



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

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

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
Investigación biofarmacéutica

“Implicación de alelos de *CYP2C9*, *UGT2B7*, *GSTM1* y *GSTT1* en el tratamiento de epilepsia con ácido valproico”

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

Manuel Alejandro Barrón Cruz
2142800399

COMITÉ TUTORIAL

Tutora:
Dra. Marisol López López

Asesora:
Dra. Helgi Jung Cook

Asesora:
Dra. Nancy Monroy Jaramillo

Noviembre, 2016

**“Implicación de alelos de *CYP2C9*, *UGT2B7*, *GSTM1* y *GSTT1* en el
tratamiento de epilepsia con ácido valproico”**

Tutora: Dra. Marisol López López

Vo.Bo

Handwritten signature of Marisol López López in black ink, written over a horizontal line.

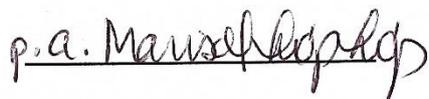
Asesora: Dra. Helgi Jung Cook

Vo.Bo.

Handwritten signature of Helgi Jung Cook in black ink, written over a horizontal line.

Asesor: Dra. Nancy Monroy Jaramillo

Vo.Bo.

Handwritten signature of Nancy Monroy Jaramillo in black ink, written over a horizontal line.

Alumno: Q. F. B. Manuel Alejandro Barrón Cruz

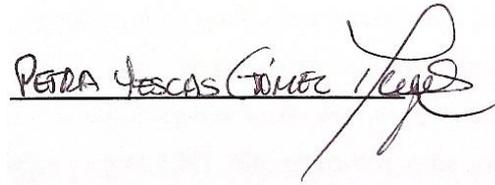
Handwritten signature of Manuel Alejandro Barrón Cruz in black ink, written over a horizontal line.

Matrícula 2142800399

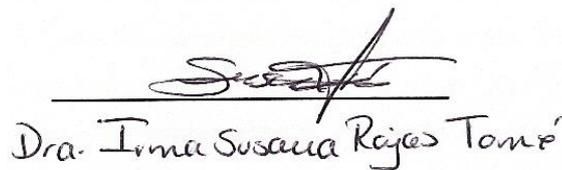
**“Implicación de alelos de *CYP2C9*, *UGT2B7*, *GSTM1* y *GSTT1* en el
tratamiento de epilepsia con ácido valproico”**

Miembros del Jurado

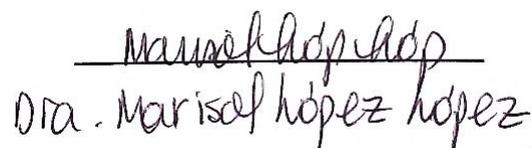
Presidente:


PETRA YESCAS GÓMEZ

Vocal:


Dra. Irma Susana Rojas Tomás

Secretario:


Dra. Marisol López López

RESUMEN

La epilepsia es un trastorno del sistema nervioso central caracterizado por una predisposición a sufrir crisis debidas a la actividad neuronal anormal, excesiva o sincrónica en el cerebro. El ácido valproico es un fármaco de primera línea para el tratamiento de crisis convulsivas en México. Los principales genes que codifican para las enzimas implicadas en el metabolismo y detoxificación del ácido valproico son *CYP2C9*, *UGT2B7*, *GSTM1* y *GSTT1*.

Se genotipificaron 86 pacientes para *UGT2B7* 801AT>TC, *UGT2B7* 161C>T, *UGT2B7* 372A>G y *CYP2C9* 430C>T, mediante PCR en tiempo real y se analizó la variación en el número de copias (CNV por sus siglas en inglés) de *GSTM1* y *GSTT1* por amplificación de sondas múltiples dependientes de ligando (MLPA). Se recopilaron los datos clínicos de los pacientes estudiados de los expedientes. Los pacientes en libertad de crisis presentaron dosis ajustadas y concentraciones plasmáticas significativamente menores que los pacientes sin libertad de crisis ($p<0.000$ y $p=0.034$). Se encontró que existen diferencias significativas entre los genotipos de la variante *UGT2B7* 801AT>TC, con respecto a las concentraciones de bilirrubina directa ($p=0.048$). Además, con respecto a la variante *UGT2B7* 161C>T, se encontraron diferencias significativas con respecto a las concentraciones de bilirrubina total ($p=0.024$) y bilirrubina directa ($p=0.032$). Los pacientes con CNV en los genes en *GSTM1* y *GSTT1* mostraron valores más altos de transaminasa glutámico oxalacética ($p=0.022$) y de bilirrubina total ($p=0.036$) que aquellos que portaban CNV en uno sólo de estos genes o en ninguno. Adicionalmente, mediante el uso del criterio del Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas de 1990, se encontró una asociación (prueba exacta de Fisher $p=0.005$) de la presencia de CNV en ambos genes, *GSTT1* y *GSTM1*, con daño hepático.

En conclusión, las variantes genéticas *UGT2B7* 801AT>TC, *UGT2B7* 161C>T y la presencia de CNV en los genes en *GSTM1* y *GSTT1* mostraron asociación con la tendencia al aumento de marcadores de daño hepático. Sin embargo, ninguno de los genotipos estudiados tuvo relación con la respuesta a la terapia farmacológica, la concentración plasmática, la concentración plasmática corregida o la dosis corregida por peso.

Agradecimientos institucionales

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología:

Por el apoyo brindado con una beca de manutención.

Número de beca: 612702

Universidad Autónoma Metropolitana:

Por el tiempo los recursos y todo el trabajo invertido en esta investigación
agradezco a:

Al Laboratorio de Genética Molecular del Departamento Sistemas Biológicos

A la Coordinación de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas.

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía:

Al Laboratorio de Neurogenética de la Unidad de Investigaciones Cerebrales

Agradecimientos personales

A mis padres, Alejandra Cruz Zavala y Manuel Barrón Servín, por el apoyo que siempre me han brindado, han sido mi guía y mi pilar, gracias por ser una constante en mi vida.

A mis hermanos Leonardo Barrón y Daniela Barrón, porque siempre me apoyaron como un equipo.

Al comité tutorial por brindar todo el apoyo, recursos, tiempo, conocimiento y paciencia para esta investigación.

A los colaboradores y amigos del laboratorio de genética molecular Yerye, Blanca y Mario, porque me ayudaron y contagiaron su entusiasmo.

A la M. en C. Ingrid Frike y el Dr. Alberto Ortega, asesores y amigos en los momentos más difíciles de esta investigación.

A los colaboradores y amigos del laboratorio de neurogenética Omar, Isaac, David, Juan, Edwin, Frida, Mónica, Evelin, Edgar, Francisco, Silvestre y Jessica, porque me mostraron una gran camaradería y aceptación en el grupo.

A mis amigos y excompañeros de trabajo quienes me apoyaron en mi decisión de emprender esta empresa gracias Jesica, Bety, Eric, Gerardo, Hugo, Yazmín, Alejandra, Diana Alejandra, Ulises, Andrés, Diana, Diego, Roberto y Julio Cesar.

Al Dr. Miguel Ramírez y al Dr. Tirso Zuñiga ya que sin su aportación esta investigación no hubiera sido posible.

A mis amigos de la maestría Javier, Jesús, Toño, Samuel, Nelly, Betsy, Juan Antonio, Nansi, Xochitl, Araceli, Aron, Eric, por hacer mejores los días de trabajo en el aula.

A mis amigos densos, por su apoyo incondicional Julia, Cesar y Luis Alberto.

A Nimsi Campos, porque sin ti este logro no habría sido posible, te doy las gracias.

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Epilepsia	2
2.1.1 <i>Definición, etiología y clasificación.</i>	2
2.2 Epidemiología y tratamiento	3
2.3 Ácido valproico	3
2.3.1 <i>Características generales</i>	3
2.3.2 <i>Farmacodinamia</i>	4
2.3.3 <i>Farmacocinética</i>	4
2.3.4 <i>Interacciones medicamentosas de ácido valproico</i>	6
2.3.5 <i>Reacciones adversas a medicamentos</i>	6
2.3.6 <i>Reacciones adversas a fármacos antiepilépticos</i>	7
2.3.7 <i>Variabilidad genética y reacciones adversas a medicamentos.</i> ..	10
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS.....	14
5.1 Objetivo general	14
5.2 Objetivos específicos	14
6. METODOLOGÍA	15
6.1. Tipo de estudio y sujetos	15
6.1.1. <i>Pacientes</i>	15
6.2. Muestras biológicas.....	16
6.2.1. <i>Toma de muestra, separación de fase leuco-plaquetaria, plasma y DNA.</i>	16
6.2.2. <i>Análisis cualitativo y cuantitativo del DNA</i>	16
6.3. Genotipificación de las muestras	16
6.3.1. <i>Criterios de análisis</i>	16
6.3.2. <i>Discriminación alélica mediante sondas TaqMan</i>	17
6.3.2. <i>Amplificación de sondas múltiples dependientes de ligando (MLPA).</i>	17
6.4. Concentraciones plasmáticas de ácido valproico y valores de marcadores de daño hepático	18
6.5. Respuesta al tratamiento con ácido valproico	18
6.6. Análisis estadístico.....	18
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20

7.1 Características demográficas de los pacientes	20
7.2 Frecuencias genóticas de <i>UGT2B7</i> y <i>CYP2C9</i> *2.....	22
7.3. Análisis de las concentraciones plasmáticas por grupo farmacológicos.....	23
7.3.1 <i>Relación de las concentraciones plasmáticas de ácido valproico en monoterapia y politerapia.</i>	23
7.3.2 <i>Relación entre grupos terapéuticos y las concentraciones plasmáticas de ácido valproico</i>	24
7.4. Relación de factores farmacocinéticas y respuesta.	25
7.4.1 <i>Relación entre control de crisis, dosis ajustadas y concentraciones plasmáticas de ácido valproico</i>	25
7.4.2 <i>Asociación de las variantes alélicas de CYP2C9 y UGT2B7 con la respuesta a ácido valproico.</i>	26
7.5 Relación de las variables farmacocinéticas, marcadores de daño hepático y genotipos de <i>UGT2B7</i> y <i>CYP2C9</i>	27
7.5.1 <i>Asociación de las variantes alélicas de CYP2C9 y UGT2B7 con las concentraciones plasmáticas ácido valproico.</i>	27
7.5.2 <i>Asociación de variantes genéticas de UGT2B7 y CYP2C9 con los niveles séricos de marcadores hepáticos</i>	30
7.5.3 <i>Daño hepático y genotipos de UGT2B7 y CYP2C9.</i>	33
7.6 Relación de <i>GSTM1</i> Y <i>GSTT1</i> con marcadores de daño hepático	34
7.6.1 <i>Asociación de variaciones en el número de copias en GSTM1 y GSTT1 con los niveles séricos de marcadores hepáticos</i>	34
7.6.2 <i>Daño hepático y variaciones en el número de copias en GSTM1/GSTT1</i>	37
8. CONCLUSIONES	40
9. BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXOS.....	44

1. ANTECEDENTES

La epilepsia es un trastorno del sistema nervioso central caracterizado por una predisposición a sufrir crisis debidas a la actividad neuronal anormal, excesiva o sincrónica en el cerebro. Se ha estimado que afecta entre 50-70 millones de personas en el mundo y ocupa el segundo lugar de los trastornos neurológicos más frecuentes después de la enfermedad vascular cerebral (1,2). En México existen entre 900,000 y 1.5 millones personas con epilepsia de las cuales tres cuartas partes son menores de 20 años (1). El tratamiento se basa principalmente en la terapia farmacológica y para ello se cuenta con un gran número de fármacos antiepilépticos (FAE), entre los que se encuentra el ácido valproico (VPA) que es ampliamente usado para el tratamiento de crisis convulsivas y en México es considerado un fármaco de primera línea (2,3).

Se ha observado una gran variabilidad en la respuesta a los FAE, incluido el VPA, con una tasa reportada de 30-40% (4,5). Además, el uso de VPA puede ocasionar reacciones adversas a medicamentos (RAM), de las cuales las más frecuentes son pérdida de memoria, temblor, exantema maculopapular, aumento de peso, hepatotoxicidad (HTX) y teratogénesis (6). Entre las RAM reportadas por el uso de VPA, las reacciones adversas hepáticas (RAH) tienen una frecuencia de 1/37,000 para pacientes adultos en monoterapia y de 1/12,000 en politerapia (7); sin embargo, cuando la falla hepática se presenta, suele ser grave o incluso fatal. Las RAH debidas al VPA están ligadas a la formación de 4-eno-VPA y 2-4-dieno-VPA-CoA, ambos metabolitos derivados de la ω -oxidación (mediada principalmente por CYP2C9), a su vez, la destoxicación de dichos compuestos es catalizada en la mitocondria por las glutatión-S-transferasas (GST) principalmente las variantes *mu* (GSTM1) y *theta* (GSTT1) (8).

Los polimorfismos de los genes que codifican para las enzimas implicadas en el metabolismo y destoxicación del VPA, como las variantes polimórficas de CYP2C9 y UGT2B7 y las CNV en los genes GSTM1 y GSTT1, pueden estar implicadas en la farmacocinética, en la farmacodinamia y en las RAM de este fármaco.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Epilepsia

2.1.1 Definición, etiología y clasificación.

La epilepsia es un trastorno del cerebro caracterizado por una predisposición a generar una ocurrencia transitoria de crisis epilépticas, las cuales, se definen como la presencia de signos y/o síntomas debidos a la actividad neuronal anormal, excesiva o sincrónica en el cerebro (1). Las convulsiones pueden ir desde episodios muy breves de ausencia o contracciones musculares hasta convulsiones prolongadas y graves(4).

