., 2004 y Speed W. C., et al., 2009).



Figura No.19 Cromosoma No.10 (— ubicación exacta del gen *CYP2C9*) (www.genecards.com).

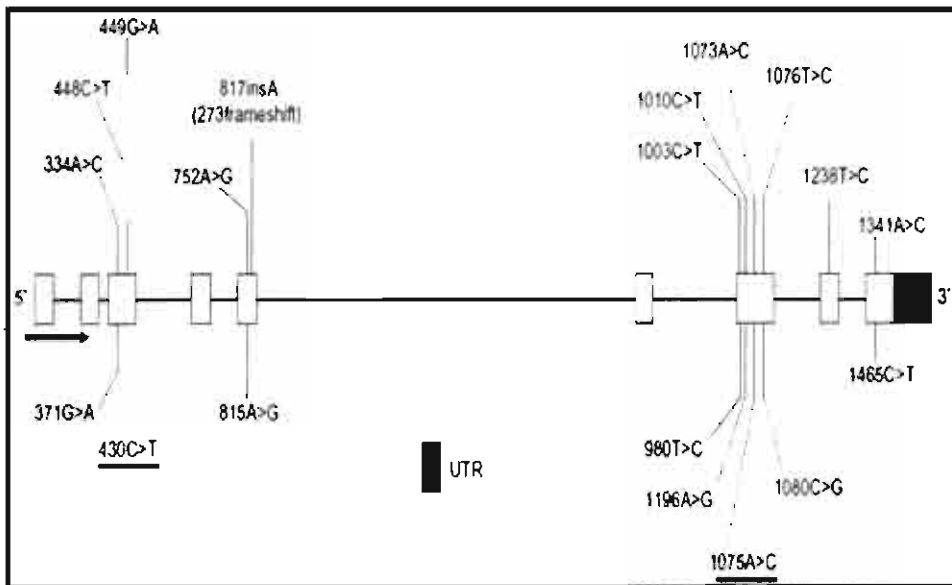


Figura No.20 Se observa el gen *CYP2C9* con los 19 SNPs no sinónimos ubicados en los exones 3,5,7,8 y 9, de los 34 polimorfismos en total, reportados hasta la fecha, y subrayados de color rojo se encuentran

los alelos *2 y *3. *CYP2C9* codifica una proteína de 490 aminoácidos con un peso molecular de 55,6 kD (Zhou S. F., et al., 2009).

Los individuos homocigotos para el *CYP2C9**2 o *3 expresarán un fenotipo metabolizador lento (PM) para los fármacos que metabolizan (tabla No.2 y 3), siendo algunos de los relevantes la S-warfarina, S-acenocumarol y fenitoína, principalmente ya presentan una ventana terapéutica muy estrecha con lo que se pasa de niveles terapéuticos a niveles tóxicos o hasta la muerte, cuando no es detectado a tiempo (www.cypalleles.ki.se).



Figura No.21 Enzima CYP2C9
www.es.wikipedia.org/wiki/CYP2C9.

La enzima citocromo P450 2C9 o CYP2C9 es miembro del sistema oxidasa de función mixta, que participa en el metabolismo de xenobióticos y varios grupos importantes de fármacos, incluyendo diversos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y los sulfonilureas.

Por su parte el diclofenaco (4'-hidroxilasa) y la tolbutamida (metilhidroxilación) (Kumar V., et al., 2006) son los dos fármacos mejor estudiados hasta la fecha, se utilizan como sustrato de prueba de la actividad enzimática de 2C9 para estudios de fenotipificado, a pesar de que se ha observado algo de actividad de otras enzimas de CYP2C para estos sustratos (Wester M. R., et al., 2000).

Anteriormente se diferenciaba entre 2C8, 2C9 y 2C10, en la actualidad debido a que estas tres enzimas son tan similares y sin mayores diferencias clínicas, se mencionan como 2C9. Además comparten la misma región en el cromosoma 10 (Inoue K., et al., 1994).

El CYP2C9 junto con el CYP2C19, constituyen el 20% de la actividad enzimática de P450 en el hígado (Dickmann L. J., et al., 2001) lo que representa

aproximadamente el 10% de los fármacos de uso más frecuente en la clínica (Miners J. O. y Birkett D. J., 1998 y Llerena A., et al., 2004).

Funcionan como sustratos del CYP2C9: los antiinflamatorios no esteroideos incluyendo los inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (Cox-2), la fenitoína, S-warfarina, tolbutamida, tetrahydrocannabinol, pero viéndose mejor esquematizado en la tabla siguiente cada uno de estos (Newlands A. J., et al., 1992 y Galli E. y Feijoo L., 2002, Dickmann L. J., et al., 2001).

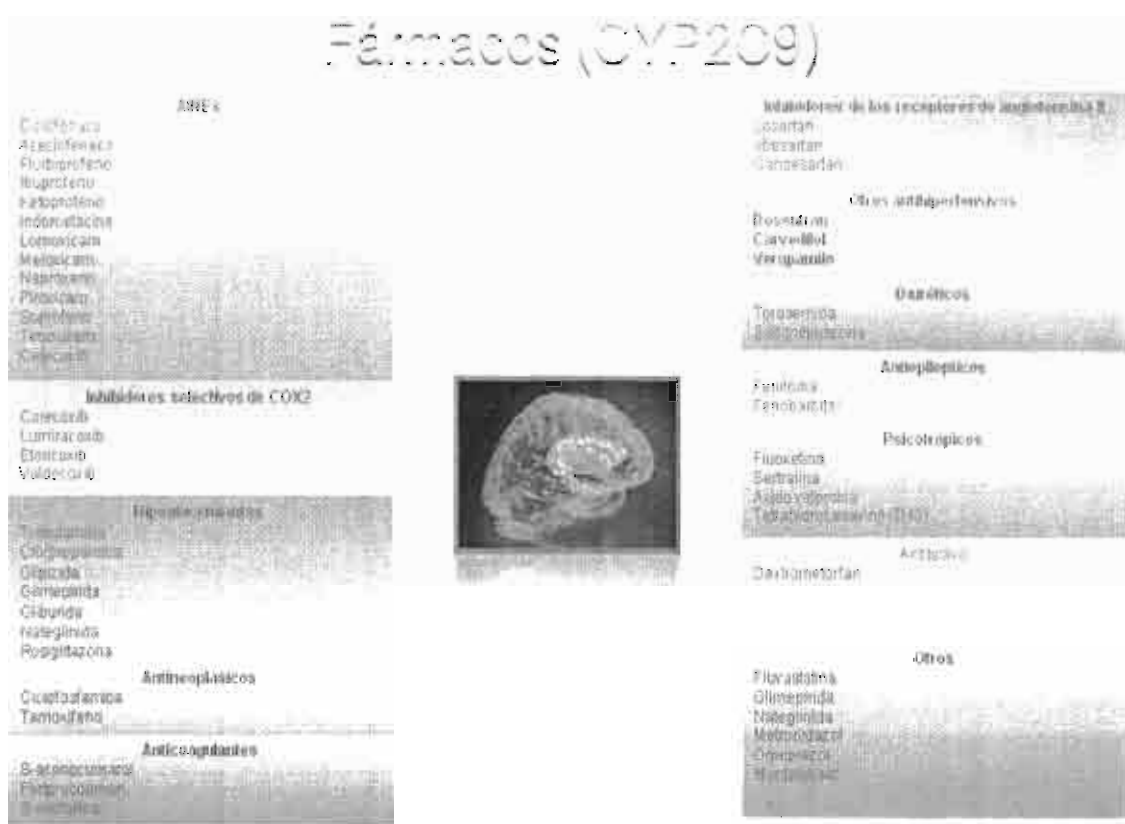


Tabla No.3 Fármacos metabolizados por CYP2C9 (Miners J. O., et al., 1998, www.genecards.org/cgi-in/carddisp.pl?gene=CYP2C9&search=CYP2C9, Libre J. M., et al., 2002, Wilkinson G. R., 2005, Flockhart D. A., 2007 y Welch R. M., 1979).

Por otra parte, como se menciona en la tabla 2 existen algunos principios activos o sustancias que producen la inhibición de CYP2C9 como es el caso de algunos

inhibidores selectivos de la recaptura de la serotonina (ISRS), dentro de los cuales la fluvoxamina es el más potente inhibidor (Newlands A. J., et al., 1992), otros inhibidores también de gran importancia son: el fluconazol, ketoconazol, metronidazol, itraconazol, ritonavir, etc. (Dickmann L. J., et al., 2001). En caso contrario, el inductor de mayor importancia claramente identificado es la rifampicina (Newlands A. J., et al., 1992), aun que también actúan como inductores la fenitoína y el secobarbital (Dickmann L. J., et al., 2001).

Estudios recientes indican que los diversos polimorfismos genéticos que presenta esta enzima, muestran frecuencias específicas de cada población como es el caso de la japonesa que presenta una frecuencia del 2% y del 6-9% de los caucásicos que son metabolizadores pobres (Hemeryck A., et al., 1999 y Coutts R. T. y Urichuk L. J., 1999).

Por su parte el alelo *CYP2C9*2* es causante del 20-30% de la pérdida de la actividad enzimática, mientras que la mutación **3* pueden reducir la actividad V_{max} hasta el 70%. Esto es debido a la disminución de la afinidad y unión de la enzima al sustrato por cada uno de los cambios presentes en cada polimorfismo. La conversión de la enzima *CYP2C9*1* (tipo silvestre) en el punto más alto, es similar a la de *CYP2C9*2*, pero a diferencia del alelo *CYP2C9*3* que disminuye sin afectar la unión al sustrato y sin alterar la interacción con la reductasa pero si está involucrado con la reducción de la catálisis (Wei L., et al., 2007).

Recientemente se realizó la comparación *in vitro* e *in vivo* del metabolismo de la S-warfarina que confirmó el decremento de la actividad catalítica de la variante *CYP2C9*3*. *In vivo* en administración oral el aclaramiento del principio activo se redujo un 90% para los sujetos heterocigotos y 66% para los homocigotos tomando en cuenta el valor obtenido para el control, es por esto que a los sujetos que presenten cualquiera de estas variantes es necesario e indispensable el ajuste de la dosis ya que la eliminación del principio activo es lenta (Yasar U., et al., 1999).

2.9 CYP2C19

Por otra parte, el gen *CYP2C19* ubicado en el brazo largo del cromosoma 10 (q24.1-q24.3) figura No.22, está compuesto por 9 exones y presenta 26 polimorfismos (www.cypalleles.ki.se). El alelo *CYP2C19*2* consiste en la sustitución de una G por una A en la posición 681 en el exón 5 que origina un corte y empalme aberrante y produce una proteína truncada e inactiva. El alelo *CYP2C19*3* está definido por el cambio de una G en lugar de una A en la posición 636 en el exón 4, lo que produce un codón de paro prematuro (figura No.23) (Wedlund P., 2000 y Xiao Z. S., et al., 1997). Los individuos homocigotos para estos alelos presentarán un metabolismo lento (PM) para varios fármacos como: amitriptilina, omeprazol, lansoprezol, pantoprezol, fenitoína, fenobarbital, ciclofosfamida, progesterona, carisoprodol, R-hexobarbital, S-mefenitoína (Burmester J. K., et al., 2010), moclobamida, N-esmetildeazepam (Goldstein J., 2001, Wedlund P., 2000, Manolopoulos V. G., 2007, Bae J. W., et al., 2007 y Roses A. D., 2008).