El tipo más frecuente de epilepsia es la epilepsia idiopática (sin causa identificable) la cual afecta al 60% de las personas. Por su parte, la epilepsia con causas conocidas se denomina epilepsia secundaria o sintomática, la cual puede ser consecuencia de ciertos padecimientos como daño cerebral por lesiones prenatales o perinatales, malformaciones congénitas o alteraciones genéticas con malformaciones cerebrales asociadas, traumatismo craneoencefálico grave, accidente cerebrovascular que limita la llegada del oxígeno al cerebro, infecciones cerebrales como las meningitis y encefalitis o la neurocisticercosis, algunos síndromes genéticos y los tumores cerebrales (4). La etiología de la epilepsia es muy compleja debido a todos los factores que pueden desencadenar una convulsión, aunque se considera que las crisis son producto de un desequilibrio entre el sistema GABAérgico (inhibitorio) y el glutamatérgico (excitatorio) (9).

De acuerdo con la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE por sus siglas en inglés) y, con base en la etiología de las crisis convulsivas, la clasificación de la epilepsia es la siguiente: genética (cuando un defecto genético contribuye directamente a la epilepsia, antes conocidas como idiopáticas), estructural-metabólica (cuando existe una alteración estructural o metabólica cerebral que predispone a la epilepsia, antes conocida como sintomática) y de causa desconocida (antes conocidas como criptogénicas) (10).

2.2 Epidemiología y tratamiento

Se ha estimado que la epilepsia afecta entre 50-70 millones de personas en el mundo (4,11), y ocupa el segundo lugar de los trastornos neurológicos más frecuentes después de la enfermedad vascular cerebral. En México existen entre 900,000 y 1.5 millones personas con epilepsia, de las cuales tres cuartas partes son menores de 20 años (12,13). De acuerdo a la guía de práctica clínica SS-210-09, en el 2011 en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, se observó una prevalencia de 3.9 por cada 1000 habitantes, y se observó que durante este mismo año se presentaron 3,456 consultas de primera vez, de las cuales 578 (16.72%) fueron en pacientes diagnosticados con epilepsia (14).

La mayoría de los pacientes con epilepsia requieren medicación a largo plazo con FAE, y los más utilizados son VPA, carbamazepina (CBZ), fenitoína (PHT), lamotrigina (LTG), topiramato (TPM), clonazepam (CZP), levetiracetam (LEV), oxcarbacepina (OXC), clobazam (CLB), primidona (PRM), fenobarbital (PB), pregabalina (PGB), etosuximida (ESM), diazepam (DZM), y gabapentina (GBP), entre otros. La terapia farmacológica es efectiva en el manejo de la epilepsia en el 70% de los casos (2,4,15).

2.3 Ácido valproico (VPA)

2.3.1 Características generales

La molécula de VPA consiste en un ácido graso de cadena corta y ramificada también conocido como ácido 2-propilpentanoico. Está indicado en diversos padecimientos neurológicos como la epilepsia, migraña y desorden bipolar. Es un fármaco de primera elección para el tratamiento de crisis epilépticas en el adulto y en la epilepsia mioclónica juvenil (2). Sus características fisicoquímicas en condiciones estándares se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de ácido valproico.

Fórmula mínima	$C_8H_{16}O_2$
Peso molecular	144.2g/mol
Apariencia	Líquido incoloro
pKa	4.8
Solubilidad	1.3 mg/mL (muy soluble en disolventes orgánicos)
Punto de ebullición	219.5 °C
Densidad	0.904 g/mL
Presión de vapor	8.47×10^{-2} mmHg
Índice de refracción:	1.425

Tomado de (16)

2.3.2 Farmacodinamia

El VPA lleva a cabo su efecto terapéutico al bloquear los canales de sodio dependientes de voltaje. El VPA también actúa sobre las enzimas que degradan y las que sintetizan el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA por sus siglas en inglés). Entre las enzimas que degradan el GABA se encuentran la transaminasa de GABA y la deshidrogenasa succínica de semialdehído, mientras que una de las enzimas encargadas de sintetizar este neurotransmisor es la descarboxilasa de ácido glutámico. En conjunto, estos mecanismos evitan la despolarización en las neuronas y con ello las descargas sostenidas y repetidas que generan las crisis convulsivas (9,17).

2.3.3 Farmacocinética

El VPA es absorbido rápida y completamente cuando se administra por vía oral. Su concentración plasmática máxima se alcanza en 1-4 horas, su volumen de distribución es de 0.2 L/kg, se une a proteínas en un 90% aproximadamente, y presenta un tiempo de vida media de 15 horas, aunque puede disminuir en pacientes que consumen otros antiepilépticos. Se ha reportado que la concentración de VPA en líquido cefalorraquídeo está en equilibrio con las concentraciones en plasma del mismo FAE (9).

El 95% del VPA es metabolizado en el hígado y el resto es eliminado de manera inalterada. Aproximadamente el 50% del metabolismo está mediado

principalmente por enzimas de fase II, específicamente, por las enzimas uridín difosfato glucuroniltransferasas (UGT); por su parte, la beta-oxidación contribuye en un 40% del metabolismo de VPA, y el 10% restante corresponde a la ω -oxidación mediada por enzimas de la súper-familia del citocromo P450 (CYP por sus siglas en inglés) (8). Algunos metabolitos resultantes, como el ácido 2-propil-2-pentanoico y el ácido 2-propil-4-pentanoico, presentan también efecto anticonvulsivo (9). La representación gráfica del metabolismo hepático de VPA y los genes involucrados se presenta en la Figura 1.

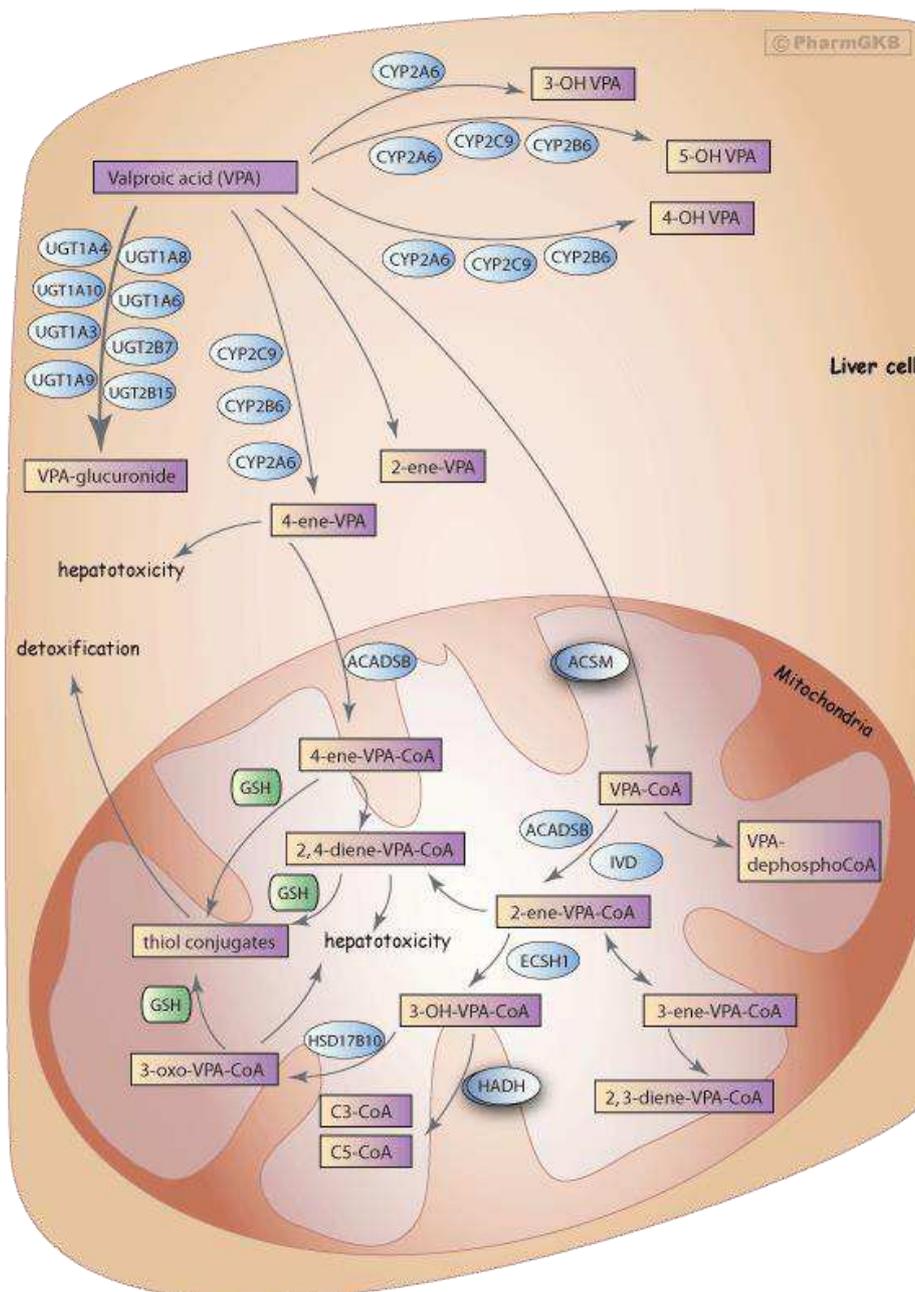


Figura 1. Representación gráfica de los genes involucrados en la farmacocinética de VPA, tomado de (8).

2.3.4 Interacciones medicamentosas de VPA

Al administrar VPA a pacientes tratados con otros FAE se pueden presentar interacciones entre los fármacos debido a la inhibición o inducción del metabolismo de estas moléculas, resultando en el aumento o disminución de los niveles plasmáticos de los FAE. En el caso del VPA, las concentraciones plasmáticas disminuyen notablemente al agregarse en la terapia CBZ, PB, PHT o PRM, y también se ha reportado una disminución leve a moderada cuando se agrega ESM y LTG. Por su parte, se han observado aumentos leves a moderados de las concentraciones plasmáticas del VPA cuando el tratamiento es concomitante con CLB y estiripentol, mientras que el felbamato produce aumentos notables de las concentraciones de VPA (18).

2.3.5 Reacciones adversas a medicamentos

Las RAM se definen como cualquier efecto perjudicial y no deseado que se presenta en el humano a las dosis empleadas para la profilaxis, el diagnóstico, la terapéutica o la modificación de una función fisiológica (19). Cualquier tipo de tratamiento farmacológico presenta el riesgo de ocasionar RAM, lo cual puede impactar en la terapia y en la calidad de vida del paciente. Hasta 1998, las RAM representaban el 3-4% de los ingresos en hospitales en Estados Unidos y su incidencia en la misma población se calculó en 6.7% (22 millones de reacciones adversas), con 106 mil fallecimientos (20). Las RAM se pueden clasificar en diferentes tipos que van desde la A hasta la F, siendo las más comunes los tipos A y B (6); una descripción más detallada de las mismas se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Tipos de reacciones adversas a medicamentos.

Tipo de RAM	Descripción
A	- Dependientes de la dosis, pueden deberse a una respuesta farmacológica excesiva
B	- No están relacionadas con la dosis ni con el mecanismo de acción farmacológico, son relativas a la sensibilidad que los individuos posean o desarrollen a la sustancia (reacciones de hipersensibilidad)
C	- Relacionadas con la dosis y el tiempo de administración en las cuales se genera la acumulación del fármaco
D	- Relacionadas con el tiempo, la dosis y la exposición prenatal (teratogénesis)
E	- Relacionadas con la suspensión del medicamento
F	- Se deben a la falla terapéutica no esperada

Tomado y modificado de (6)

Las RAM no se presentan con la misma frecuencia e intensidad en todos los pacientes, las razones más evidentes para esta idiosincrasia son la alimentación, la presencia de otras enfermedades, tratamientos concomitantes y los factores genéticos de cada paciente (6).

2.3.6 Reacciones adversas a FAE

Los FAE pueden generar distintos tipos de RAM con diferentes grados de severidad. Debido a sus características fisicoquímicas logran atravesar la barrera hemato-encefálica e interactuar con distintos receptores, transportadores y enzimas del sistema nervioso central, lo cual puede ocasionar diversos efectos no deseados de tipo psiquiátrico y neurológico (21), aunque también se han reportado RAM que involucran otros órganos o sistemas como el estómago, hígado, sistema hematológico, entre otros.

2.3.6.1 Reacciones Adversas a Medicamentos debidas a VPA

En el tratamiento con VPA se pueden presentar RAM tanto de tipo A como de tipo B, e incluso de tipo D. Entre las RAM a VPA más importantes se encuentran la pérdida de memoria, temblor, exantema maculopapular, aumento de peso, hepatotoxicidad y teratogénesis (6,22,23).

2.3.6.1.1 Daño hepático inducido por VPA

El daño hepático inducido por fármacos (DILI, por sus siglas en inglés *drug induced liver injury*) se define como el daño hepático causado por la exposición a una molécula de tipo medicamentosa u otros agentes no infecciosos. Es un problema importante debido a que están reportados casos de falla hepática fulminante (disfunción hepática fatal) a causa de fármacos; no obstante, presenta una frecuencia baja en pacientes mayores de 2 años. La incidencia reportada de DILI en pacientes con politerapia y con monoterapia es de 1/12000 y de 1/37000, respectivamente (7). La incidencia en pacientes tratados en politerapia toma importancia ya que se ha reportado que hasta un 67% de los pacientes que sufren epilepsia toman dos o más FAE (15). Este porcentaje de pacientes presentan un mayor riesgo de sufrir alteraciones hepáticas que pueden

evolucionar con el tiempo y llegar a la muerte(7). La detección de susceptibilidad a DILI en etapas tempranas es de suma importancia ya que se ha reportado la muerte de 132 pacientes relacionada con la administración de VPA entre 1978 y 1993 (24) y 26 casos en pacientes adultos entre 1980 y 1996 (25). Los primeros reportes surgen en 1979, cuando Gerber y cols., sugirieron la relación entre la hepatotoxicidad y el VPA al reportar tres casos fatales, dos de los cuales incluían tratamiento con VPA en monoterapia. Las autopsias mostraron niveles elevados de transaminasas glutámico-pirúvicas y transaminasas glutámico-oxalacéticas, con lo cual se comprobó el daño hepático fulminante ocasionado por alguno de los metabolitos de VPA (26). Posteriormente, en 1987 se asoció al 4-eno-VPA como responsable del daño hepático (27); y en 1995, Tang y cols., sugirieron que la formación de 2,4-dieno-VPA bloquea la destoxicación hepática llevada a cabo en la mitocondria mediante la conjugación de glutatión (GSH) con 4-eno-VPA. En esta teoría se postula que esto puede deberse a la inhibición irreversible de la enzima glutatión reductasa (GR), la cual se encarga de regenerar el GSH a partir de su forma oxidada como glutatión disulfuro (GSSG), lo que produce un aumento de los niveles de 4-eno-VPA en el hepatocito (28).

2.3.6.1.2 Marcadores de daño hepático

Los marcadores de daño hepático relacionados a la hepatotoxicidad y sus valores de referencia se muestran en la Tabla 3:

Tabla 3. Marcadores de daño hepático y su valor de referencia

Marcador	Abreviatura (valor de referencia)
Fosfatasa alcalina	FA (32-92UI/L)
Bilirrubina total	BT (0,2-1mg/dL)
Bilirrubina directa	BD (0-0,2mg/dL)
Bilirrubina indirecta	BI (0-0,8mg/dL)
Transaminasa glutámico oxalacética	TGO (10-42UI/L)
Transaminasa glutámico pirúvica	TGP (10-40UI/L)

En la literatura existen criterios distintos para determinar si un paciente presenta daño hepático, todos ellos toman en cuenta los niveles de marcadores específicos de daño hepático. Por ejemplo, la FDA considera la “ley de Hy”

(basada en observaciones de Hy Zimmerman) para definir el riesgo a DILI de acuerdo a los siguientes criterios (29):

- Valores de TGO ó TGP tres veces por arriba del límite normal superior.
- Valores de BT elevados dos veces por arriba del límite normal superior sin que haya indicios de colestasis (fosfatasa alcalina elevada).
- Cuando no hay alguna razón que indique elevación de transaminasas y bilirrubina como hepatitis virales o alguna enfermedad hepática alguna.

Otros estudios han considerado los criterios indicados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS por sus siglas en inglés), en donde los parámetros acordados para definir el daño hepático son (30,31)

- TGP > 80 UI/L
- BD > 0,4 mg/dL
- Aumento de TGO, FA o BT por encima del límite alto de “normalidad” siempre y cuando uno de estos marcadores tenga valores dos veces por encima del límite alto de normalidad.

Para reducir el número de casos falsos (debidos a enfermedad hepática grasa no alcohólica) y excluir casos de adaptación metabólica (alteraciones bioquímicas en las que los niveles regresan a la normalidad pese a la continuidad de la terapia) fue necesario modificar los fenotipos para definir DILI (32). Este nuevo consenso fue realizado por un grupo internacional de expertos en DILI, y considera que existe un riesgo de DILI cuando se presentan alguno de los siguientes criterios (32):

- Valores de TGP elevados cinco veces el límite superior normal.
- Valores mayores al doble del límite superior normal de FA (en conjunto con elevación de GGT en ausencia de enfermedades óseas).
- Valores mayores al triple del límite superior normal de TGO con elevación de BT dos veces por arriba del límite superior normal.

Además este criterio utiliza una clasificación de leve, moderada, severa o fatal de acuerdo a la combinación de elevación de TGP y/o FA con BT y a los síntomas clínicos de daño hepático (32).

2.3.7 Variabilidad genética y reacciones adversas a medicamentos

Los polimorfismos genéticos pueden influir en las concentraciones plasmáticas de VPA, así como en la respuesta y ocurrencia de RAM a FAE, lo cual es materia de estudio de la farmacogenética y la farmacogenómica (5). En 1909 Archibald E. Garrod, publicó su libro "*The inborn errors of metabolism*" en el cual acuña el término "individualidad química", esto hace referencia a la variedad de respuestas metabólicas ante sustancias xenobióticas aparentemente debidas a diferencias interindividuales. Posteriormente, en 1931, Alfred L. Fox sintetizó la feniltiocarbamida mientras buscaba un edulcorante y observó que el sabor amargo de este compuesto era percibido sólo por algunos individuos. En 1932, S. H. Snyder investigó y comprobó que esta variabilidad interindividual tenía una etiología genética mediante un estudio en 800 familias y encontró que la respuesta a feniltiocarbamida se heredaba de manera monogénica autosómica recesiva. Este fue el primer estudio en el que se logró atribuir un polimorfismo genético a la diferencia en la respuesta a una sustancia química. Finalmente, en 1959, Friedrich Vogel acuñó el término de farmacogenética y desde entonces la disciplina ha desempeñado cada vez un papel más importante para el desarrollo de terapias más seguras y más efectivas encaminadas a la personalización de la terapia farmacológica.

Actualmente es bien conocido que polimorfismos en genes que codifican para enzimas metabolizadoras, transportadores y receptores de fármacos pueden impactar en la ocurrencia de RAM a FAE. El estudio de estas variables genéticas para su identificación como marcadores predictivos de respuesta, eficacia y potenciales RAM (6) es materia de estudio de la farmacogenética y la farmacogenómica. Las enzimas metabolizadoras de fármacos de mayor relevancia en estudios farmacogenéticos están presentadas en la Tabla 4.

Tabla 4. Principales enzimas metabolizadoras de fármacos.

Fase I	Fase II
Citocromo P450 (CYP450)	Uridínadifosfato glucuroniltransferasa (UGT)
Aldehído deshidrogenasa (ALDH)	Sulfotransferasa (ST)
Alcohol deshidrogenasa (ADH)	Gutación-S-transferasa (GST)
Esterasas	N-acetiltransferasa (NAT)
Dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD)	Histidina metiltransferasa (HMT)
Epóxido hidrolasa (EH)	Catecol O-metiltransferasa (COMT)
NADPH:quinona oxidoreductasa (NQO1)	Tiopurina metiltransferasa (TPMT)

Tomado de (33)

Los polimorfismos genéticos pueden afectar la función de estas enzimas, lo cual produce cambios en la farmacocinética de los fármacos que son sustratos para estas enzimas. Es por ello que el impacto de la variabilidad genética en el metabolismo de los fármacos se refleja por diferencias en la eliminación, la vida media y las concentraciones máximas alcanzadas en el plasma (34).

2.3.7.1 Farmacogenética de VPA

Existen pocos estudios farmacogenéticos de VPA, por lo que los avances que se puedan aportar respecto a variantes genéticas que se asocien con variabilidad en la respuesta, toxicidad y/o el metabolismo de VPA son de gran importancia (8,18).

Respecto a los polimorfismos genéticos en enzimas metabolizadoras de fármacos, los estudios se han centrado en variantes de la familia de las UGT. Los alelos de *UGT2B7* se han asociado con variación en la concentración plasmática de VPA (35,36).

Los polimorfismos genéticos en las enzimas del citocromo P450 también han sido estudiados en relación con el metabolismo de VPA. Se ha reportado que variantes de *CYP2C9* se asocian con mayores concentraciones plasmáticas de VPA (37). Asimismo, un estudio documentó que el genotipo de *CYP2C9* ayuda a la selección de una dosis de VPA adecuada en pacientes pediátricos (38). De acuerdo a ello, otro estudio reportó que pacientes portadores de alelos de *CYP2C9* con actividad disminuida presentan concentraciones plasmáticas

significativamente más elevadas que aquellos portadores de las variantes silvestres (39).

Diversos estudios han investigado la relación entre las alteraciones hepáticas observadas en los pacientes bajo tratamiento con VPA y diversos polimorfismos genéticos de *CYP2C9* y *CYP2C19*, genes que codifican las enzimas responsables de la generación del metabolito 4-eno-VPA; sin embargo, los resultados obtenidos no han mostrado una asociación (40,41).

Las enzimas metabolizadoras de fase II, como UGT y las GST, tienen una gran importancia en el metabolismo de VPA. Las UGT metabolizan aproximadamente el 50% del fármaco administrado (8) y no generan metabolitos hepatotóxicos. La UGT con mayor contribución en el metabolismo de VPA es la UGT2B7 por lo que el estudio de los polimorfismos genéticos de esta enzima puede ser relevante en la variación del metabolismo de VPA. Por su parte, las enzimas GST ayudan a la detoxificación hepática al metabolizar y evitar la acumulación del metabolito 4-eno-VPA. En el caso de las enzimas de la familia GST se tienen estudios que concluyen que los alelos nulos de *GSTT1* y *GSTM1* están asociados al incremento de marcadores de daño hepático (42), con un OR = 6.5 para el genotipo con ambos alelos nulos (*GSTM1* y *GSTT1*), lo cual indica que al menos en población japonesa, este genotipo representa un riesgo de hepatotoxicidad (42).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos estudios han reportado una variabilidad en la respuesta a fármacos antiepilépticos en donde se incluye al VPA. Algunos de estos estudios evalúan la relación de polimorfismos genéticos de enzimas metabolizadoras, transportadores y receptores con la respuesta, tanto eficacia como efectos adversos, y el metabolismo de VPA. En la población mestizo mexicana no se han realizado este tipo de investigaciones, y existen alrededor de 2 millones de personas afectadas con epilepsia y el VPA es uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de este desorden neurológico. La información que se genere de esta investigación puede contribuir a un tratamiento con VPA más seguro y eficaz.

4. HIPÓTESIS

Variantes en *CYP2C9*, *UGT2B7*, *GSTM1* y *GSTT1* están implicadas en la respuesta, concentraciones plasmáticas y daño hepático por VPA en pacientes mestizos mexicanos con epilepsia.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la asociación entre el genotipo de *CYP2C9*, *UGT2B7*, *GSTM1* y *GSTT1* y la respuesta, las concentraciones plasmáticas y el daño hepático inducido por VPA en pacientes mestizos mexicanos con epilepsia.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar si existe relación entre las variantes alélicas de *CYP2C9* y *UGT2B7* con la respuesta a VPA.
2. Evaluar si existe relación entre las variantes alélicas de *CYP2C9* y *UGT2B7* con las concentraciones plasmáticas VPA.
3. Estudiar si la terapia concomitante afecta las concentraciones plasmáticas VPA.
4. Determinar si variantes en *CYP2C9*, *UGT2B7*, *GSTM1* y *GSTT1* están implicadas en el daño hepático inducido por VPA.

6. METODOLOGÍA

6.1. Tipo de estudio y sujetos

El tipo de estudio es observacional, descriptivo, transversal y retrospectivo. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética y por el Comité de Investigación del Instituto Nacional de Neurología “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS). Los pacientes incluidos en el estudio fueron captados en la Consulta Externa del INNNMVS y tienen residencia en la Ciudad de México y en varios estados de la República Mexicana. Se definieron como mestizos mexicanos (MM) si por lo menos tres generaciones de familiares en primer grado habían nacido en México (43). Todos los pacientes fueron informados sobre los objetivos del estudio y dieron su consentimiento por escrito para su participación voluntaria en el mismo.

6.1.1. Pacientes

Se seleccionaron pacientes referidos de la consulta externa de INNNMVS. En el estudio se incluyeron 86 pacientes: 39 hombres (45.3%) 47 mujeres (54.7%), con una edad promedio de 30.49 ± 10.32 años, en monoterapia y en politerapia con otros FAE, tales como: fenitoína (PHT), lamotrigina (LTG), carbamazepina (CBZ), levetiracetam (LEV), topiramato (TPM), clonacepam (CNP), clobazam (CLB). Las características demográficas de los pacientes fueron obtenidas de los expedientes clínicos del instituto.

- Criterios de inclusión:
 - Pacientes mestizos mexicanos con diagnóstico de epilepsia tratados con VPA en monoterapia o politerapia.
 - Ambos géneros.
 - Edad entre (14 y 71 años).
- Criterios de exclusión:
 - Pacientes que no aceptaran participar en el estudio.
 - Pacientes sin expediente clínico.
 - Pacientes con antecedentes tóxico maníacos.
 - Pacientes que presentaran daño hepático o renal.