Figura No.22 Cromosoma No.10 (← ubicación exacta del gen *CYP2C19*) (www.genecards.com).

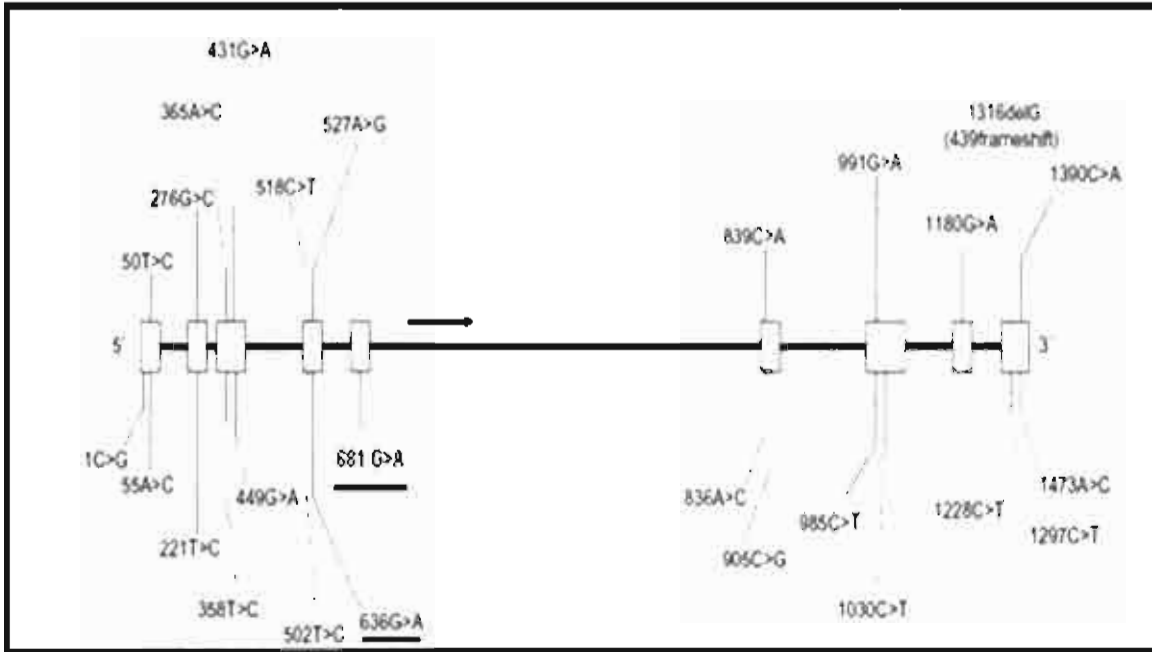


Figura No.23 Posición de los 26 SNPs no sinónimos presentes en el gen *CYP2C19*, presentes en los exones 3, 5, 7,8 y 9. Y subrayados de color rojo se encuentran los alelos *2 y *3 (Zhou S. F., 2009).

Por otra parte la S-mefenitoína se usa como el sustrato de prueba de la actividad 2C19, incluso anteriormente se referían al 2C19 como la enzima S-mefenitoína (Galli E. y Feijoo L., 2002 y Alexanderson B., et al., 1969).

El CYP2C19 junto con su pariente cercano el CYP2C9, comprenden el 20% de la actividad enzimática en el hígado (Dickmann L. J., et al., 2001). La frecuencia de los metabolizadores pobres depende de cada población como es el caso del 2-6% en los caucásicos, del 15-20% de los japoneses y del 10%-20% de los africanos (Rasmussen B. B., 1998).

En cuanto a los inhibidores el principal es la fluvoxamina (Rasmussen B. B., et al., 1998), pero también la fluoxetina, la paroxetina, ticlopidina, modafinil, ritonavir y omeprazol funcionan de esta manera (Ko J. W., et al., 1997, Grozinger M., et al., 1998 y Donahue S., et al., 1999). Al contrario la rifampicina es el inductor más conocido (Zhou H. H., et al., 1990). Y como sustratos del

CYP2C19 encontramos a diversos principios activos como: clomipramina, imipramina, citalopram, moclobemida, tolbutamida, proguanil, hexobarbital, mefobarbital, mefenitoína, propranolol, omeprazol, diazepam (tabla No.2 y 4) (Galli E. y Feijoo L., 2002, www.cypalleles.ki.se, Donahue S., et al., 1999 y Flockhart D. A., 1995).

Fármacos (CYP2C19)


<p>Psicotrópicos</p> <ul style="list-style-type: none"> Amitriptilina Citalopram Clomipramina Imipramina Desipramina Moclobemida Triptamina Fluvoxamina Risperidona Risperidona Risperidona Risperidona Risperidona 		<p>Inhibidores de la bomba de protones</p> <ul style="list-style-type: none"> Omeprazol Lanzoprazol Pantoprazol
<p>Antiepilépticos</p> <ul style="list-style-type: none"> Simfenitoina Fenitoína Carbamazepina Fenobarbital Mefobarbital Valproato de sodio 		<p>Anticoagulantes</p> <ul style="list-style-type: none"> Warfarina Sacubumab
<p>Antibióticos</p> <ul style="list-style-type: none"> Rifampicina Penicilina 	<p>β-Bloqueadores</p> <ul style="list-style-type: none"> Propranolol Propafenolol 	<p>Antineoplásicos</p> <ul style="list-style-type: none"> Ciclofosfamida
		<p>AINEs</p> <ul style="list-style-type: none"> Diclofenaco Ibuprofeno Paracetamol
		<p>Hormonas</p> <ul style="list-style-type: none"> Progesterona
		<p>Antipalúdicos</p> <ul style="list-style-type: none"> Proguanil
		<p>Otros</p> <ul style="list-style-type: none"> Hexobarbital Dextrometorfano Anticidramina

Tabla No.4 Fármacos metabolizados por CYP2C19 (Goldstein J., 2001, Santiago C., et al., 2002, Wedlund P., 2000 y Manolopoulos V. G., 2007).

Finalmente es importante mencionar que para ambos genes, *CYP2C9* y *CYP2C19*, el genotipo **1/*1* origina un fenotipo metabolizador extenso (más frecuente), los genotipos **1/*2* y **1/*3* expresarán un fenotipo metabolizador intermedio, mientras que **2/*2*, **3/*3* y **2/*3* presentan un metabolismo lento (PM), siendo este último el de mayor interés a nivel clínico (Itagaki F., et al., 2004 y Xiao Z. S., et al., 1997).

3. JUSTIFICACIÓN

3. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de las frecuencias de las variantes genéticas presentes en el gen *CYP2C9* y el *CYP2C19* en población mexicana (mestiza e indígena) pueden utilizarse para ayudar a individualizar el tratamiento farmacológico mediante la selección del fármaco y la dosis más adecuada. De esta forma se mejoraría la respuesta individual a fármacos que son metabolizados por las enzimas *CYP2C9* y *CYP2C19*, ya que se reducirían los efectos secundarios y las reacciones adversas, además de que se obtendría una mayor eficacia terapéutica. Esto es particularmente crítico en el caso de fármacos que presentan una ventana terapéutica muy estrecha, lo que exige un control muy estricto.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos *CYP2C9**2, *CYP2C9**3, *CYP2C19**2 y *CYP2C19**3 en población mexicana.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la frecuencia genotípica y alélica de *CYP2C9* (*2 y *3), *CYP2C19* (*2 y *3).
- Determinar la frecuencia de individuos metabolizadores lentos (PM) de *CYP2C9* y *CYP2C19* en 200 mestizos y en 300 indígenas mexicanos.
- Comparar las frecuencias obtenidas con lo reportado para otras poblaciones.

5. HIPÓTESIS

5. HIPÓTESIS

Las frecuencias de los polimorfismos *CYP2C9* (*2 y *3) y *CYP2C19* (*2 y *3) en población mestiza e indígena mexicana son diferentes a las reportadas para otras poblaciones.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS

6.1.1 POBLACIONES ESTUDIADAS

Se estudiaron dos grupos pertenecientes a la población mexicana, tomando en cuenta que previo a la toma de muestra cada uno de los individuos firmaron una carta de consentimiento informado.

El primer grupo está compuesto por 243 individuos mestizos del Distrito Federal y del estado de México (Los Reyes la Paz). El segundo grupo comprende 495 individuos provenientes de varios grupos indígenas: **1:**otomíes (Actopan, Hidalgo); **2:**tarahumaras (Chihuahua); **3:**tzeltales (Chiapas); **4:**purépechas (Michoacán); **5** y **6:**nahuas de Zitlala y Chila (Guerrero); **7:**nahuas de Santo Domingo (Morelos); **8:**nahuas de Milpa Alta (D.F.); **9:**nahuas de Coyolillo (Veracruz); **10:**nahuas de Necoxtla (Veracruz) y **11:**nahuas de Ixhuatlancillo (Veracruz).

Las muestras de mestizos mexicanos provienen del banco de DNA del Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Todos los individuos tienen ambos padres y abuelos de ascendencia mexicana.

Las muestras de poblaciones indígenas fueron proporcionadas por la Dra. Rosenda Peñaloza del Departamento de Genética del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS), la Dra. Leonora Buentello del Instituto de Investigaciones Antropológicas (UNAM) y por el banco de DNA del Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. En su recolección se realizaron los análisis pertinentes para asegurarse

que pertenecían a esos grupos étnicos como: dialecto, grupos sanguíneos ABO y Rh (O Rh⁺), y diversos marcadores genéticos (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC y HLA_DQA1 (*Antígeno Leucocitario Humano*)) (Buentello M. L., et al., 2008).

6.2 TOMA DE MUESTRA

Cada una de las muestras fue tomada en condiciones asépticas (material nuevo y estéril) (figura No.24). La muestra fue de aproximadamente 15mL de sangre periférica en tubos *vacutainer* que contenían ACD (ácido cítrico–dextrosa) como solución anticoagulante.



Figura No.24 Toma de muestra y tubos con anticoagulante ACD (Lab. de Genética Molecular, INNN,MVS).



Figura No.25 Transferencia a tubo cónico de 15 mL. (Lab. de Genética Molecular, INNN,MVS).

6.3 LISIS DE GLÓBULOS ROJOS Y OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS

Para el análisis de cada una de las muestras se utilizó DNA genómico que fue extraído a partir de glóbulos blancos. Para ello, primero es necesario eliminar los demás elementos celulares (figura No.25), como es el caso de los eritrocitos por medio de lisis. Se utilizó la técnica de TTS, que se describe a continuación.

1. Transferir 3 mL de sangre a un tubo cónico de 15 mL y agregar tres veces el volumen igual de amortiguador TTS (Tris 10mM (pH 7.6), tritón al 1%, sacarosa 0.32M). Invertir el tubo varias veces.
2. Centrifugar a 4000 rpm/6 minutos; decantar con cuidado.
3. Agregar al botón 1 mL de amortiguador TTS. Resuspender el botón (agitación) y pasar a un microtubo de 1.5 mL. Agitar hasta homogenizar.
4. Centrifugar a 14000 rpm/4 minutos en microcentrífuga. Decantar añadir 1 mL de amortiguador TTS, resuspender.
5. Centrifugar a 14000 rpm/4 minutos en microcentrífuga (*repetir de dos veces a tres veces el paso anterior, hasta que el botón sea de color blanco*).

6.4 EXTRACCIÓN DE DNA GÉNOMICO (MÉTODO TTS)

Al botón de leucocitos limpio agregar 570 μ L de NaCl 5 mM. Agitar dos minutos y colocar 30 μ L de SDS al 10%. Agitar dos minutos y agregar 200 μ L de NaCl saturado y agitar 10 minutos.

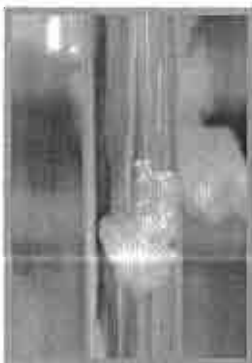


Figura No.26 DNA genómico (Lab. de Genética Molecular, INNN,MVS).

1. Centrifugar a 14000 rpm/20 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante a un tubo de 13x100mm estéril.
2. Agregar 600 μ L de cloroformo alcohol-isoamílico, agitar por 10 minutos y centrifugar a 14000 rpm durante 15 min.

3. Pasar la fase acuosa a otro tubo, que contenga 3 mL de etanol absoluto a -20°C para precipitar el DNA (figura No.26).
4. Agregar 600 μL de etanol al 70%, homogenizar y centrifugar a 14000 rpm durante 15 minutos, decantar y posteriormente dejar evaporar el etanol en condiciones estériles, finalmente resuspender el DNA en un microtubo con 1.5 mL de agua estéril, colocar en baño maría a 50°C durante 24 horas (Buffone G. J. y Darlington G. J., 1985).

6.5 CUANTIFICACIÓN DEL DNA GENÓMICO

1. La muestra de DNA genómico se diluye 1:100, para lo cual se colocan 495 μL de agua inyectable estéril y 5 μL de DNA genómico.
2. Se homogeniza adecuadamente en vortex.
3. Se lee a una longitud de onda de 260nm y 280nm, se calibra utilizando agua inyectable estéril (blanco) en una celda de cuarzo.

Con estos resultados se calculó la concentración y pureza de cada una de las muestras de DNA.

6.6 INTEGRIDAD DEL DNA GENÓMICO

La integridad de cada una de las muestras de DNA genómico se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (figura No.27).

1. Se prepara un gel de agarosa al 0.8% con TBE (amortiguador tris-borato-EDTA) al 0.5X.



Figura No.27 Gel de agarosa al 0.8% con las muestras ya cargadas. (Lab. de Genética Molecular, INNN,MVS).

2. Se carga cada uno de los pozos con 1 μ L de DNA genómico y 0.5 μ L de amortiguador de carga.
3. Se dejan correr las muestras a 100V durante 1hr.
4. Se tiñe el gel en una solución de bromuro de etidio (10 mg/mL) por 10seg y se elimina sumergiendo el gel en agua durante 20 min. o por más tiempo si es necesario.
5. El gel se observa en el transiluminador de luz ultravioleta (figura No.28).
6. El DNA íntegro se observa como una sola banda de alto peso molecular.

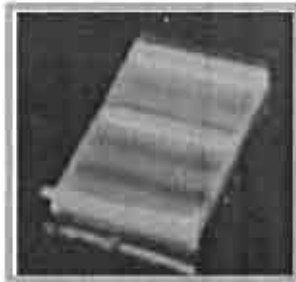


Figura No.28 Gel de agarosa al 0.8% listo para observarse en el transiluminador de luz UV. (Lab. de Genética Molecular, INNN,MVS).

6.7 AMPLIFICACIÓN MEDIANTE

6.7.1 PCR CONVENCIONAL

Los fragmentos específicos para cada uno de los alelos estudiados (*CYP2C9**2 y *3) y (*CYP2C19**2 y *3) se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (figura No.29) para posteriormente utilizarlos en una reacción enzimática (PCR-RFLP) de acuerdo a lo descrito por (Yasar Ü., et al., 1999 y Ohkobo Y., et al., 2006).



Figura No.29 Microtubos dentro del termociclador. (Lab. de Genética Molecular, INNN,MVS).

Los oligonucleótidos empleados y las mezclas de reacción se muestran en la tablas siguientes (5 y 6).

Una vez terminada la reacción de PCR, se verificaron los fragmentos amplificados en gel de agarosa al 2% utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb (*Roche*).

Tabla No.5 SECUENCIAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS PREVIAMENTE DISEÑADOS PARA CADA UNO DE LOS POLIMORFISMOS Y LA RESPECTIVA MEZCLA DE REACCIÓN		
Nombre del alelo	Secuencia de oligonucleótidos 5' → 3'	Mezcla de reacción
CYP2C9*2	(24pb) TACAAATACAATGAAAATATCATG (21pb) CTAACAACCAGACTCATAATG	DNA 2µL <i>Master mix (Qiagen)</i> 10µL Oligonucleótido F 1µL Oligonucleótido R 1µL H ₂ O 6µL
CYP2C9*3	(30pb) AATAATAATATGCACGAGGTCCAGAGATGC (22pb) GATACTATGAATTTGGGACTTC	DNA 2µL <i>Master mix (Qiagen)</i> 10µL Oligonucleótido F 1µL Oligonucleótido R 1µL H ₂ O 6µL
CYP2C19*2	(20pb) ATTACAACCAGAGCTTGGC (21pb) TATCACTTCCATAAAGCAAG	DNA 2µL <i>Master mix (Qiagen)</i> 10µL Oligonucleótido F 1µL Oligonucleótido R 1µL MgCl ₂ 1µL H ₂ O 5µL
CYP2C19*3	(20pb) ACTTTCATCCTGGGCTGTGC (21) ACTTCAGGGCTTGGTCA ATA	DNA 2µL <i>Master mix (Qiagen)</i> 10µL Oligonucleótido F 1µL Oligonucleótido R 1µL MgCl ₂ 1µL DMSO 1.5µL H ₂ O 3.5µL

*Nota: La alícuota de 2 µL de DNA es equivalentes a ~100 ng.

Tabla No.6 CONDICIONES DE REACCIÓN Y EL TAMAÑO DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO QUE SE OBTIENE	
Condiciones de reacción	Tamaño del fragmento
94°C/5min 94°C/60seg } 56.1°C/30seg } 40 ciclos 72°C/30seg } 72°C/7min	691pb
94°C/10min 94°C/30seg } 57.3°C/30seg } 40 ciclos 72°C/30seg } 72°C/7min	167pb
94°C/10min 94°C/30seg } 52.8°C/30seg } 40 ciclos 72°C/30seg } 72°C/5min	167pb
94°C/10min 94°C/30seg } 53°C/30seg } 40 ciclos 72°C/30seg } 72°C/5min	233pb

6.7.1.1 RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA

La restricción enzimática se realizó en los fragmentos amplificados mediante PCR convencional, de la siguiente forma:

1. Para la elaboración de la mezcla de reacción se coloca en un microtubo de 0.25 – 1.5 mL, dependiendo de la cantidad que se desea preparar (p/c muestra): 2 µL de amortiguador, 2.5 µL de H₂O estéril y (5U) 0.5 µL de la enzima. La mezcla se homogeniza perfectamente y se centrifuga.

Por otra parte se colocan 15 µL del producto de DNA amplificado por PCR y 5 µL de la mezcla en tubos de 0.25 mL (esto se realiza sobre una gradilla fría) y se homogeniza toda la mezcla.

2. Se colocan las muestras en baño maría a 30°C (*SmaI*) o 37°C (*BamHI*, *AvaI* y *NsiI*) por una hora.
3. Se prepara el gel de agarosa al 3% con TBE al 0.5X.
4. Trascurrido el tiempo, las muestras se colocan en cada uno de los pozos y se corren a 300 V aproximadamente hasta que el primer colorante (azul) se encuentre a 2 cm de la orilla del gel.
5. El gel se revela en bromuro de etidio, se lava con agua, se lee y se determinan los genotipos.

En la tabla No.7 se muestra de una forma sencilla cada una de las enzimas de restricción y el sitio de corte que reconocen, la mezcla de reacción y los genotipos posibles en cada caso.

Tabla No.7 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN UTILIZADAS EN CADA CASO

Nombre del fragmento amplificado	Enzima (sitio de corte)	Mezcla de reacción	Genotipos Posibles
CYP2C9*2	<i>Anabaena variabilis</i> (<i>AvaII</i>) 5'...GIGACC...3'	DNA 15µL <i>AvaII</i> 0.5µL Amortiguador 2µL H ₂ O 2.5µL	Hn=164 y 527pb Ht=164, 527 y 691pb Hm=691pb
CYP2C9*3	<i>Neisseria sicca</i> (<i>NsiI</i>) 5'...ATGCA/T...3'	DNA 15µL <i>NsiI</i> 0.5µL Amortiguador 2µL H ₂ O 2.5µL	Hn=167 Ht=63, 104 y 167pb Hm= 63, 104pb
CYP2C19*2	<i>Serratiamarcescens</i> (<i>SmaI</i>) 5'...CCCIGGG...3'	DNA 15µL <i>SmaI</i> 0.5µL Amortiguador 2µL H ₂ O 2.5µL	Hn=50 y 117pb Ht=50, 117 y 167pb Hm=167pb
CYP2C19*3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (<i>BamHI</i>) 5'...GIGATCC...3'	DNA 15µL <i>BamHI</i> 0.5µL Amortiguador 2µL H ₂ O 2.5µL	Hn=96 y 137pb Ht=96, 137 y 233pb Hm=233pb

6.7.2 TR-PCR

La técnica PCR tiempo real se utilizó sólo para procesar algunas de las últimas muestras de los alelos *CYP2C9*2*, *CYP2C19*2* y *CYP2C19*3* ya que al inicio de este proyecto no se tenía acceso a esta tecnología porque no se contaba con el equipo necesario. Este método es muy rápido por lo que es posible obtener los genotipos en aproximadamente 1:30h (Higuchi R., et al., 1993 y Kubista M., et al., 2006).

Para realizar esta técnica se utilizaron sondas previamente diseñadas para cada polimorfismo (www.cypalleles.ki.se). En la tabla No.8 se muestran las condiciones de cada reacción.

Tabla No.8 MEZCLA DE REACCIÓN Y LA SONDA UTILIZADA EN CADA CASO		
Nombre del alelo	Sonda	Mezcla de reacción
<i>CYP2C9*2</i>	C_25625805_10 # Catálogo: 4362691	DNA 40 ng (1 µL) Sonda 0.25 µL
<i>CYP2C19*2</i>	C_25986767_70 # Catálogo: 4362691	<i>Master Mix</i> (Qiagen) 2.5 µL H ₂ O 1.25 µL
<i>CYP2C19*3</i>	C_27861809_10 # Catálogo: 4362691	Total de reacción.5 µL

Cada enzima de restricción utilizada y el sitio de corte que reconocen, la mezcla de reacción y los genotipos posible en cada caso. Hn: homocigoto normal, Ht: heterocigoto y Hm: homocigoto mutado (González H. M, et al., 2003 y www.cypalleles.ki.se).

6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez obtenidos cada uno de los genotipos, se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas de *CYP2C9**2 y *3, de *CYP2C19**2 y *3 de cada una de las poblaciones estudiadas. Se analizan cada uno de los grupos para saber si es que se encontraban en equilibrio (*Hardy-Weinberg*).