6.2. Muestras biológicas

Siguiendo los lineamientos éticos establecidos en la declaración de Helsinki en su actualización del 2013 (44), a todos los pacientes se les tomó una muestra de 12mL de sangre periférica colectada en tubos Vacutainer® con ACD (ácido-citrato-dextrosa) como anticoagulante.

6.2.1. Toma de muestra, separación de fase leuco-plaquetaria, plasma y DNA.

Las muestras de sangre periférica colectadas fueron procesadas en un lapso no mayor a 3 horas después de su obtención. Para la obtención de las células mononucleares (CMN), la sangre total se fracciona en volúmenes de 3 mL, se añadió solución amortiguadora de lisis de glóbulos rojos (NH_4Cl 0.155 M, KHCO_3 0.01 M, EDTA 0.001 M) y se centrifugó a 3000 rpm x 1 min. Posteriormente, se les adicionó un amortiguador fosfato salino (PBS 1X) y se extrajo DNA genómico por método salino y precipitación con etanol absoluto, se almacenó a -20°C hasta su uso (45).

6.2.2. Análisis cualitativo y cuantitativo del DNA

En todos los casos se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo del DNA genómico extraído por el método descrito en el apartado anterior. El análisis cualitativo consistió en evaluar la calidad e integridad de los DNAs genómicos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TBE (Tris base 0.9 M, ácido bórico 0.89 M, EDTA 0.025 M). La concentración y pureza de las muestras de DNA se determinó en un espectrofotómetro de baja retención (*Nanodrop 2000 Thermo Scientific®*). Se verificó que las relaciones de las lecturas de las longitudes de onda 260/280 nm estuvieran en un intervalo de 1.8-2 y la relación 260/230 nm fuera cercana a 2.3. A partir de las lecturas obtenidas se prepararon diluciones de trabajo de DNA a una concentración de 100 ng/ μL .

6.3. Genotipificación de las muestras

6.3.1. Criterios de análisis

En el presente estudio se analizaron las principales variantes genéticas implicadas en la vía metabólica de VPA, además de las principales variantes

genéticas involucradas en el desarrollo de hepatotoxicidad por VPA. La determinación de las variantes genéticas de los pacientes tratados con VPA se realizó mediante la genotipificación de *CYP2C9*, *UGT2B7*, y las duplicaciones y la exploración de deleciones en *GSTT1* y *GSTM1*(8).

6.3.2. Discriminación alélica mediante sondas TaqMan

6.4.2.1. Genotipificación de *CYP2C9* y *UGT2B7*

Las variantes genéticas *CYP2C9**2 (c.C430C>T; rs1799853; R144C; C_25625805_10), *UGT2B7**1d (g.372A>G; rs28365063; R124R; C__30689135_20), *UGT2B7**2b (c.-161C>T; rs7668258; C__27827970_40), *UGT2B7* (c.801A>T/c.802T>C; rs7438284/rs7439366; P267P/Y268H; C_32449742_20 sonda de múltiples nucleótidos) fueron analizadas mediante sondas alelo-específicas tipo TaqMan por PCR tiempo real (41).

6.3.2. Amplificación de sondas múltiples dependientes de ligando (MLPA).

Las deleciones y duplicaciones de los genes *GSTT1* y *GSTM1* se analizaron por MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*® MRC-Holland). El método de MLPA es un método simple para la cuantificación relativa de más de 40 secuencias en una sola reacción. Es útil para el estudio de mutaciones puntuales de secuencia y mutaciones estructurales, dependiendo del diseño de las sondas. El estudio de las mutaciones estructurales consiste en la hibridación de oligonucleótidos cercanos al sitio de estudio que contiene la secuencia espaciadora y que al amplificar les conferirá un tamaño único, adicionalmente poseen las secuencias complementarias a los cebadores universales. Después de la hibridación, se realiza una ligación que produce sondas de tamaño conocido y se amplifican incorporando un fluoróforo. Los productos amplificados se separan por electroforesis capilar y se detecta la cantidad de emisión del fluoróforo. La interpretación se realiza mediante la presencia o ausencia de la señal de emisión. Las deleciones y duplicaciones de los genes *GSTT1* y *GSTM1* fueron analizadas mediante esta metodología incluidas en el panel *SALSA MLPA P128-C1 Cytochrome P450 probemix* y se utilizó el programa Cofalyzer.net (42).

6.4. Concentraciones plasmáticas de VPA y valores de marcadores de daño hepático

Las concentraciones plasmáticas de VPA y los marcadores de daño hepático (Tabla 5) en los pacientes fueron obtenidos de los expedientes clínicos del INNNMVS.

El cálculo de concentraciones plasmáticas corregidas por dosis/peso se realizó calculando el cociente entre las concentraciones plasmáticas y la dosis corregida por peso, esto se hizo para cada paciente obteniendo la media de la muestra y un rango que se reportaron en la Tabla 5.

Los valores de referencia de los marcadores de daño hepático fueron establecidos de acuerdo a los procedimientos del laboratorio de análisis clínicos del INNNMVS.

Los criterios para la clasificación de DILI son los siguientes:

- Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS por sus siglas en inglés), consenso de 1990 (30).
- Criterio “Hy’s Low” que al cumplirse se puede asumir que existe un riesgo de 1 en 10 de sufrir riesgo mortal por DILI (46).
- Consenso del Grupo Internacional de Expertos en DILI el tema de acuerdo a las recomendaciones del Centro Oxford de Medicina Basada en Evidencias de 2011 (32).

6.5. Respuesta al tratamiento con VPA

De acuerdo a la ILAE se considera que un paciente se encuentra libre de crisis cuando el número de crisis por año es igual a cero (47). En el presente estudio se estableció la libertad de crisis como el parámetro a evaluar para la respuesta a tratamiento.

6.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS v.22. Para el análisis de los resultados obtenidos en el estudio se consideraron los parámetros demográficos, medicamentos concomitantes, biomarcadores de daño hepático y las concentraciones plasmáticas de VPA con los genotipos analizados. Los pacientes se clasificaron en grupos terapéuticos de acuerdo con las diferentes

concentraciones plasmáticas de VPA: subterapéutica (<50 µg/mL); terapéuticas (50-100 µg/mL); y supraterapéuticas (>100 µg/mL). Se utilizó la prueba exacta de Fisher para comparar las frecuencias genotípicas de los *loci* dentro de cada grupo terapéutico. Las concentraciones plasmáticas de VPA fueron corregidas dividiendo la concentración plasmática (µg/mL) por dosis diaria/peso (mg/kg).

Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando ANOVA y prueba de t *Student* para evaluar las asociaciones entre las variables dependientes (concentración plasmática y concentración corregida por dosis/peso) y las variables independientes (genotipos de *CYP2C9*, *UGT2B7* y deleciones y duplicaciones de *GSTT1* y *GSTM1*). La significancia estadística se estableció en valores de $P < 0.05$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Características demográficas de los pacientes

La Tabla 6 resume los datos demográficos de los pacientes con epilepsia tratados con VPA. En general, los pacientes en este estudio eran jóvenes (edad media = 30.49 ± 10.32 años), 54.7% mujeres y 45.3% hombres. La media de las concentraciones plasmáticas de VPA fue de 66.4 ± 28.60 $\mu\text{g/mL}$ la cual se encuentra dentro del intervalo terapéutico (50-100 $\mu\text{g/mL}$) (48).

Del total de pacientes (n=86), nueve (10.5%) eran tratados en monoterapia con VPA y el resto en politerapia (89.5%). Los pacientes en politerapia fueron subclasificados de acuerdo a las interacciones farmacocinéticas reportadas para FAE (18):

- Pacientes tratados con VPA en concomitancia con inductores del metabolismo de VPA (CBZ, LTG, PHT).
- Pacientes tratados con VPA en concomitancia con inhibidores del metabolismo de VPA (CLB).
- Pacientes tratados con VPA y otros fármacos que no afectan el metabolismo de VPA (TPM, LEV, CNP).

El rango terapéutico de VPA es de 50-100 $\mu\text{g/mL}$ (48). De los 86 pacientes con epilepsia, 52 pacientes (60%) tuvieron concentraciones de VPA dentro del intervalo, 25 pacientes (29.8%) presentaron concentraciones subterapéuticas y 9 pacientes (10.5%) se encontraban en rango supraterapéutico.

La dosis de mantenimiento recomendada de VPA es de 15 mg/kg/día para pacientes con monoterapia y 20 mg/kg/día para pacientes con terapia concomitante de inductores (48). En la muestra en estudio, los pacientes en politerapia con inductores del metabolismo de VPA fueron el 70.9%, con un rango de peso de 32 a 122 kg (Tabla 5), por lo que se puede esperar una dosificación diaria de 480 a 2440 mg/día (dosis/kg/día x peso en kg = dosis/día) en pacientes en monoterapia y en politerapia. La información obtenida indica que el 90.7% de los pacientes de la muestra se encontraron dentro de este régimen, aunque la guía de práctica clínica de la Secretaría de Salud marca como dosis máxima para VPA la administración de 60 mg/kg/día (3), lo cual cubre la muestra

en su totalidad (1920-7320mg/kg) y es evidencia de un adecuado manejo de la terapéutica.

Tabla 5. Características demográficas y farmacológicas de la muestra (n =86).

Característica	Total	Hombres	Mujeres
	(n= 86)	(n=39)	(n=47)
Edad, media en años (rango)	30.49(14-71)	30.6 (15-51)	30.4 (14-71)
Peso, media en kg (rango)	67.6 (32-122)	74.8 (46-122)	62.26 (32-111)
Dosis diaria de VPA, media en mg/día (rango)	1238.9(200-4000)	1200.0 (600-2540)	1271.2 (200-4000)
Concentraciones plasmáticas VPA, media en µg/mL, (rango)	66.4 (2.0-142.0)	60.7 (10.6-120.0)	70.2 (2.0-142.0)
Concentraciones corregidas VPA media en (µg/mL)/(mg/kg) (rango)	4.1 (0.1-14.5)	3.9 (0.7-14.5)	4.2 (0.1-11.2)
<u>Grupos terapéuticos</u>			
Subterapéutico (<50 µg/mL)(n=)	25	13	12
Terapéutico (50-100 µg/mL) (n=)	52	22	30
Supraterapéutico(>100 µg/mL) (n=)	9	4	5
<u>Co-tratamiento</u>			
Monoterapia (n=)	9	4	5
Politerapia (n=)	77	35	42
<u>Fármacos concomitantes*</u>			
VPA+inhibidor (n=)	8	3	5
VPA+No inhibidor+No inductor(n=)	17	7	10
VPA+inductor (n=)	61	29	32

VPA: ácido valproico

*Inhibidores de VPA: clobazam (CLB); inductores: carbamazepina (CBZ), lamotrigina (LTG), fenitoína (PHT); no inductor/no inhibidor: topiramato (TPM), clonazepam (CLB), levetiracetam (LEV).

7.2 Frecuencias genotípicas de *UGT2B7* y *CYP2C9**2

Las frecuencias genotípicas de la variante *CYP2C9**2 y las variantes de *UGT2B7* estudiadas se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Frecuencias genotípicas y alélicas de *CYP2C9* y *UGT2B7* (n =86)

	Genotipo	n	Frecuencia genotípica	Intervalo de confianza 95%	
				Límite inferior	Límite superior
<i>UGT2B7</i> 801A>T 802T>C	AT/TC	31	0.36	0.355	0.366
	TC/TC	53	0.62	0.611	0.622
	AT/AT	2	0.02	0.023	0.024
	AT	35	0.17	0.171	0.173
	TC	168	0.83	0.826	0.828
<i>UGT2B7</i> 372A>G*	A/G	7	0.08	0.080	0.083
	A/A	79	0.92	0.917	0.920
	A	165	0.96	0.957	0.960
	G	7	0.04	0.039	0.042
<i>UGT2B7</i> -161C>T	C/T	25	0.29	0.286	0.295
	T/T	6	0.07	0.068	0.071
	C/C	55	0.64	0.634	0.645
	C	135	0.78	0.318	0.321
	T	37	0.21	0.783	0.786
<i>CYP2C9</i> 430C>T**	C/T	6	0.07	0.068	0.071
	C/C	80	0.93	0.929	0.932
	C	166	0.97	0.963	0.966
	T	6	0.30	0.033	0.036

Frecuencias: *G/G = 0.0, **T/T = 0.0

Las frecuencias genotípicas reportada para las variantes *UGT2B7* -161C>T (Tabla 6), coinciden con las reportadas en sudafricanos (C/C =133, C/T =75 y T/T =15) (estadístico χ^2 , p =0.743) (49). Las frecuencias genotípicas de *UGT2B7* 372A>G difieren de las reportadas por Mi-Sun Hwang y cols., en el 2010, en el que genotiparon a 50 pacientes coreanos mediante secuenciación. Los autores reportaron frecuencias genotípicas que son diferentes a las encontradas en el presente estudio (A/A =39, A/G = 9 y G/G =2) (estadístico por χ^2 , p =0.034) (50).

Para la variante *UGT2B7* 801A>T 802T>C, la frecuencia alélica TC reportada por el fabricante de las sondas TaqMan en diferentes poblaciones (51) es: chinos=0.73, japoneses=0.70, afroamericanos=0.64 y caucásicos=0.42. Al comparar estos datos de referencia con las frecuencias obtenidas en el presente estudio se observa que la única población en la que no se encuentra una diferencia significativa es con la china (F exacta de Fisher, población de estudio contra china $p=0.124$; japonesa $p=0.045$; afroamericano $p=0.003$ y caucásica $p<0.0001$).