Por otra parte, los datos resultantes en cuanto a las frecuencias de la población mestiza se compararon con los obtenidos en la población indígena y entre sí. Y finalmente los datos obtenidos en el presente estudio se comparan con los reportados en otras poblaciones, por medio de la prueba de X_i^2 de Mantel-Haenszel.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

Se analizaron un total de 243 muestras de DNA de población mestiza y 495 muestras de población indígena mexicana. En cada una de las muestras se verificó la integridad del DNA genómico mediante el análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8%. En todos los casos las muestras presentaron una buena calidad del DNA genómico extraído. En la figura No.19 se puede observar el DNA genómico de 4 muestras representativas.

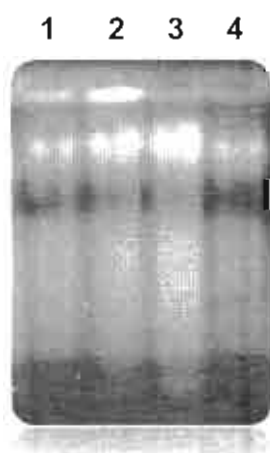


Figura No.30 DNA genómico de 4 muestras en gel de agarosa al 0.8%. (Lab. de Genética molecular, INNN,MVS).

7.2 ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO

Todas las muestras también se analizaron por espectrofotometría, observando una concentración promedio de 120 a 200 ng/ μ L y una pureza de 1.5 a 1.8. Estos resultados sirvieron para calcular la concentración de DNA para realizar PCR, PCR-RFLP y TR-PCR.

7.3 GENOTIPIFICACIÓN

Los productos de PCR obtenidos en cada una de las reacciones se verificaron en gel de agarosa al 2%, para posteriormente realizar la restricción enzimática, bajo las condiciones de reacción ya establecidas previamente para cada caso. Como resultado, se obtuvo el genotipo correspondiente a cada una de las muestras.

En la figura No.31 se pueden observar de forma representativa los genotipos obtenidos tanto para *CYP2C9*2* como para *CYP2C9*3*, mientras que en la figura No.32 se observan los genotipos para *CYP2C19*2* y *CYP2C19*3*.

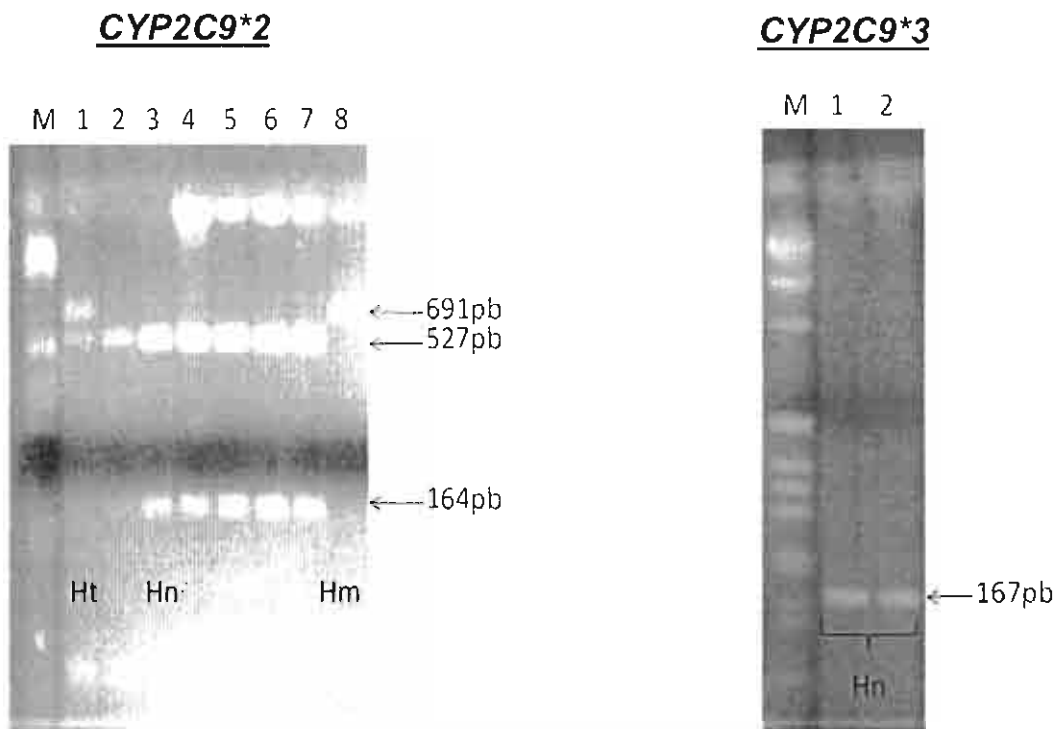


Figura No.31 Genotipos de *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3*. M: marcador de peso molecular, Hn: homocigoto normal, Hm: homocigoto mutado, Ht: heterocigoto. (Lab. de Genética molecular, INNN - MVS).

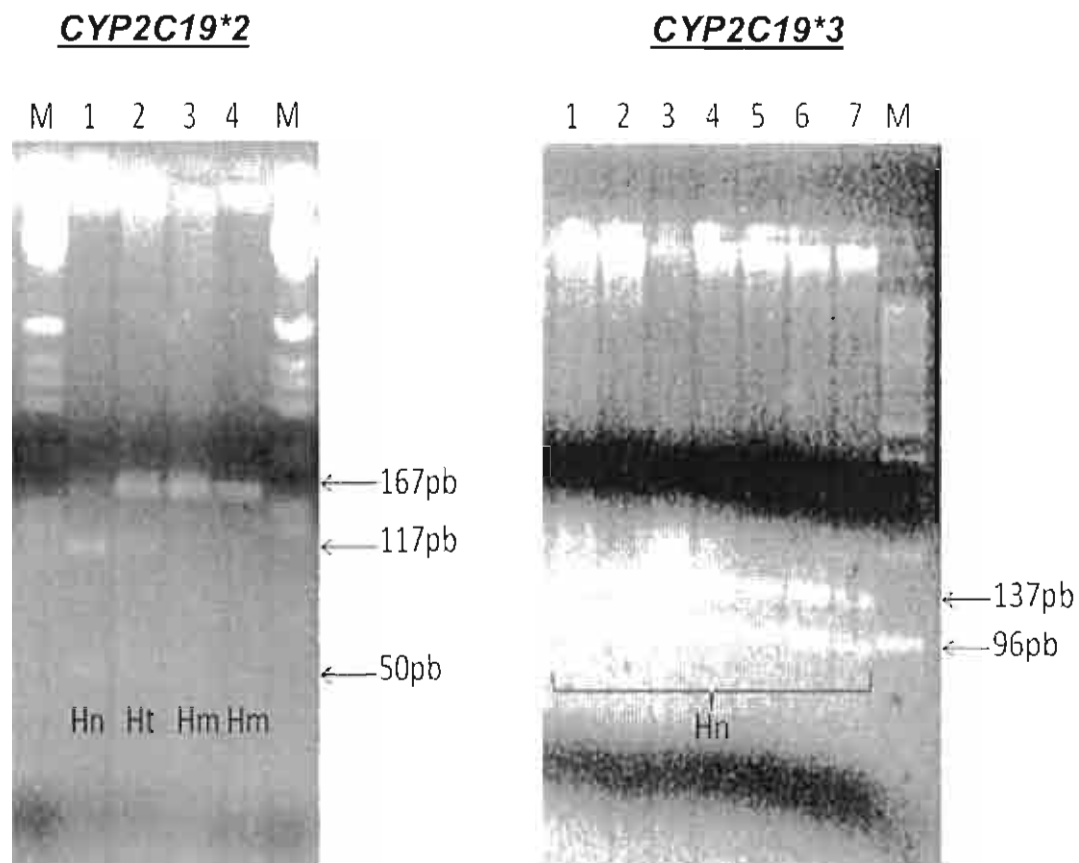


Figura No.32 Genotipos de *CYP2C19*2* y *CYP2C19*3*. M: marcador de peso molecular, Hn: homocigoto normal, Hm: homocigoto mutado, Ht: heterocigoto. (Lab. de Genética molecular, INNN - MVS)

7.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

7.4.1 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS

Las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas para ambos genes se muestran en la tabla No.9. Se puede observar que para la población indígena, las frecuencias de los alelos silvestres *CYP2C9*1* y *CYP2C19*1* fueron 98% y 94% y para los alelos *CYP2C9*2* y *CYP2C19*2* fueron 2% y 6%, respectivamente. Los alelos *CYP2C9*3* y *CYP2C19*3* no se encontraron presentes en ninguna de las

muestras analizadas. Por otra parte, para la población mestiza, las frecuencias de los alelos *CYP2C9*1* y *CYP2C19*1* fueron 97% y 92%, para los alelos *CYP2C9*2* y *CYP2C19*2* fueron 3% y 8%. Los alelos *CYP2C9*3* y *CYP2C19*3* no fueron detectados en ninguna de las muestras de esta población.

En cuanto a las frecuencias genotípicas para la población indígena se observó que la proporción de homocigotos silvestres fue 96% para *CYP2C9* y 89% para *CYP2C19*, la frecuencia de individuos heterocigotos fue 3% para *CYP2C9* y 10% para *CYP2C19*, y la frecuencia de homocigotos fue 0.2% para *CYP2C9*2* y *CYP2C19*2*. Por otra parte, para la población mestiza las frecuencias obtenidas de homocigotos silvestres fueron 93% para *CYP2C9* y 84% para *CYP2C19*. La frecuencia de individuos heterocigotos fue 7% para *CYP2C9* y 16% para *CYP2C19*, y no se encontró presencia de homocigotos mutados para *CYP2C9*. En el caso de *CYP2C19* se observó que 0.4% de los individuos presentaron un genotipo homocigoto *CYP2C19*2/CYP2C19*2*, que correspondería a un fenotipo metabolizador lento.

Tabla No.9 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALELICAS DE (CYP2C9*2 y *3 y CYP2C19*2 y *3) EN POBLACION MESTIZA MEXICANA, OBTENIDAS EN EL PRESENTE TRABAJO

POBLACIÓN	A l e l o	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS (CYP2C9*2 y *3 y CYP2C19*2 y *3)								FRECUENCIAS ALELICAS (CYP2C9*2 y *3 y CYP2C19*2 y *3)			
		CYP2C9				CYP2C19				CYP2C9			
		n	Hn	Ht	Hm	n	Hn	Ht	Hm	*1	*2	*3	
1:Otómies (Actopan, Hidalgo)	*2	63	0.91 (57)	0.09 (6)	0	63	0.98(62)	0.02 (1)	0	0.95 (120)	0.05 (6)	0	0.95
	*3	63	1 (63)	0	0	63	1 (63)	0	0				
2:Tarahumaras (Chihuahua)	*2	44	0.96 (42)	0.02 (1)	0.02 (1)	44	0.91 (40)	0.09 (4)	0	0.97 (85)	0.03 (3)	0	0.97
	*3	44	1 (44)	0	0	44	1 (44)	0	0				
3:Tzeltales (Chiapas)	*2	31	0.94 (29)	0.06 (2)	0	31	0.97 (30)	0.03 (1)	0	0.97 (60)	0.03 (2)	0	0.97
	*3	31	1 (31)	0	0	31	1 (31)	0	0				
4:Purépechas (Michoacán)	*2	35	1 (35)	0	0	35	1 (35)	0	0	1 (70)	0	0	1
	*3	35	1 (35)	0	0	35	1 (35)	0	0				
5:Nahuas de Zitlala	*2	45	0.98 (44)	0.02 (1)	0	45	1 (45)	0	0	0.99 (89)	0.01 (1)	0	1
	*3	45	1 (45)	0	0	45	1 (45)	0	0				
6:Nahuas de Chila (Guerrero)	*2	28	1 (28)	0	0	28	0.86 (24)	0.14 (4)	0	1 (56)	0	0	0.9
	*3	28	1 (28)	0	0	28	1 (28)	0	0				
7:Nahuas de Santo Domingo (Morelos)	*2	178	0.97 (173)	0.03 (5)	0	178	0.77 (137)	0.22 (40)	0.01 (1)	0.99 (351)	0.01 (5)	0	0.88
	*3	178	1 (178)	0	0	178	1 (178)	0	0				
8:Nahuas de Miipa Alta (D.F.)	*2	11	1 (11)	0	0	11	1 (11)	0	0	1 (22)	0	0	1
	*3	11	1 (11)	0	0	11	1 (11)	0	0				
9:Nahuas de Coyoláto (Veracruz)	*2	28	0.96 (27)	0.04 (1)	0	28	0.89 (25)	0.11 (3)	0	0.98 (55)	0.02 (1)	0	0.9
	*3	28	1 (28)	0	0	28	1 (28)	0	0				
10:Nahuas de Necoxtla (Veracruz)	*2	32	0.97 (31)	0.03 (1)	0	32	1 (32)	0	0	0.98 (63)	0.02 (1)	0	1
	*3	32	1 (32)	0	0	32	1 (32)	0	0				
Nahuas en total	*2	322	0.98 (314)	0.02(8)	0	322	0.85 (274)	0.15 (47)	0.003 (1)	0.99 (636)	0.01 (8)	0	0.92
	*3	322	1 (322)	0	0	322	1 (322)	0	0				
Indígenas en total	*2	495	0.96 (477)	0.03 (17)	0.002 (1)	495	0.89 (441)	0.10 (53)	0.002 (1)	0.98 (971)	0.02 (19)	0	0.94
	*3	495	1 (495)	0	0	495	1 (495)	0	0				
11.Mestizos	*2	243	0.93 (225)	0.07 (17)	0	243	0.84 (203)	0.16 (39)	0.004 (1)	0.97 (459)	0.03 (17)	0	0.9
	*3	243	1 (243)	0	0	243	1 (243)	0	0				

g= frecuencia genotípica, a= frecuencia alélica, n= numero de alelos, Hn= homocigoto normal, Ht= heterocigoto y Hm=

Nota: El cálculo de las frecuencias se realizó tomando como 100% equivale a 1.

7.4.2 EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG

Se calculó el Equilibrio de Hardy-Weinberg para cada población mediante la siguiente fórmula:

$$1 = p^2 + 2pq + q^2$$

Los datos obtenidos para la población indígena y mestiza mexicana analizadas se muestran en la tabla No.10.

Tabla No.10 EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG DE LA POBLACIÓN INDÍGENA Y MESTIZA MEXICANA					
Genotipo	N	Frecuencia observada	IC 95%	Frecuencia esperada*	Eq. H-W
Población indígena mexicana					
CYP2C9*1/*1	477	0.96	0.95-0.99	0.96	4.07
CYP2C9*1/*2	17	0.03	0.006-0.044	0.03	
CYP2C9*2/*2	1	0.002	-0.002-0.005	0.003	
CYP2C19*1/*1	441	0.89	0.87-0.98	0.89	0.07
CYP2C19*1/*2	53	0.10	0.006-0.116	0.10	
CYP2C19*2/*2	1	0.002	-0.005-0.014	0.002	
Población mestiza mexicana					
CYP2C9*1/*1	226	0.93	0.88-0.95	0.93	0.32
CYP2C9*1/*2	17	0.07	0.04-0.11	0.07	
CYP2C9*2/*2	0	0	-	0	
CYP2C19*1/*1	203	0.84	0.70-1.02	0.84	0.36
CYP2C19*1/*2	39	0.16	-0.29-0.28	0.15	
CYP2C19*2/*2	1	0.004	-0.007-0.013	0.007	

*Calculado mediante Hardy-Weinberg

Se observó que tanto la población indígena como la población mestiza se encuentran en equilibrio, ya que tanto las frecuencias observadas como las esperadas son muy similares, también tomando en cuenta que cada uno de los valores obtenidos de χ^2 resultaron menores de 5.99 (gl=2 al 95%) se puede asumir, que ambas poblaciones se encuentran en equilibrio.

7.4.3 PRUEBA DE χ^2

Las frecuencias genotípicas obtenidas para *CYP2C9* y *CYP2C19* de la población indígena fueron comparadas con las observadas en la población mestiza (tabla No.11). Sólo se analizaron las frecuencias de los genotipos heterocigotos, ya que los genotipos homocigotos silvestres no son relevantes, porque son los que se encuentran en mayor proporción dentro de una población. Por otra parte, los datos obtenidos para los genotipos homocigotos mutados son despreciables ya que presentan un valor de cero en prácticamente todos los grupos estudiados. El grado de significancia se asumió como $P < 0.05$.

Tabla No.11 PRUEBA DE χ^2 ENTRE AMBOS GRUPOS DEL PRESENTE TRABAJO				
Genotipo	Frecuencia		χ^2	p
	Indígenas	Mestizos		
<i>CYP2C9</i> *1/*2	3%	7%	5.37	0.02
<i>CYP2C19</i> *1/*2	10%	16%	4.26	0.039

Tanto el genotipo *CYP2C9*1/*2* ($p=0.02$) como *CYP2C19*1/*2* ($p=0.039$) mostraron una diferencia estadísticamente significativa, en cuanto a las frecuencias presentes en ambas poblaciones. Esto puede deberse a que a pesar de que los grupos indígenas no son totalmente puros, genéticamente hablando, se encuentran más conservados debido a su aislamiento, en comparación con la población mestiza.

También se compararon las frecuencias genotípicas encontradas para el grupo nahua (grupo mexicano mayoritario de la población indígena) con las de la población mestiza (tabla No.12) Se observó que la diferencia para el genotipo *CYP2C9*1/*2* es más significativa ($p=0.009$) que para el conjunto de la población indígena estudiada, pero es menor para el genotipo *CYP2C19*1/*2* ($p=0.63$).

Tabla No.12 PRUEBA DE χ^2 ENTRE LA POBLACIÓN NAHUA Y LA MESTIZA				
Genotipo	Frecuencia		χ^2	p
	Nahuas	Mestizos		
<i>CYP2C9*1/*2</i>	2%	7%	6.65	0.0098
<i>CYP2C19*1/*2</i>	15%	16%	0.23	0.63

También se realizó la comparación de las frecuencias genotípicas obtenidas de *CYP2C9*1/*2* y *CYP2C19*1/*2* entre cada uno de los grupos indígenas (tabla No.13 y No.14).

Tabla No.13 PRUEBA DE χ^2 PARA CYP2C9*1/*2 ENTRE LOS GRUPOS INDÍGENAS				
Población	Frecuencia		χ^2	p
Otomies vs Tarahumaras	9%	2%	2.21	0.13
Otomies vs Nahuas de Zitlala	9%	2%	2.29	0.13
Otomies vs Nahuas de Santo Domingo	9%	3%	4.80	0.03
Otomies vs Nahuas de Coyolillo	9%	4%	0.96	0.33
Otomies vs Nahuas de Necoxtla	9%	3%	1.26	0.26
Tzeltales vs Tarahumaras	6%	2%	0.78	0.38
Tzeltales vs Nahuas de Zitlala	6%	2%	0.85	0.36
Tzeltales vs Nahuas de Santo Domingo	6%	3%	1.08	0.29
Tzeltales vs Nahuas de Coyolillo	6%	4%	0.25	0.62
Tzeltales vs Nahuas de Necoxtla	6%	3%	0.38	0.54

En la tabla No.13, se muestra la comparación de las frecuencias obtenidas para CYP2C9*1/*2 entre cada uno de los grupos indígenas analizados, observando diferencia estadísticamente significativa entre los otomies (9%) y los nahuas de Santo Domingo (3%) ya que presentan un valor de $p=0.03$. Esto podría deberse a que los otomies han conservado más sus raíces y se han mezclado menos que otros grupos, mostrando así una frecuencia muy baja, en comparación con los nahuas de Santo Domingo, que claramente se observa que es un grupo mestizado por su cercanía con el Distrito Federal.

Tabla No.14 PRUEBA DE χ^2 PARA CYP2C19*1/*2 ENTRE LOS GRUPOS INDÍGENAS				
Población	Frecuencia		χ^2	p
Nahuas de Santo Domingo vs Nahuas de Chila	22%	14%	0.96	0.33
Nahuas de Santo Domingo vs Nahuas de Coyolillo	22%	11%	2.02	0.16
Nahuas de Santo Domingo vs Tarahumaras	22%	9%	3.96	0.046
Nahuas de Chila vs Nahuas de Coyolillo	14%	11%	0.16	0.69
Nahuas de Chila vs Tarahumaras	14%	9%	0.46	0.49
Nahuas de Coyolillo vs Tarahumaras	11%	9%	0.05	0.82
Tarahumaras vs Otomíes	9%	2%	3.24	0.07
Tarahumaras vs Tzeltales	9%	3%	0.99	0.32

Nota: Para la elaboración de cada uno de los análisis de χ^2 los gl=1.

En la tabla No.14, se muestran los resultados del análisis de χ^2 de las frecuencias obtenidas para CYP2C19*1/*2 en cada uno de los grupos indígenas analizados, en donde se puede observar que existe diferencia significativa entre los nahuas de Santo Domingo de Morelos (22%) y los tarahumaras de Chihuahua (9%) ya que presentan un valor de $p=0.046$. Lo que podría deberse, de igual forma que en el caso anterior (tabla No.13), ya que la población tarahumara es un grupo más conservado debido a que ha existido menor mezcla con otros grupos en comparación con los nahuas de Santo Domingo, que es un grupo más mestizado.

Por otra parte en la tabla No.15 se muestra la comparación entre los datos obtenidos en este estudio y los reportados en otras poblaciones.