7.3. Análisis de las concentraciones plasmáticas por grupo farmacológico.

7.3.1 Relación de las concentraciones plasmáticas de VPA en monoterapia y politerapia.

Se compararon las medias de las concentraciones plasmáticas de VPA entre los grupos de pacientes en monoterapia y los de politerapia por medio de la prueba *t* de Student. No se encontró diferencia significativa entre los grupos ($p=0.409$, Tabla 7), por lo que la politerapia con FAE no mostró influencia en las concentraciones plasmáticas de VPA.

Tabla 7. Comparación de las concentraciones plasmáticas de VPA entre los grupos de pacientes en monoterapia y politerapia (n =86).

	n	Media (µg/mL)	Desviación estándar	Prueba t ^a Sig. (bilateral)
Politerapia	77	66.94	29.765	
Monoterapia	9	61.66	15.642	0.409
Total	86	66.39	28.598	

a. Prueba *t* de Student para varianzas diferentes, Sig= significancia estadística.

El aumentar el número de FAE es una estrategia que busca incrementar, en algunos casos, la efectividad del tratamiento en pacientes con epilepsia refractaria, lo cual es conocido como politerapia racional (52,53). En el caso de VPA, la concentración plasmática puede variar de acuerdo a la administración concomitante de otros FAE (48). Sin embargo, a través de la prueba estadística realizada (Tabla 7) se evidencia que la politerapia no es suficiente para explicar la variación en las concentraciones plasmáticas de VPA.

7.3.2 Relación entre grupos terapéuticos y las concentraciones plasmáticas de VPA

Para evaluar el impacto del tratamiento concomitante en las concentraciones plasmáticas de VPA se realizó un análisis comparando este parámetro entre los grupos farmacológicos presentados en la Tabla 5. El resultado se muestra en la Tabla 8. Se encontró que no existe diferencia significativa entre los grupos ($p = 0.059$), por lo que no se tiene evidencia suficiente de que los fármacos inductores o inhibidores concomitantes a VPA generen diferencias en la media de niveles plasmáticos de VPA en esta población.

Tabla 8. Relación entre grupos terapéuticos y las concentraciones plasmáticas de VPA ($\mu\text{g/mL}$) ($n = 86$).

Grupo terapéutico	n	Media	Desviación estándar	Estadístico ^b Significancia.
Inductor ^c	61	63.26	29.81	0.059 ^a
Monoterapia+ (no inhibidor/no inductor) ^c	17	67.14	20.57	
Inhibidor ^c	8	88.68	26.29	
Total	86	66.39	28.59	

a. Cumplen con la prueba de Levene.

b. ANOVA de una vía.

c. Inhibidores de VPA: clobazam (CLB); inductores: carbamazepina (CBZ), lamotrigina (LTG), fenitoína (PHT); no inductor/no inhibidor: topiramato (TPM), clonazepam (CLB), levetiracetam (LEV).

En la literatura se ha reportado que en la farmacoterapia de la epilepsia con VPA se debe considerar el efecto de fármacos inhibidores del metabolismo (por ejemplo CLB) durante la prescripción de VPA y el control de los niveles terapéuticos de este FAE (48). Un estudio reciente reportó la inhibición en el metabolismo de VPA debida a la administración de CLB (18). Por lo tanto, aun cuando no se encontró una diferencia significativa entre las concentraciones plasmáticas de VPA en función del grupo terapéutico, no se puede descartar el efecto de los inhibidores e inductores sobre las concentraciones plasmáticas de VPA, ya que la significancia obtenida (valor p) es de 0.059, lo cual puede deberse al bajo número bajo de pacientes (8/86) que toman FAE inhibidor (CLB) y VPA.

7.4. Relación de factores farmacocinéticos y respuesta.

7.4.1 Relación entre control de crisis, dosis ajustadas y concentraciones plasmáticas de VPA

En el presente estudio se encontró un 25.6% de pacientes con libertad de crisis, lo cual coincide con lo reportado por Martínez y cols., en el 2012, quienes realizaron un análisis descriptivo de la epilepsia farmacorresistente en la misma población de estudio con una n=206 (15).

Con el fin de evaluar el impacto de las dosis ajustadas de VPA en la eficacia del tratamiento antiepiléptico, se realizó una prueba de t de *Student* entre los grupos de pacientes en libertad de crisis y pacientes sin libertad de crisis. Se encontró que los pacientes sin libertad de crisis tienen una media de dosis ajustada por peso significativamente mayor a los pacientes que tienen libertad de crisis ($p < 0.000$) (Tabla 9). Por otro lado, las concentraciones plasmáticas de los pacientes en libertad de crisis fueron significativamente menores que las de los pacientes sin libertad de crisis ($p = 0.034$) (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de la relación de respuesta al tratamiento con las concentraciones plasmáticas de VPA, concentraciones plasmáticas corregidas de VPA y dosis ajustadas (n=86)

	Respuesta al tratamiento	N	Media	Desviación estándar	Estadístico
					Sig. (bilateral)
Concentraciones corregidas VPA ($\mu\text{g/mL}$)/(mg/kg)	Sin libertad de crisis	64	3.82	2.14	0.060 ^b
	Con libertad de crisis	22	4.79	2.64	
Dosis ajustadas (mg/kg/día)	Sin libertad de crisis	64	20.90	10.33	0.000 ^a
	Con libertad de crisis	22	13.98	5.75	
Concentraciones plasmáticas de VPA ($\mu\text{g/mL}$)	Sin libertad de crisis	64	67.99	29.41	0.034 ^b
	Con libertad de crisis	22	61.74	26.16	

a. Prueba t para varianzas diferentes, b. Prueba U de Mann Whitney, Conc= concentraciones. Sig= significancia estadística.

La asociación encontrada corresponde con lo reportado en la literatura en donde se indica que si el tratamiento no es satisfactorio se debe aumentar la dosis hasta la máxima tolerada (54). La dosis máxima de VPA en la guía de práctica clínica de la Secretaría de Salud es de 60 mg/kg/día (3), y las dosis medias obtenidas entre los grupos en libertad de crisis se encuentran por debajo de este parámetro, por lo que están dentro de los límites recomendados en la literatura especializada.

7.4.2 Asociación de las variantes alélicas de *CYP2C9* y *UGT2B7* con la respuesta a VPA

Se realizó un análisis de tablas cruzadas para observar la relación entre los genotipos de *CYP2C9* y *UGT2B7* con la libertad de crisis. Los resultados se muestran en la Tabla 10 en donde se observa que no hay una asociación de las variantes genéticas de *CYP2C9* y *UGT2B7* con la libertad de crisis en pacientes con epilepsia tratados con VPA.

Tabla 10. Asociación entre las variantes alélicas de *CYP2C9* y *UGT2B7* con la respuesta a VPA (n =86)

Variante alélica	Libertad de crisis		Total	Estadístico Significancia
	Sin libertad de crisis	Con libertad de crisis		
<i>UGT2B7</i> 801A>T 802T>C	AT/TC	25	6	0.385 ^a
	TC/TC	37	16	
	AT/AT	2	0	
	Total	64	22	
<i>UGT2B7</i> 372A>G	A/G	6	1	0.672 ^b
	A/A	58	21	
	Total	64	22	
<i>UGT2B7</i> 161C>T	C/T	21	4	0.205 ^a
	T/T	3	3	
	C/C	40	15	
	Total	64	22	
<i>CYP2C9</i> 430C>T	C/T	4	2	0.643 ^b
	C/C	60	20	
	Total	64	22	

a. Pruebas de Chi-cuadrado.

b. Prueba exacta de Fisher.

Actualmente, existen pocos estudios en donde se evalúe la influencia de variantes de *CYP2C9* y *UGT2B7* con la respuesta a VPA, sin embargo, sí se ha reportado el impacto de estas variantes genéticas con los niveles plasmáticos de este FAE, lo cual podría afectar la respuesta al tratamiento. En 2012, Guo y cols., realizaron un estudio en 98 pacientes pediátricos de origen chino con epilepsia tratados con VPA y encontraron que la variante *UGT2B7* 802T>C no tiene influencia sobre las concentraciones plasmáticas de este FAE y menciona que al parecer los factores genéticos no tienen relación con la libertad de crisis en el tratamiento con VPA (41).

7.5 Relación de las variables farmacocinéticas, marcadores de daño hepático y genotipos de UGT2B7 y CYP2C9

7.5.1 Asociación de las variantes alélicas de CYP2C9 y UGT2B7 con las concentraciones plasmáticas VPA

El resultado del análisis estadístico para explorar la relación de las variantes genéticas de *UGT2B7* 801A>T 802T>C, 161C>T, 372A>G y de *CYP2C9* 430C>T, con las concentraciones plasmáticas de VPA, se muestra en las Tablas 11-14. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas ajustadas por dosis/peso, las dosis ajustadas por peso ni las concentraciones plasmáticas de VPA, con respecto a las diferentes variantes genéticas estudiadas.

Tabla 11. Relación de los genotipos de *UGT2B7* 801A>T 802T>C con las concentraciones plasmáticas de VPA, concentraciones plasmáticas corregidas de VPA y dosis ajustadas (n=86)

	Genotipo	n	Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Estadístico
					Límite inferior	Límite superior	Significancia (valor p)
Concentraciones corregidas VPA (µg/mL)/(mg/kg)	AT/TC	31	4.12	2.30	3.28	4.96	0.898 ^{a, d}
	TC/TC	53	4.05	2.33	3.40	4.69	
	AT/AT	2	3.80	3.25	-25.42	33.02	
	Total	86	4.07	2.30	3.57	4.56	
Dosis ajustadas (mg/kg/día)	AT/TC	31	19.05	11.35	14.88	23.21	0.415 ^{a, d}
	TC/TC	53	18.81	8.69	16.41	21.20	
	AT/AT	2	28.80	14.57	-102.07	159.67	
	Total	86	19.13	9.82	17.02	21.23	
Concentraciones plasmáticas de VPA (µg/mL)	AT/TC	31	66.96	31.11	55.55	78.38	0.607 ^{b, c}
	TC/TC	53	65.32	27.11	57.85	72.80	
	AT/AT	2	85.90	37.76	-253.36	425.16	
	Total	86	66.39	28.60	60.26	72.53	

a. No cumple con homocedasticidad y normalidad.

b. Cumple con las pruebas de homocedasticidad y normalidad.

c. ANOVA de una vía.

d. Kruskal Wallis. Conc.= concentraciones.

Tabla 12. Relación de los genotipos de *UGT2B7* 161C>T con las concentraciones plasmáticas de VPA, concentraciones plasmáticas corregidas de VPA y dosis ajustadas (n=86)

	Genotipo	n	Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Estadístico
					Límite inferior	Límite superior	Sig.
Concentraciones corregidas VPA (µg/mL)/(mg/kg)	C/T	25	4.17	2.42	3.17	5.17	0.515 ^{a, d}
	T/T	6	4.43	1.09	3.29	5.57	
	C/C	55	3.98	2.37	3.34	4.62	
	Total	86	4.07	2.30	3.57	4.56	
Dosis ajustadas (mg/kg/día)	C/T	25	20.40	12.15	15.39	25.42	0.442 ^{b, c}
	T/T	6	14.68	4.79	9.66	19.71	
	C/C	55	19.03	9.00	16.60	21.46	
	Total	86	19.13	9.82	17.02	21.23	
Concentraciones plasmáticas de VPA (µg/mL)	C/T	25	72.13	31.30	59.21	85.05	0.457 ^{b, c}
	T/T	6	68.62	33.21	33.76	103.47	
	C/C	55	63.54	26.94	56.26	70.83	
	Total	86	66.39	28.60	60.26	72.53	

a. No cumple con homocedasticidad y normalidad.

b. Cumple con las pruebas de homocedasticidad y normalidad.

c. ANOVA de una vía.

d. Kruskal Wallis.