Tabla No.15 FRECUENCIAS ALÉLICAS DE CYP2C9*1, *2 y *3 y CYP2C19 *1, *2 y *3 EN DIFERENTES POBLACIONES A NIVEL MUNDIAL									
POBLACIÓN	CYP2C9				CYP2C19				REFERENCIAS
	n	*1	*2	*3	n	*1	*2	*3	
Caucásica	0.2-1 %				2-3%				Meyer U. A., 2000. / Mizutani T., 2003.
Española	102	0.75	0.16	0.10					Dorado P., et al. 2003.
Norte americana / Europea-americana	325	0.78	0.15	0.07	105	0.87	0.13	0	Gaedigk A., et al., 2001. / Goldstein J. A., et al., 1997.
Boliviana	778	0.92	0.05	0.03	778	0.92	0.08	0.001	Heydy V., et al., 2005.
Asiática	2-3 %				19%				Meyer U. A., 2000. / Mizutani T., 2003
Egipcia	247	0.82	0.12	0.06	247	0.89	0.11	0.002	Hamdy S. I., et al., 2002.
Iraní	160	0.79	0.11	0.10					Peyvandi F., et al., 2002.
Turca	499	0.79	0.11	0.10	404	0.88	0.12	0.004	Aynacioglu A. S., Brockmoller J., et al., 1999. / Aynacioglu A. S., Sachse C., et al. 1999.
Europea									
Británica	200	0.79	0.13	0.09					Stubbins M. J., et al., 1996.
Alemana	367	0.82	0.11	0.08	328	0.84	0.16	0.002	Cascobi J., et al., 1996. / Aynacioglu A. S., et al., 1999.
Italiana	157	0.80	0.11	0.09					Scordo M. G., et al., 2001.
Sueca	430	0.82	0.11	0.07	160	0.83	0.17	0	Yasar U., et al., 1999. / Chang M., et al. 1995.
Oriental					10-25%				Meyer U. A., 2000.
China	102	0.95	0	0.05	121	0.50	0.50	0.005	Gaedigk A., et al., 2001. / Wang S. L., et al., 1995.
Japonesa	218	0.98	0	0.02	106	0.67	0.23	0.104	Nasu K., et al., 1997. / Goldstein J. A., et al., 1997.
Coreana	574	0.99	0	0.01	103	0.68	0.21	0.12	Yoon Y. R., et al. 2001. / Roh H. K., et al., 1996.
Taiwanesa	196	0.97	0	0.03	236	0.63	0.32	0.055	Sullivan-Klose T. H., et al., 1996. / Goldstein J. A., et al., 1997.
Africana									
Afro-Americana	120	0.95	0.03	0.01	216	0.75	0.25	0	Dickmann L. J., et al., 2001. / Goldstein J. A., et al., 1997.
Amerindia									
Nativa canadiense	114	0.91	0.03	0.06	115	0.81	0.19	0	Gaedigk A., et al., 2001. / Nowak M. P., et al., 1998.
Mexico-americana	97	0.74	0.15	0.10	346	0.90	0.10	0.001	Llerena A., et al., 2004. / Gonzalez H. M., et al., 2003.
Indígena mexicana	495	0.98	0.02	0	495	0.94	0.06	0	"Este estudio"
Mestiza mexicana	243	0.97	0.03	0	243	0.92	0.08	0	"Este estudio"

En cuanto a *CYP2C9*2* en el presente estudio se muestra una frecuencia alélica del 3% para la población mestiza y del 2% para la indígena, por lo que se realizó la comparación de ambos grupos con la población boliviana (5%), afro-americana (3%) y nativa canadiense (3%) (tabla No.16), ya que como se observa son las frecuencias más parecidas a las encontradas. Sólo se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la población boliviana y la indígena mexicana ($p=0.00002$).

Tabla No.16 PRUEBA DE χ^2 PARA <i>CYP2C9*2</i> EN LA POBLACIÓN MEXICANA EN COMPARACIÓN CON OTRAS POBLACIONES					
Población	Frecuencias		χ^2	p	
Boliviana	5%	M	3%	2.71	0.09
		I	2%	17.51	0.00002
Afro-americana	3%	M	3%	0.7	0.79
		I	2%	1.15	0.28
Nativa canadiense	3%	M	3%	0.02	0.88
		I	2%	1.43	0.17

M: población mestiza e I: población indígena.

Por otra parte, el análisis de la frecuencia alélica de *CYP2C19*2*, en comparación con las frecuencias alélicas de la población mestiza (8%) y la indígena (6%) con la de la población egipcia (11%), mexico-americana (10%) y la boliviana se muestran en la tabla No.17. Se observa diferencia estadísticamente significativa de la población indígena mexicana con cada una de las poblaciones analizadas y que podría explicarse, ya que la población indígena se encuentra más conservada (genéticamente) a diferencia de la mestiza que es resultado de la mezcla de diversas raíces genéticas a través del tiempo.

Tabla No.17 PRUEBA DE χ^2 PARA CYP2C19*2 EN LA POBLACIÓN MEXICANA EN COMPARACIÓN CON OTRAS POBLACIONES					
Población	Frecuencias			χ^2	p
	Egipcia	11%	M		
I			6%	13.98	0.00018
Mexico-americana	10%	M	8%	0.83	0.36
		I	6%	11.62	0.00065
Boliviana	8%	M	8%	0.09	0.75
		I	6%	28.77	0.0000001

M: población mestiza e I: población indígena.

Por lo que respecta al alelo *3, para ambos genes la frecuencia fue de 0%, ya que no se presentó en la totalidad de los individuos analizados.

En contraste con lo que se ha reportado en otras poblaciones respecto a CYP2C9*3, donde se muestran frecuencias muy bajas pero no ausencia como tal, a diferencia de CYP2C19*3 en donde la frecuencia de diversas poblaciones es similar: europeo-americana, sueca, afro-americana y la nativa canadiense. Por otra parte los datos contrastan en ambos casos con lo informado para diversas poblaciones, por ejemplo, para el alelo CYP2C9*3 en la población turca, iraní, española e incluso la población mexico-americana, que presentan valores hasta de 10%, o las frecuencias reportadas para el alelo CYP2C19*3, en la población coreana y japonesa que reportan datos hasta de 12%.

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

Se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas para *CYP2C9**2, *CYP2C9**3, *CYP2C19**2 y *CYP2C19**3 en 243 individuos mestizos y 495 indígenas mexicanos, siendo un mayor número de individuos de los que inicialmente se habían propuesto.

En el total de las muestras analizadas se encontraron individuos que presentaban alguno de los tres fenotipos metabolizadores posibles (MR, MI y MP).

La población indígena presentó una frecuencia de 96% para *CYP2C9* y de 89% para *CYP2C19* correspondientes a individuos con un metabolismo rápido y 3% para *CYP2C9* y 10% para *CYP2C19* en la población mestiza. Los individuos con metabolismo intermedio en la población indígena fue 3% para *CYP2C9* y 10% para *CYP2C19* y para la población mestiza fue 7% para *CYP2C9* y 16% para *CYP2C19*. Y en cuanto a la frecuencia de metabolizadores lentos la frecuencia correspondiente a la población indígena es de 0.2% para *CYP2C9* y de 0.2% *CYP2C19*, para la población mestiza fue de 0% *CYP2C9* y de 0.4% para *CYP2C19*.

Tomando en cuenta que estos fenotipos metabolizadores son debidos al alelo *2 únicamente, ya que no se encontró la presencia del alelo *3 en ninguno de los casos.

La frecuencia alélica de *CYP2C9**2 fue 3% en población mestiza mexicana, de manera similar a lo reportado en población boliviana (5%) e igual que para afro-americana (3%) y nativa canadiense (3%). En cuanto a la población indígena mexicana (2%) sólo la población afro-americana (3%) y la nativa canadiense (3%) presentaron datos similares. La ausencia del alelo *CYP2C9**3 en mestizos e

indígenas mexicanos, no fue similar a lo reportado en las poblaciones antes mencionadas.

Por otro lado, para el caso de la frecuencia alélica de *CYP2C19*2* encontrada en este estudio en la población mestiza (8%) y en la indígena (6%) muestra similitud entre si, con la población egipcia (11%), mexico-americana (10%) y boliviana (8%). En lo que respecta al alelo *CYP2C19*3* tanto la población europeo-americana, sueca, afro-americana y la nativa canadiense muestran una frecuencia de 0%, como lo determinado para la población indígena y mestiza aquí es estudiada.

Los resultados de este estudio, contribuyen a un mayor conocimiento de la estructura genética en la población mestiza e indígena mexicana. En particular, son importantes para considerarlos en la evaluación de la respuesta clínica y en la aparición de efectos adversos producidos por los fármacos, que son sustratos de las enzimas *CYP2C9* y *CYP2C19*, en especial de los que presentan una ventana terapéutica estrecha.

PERSPECTIVAS A FUTURO

- Se analizarán más polimorfismos presentes en otros CYPs, enzimas de fase II, transportadores, receptores, etc.
- Contar con bases de datos correspondientes a cada individuo en cuanto a su perfil genético.
- La aplicación de la farmacogenética en la práctica clínica, podrá aportar información valiosa para de esta forma minimizar los efectos adversos.
- Permitirá dar una farmacoterapia más segura y eficaz, al permitir identificar aquellos sujetos portadores de genes de susceptibilidad ya sea al efecto o a los eventos adversos de diferentes agentes terapéuticos (farmacoterapia personalizada).
- En el área de investigación, se aportarán datos para una selección más adecuada de posibles candidatos, mejorando los criterios de inclusión y exclusión.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Alexanderson B., Evans D. A. y Sjoqvist F. Steady-state plasma levels of nortriptyline in twins: influence of genetic factors and drug therapy. *Br J Med* 1969;4:764–8.
2. Aynacioglu A. S, Brockmoller J, Bauer S, et al. Frequency of cytochrome P-450 CYP2C9 variants in Turkish population and functional relevance for phenytoin. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:409-15.
3. Aynacioglu A. S, Sachse C, Bozkurt A, et al. Low frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in Turkish population. *Clin Pharmacol Ther* 1999;66:185-92.
4. Bae J. W, Kim H. K, Kim J. H, et al. Allele and genotype frequencies of CYP2C9 in a Korean population. *Br J Clin Pharmacol* 2007;60(4):418–22.
5. Brosten K. Isozyme specific drug oxidation: genetic polymorphism and drug-drug interactions. *Nord J Psychiatry* 1993;47(30):21-6.
6. Buentello M. L, Peñaloza E. R. I, Salamanca G. F, et al. Genetic Admixture of Eight Mexican Indigenous Populations: Based on Five Polymarker, HLA-DQA1, ABO, and RH Loci. *Am J Hum Biol* 2008;20:647–50.
7. Buffone G. J. y Darlington G. J. Isolation of DNA from biological specimens, without extraction with phenol. *Clin Chem* 1985;31:164-5.
8. Burmester J. K, Sedova M, Shapero M. H, et al. DMET Microarray Technology for Pharmacogenomics-Based Personalized Medicine. *Methods Mol Biol* 2010;632:99-124.

-
-
9. Cascobi I, Ackermann E, Sachse C, et al. A novel CYP2C9 intron 2T/C transition and linkage to mutations Leu359 and Cys144. *Clin Pharmacol Ther* 1998;63:198.
 10. Conney A. H. Induction of microsomal cytochrome P-450 enzymes. *Life Sci* 1986;39:2493-518.
 11. Consejo Nacional de Población con base en el XII Censo General de Población y Vivienda, 2000 (http://www.conapo.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=37&Itemid=235 Fecha de última consulta:11-01-10).
 12. Coutts R. T. y Urichuk L. J. Polymorphic cytochromes P450 and drugs used in psychiatry. *Cell Mol Neurobiol* 1999;19:325-54.
 13. Crettol S, Petrovic N y Murraya M. Pharmacogenetics of Phase I and Phase II Drug Metabolism. *Current Pharmaceutical Design* 2010;16:204-19.
 14. Chang M, Dahl M. L, Tybring G, et al. Use of omeprazole as a probe drug for CYP2C19 phenotype in Swedish Cucasians: comparison with S-mephenytoin hydroxylation phenotype and CYP2C19 genotype. *Pharmacogenetics* 1995;5:358-63.
 15. Chapple C. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P-450-dependent monooxygenases. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998;49:311-43.
 16. Chowbay B, Zhou S. y Lee E. J. An interethnic comparison of polymorphisms of the genes encoding drug-metabolizing enzymes and drug transporters: experience in Singapore. *Drug Metab Rev* 2005;37:327-78.