Tabla 13. Relación de los genotipos de *UGT2B7* 372A>G con las concentraciones plasmáticas de VPA, concentraciones plasmáticas corregidas de VPA y dosis ajustadas (n=86)

	Genotipo	n	Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Estadístico
					Límite inferior	Límite superior	Significancia (valor p)
Concentraciones corregidas VPA (µg/mL)/(mg/kg)	A/G	7	3.36	1.57	1.90	4.81	0.613 ^{a, d}
	A/A	79	4.13	2.35	3.60	4.66	
	Total	86	4.07	2.30	3.57	4.56	
Dosis ajustadas (mg/kg/día)	A/G	7	17.97	6.23	12.21	23.73	0.748 ^{b, c}
	A/A	79	19.23	10.10	16.97	21.49	
	Total	86	19.13	9.82	17.02	21.23	
Concentraciones plasmáticas de VPA (µg/mL)	A/G	7	54.90	28.25	28.77	81.03	0.266 ^{a, d}
	A/A	79	67.41	28.58	61.01	73.81	
	Total	86	66.39	28.60	60.26	72.53	

a. No cumple con las pruebas de homocedasticidad y normalidad

b. Cumple con las pruebas de homocedasticidad y normalidad

c. t Student

d. U de Mann Whitney

Tabla 14. Relación de los genotipos de *CYP2C9* 430C>T con las concentraciones plasmáticas de VPA, concentraciones plasmáticas corregidas de VPA y dosis ajustadas (n=86)

	Genotipo	n	Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Estadístico ^b
					Límite inferior	Límite superior	Significancia (valor p)
Concentraciones Corregidas VPA (µg/mL)/(mg/kg)	C/T	6	4.05	2.04	1.91	6.19	0.819 ^a
	C/C	80	4.07	2.33	3.55	4.59	
	Total	86	4.07	2.30	3.57	4.56	
Dosis ajustadas (mg/kg/día)	C/T	6	17.42	9.35	7.60	27.23	0.760 ^a
	C/C	80	19.25	9.90	17.05	21.46	
	Total	86	19.13	9.82	17.02	21.23	
Concentraciones plasmáticas de VPA (µg/mL)	C/T	6	66.50	30.74	34.24	98.76	0.839 ^a
	C/C	80	66.39	28.64	60.01	72.76	
	Total	86	66.39	28.60	60.26	72.53	

a. No cumple con las pruebas de homocedasticidad y normalidad

b. U de Mann Whitney

Los resultados obtenidos son similares a algunos de los reportados en la literatura en donde no encuentran relación entre algunos de estos genotipos y la alteración de las concentraciones plasmáticas de VPA. Como ya se mencionó, Guo y cols. reportaron en el 2012 que la variante *UGT2B7* 802T>C no tiene implicaciones en las concentraciones plasmáticas ni en las concentraciones corregidas de VPA en población china (41). Asimismo, Smith y cols., en 2016 realizaron un estudio retrospectivo con 252 paciente noruegos y 857 datos de concentraciones séricas de VPA, los cuales comprendían 4 años de evolución clínica, y concluyeron que las variantes genéticas de *CYP2C9* (*1, *2 y *3) no tienen relevancia clínica en la variabilidad de la farmacocinética de VPA (55). Sin embargo, un estudio realizado en el 2010, en el que participaron 179 pacientes epilépticos de origen chino, indica que después de analizar los genotipos y las concentraciones plasmáticas de los pacientes para *CYP2C9*, se puede explicar una parte de la variabilidad en la farmacocinética de VPA (56). Por lo tanto, podemos decir que los resultados presentados en esta investigación son consistentes con lo descrito por algunos estudios previamente reportados en los que no existe relación de las variables genéticas de *CYP2C9*.

7.5.2 Asociación de variantes genéticas de *UGT2B7* y *CYP2C9*, con los niveles séricos de marcadores hepáticos

Se realizó la comparación entre los marcadores de daño hepático y los genotipos de las variantes *UGT2B7* 801A>T 802T>C, 161C>T, 372A>G y *CYP2C9* 430C>T. Los resultados se plasman en las Tablas 15-18 y a partir de su análisis se encontró que existen diferencias significativas entre los genotipos de la variante *UGT2B7* 801A>T 802T>C, donde el genotipo TC/TC tiene valores de BD significativamente superiores a los encontrados para el genotipo AT/AT (genotipo silvestre). Con respecto a *UGT2B7* 161C>T, por el contrario, se encontraron valores significativamente más altos de BT en relación al genotipo C/C (genotipo silvestre). Asimismo, se encontraron niveles de BD significativamente más altos con el genotipo C/T que los obtenidos por los genotipos de C/C y T/T.

Tabla 15. Relación entre *UGT2B7* 801A>T 802T>C y marcadores de daño hepático (n=86)

	Genotipo	n	Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Estadístico Significancia (valor p)
					Límite inferior	Límite superior	
FA	AT/TC	31	78.16	25.64	68.76	87.56	0.418 ^{b, c}
	TC/TC	53	72.54	24.20	65.87	79.21	
	AT/AT	2	90.03	26.01	-143.64	323.70	
	Total	86	74.97	24.72	69.67	80.27	
BT	AT/TC	31	0.28	0.12	0.24	0.33	0.053 ^{a, d}
	TC/TC	53	0.50	1.22	0.17	0.84	
	AT/AT	2	0.19	0.00	0.19	0.19	
	Total	86	0.42	0.96	0.21	0.62	
BD	AT/TC	31	0.15	0.14	0.09	0.20	0.048 ^{* a, d}
	TC/TC	53	0.14	0.04	0.13	0.15	
	AT/AT	2	0.09	0.00	0.09	0.09	
	Total	86	0.14	0.09	0.12	0.16	
BI	AT/TC	31	17.49	7.53	14.73	20.26	0.331 ^{a, d}
	TC/TC	53	21.88	15.03	17.74	26.03	
	AT/AT	2	18.16	3.46	-12.97	49.29	
	Total	86	20.22	12.77	17.48	22.95	
TGO	AT/TC	31	16.85	9.85	13.24	20.46	0.081 ^{a, d}
	TC/TC	53	25.95	25.11	19.03	32.87	
	AT/AT	2	21.78	6.94	-40.61	84.17	
	Total	86	22.57	20.96	18.08	27.07	
TGP	AT/TC	31	58.39	75.37	30.74	86.03	0.173 ^{a, d}
	TC/TC	53	73.39	89.77	48.64	98.13	
	AT/AT	2	159.78	84.24	-597.13	916.69	
	Total	86	69.99	85.23	51.72	88.26	

a. No cumple con homocedasticidad y normalidad

b. Cumple con las pruebas de homocedasticidad y normalidad

c. ANOVA de una vía

d. Kruskal Wallis.

e.* Significancia estadística

Tabla 16. Análisis entre la variante *UGT2B7* 161C>T y marcadores de daño hepático (n=86)

Marcador	Genotipo	n	Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Estadístico ^{a, b}
					Límite inferior	Límite superior	
FA	C/T	25	79.17	26.42	68.27	90.08	0.522
	T/T	6	75.61	29.94	44.18	107.03	
	C/C	55	73.00	23.58	66.62	79.37	
	Total	86	74.97	24.72	69.67	80.27	
BT	C/T	25	0.28	0.12	0.23	0.33	0.024*
	T/T	6	0.21	0.07	0.13	0.29	
	C/C	55	0.50	1.20	0.17	0.82	
	Total	86	0.42	0.96	0.21	0.62	
BD	C/T	25	0.15	0.16	0.09	0.22	0.032*
	T/T	6	0.10	0.04	0.06	0.14	
	C/C	55	0.14	0.04	0.13	0.15	
	Total	86	0.14	0.09	0.12	0.16	
BI	C/T	25	17.62	5.43	15.37	19.86	0.234
	T/T	6	14.19	5.24	8.69	19.68	
	C/C	55	22.05	15.17	17.95	26.16	
	Total	86	20.22	12.77	17.48	22.95	
TGO	C/T	25	16.74	9.26	12.92	20.56	0.081
	T/T	6	15.44	9.19	5.79	25.08	
	C/C	55	26.00	24.75	19.31	32.69	
	Total	86	22.57	20.96	18.08	27.07	
TGP	C/T	25	66.48	86.06	30.96	102.00	0.770
	T/T	6	55.91	59.64	-6.68	118.49	
	C/C	55	73.12	88.18	49.28	96.96	
	Total	86	69.99	85.23	51.72	88.26	

a. Kruskal Wallis

b. Ninguno de los grupos cumple con las pruebas de homocedasticidad y/o normalidad.

Tabla 17. Análisis entre la variante *UGT2B7* 372A>G y marcadores de daño hepático (n=86)

Marcador	Genotipo	n	Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Estadístico
					Límite inferior	Límite superior	
FA	A/G	7	73.21	38.59	37.52	108.89	0.290 ^{a, d}
	A/A	79	75.13	23.47	69.87	80.39	
	Total	86	74.97	24.72	69.67	80.27	
BT	A/G	7	0.34	0.17	0.18	0.49	0.788 ^{a, d}
	A/A	79	0.42	1.00	0.20	0.65	
	Total	86	0.42	0.96	0.21	0.62	
BD	A/G	7	0.12	0.04	0.08	0.16	0.531 ^{a, d}
	A/A	79	0.14	0.10	0.12	0.17	
	Total	86	0.14	0.09	0.12	0.16	
BI	A/G	7	18.31	8.50	10.44	26.17	0.463 ^{a, d}
	A/A	79	20.38	13.10	17.45	23.32	
	Total	86	20.22	12.77	17.48	22.95	

Marcador	Genotipo	n	Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Estadístico
					Límite inferior	Límite superior	
TGO	A/G	7	18.72	13.67	6.08	31.36	0.554 ^{a, d}
	A/A	79	22.91	21.52	18.09	27.73	
	Total	86	22.57	20.96	18.08	27.07	
TGP	A/G	7	67.32	78.34	-5.13	139.78	0.559 ^{a, d}
	A/A	79	70.23	86.27	50.90	89.55	
	Total	86	69.99	85.23	51.72	88.26	

a. No cumple con las pruebas de homocedasticidad y normalidad

b. Cumple con las pruebas de homocedasticidad y normalidad

c. t Student

d. U de Mann whitney

Tabla 18. Análisis entre la variante *CYP2C9* 430C>T y marcadores de daño hepático (n=86)

Marcador	Genotipo	n	Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Estadístico ^{a, b}
					Límite inferior	Límite superior	
FA	C/T	6	78.89	17.22	60.81	96.96	0.325
	C/C	80	74.68	25.24	69.06	80.30	
	Total	86	74.97	24.72	69.67	80.27	
BT	C/T	6	0.31	0.14	0.17	0.46	0.852
	C/C	80	0.42	1.00	0.20	0.65	
	Total	86	0.42	0.96	0.21	0.62	
BD	C/T	6	0.13	0.05	0.08	0.18	0.734
	C/C	80	0.14	0.09	0.12	0.16	
	Total	86	0.14	0.09	0.12	0.16	
BI	C/T	6	17.05	5.40	11.38	22.71	0.760
	C/C	80	20.45	13.14	17.53	23.38	
	Total	86	20.22	12.77	17.48	22.95	
TGO	C/T	6	14.82	10.32	3.99	25.66	0.105
	C/C	80	23.15	21.48	18.37	27.93	
	Total	86	22.57	20.96	18.08	27.07	
TGP	C/T	6	31.07	9.63	20.96	41.18	0.383
	C/C	80	72.91	87.67	53.40	92.42	
	Total	86	69.99	85.23	51.72	88.26	

a. No cumple con las pruebas de homocedasticidad y normalidad

b. U de Mann Whitney

Si se considera el proceso de glucuronidación como proceso de destoxificación (57), es válido inferir que las alteraciones debidas a la variante genética *UGT2B7* 801 en estado homocigoto TC/TC, alteren este proceso para la eliminación de metabolitos hepatotóxicos. Sin embargo, se ha descrito que algunas veces *UGT2B7* puede generar acil-glucurónidos los cuales son intermediarios reactivos tóxicos, como es el caso del metabolismo del diclofenaco (58,59). Por tanto, los resultados de *UGT2B7* obtenidos en esta investigación se podrían explicar por

mecanismos similares a la formación de especies reactivas tóxicas como acil-glucurónidos formados en mayor proporción cuando se tiene un genotipo determinado.

7.5.3 Daño hepático y genotipos de *UGT2B7* y *CYP2C9*

Se realizó un análisis mediante tablas cruzadas para observar la relación entre los pacientes con daño hepático y las variantes genéticas estudiadas de *CYP2C9* y de *UGT2B7*. Los resultados se muestran en las Tablas 19 y 20 y en cada una se considera un criterio de diagnóstico para DILI. Sin embargo, no se observó ninguna relación significativa entre los pacientes con probable daño hepático y los genotipos *UGT2B7* 801A>T 802T>C, 161C>T, 372A>G y *CYP2C9* 430C>T.

Tabla 19. Relación del daño hepático con criterio de CIOMS 1990 y genotipos de *CYP2C8* y *UGT2B7*.

	Genotipo	Daño hepático		Total	Estadísticos Significancia (valor p)
		Con daño hepático	Sin daño hepático		
<i>UGT2B7</i> 801A>T 802T>C	AT/TC	1	30	31	0.835 ^a
	TC/TC	3	50	53	
	AT/AT	0	2	2	
	Total	4	82	86	
<i>UGT2B7</i> 372A>G	A/G	0	7	7	0.708 ^b
	A/A	4	75	79	
	Total	4	82	86	
<i>UGT2B7</i> 161C>T	C/T	1	24	25	0.820 ^a
	T/T	0	6	6	
	C/C	3	52	55	
	Total	4	82	86	
<i>CYP2C9</i> 430C>T	C/T	0	6	6	0.744 ^b
	C/C	4	76	80	
	Total	4	82	86	

a. Chi cuadrada de Pearson

b. F exacta de Fisher

Tabla 20. Relación del daño hepático con criterio del Consenso del Grupo internacional de expertos 2011 y genotipos de *CYP2C8* y *UGT2B7*.

Genotipo	Daño hepático leve			Estadísticos	
	Con daño hepático	Sin daño hepático	Total	Significancia	
<i>UGT2B7</i> 801A>T 802T>C	AT/TC	0	31	31	0.529 ^a
	TC/TC	2	51	53	
	AT/AT	0	2	2	
	Total	2	84	86	
<i>UGT2B7</i> 372A>G	A/G	0	7	7	0.843 ^b
	A/A	2	77	79	
	Total	2	84	86	
<i>UGT2B7</i> 161C>T	C/T	0	25	25	0.561 ^a
	T/T	0	6	6	
	C/C	2	53	55	
	Total	2	84	86	
<i>CYP2C9</i> 430C>T	C/T	0	6	6	0.865 ^b
	C/C	2	78	80	
	Total	2	84	86	

a. Chi cuadrada de Pearson.

b. F exacta de Fisher.