-
-
17. Dickmann L. J, Rettie A. E, Kneller M. B, et al. Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9*5) expressed among African Americans. *Mol Pharmacol* 2001;60:382–7.
18. Donahue S, Flockart D. A. y Abernathy D. R. Ticlopidine inhibits phenytoin clearance. *Clin Pharmacol Ther* 1999;66:563-8.
19. Donato M. T. ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona?, 2003. (www.uv.es/jcastell/Citocromo_P450.pdf Fecha de última consulta:07-02-09).
20. Dorado P, Berez R, Norberto M. J, et al. CYP2C9 genotypes and diclofenac metabolism in Spanish healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;59:221-5.
21. Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, et al. Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol* 1979;16:183–7.
22. Evans W. E. y Relling M. V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999;286:487–91.
23. Flockhart D. A. Drug interactions and the cytochrome P450 system: a role of cytochrome P450 2C19. *Clin Pharmacokinet* 1995;29(1):45-52.
24. Flockhart D. A. Drug Interactions: Cytochrome P450 drug interaction table. *Indiana University School of Medicine*, 2007. (<http://medicine.lupui.edu/clinpharm/ddis/> Fecha de última consulta: 30-01-10).
25. Fossi M. C, Massi A. y Leonzio C. Blood esterase inhibition in birds as an index of organophosphorus contamination: field and laboratory studies *Etoxicology* 1994;3(1).

-
26. Gaedigk A, Casley W. L, Tyndale R. F, et al. Cytochrome P-450C9 (CYP2C9) allele frequencies in Canadian Native Indian and Inuit populations. *Can J Physiol Pharmacol* 2001;79:841-7.
27. Galli E. y Feijoo L. Citocromo P-450 y su importancia clínica. *Neuro-Psiquiatría* 2002;65:187-90.
28. Gelboin H. V. Benzopyrene metabolism, activation, and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol* 1980;60:1107-66.
29. Goldstein J. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52(4):349-55.
30. Goldstein J. A, Ishizaki T, Chiba K, et al. Frequencies of the defective CYP2C19 alleles responsible for the mephenytoin poor metabolizer phenotype in various Oriental, Caucasian, Saudi Arabian and American black populations. *Pharmacogenetics* 1997;7:59-64.
31. González F. J. Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:346-52.
32. González F. J. The study of xenobiotic-metabolizing enzymes and their role in toxicity in vivo using targeted gene disruption. *Toxicol Lett* 1998;102-103:161-6.
33. González H. M, Romero E. M, Peregrina A. A, et al. CYP2C19 and CYP3A4 dependent omeprazole metabolism in West Mexicans. *J Clin Pharmacol* 2003;43(11):1211-5.

-
-
34. Gotoh O. Substrate recognition sites in cytochrome P-450 family 2 (CYP2) protein from comparative analysis of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* 1992;267:83-90.
35. Graham S. E. y Peterson J. A. How similar are P-450s and what can their differences teach us. *Arch Biochem Biophys* 1999;369:24-9.
36. Grozinger M, Hartter S, Hiemke C, et al. Interaction of modafinil and clomipramine as comedication in a narcoleptic patient. *Clin Neuropharmacol* 1998;21:127-9.
37. Guengerich F. P. Human cytochrome P450 enzymes. *Life Sci* 1992;50:1471-8.
38. Hamdy S. I, Hiratsuka M, Narahara K, et al. Allele and genotype frequencies of polymorphic cytochromes P450 (CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 53(6):596-603.
39. Hemeryck A, De Vriendt C. y Belpaire F. M. Inhibition of CYP 2C9 by 7 selective serotonin reuptake inhibitors: in vitro studies with tolbutamide and (S)-warfarin using human liver microsomes. *Eur J Clin Pharmacol* 1999;54:947-51.
40. Heydy V, Villalta B, Yamamoto K, et al. Genetic polymorphism of CYP2C9 and CYP2C19 in a Bolivian population: an investigative and comparative study. *Eur J Clin Pharmacol* 2005;61(3):179-84.

-
-
41. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 1993;11(9):1026-30.
42. Ingelman S. M. Drug metabolic enzymes:genetic polymorphisms. *Life Sci* 2005. (doi:10.1038/npg.els.0006015).
43. Inoue K, Inazawa J, Suzuki Y, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of chromosomal localization of three human cytochrome P450C genes (CYP2C8, 2C9, 2C10) at 10q24.l. *J Hum Genet* 1994;39:337-43.
44. Itagaki F, Homma M, Yuzawa K, et al. Effect of lansoprazole and rabeprazole on tacrolimus pharmacokinetics in healthy volunteers with CYP2C19 mutations. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56(8):1055-9.
45. Kent U. M, Juschyshyn M. I. y Hollenberg P. F. Mechanism-based inactivators as probes of cytochrome P-450 structure and function. *Curr Drug Metab* 2001;2:215-43.
46. Klassen C. y Curtis D. Manual de toxicología, 5ª ed., Mc Graw Hill Interamericana editores SA de CV. México, 1999.
47. Klose T. H. S, Ghanayem B. I, Bell D. A, et al. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics* 1996;6(4):341-9.
48. Ko J. W, Sukhova N, Thacker D, et al. Evaluation of omeprazole and lansoprazole as inhibitors of cytochrome P450 isoforms. *Drug Metab Dispos* 1997;25:853-62.

-
-
49. Kubista M, Andrade J. M, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006;27:95-125.
50. Kumar V, Wahlstrom J. L, Rock D. A, et al. CYP2C9 inhibition: impact of probe selection and pharmacogenetics on *in vitro* inhibition profiles. *Drug Metab Dispos* 2006;34:1966–75.
51. Llerena A, Dorado P, O’Kirwan F, et al. Lower frequency of *CYP2C9*2* in Mexican-Americans compared to Spaniards. *J Pharmacogenomics* 2004;4:403-6.
52. Lin H. y Lu A. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 1998;35(5):361-90.
53. Liska D. A. The detoxification enzyme systems. *Alt Med Rev* 1998;3(3):187-98.
54. Llibre J. M, Romeu J, Lopez E, et al. Severe interaction between retonavir and acenocoumarol. *Ann Pharmacother* 2002;36:621-3.
55. López L. M, Guerrero C. J, Familiar L. I, et al. Farmacogenómica: búsqueda de la terapia personalizada. *Neurol* 2004; 39(11):1063-71.
56. Mahgoub A, Idle J. R, Dring L. G, et al. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* 1977;2:584–6.
57. Maniatis F, Fritsh E. F. y Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. *New York: Laboratory Cold Spring Harber* 1982:458-60.
58. Manolopoulos V. G. Pharmacogenomics and adverse drug reactions in diagnostic and clinical practice. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(7):801-14.

-
59. Manyike P. T, Kharasch E. D, Kalhorn T. F, et al. Contribution of CYP2E1 and CYP3A to acetaminophen reactive metabolite formation. *Clin Pharmacol Ther* 2000;67:275-82.
60. McLeod H. L. Pharmacogenetics: more than skin deep. *Nat Genet* 2001;29:247-8.
61. McLeod H. L. y Evans W. E. Pharmacogenomics: unlocking the human genome for better drug therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:101-21.
62. Meyer U. A. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 2000;356:1667-71.
63. Miller S. A, Dykes D. D. y Polesky H. F. A salting out method for DNA preparation. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
64. Miners J. O. y Birkett D. J. Cytochrome P450C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 1998;45:525-38.
65. Mizutani T. PM frequencies of major CYPs in Asians and Caucasians. *Drug Metab* 2003;35:99-106.
66. Motulsky A. G. y Qi M. Pharmacogenetics, pharmacogenomics and ecogenetics. *J Zhejiang Univ Sci* 2006;7(2):169-70.
67. Nagata K. y Yamazoe Y. Genetic polymorphism of human cytochrome P450 involved in drug metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet* 2002; 17(3):167-89.

-
68. Nasu K, Kubota T. y Ishizaki T. Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in Japanese population. *Pharmacogenetics* 1997;7:405-9.
69. Nebert D. W, Nelson D. R, Adesnik M, et al. The P4S0 gene superfamily: update on the naming of new genes and nomenclature of chromosomal loci. *DNA* 1989;8:1-13.
70. Nebert D. W. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: why is this relevant to the clinical geneticist? *Clinical Genetics* 1999;56:247-58.
71. Nebert D. W. y Russell D. W. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002;360(9340):1155-62.
72. Nelson D. R, Kamataki T, Waxman D. J, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 1993;12:1-51.
73. Newlands A. J, Smith D. A, Jones B. C, et al. Metabolism of non-steroidal anti-inflammatory drugs by cytochrome P4502C. *Br. J Clin Pharmacol* 1992;134:52.
74. Noguera S. R. y Ruiz G. R. El proyecto genoma humano. *Ciencias* 58 Abril -Junio, 2000 (http://www.alumno.unam.mx/algo_leer/Genoma.pdf Fecha de última consulta:09-01-10).
75. Nowak M. P, Sellers E. M. y Tyndale R. F. Canadian Native Indians exhibit unique CYP2A6 and CYP2C19 mutant allele frequencies. *Clin Pharmacol Ther* 1998;64:378-83.

-
-
76. Ohkubo Y, Ueta A, Ando N, et al. Novel mutations in the cytochrome P450 2C19 gene: a pitfall of the PCR-RFLP method for identifying a common mutation. *J Hum Genet* 2006;51:118–23.
77. Okey A. B. Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharm Ther* 1990;45:241-98.
78. Omura T. Forty years of cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266:690-98.
79. Omura T. y Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964;239: 2370-78.
80. Orellana B. M. y Guajardo T. V. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Med Chile* 2004;132:85-94.
81. Orozco L, González L, Chávez M, et al. Haplotype analysis of cystic fibrosis mutations in mexican patients. *Am J Med Gen* 2001;102(3):277-81.
82. Ortiz de Montellano, P. R. y De Voss J. J. Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P-450. *Nat Prod Rep* 2002;19:477-93.
83. Pelkonen O. y Raunio H. Metabolic activation of toxins: tissue-specific expression and metabolism in target organs. *Environ Health Perspect* 1997;4:767-74.
84. Peyvandi F, Spreafico M, Karimi M, et al. Allele frequency of CYP2C9 gene polymorphisms in Iran. *Thromb Haemost* 2002;88:874-5.

-
85. Proyecciones de indígenas de México y de las entidades federativas 2000-2010, CONAPO.
86. Raisman J. S. y González A. M. UNAM, 2006 (<http://www.biologia.edu.ar/genetica/genet4.htm> Fecha de última consulta:09-02-10).
87. Rasmussen B. B, Nielsen T. L. y Brosen K. Fluvoxamine inhibits the CYP 2C19-catalysed metabolism of proguanil in vitro. *Eur J Clin Pharmacol* 1998;54:735-40.
88. Rendic S. y Di Carlo F. J. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab* 1997; 29:413–580.
89. Rettie A. E. y Jones J. P. Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:477–94.
90. Roden D. M, Altman R. B, Benowitz N. L, et al. Pharmacogenomics: Challenges and Opportunities. *Ann Intern Med* 2006;145:749-57.
91. Rodríguez A. C, Gomez A, Karlgren M, et al. Molecular genetics and epigenetics of the cytochrome P450 gene family and its relevance for cancer risk and treatment. *Hum Genet* 2010;127:1–17.
92. Roh H. K, Dahl M. L, Tybring G, et al. CYP2C19 genotype and phenotype determined by omeprazole in Korean population. *Pharmacogenetics* 1996;6:547-51.