En la literatura no existen estudios que relacionen los criterios diagnósticos para DILI y las variables genéticas analizadas en este trabajo, por lo tanto, es difícil comparar estos resultados con estudios en los que se observa solo la asociación de los niveles de algunos marcadores de daño hepático. Esto puede deberse a que estos criterios están más enfocados en la atención clínica. Además, estos resultados pueden estar indicando que, aun cuando se encontraron asociaciones con bilirrubinas en los resultados anteriores, los procesos que están involucrados en el aumento de bilirrubinas no son suficientes para generar DILI, podrían tratarse de una alteración bioquímica aislada (30,32,46).

7.6 Relación de *GSTM1* Y *GSTT1* con marcadores de daño hepático y Daño hepático.

7.6.1 Asociación de variaciones en el número de copias en *GSTM1* y *GSTT1* con los niveles séricos de marcadores hepáticos

Se realizó el análisis estadístico para evaluar la influencia de CNV (duplicaciones o deleciones) de los genes *GSTM1* y *GSTT1*, y la combinación de ambos en los niveles séricos de marcadores hepáticos. El análisis de CNV en *GSTM1* y

GSTM1 de manera individual no mostró una influencia en los niveles de los marcadores de daño hepático (Tabla 21 y 22).

Tabla 21. Media de los niveles séricos de marcadores de daño hepático en función de la variación en el número de copias de *GSTM1* (n=86)

No. de copias <i>GSTM1</i>		n	Media	Desviación estándar	Estadístico ^a
					Significancia
FA	Delección	42	75.19	27.12	0.935
	Normal	41	74.85	23.28	
	Duplicación	3	73.56	6.77	
	Total	86	74.97	24.72	
BT	Delección	42	0.55	1.37	0.153
	Normal	41	0.29	0.12	
	Duplicación	3	0.22	0.10	
	Total	86	0.42	0.96	
BD	Delección	42	0.16	0.12	0.146
	Normal	41	0.13	0.04	
	Duplicación	3	0.11	0.05	
	Total	86	0.14	0.09	
BI	Delección	42	22.10	16.21	0.452
	Normal	41	18.28	8.19	
	Duplicación	3	20.24	6.63	
	Total	86	20.22	12.77	
TGO	Delección	42	26.86	27.16	0.369
	Normal	41	18.58	11.73	
	Duplicación	3	17.04	6.61	
	Total	86	22.57	20.96	
TGP	Delección	42	76.80	94.55	0.879
	Normal	41	64.75	78.23	
	Duplicación	3	46.33	26.03	
	Total	86	69.99	85.23	

a. Kruskal Wallis

Tabla 22. Media de los niveles séricos de marcadores de daño hepático en función de la variación en el número de copias de *GSTT1* (n=86)

No. de copias <i>GSTT1</i>		n	Media	Desviación estándar	Estadístico ^a
					Significancia
FA	Delección	17	75.81	28.37	0.556
	Normal	34	77.17	23.01	
	Duplicación	35	72.44	24.96	
	Total	86	74.97	24.72	
BT	Delección	17	0.34	0.20	0.986
	Normal	34	0.31	0.12	
	Duplicación	35	0.56	1.50	
	Total	86	0.42	0.96	
BD	Delección	17	0.14	0.05	0.814
	Normal	34	0.14	0.05	
	Duplicación	35	0.15	0.13	
	Total	86	0.14	0.09	
BI	Delección	17	22.70	12.68	0.369
	Normal	34	17.03	5.01	
	Duplicación	35	22.11	17.04	
	Total	86	20.22	12.77	
TGO	Delección	17	24.91	21.88	0.655
	Normal	34	17.39	7.77	
	Duplicación	35	26.47	27.74	
	Total	86	22.57	20.96	
TGP	Delección	17	79.00	106.40	0.987
	Normal	34	69.10	76.32	
	Duplicación	35	66.48	84.41	
	Total	86	69.99	85.23	

a. Kruskal Wallis

Se realizó una estratificación de la muestra de 86 pacientes de acuerdo a la presencia de las variaciones en el número de copias en *GSTM1* y *GSTT1* de manera combinada. De esta manera se conformaron dos grupos: el grupo 1, con 24 pacientes portadores de alteraciones (deleciones y/o duplicaciones) en ambos genes; y el grupo 2, con 62 pacientes portadores de una o ninguna alteración en *GSTM1* y *GSTT1*. Se realizó el análisis estadístico para evaluar el impacto de esta combinación en los niveles séricos de marcadores de daño hepático (Tabla 23).

Tabla 23. Media de los niveles séricos de marcadores de daño hepático en función de la variación en el número de copias de *GSTM1* y *GSTT1* combinados.

	Grupos ^a	n	Media	Desviación estándar	Estadístico ^b Significancia
FA	Grupo 1	24	77.33	32.46	0.743
	Grupo 2	62	74.06	21.23	
	Total	86	74.97	24.72	
BT	Grupo 1	24	0.73	1.80	0.036*
	Grupo 2	62	0.29	0.12	
	Total	86	0.42	0.96	
BD	Grupo 1	24	0.17	0.16	0.194
	Grupo 2	62	0.13	0.04	
	Total	86	0.14	0.09	
BI	Grupo 1	24	25.49	20.58	0.142
	Grupo 2	62	18.17	7.22	
	Total	86	20.22	12.77	
TGO	Grupo 1	24	34.14	33.75	0.022*
	Grupo 2	62	18.09	10.49	
	Total	86	22.57	20.96	
TGP	Grupo 1	24	78.39	101.67	0.644
	Grupo 2	62	66.74	78.65	
	Total	86	69.99	85.23	

a. Grupo 1: "Con alteraciones en ambos genes / Grupo 2: Con una o ninguna alteración

b. U de Mann-Whitney

Diversos estudios han identificado a *GSTM1* y *GSTT1* como biomarcadores de la susceptibilidad a diferentes enfermedades como diabetes mellitus tipo 2, cáncer de mama, entre otros (60–62). Un estudio realizado por Fukushima y col en el 2008, con 149 pacientes pediátricos japoneses concluyó que el genotipo combinado con ambos alelos nulos para *GSTM1* y *GSTT1* puede ser un factor de riesgo para el aumento de niveles séricos de marcadores de daño hepático como TGO y la gamma glutamil transferasa. Sin embargo, los autores no pudieron establecer la administración de VPA fuera la causa de aumentos en los niveles de los marcadores de daño hepáticos mencionados(42).

En este trabajo se encontraron valores significativamente más altos de TGO y BT en los pacientes que portaban CNV en *GSTM1* y *GSTT1*. Esta condición cumple con lo establecido para daño hepático inducido por fármacos o DILI, sin embargo, al igual que el estudio de Fukushima y cols. (2008), esto no puede atribuirse a la administración con VPA ya que las enzimas GST se encargan de metabolizar una gran cantidad de compuestos endógenos y exógenos y la tendencia a mayores niveles de TGO y BT podrían no deberse únicamente a la administración de VPA. Asimismo, es importante recalcar que las medias de los niveles de TGO y BT no están fuera de los intervalos de referencia por lo que únicamente se puede hablar de una tendencia a presentar mayores niveles de estos marcadores en individuos que portan alteraciones en el número de copias de *GSTM1* y *GSTT1*. Esto podría ser de relevancia clínica a futuro ya que, con la ayuda de estudios realizados en un mayor período de tiempo, se podrá determinar si la presencia de estas alteraciones conduce a daño hepático. Las variantes genéticas analizadas de *UGT2B7* y *CYP2C9* no mostraron asociación con los niveles séricos de marcadores hepáticos. Esto fue similar a lo reportado previamente (42).

7.6.2 Daño hepático y CNV en *GSTM1/GSTT1*

Debido a la importancia y complejidad de las manifestaciones del daño hepático, es importante basarse en las consideraciones emitidas por organismos internacionales para determinar si un paciente presenta alteración en el hígado debido al uso de fármacos.

*7.6.2.1 Criterios de CIOMS 1990 y variación en el número de copias de *GSTM1* y *GSTT1*.*

De acuerdo a los parámetros indicados por el criterio del CIOMS consenso de 1990 (30), se encontraron cuatro pacientes con daño hepático, tres de los cuales presentaron niveles de TGP > dos veces el límite superior, y un paciente con valores de BD > dos veces el límite superior.

Al realizar el análisis estadístico, se encontró una asociación (prueba exacta de Fisher $p=0.005$) de la presencia de CNV en ambos genes, *GSTT1* y *GSTM1*, con daño hepático (Tabla 24).

Tabla 24. Tablas cruzadas entre variación de número de copias de GSTM1 y GSTT1 y daño hepático inducido por fármacos vasado en CIOMS 1990 (n =86)

	Con daño hepático	Sin daño hepático	Total	Significancia ^a
Con alteraciones en número de copias en ambos genes	4	20	24	0.005 ^b
Con una o ninguna alteración en el número de copias	0	62	62	
Total	4	82	86	

a. Prueba exacta de Fisher. b. *Odds ratio* (OR) (se sumó 0.5 a cada dato para calcular OR)= 27.44 (intervalo de confianza de 10.737 (IC 95%= 1.415- 532.0)

Los parámetros considerados por el consenso de CIOMS de 1990 permiten una mayor sensibilidad para identificar una hepatotoxicidad utilizando cambios en los niveles séricos de marcadores de daño hepático. Actualmente, se considera que estos parámetros pueden ser confusos para el diagnóstico de DILI, ya que es posible que sean alcanzados por un paciente que presenta una respuesta adaptativa a los tratamientos farmacológicos y se han clasificado como una alteración bioquímica aislada y de baja severidad (32); sin embargo, esto no significa que el DILI quede descartado. Se considera importante que cuando se identifican niveles de marcadores hepáticos que puedan indicar DILI, se realice el análisis de causalidad por parte del clínico. Este análisis debe estar basado en un algoritmo de diagnóstico llamado RUCAM (Roussel Uclaf Causality Assessment Method por sus siglas en inglés o algún otro especializado para DILI), la confirmación mediante esta herramienta consolida el diagnóstico de DILI (46).

7.6.2.2 Criterio “Hy’s Low” y variación en el número de copias de GSTM1 y GSTT1.

Este es el criterio considerado por la FDA (29) y es probablemente el más utilizado a nivel mundial. Sin embargo, contiene parámetros en donde se permiten niveles séricos mayores de los marcadores de daño hepático en comparación con otros criterios(30,32). Por lo tanto, usando el criterio “Hy’s Low” ningún individuo cumpliría con los parámetros descritos. Este criterio está enfocado a identificar riesgo de daño hepático severo, por lo que para este estudio no fue de utilidad.

7.6.2.3 Criterio del consenso Grupo Internacional de Expertos en DILI 2011

Finalmente, utilizando el criterio del consenso realizado por un Grupo Internacional de Expertos en DILI (por sus siglas en inglés IDILIEG 2011), de acuerdo a las recomendaciones del centro Oxford de Medicina Basada en Evidencias de 2011 (32) se identificaron dos pacientes con leve daño hepático, ya que ambos tenían valores de TGP 3 veces mayores que el límite superior, pero sin aumento en las bilirrubinas. El análisis de tablas cruzadas con prueba exacta de Fisher demostró que no existía una asociación entre la presencia de CNV en *GSTM1* y *GSTT1* y el daño hepático (Tabla 25).

Tabla 25. Tablas cruzadas entre variación de número de copias de *GSTM1* y *GSTT1* y daño hepático inducido por fármacos vasado en IDILIEG 2011 (n=86)

	Con daño hepático	Sin daño hepático	Total	Significancia ^a
Con alteraciones en número de copias en ambos genes	2	22	24	0.076
Con una o ninguna alteración en el número de copias	0	62	62	
Total	4	82	86	

a. Prueba exacta de Fisher.

El grupo internacional de expertos en el tema incrementaron el criterio de 2 veces el límite superior de TGP a 5 veces. Los expertos marcan entre los motivos del cambio la alta probabilidad de error al momento de diagnosticar DILI, debido al incremento de comorbilidades como la obesidad la cual puede en muchos casos causar hígado graso no alcohólico (63). Sin embargo, los criterios “Hy Law” colocan a los pacientes con 3 veces el límite alto de TGP o TGO en un contexto de riesgo de muerte por DILI del 10% (46), por lo tanto, un paciente con DILI puede ser subdiagnosticado hasta que el nivel de TGP sea de 5 veces el límite superior de TGP, entonces el riesgo de muerte por DILI será mayor al 10%.

8. CONCLUSIONES

Las variantes genéticas estudiadas *UGT2B7* 801A>T 802T>C, *UGT2B7* 161C>T, *UGT2B7* 372A>G y *CYP2C9* 430C>T no tienen relación con la respuesta al tratamiento con VPA, no alteran significativamente las concentraciones plasmáticas, las concentraciones plasmáticas corregidas y las dosis ajustadas de VPA.

Las variantes genéticas *UGT2B7* 372A>G y *CYP2C9* 430C>T no mostraron relación significativa con el cambio en los niveles de marcadores de daño hepático. Sin embargo, las variantes genéticas de *UGT2B7* 801A>T 802T>C, *UGT2B7* 161C>T mostraron relación con la variación de los niveles de BT y BD, lo cual indica que estos genotipos pueden explicar en parte la variación en los niveles de dichos marcadores.