-
-
93. Roses A. D. Pharmacogenetics in drug discovery and development: a translational perspective. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(10):807-17.
94. Rubi C. R, Martinez C. G, Muñoz V. J. F, et al. Pre-hispanic mesoamerican demography approximates the present-day ancestry of mestizos throughout the territory of Mexico. *Am J Phys Anthropol* 2009;139(3):284–94.
95. Santiago C, Bandrés F. y Gómez-Gallego F. Polimorfismos de citocromo P450 papel como marcador biológico. *Medicina del Trabajo* 2002;11(3):130-40.
96. Schlichting I, Berendzen J, Chu K, et al. The catalytic pathway of cytochrome P-450cam at atomic resolution. *Science* 2000;287:1615-22.
97. Scordo M. G, Aklillu E, Yasar U, et al. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in Caucasian and a black African population. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:447-50.
98. Sheweita S. A. Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions. *Curr Drug Metab* 2000;1:107-32.
99. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, et al. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270(1):414-23.
100. Speed W. C, Kang S. P, Tuck D. P, et al. Global variation in CYP2C8 - CYP2C9 functional haplotypes. *Pharmacogenomics* 2009;9(4):283–90.

-
-
101. Stubbins M. J, Harries L. W, Smith G, et al. Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics* 1996;6(5):429-39.
102. Takada K, Arefayene M, Desta Z, et al. Cytochrome P450 pharmacogenetics as a predictor of toxicity and clinical response to pulse cyclophosphamide in lupus nephritis. *Arthritis & rheumatism* 2004;50(7):2202-10.
103. Tian C, Hinds D, Shigeta R, et al. A genomewide single nucleotide polymorphism panel for mexican american admixture mapping. *Am J Hum Genet* 2007;80:1014–23.
104. Vargas A. G, Gamboa R, Vergara Y, et al. LMP2 and LMP7 gene polymorphism in mexican populations: mestizos and amerindians. *Genes and Immunity* 2002;3:373-77.
105. Vesell E. S. y Page J. G. Genetic control of drug levels in man: phenylbutazone. *Science* 1968;159:1479-80.
106. Wang L. L, Li Y. y Zhou S. F. A bioinformatics approach for the phenotype prediction of nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms in human cytochrome P450s. *Drug Metab Dispos* 2009;37(5):977-91.
107. Wang S. L, Huang J, Lai M. D, et al. Detection of CYP2C9 polymorphism based on the polymerase chain reaction in Chinese. *Pharmacogenetics* 1995;5:37-42.
108. Waterman M. R. The P-450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 1987;6:1-11.

-
109. Wedlund P. The CYP2C19 enzyme polymorphism. *Pharmacology* 2000;61(3):174-83.
110. Wei L, Locuson C. W. y Tracy T. S. Polymorphic variants of CYP2C9: mechanisms involved in reduced catalytic activity. *Mol Pharmacol* 2007;72:1280–8.
111. Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *NEJM* 2003;348:529–537.
112. Welch R. M. Toxicological implications of drug metabolism. *Pharmacol* 1979;30:457-67.
113. Wester M. R, Lasker J. M, Johnson E. F, et al. CYP2C19 participates in tolbutamide hydroxylation by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2000;28:354–9.
114. Wilkinson G. R. Drug metabolism and variability among patients un drug response. *NEJM* 2005;352:2211-21.
115. Williams P. A, Cosme J, Sridhar Y, et al. Mammalian microsomal cytochrome P-450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell* 2000;5:121-31.
116. www.1.bp.blogspot.com/_W7tnZE1tW6A/SKfgmM3XaqI/AAAAAAAAAYl/8pG5ptp4dOw/s400/gene+shuffle.jpg Fecha de última consulta:02-02-10.
117. www.cnnexpansion.com/actualidad/2009/06/04/genoma-destapa-diferencias-de-mexicanos Fecha de última consulta:09-01-10.

-
118. www.cypalleles.ki.se Fecha de última consulta:18-01-10.
119. www.drnelson.utmem.edu/CytochromeP-450.html Fecha de última consulta:07-02-09.
120. www.elergonomista.com/farmacologia/metab.html Fecha de última consulta:22-11-09.
121. www.es.wikipedia.org/wiki/CYP2C9 Fecha de última consulta:02-02-10.
122. www.genecards.com Fecha de última consulta:01-02-10.
123. www.genecards.org/cgi-in/carddisp.pl?gene=CYP2C9&search=CYP2C9 Fecha de última consulta:29-03-09.
124. www.hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/yccr.coriell.org/PDF/NHGRI/Newsletters/hapmap1_es.pdf Fecha de última consulta:09-01-10.
125. www.hmg.oxfordjournals.org/content/vol15/suppl_1/images/large/ddl08701.jpeg Fecha de última consulta:02-04-09.
126. www.med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/clas4to/5_farmacodin.pdf Fecha de última consulta:09-02-10.
127. www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/posters/chromosome/omim.shtml#GeneMap Fecha de última visita:29-03-09.
128. www.signaturegenetics.com/public/gifs/img_226_02.jpg&imgrefurl=http://www.signaturegenetics.com/public/2/226.html&usg=__bX8XAZrgQh-hiehUKYCY3bHMQP8=&h=356&w=489&sz=56&hl=es&start=539&um=1&tbnl

d=Z4sd6sBGPxaEMM:&tbnh=95&tbnw=130&prev=/images%3Fq%3DCYP2C1
9%26nds%3D18%26hl%3Des%26sa%3DN%26start%3D522%26u%3D1
Fecha de última consulta:02-04-09.

129. www.uam.es/departamentos/medicina/farmacologia/especifica/Enfermeria/Enf_T3.pdf Fecha de última consulta:20-11-09.

130. www.uv.es/jcastell/Metabolismo_de_xenobioticos.pdf. Fecha de última consulta:22-04-09.

131. Xiao Z. S, Goldstein J. A, Xie H. G, et al. Differences in the incidence of the CYP2C19 polymorphism affecting the S-mephenytoin phenotype in Chinese Han and Bai populations and identification of a new rare CYP2C19 mutant allele. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;281(1):604-9.

132. Yasar U, Eliasson E, Dahl M. L, et al. Validation of methods for CYP2C9 genotyping: frecuencies of mutant alleles in a Swedish population. *Biochem Biophys Res Cummun* 1999;254:628-31.

133. Yoon Y. R, Shon J. H, Kim M. K, et al. Frecuency of cytochrome P-450 2C9 mutant alleles in Korean population. *Br J Clin Pharmacol* 2001;51:277-80.

134. Zhou H. H, Anthony L. B, Wood A. J, et al. Induction of polymorphic 4'-hydroxylation of S-mephenytoin by rifampicin. *Br J Clin Pharmacol* 1990;30:471-5.

135. Zhou S. F. Drugs behave as substrates, inhibitors, and inducers of human cytochrome P450 3A4. *Curr Drug Metab* 2008;9:310-22.

136. Zhou S. F, Liu J. P, y Chowbay B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metabolism Reviews* 2009;41(2):289–95.

10. ANEXOS

GLOSARIO

Alelo forma alterna de un gen.

Amplificación un aumento del número de copias de un fragmento específico de ADN.

Electroforésis un método que permite separar grandes moléculas (como proteínas o fragmentos de ADN) en una mezcla de moléculas similares. Se pasa una corriente eléctrica por el medio de suspensión y cada molécula "viaja" por el medio a velocidades diferentes que dependen de su tamaño y carga eléctrica. La separación se basa en estas diferencias. La agarosa y los geles de acrilamida se usan comúnmente para separar ácidos nucleicos y proteínas.

Endonucleasa (del griego *endon* = dentro; *asa* = sufijo que indica actividad enzimática). Enzima que corta una molécula de ADN en un sitio interno de la secuencia de nucleótidos.

Endonucleasa de restricción Enzima que reconoce específicamente determinadas secuencias y corta a la molécula de ADN en ese sitio. De las bacterias se obtuvieron más de 400 enzimas que reconocen más de 150 diferentes secuencias de ADN (sitios de corte por enzimas de restricción).

Eucariotas (del griego *eu* = bueno, verdadero; *karyon* = núcleo, nuez) organismos caracterizados por poseer células con un núcleo verdadero rodeado por una membrana.

Exón región de un gen que contiene la información para producir la proteína (región codificante).

Farmacocinética el estudio de los procesos físico-químicos que sufre un fármaco cuando se administra o incorpora a un organismo. Estos procesos serían liberación, absorción, distribución, metabolización y eliminación.

Farmacodinamia ciencia que estudia el mecanismo de acción de los fármacos, es decir estudia como los procesos bioquímicos y fisiológicos dentro del organismo se ven afectados por la presencia del fármaco.

Farmacogenética es el estudio de la influencia de factores genéticos en la variación individual en la respuesta a los fármacos.

Farmacogenómica es más global ya que prevé el estudio de todo el conjunto de genes y su contribución a la variabilidad en la eficacia de los medicamentos y la toxicidad.

Farmacotecnia rama encomendada a la preparación de las drogas según administración individualizada.

Genes (del griego genos = nacimiento, raza; del latín genus = raza, origen) segmentos específicos de ADN que controlan las estructuras y funciones celulares; la unidad funcional de la herencia.

Genética: el estudio de la herencia de los caracteres.

Genoma: todo el material genético de los cromosomas de un organismo en particular (contenidos en una sola célula).

Heterocigoto que posee dos formas diferentes de un gen en particular; cada una heredada de cada uno de los progenitores.

Homocigoto que posee dos formas idénticas de un gen específico heredadas de cada uno de los progenitores.

Índice o ventana terapéutica es la dosis a la cual se produce la muerte en el 50% de una población determinada (DL_{50}) entre la dosis mínima necesaria para lograr el efecto deseado (DE_{50}).

Intrón la secuencia de bases de ADN que interrumpe la secuencia de un gen que codifica para una proteína (región no codificante).

Locus (plural = *loci*) posición de un gen en un cromosoma.

Mutación según Vries (1901) es cualquier cambio heredable en el material hereditario que no se puede explicar mediante segregación o recombinación. A partir de 1953, Watson y Crick se menciona que una mutación es cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos del ADN y que es la fuente primaria de variabilidad genética en las poblaciones y se encuentra presente en <1%.

Polifarmacia es el consumir más de 3 medicamentos simultáneamente (OMS).

Polimorfismo variación estable en un locus de la secuencia genética, que se detecta en el >1% de una población específica.

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) es el tipo más común de variación genética, y puede ocurrir cada 100 a 300 bases.

Posología el estudio de la dosificación de los fármacos.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de las iniciales en inglés *Polimerase Chain Reaction*) método de amplificación de una secuencia de bases del ADN usando una polimerasa termoestable y dos cebadores ("primers"), con lo que el objetivo es obtener un número determinado de copias a partir del fragmento inicial.

RFLP (del inglés **R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphisms; polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción) bajo esta sigla se reconoce las variaciones entre individuos de la longitud de los fragmentos de ADN cortados por enzimas de restricción. Este hecho generalmente es causado por mutaciones en el sitio de corte.

Sonda (del francés sonde, abreviación del anglosajón sundline) molécula de ADN o ARN monocatenario con una secuencia de bases específica, marcada radiactivamente o inmunológicamente, que se utiliza para detectar secuencias de bases complementarias por hibridación.

Toxicología el estudio de los efectos nocivos o tóxicos de los fármacos.