La terapia concomitante agrupada por; (1) inductores, (2) inhibidores y (3) fármacos no inhibidores / no inductores más monoterapia, no alteró significativamente las concentraciones plasmáticas de VPA.

Las variaciones por número de copia de los genes *GSTM1* y *GSTT1* de manera individual no estuvieron relacionados con el desarrollo de hepatotoxicidad, ni con alteraciones en los niveles de marcadores de daño hepático. Sin embargo, el genotipo combinado en el que se tienen CNV en ambos genes (*GSTM1* y *GSTT1*) tiene niveles de TGO y BD significativamente más altos que los pacientes que tiene CNV en sólo uno de los genes.

Este trabajo contribuye modestamente al conocimiento de la relación genotipo-fenotipo de las variantes genéticas de *CYP2C9*, *UGT2B7*, *GSTT1* y *GSTM1*, y su relación con respecto a algunos aspectos farmacodinámicos y el desarrollo de reacciones adversas hepáticas. De este modo, se demostró que dichos genes están implicados en la terapéutica de VPA, por su papel en el desarrollo de niveles significativamente más altos de marcadores de daño hepático, y la proporción significativamente más alta de pacientes con DILI según los criterios del CIOMS de 1990. Asimismo, es importante resaltar que todos los objetivos fijados en el presente estudio fueron alcanzados.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. abril de 2014;55(4):475–82.
2. GRR_SSA_210_09.pdf [Internet]. [citado el 22 de enero de 2016]. Disponible en: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/210_SSA_09_Epilepsia/GRR_SSA_210_09.pdf
3. EyR_SSA_210_09.pdf [Internet]. [citado el 22 de enero de 2016]. Disponible en: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/210_SSA_09_Epilepsia/EyR_SSA_210_09.pdf
4. OMS | Epilepsia [Internet]. WHO. [citado el 19 de febrero de 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/es/>
5. Löscher W, Klotz U, Zimprich F, Schmidt D. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. *Epilepsia*. 2009;50(1):1–23.
6. Fricke-Galindo I, Jung-Cook H, Llerena A, López-López M. Pharmacogenetics of adverse reactions to antiepileptic drugs. *Neurol Barc Spain*. 2015;
7. Ahmed SN, Siddiqi ZA. Antiepileptic drugs and liver disease. *Seizure*. abril de 2006;15(3):156–64.
8. Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamba JK, Leeder JS, Song W, Birnbaum AK, et al. Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(4):236–41.
9. Brunton L, Chabner B, Knollman B. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition. McGraw Hill Professional; 2011. 2107 p.
10. Shorvon SD. The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*. 2011;52(6):1052–7.
11. Ngugi AK, Kariuki SM, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR. Incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis. *Neurology*. 2011;77(10):1005–12.
12. Duarte F, Silvia A, Araujo C, Alberto Ó. Aspectos psicosociales de la epilepsia. *Arch Neurocienc México DF*. 2004;9(3):135–42.
13. Epidemiología - Epilepsia | Epilepsia en México [Internet]. [citado el 22 de enero de 2016]. Disponible en: <http://epilepsiaenmexico.com/epidemiologia/>
14. Hernández-Vanegas, Laura E., M-JIE. Epilepsia. Primera edición. México: INNN; 2014. 295 p. (Series INNN; vol. 1).
15. Martínez-Juarez IE, López-Zapata R., Gómez-Arias B., Bravo-Armenta E., Romero-Ocampo L., Estévez-Cruz Z., et al. Epilepsia farmacorresistente: uso de la nueva definición y factores de riesgo relacionados. Estudio en población mexicana de un centro de tercer nivel - Revista de Neurología. *Rev Neurol*. 2012;54(3):159–66.
16. Pubchem. VALPROIC ACID | C8H16O2 - PubChem [Internet]. [citado el 31 de marzo de 2016]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3121#section=Top>
17. Lasoń W, Dudra-Jastrzębska M, Rejda K, Czuczwar SJ. Basic mechanisms of antiepileptic drugs and their pharmacokinetic/pharmacodynamic interactions: an update. *Pharmacol Rep PR*. 2011;63(2):271–92.
18. Zaccara G, Perucca E. Interactions between antiepileptic drugs, and between antiepileptic drugs and other drugs. *Epileptic Disord Int Epilepsy J Videotape*. 2014;16(4):409–31.
19. GUIA DE FARMACOVIGILANCIA PARA EL REPORTE DE SOSPECHAS DE REACCIONES ADVERSAS.pdf [Internet]. [citado el 8 de julio de 2016]. Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Documents/GUIA%20DE%20FARMACOVIGILANCIA%20PARA%20EL%20REPORTE%20DE%20SOSPECHAS%20DE%20REACCIONES%20ADVERSAS.pdf>
20. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: A meta-analysis of prospective studies. *JAMA*. 1998;279(15):1200–5.

21. Ketter TA, Post RM, Theodore WH. Positive and negative psychiatric effects of antiepileptic drugs in patients with seizure disorders. *Neurology*. 1999;53(5 Suppl 2):S53-67.
22. Tomson T, Battino D, Perucca E. Valproic acid after five decades of use in epilepsy: time to reconsider the indications of a time-honoured drug. *Lancet Neurol*. 2015;
23. Star K, Edwards IR, Choonara I. Valproic acid and fatalities in children: a review of individual case safety reports in VigiBase. *PloS One*. 2014;9(10):e108970.
24. St. König A, Siemes H, Bläker F, Boenigk E, Groß-Selbeck G, Hanefeld F, et al. Severe Hepatotoxicity During Valproate Therapy: An Update and Report of Eight New Fatalities. *Epilepsia*. 1994;35(5):1005–15.
25. König SA, Schenk M, Sick C, Holm E, Heubner C, Weiss A, et al. Fatal liver failure associated with valproate therapy in a patient with Friedreich's disease: review of valproate hepatotoxicity in adults. *Epilepsia*. julio de 1999;40(7):1036–40.
26. Gerber N, Dickinson RG, Harland RC, Lynn RK, Houghton D, Antonias JI, et al. Reye-like syndrome associated with valproic acid therapy. *J Pediatr*. 1979;95(1):142–4.
27. Sadeque AJ, Fisher MB, Korzekwa KR, Gonzalez FJ, Rettie AE. Human CYP2C9 and CYP2A6 mediate formation of the hepatotoxin 4-ene-valproic acid. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;283(2):698–703.
28. Tang W, Borel AG, Fujimiya T, Abbott FS. Fluorinated analogues as mechanistic probes in valproic acid hepatotoxicity: hepatic microvesicular steatosis and glutathione status. *Chem Res Toxicol* 1995;8(5):671–82.
29. Pauls L, Senior J. Serious Drug Induced Liver Injury [Internet]. FDA. 2013 [citado el 5 de octubre de 2016]. Disponible en: http://google2.fda.gov/search?q=cache:d4CWKL9YF7wJ:www.fda.gov/downloads/training/clinicalinvestigatortrainingcourse/ucm378686.pdf+Hy%27s+Law+2014&client=FDAGov&proxystylesheet=FDAGov&output=xml_no_dtd&site=FDAGov&ie=UTF-8&access=p&oe=UTF-8
30. Bénichou C. Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. *J Hepatol*. 1990;11(2):272–6.
31. Tejada Cifuentes F. Hepatotoxicidad por Fármacos. *Rev Clínica Med Fam*. 2010;3(3):177–91.
32. Aithal GP, Watkins PB, Andrade RJ, Larrey D, Molokhia M, Takikawa H, et al. Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;89(6):806–15.
33. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. 1999;286(5439):487–91.
34. Schlienger RG, Shapiro LE, Shear NH. Lamotrigine-induced severe cutaneous adverse reactions. *Epilepsia*. 1998;39 Suppl 7:S22-26.
35. Hung C-C, Ho J-L, Chang W-L, Tai JJ, Hsieh T-J, Hsieh Y-W, et al. Association of genetic variants in six candidate genes with valproic acid therapy optimization. *Pharmacogenomics*. 2011;12(8):1107–17.
36. Sun Y, Zhuo W, Lin H, Peng Z, Wang H, Huang H, et al. The influence of UGT2B7 genotype on valproic acid pharmacokinetics in Chinese epilepsy patients. *Epilepsy Res*. 2015;114:78–80.
37. Ho PC, Abbott FS, Zanger UM, Chang TKH. Influence of CYP2C9 genotypes on the formation of a hepatotoxic metabolite of valproic acid in human liver microsomes. *Pharmacogenomics J*. 2003;3(6):335–42.
38. Búdi T, Tóth K, Nagy A, Szever Z, Kiss Á, Temesvári M, et al. Clinical significance of CYP2C9-status guided valproic acid therapy in children. *Epilepsia*. 2015;56(6):849–55.
39. Tóth K, Búdi T, Kiss Á, Temesvári M, Háfra E, Nagy A, et al. Phenoconversion of CYP2C9 in epilepsy limits the predictive value of CYP2C9 genotype in optimizing valproate therapy. *Pers Med*. 2015;12(3):199–207.

40. Amini-Shirazi N, Ghahremani MH, Ahmadkhaniha R, Mandegary A, Dadgar A, Abdollahi M, et al. Influence of CYP2C9 polymorphism on metabolism of valproate and its hepatotoxic metabolite in Iranian patients. *Toxicol Mech Methods*. 2010;20(8):452–7.
41. Guo Y, Hu C, He X, Qiu F, Zhao L. Effects of UGT1A6, UGT2B7, and CYP2C9 genotypes on plasma concentrations of valproic acid in Chinese children with epilepsy. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2012;27(5):536–42.
42. Fukushima Y, Seo T, Hashimoto N, Higa Y, Ishitsu T, Nakagawa K. Glutathione-S-transferase (GST) M1 null genotype and combined GSTM1 and GSTT1 null genotypes are risk factors for increased serum gamma-glutamyltransferase in valproic acid-treated patients. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2008;389(1–2):98–102.
43. Lisker R. Estructura genética de la población mexicana aspectos médicos y antropológicos. México: Salvat Mecicana de Editores; 1981. 158 p. (Biblioteca Médica Mexicana).
44. WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects [Internet]. 2013 [citado el 10 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/>
45. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press; 2001. 1365 p.
46. Chalasani NP, Hayashi PH, Bonkovsky HL, Navarro VJ, Lee WM, Fontana RJ. ACG Clinical Guideline: The Diagnosis and Management of Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury. *Am J Gastroenterol*. 2014;109(7):950–66.
47. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. 2010;51(6):1069–77.
48. Bauer LA. *Applied Clinical Pharmacokinetics*. McGraw Hill Professional; 2007. 842 p.
49. Swart M, Evans J, Skelton M, Castel S, Wiesner L, Smith PJ, et al. An Expanded Analysis of Pharmacogenetics Determinants of Efavirenz Response that Includes 3'-UTR Single Nucleotide Polymorphisms among Black South African HIV/AIDS Patients. *Front Genet*. 2015;6:356.
50. Hwang M-S, Lee S-J, Jeong H-E, Lee S, Yoo M-A, Shin J-G. Genetic variations in UDP-glucuronosyltransferase 2B7 gene (UGT2B7) in a Korean population. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2010;25(4):398–402.
51. C_32449742_20 TaqMan SNP Genotyping Assays [Internet]. [citado el 20 de julio de 2015]. Disponible en: http://www.lifetechnologies.com/order/genome-database/browse/genotyping/keyword/C_32449742_20?ICID=uc-snp-C_32449742_20
52. Lee JW, Dworetzky B. Rational Polytherapy with Antiepileptic Drugs. *Pharmaceuticals*. 2010;3(8):2362–79.
53. Stephen LJ, Brodie MJ. Antiepileptic drug monotherapy versus polytherapy: pursuing seizure freedom and tolerability in adults. *Curr Opin Neurol*. 2012;25(2):164–72.
54. Sánchez-Álvarez JC, Ramos-Lizana J, Machado-Casas IS, Serrano-Castro PJ, Martínez-Antón JL, Ruiz-Giménez J, et al. Combined treatment with antiepileptic drugs. *Andalusian Epilepsy Guide 2015*. *Rev Neurol*. 2015;60(8):365–79.
55. Smith RL, Haslemo T, Refsum H, Molden E. Impact of age, gender and CYP2C9/2C19 genotypes on dose-adjusted steady-state serum concentrations of valproic acid—a large-scale study based on naturalistic therapeutic drug monitoring data. *Eur J Clin Pharmacol*. 2016;72(9):1099–104.
56. Tan L, Yu J-T, Sun Y-P, Ou J-R, Song J-H, Yu Y. The influence of cytochrome oxidase CYP2A6, CYP2B6, and CYP2C9 polymorphisms on the plasma concentrations of valproic acid in epileptic patients. *Clin Neurol Neurosurg*. 2010;112(4):320–3.
57. Chen C-H. Phase II Enzymes. En: *Activation and Detoxification Enzymes* [Internet]. Springer New York; 2012 [citado el 11 de noviembre de 2016]. p. 37–48. Disponible en: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-1049-2_5

58. CHALASANI N, BJÖRNSSON E. Risk Factors for Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury. *Gastroenterology*. junio de 2010;138(7):2246–59.
59. Leise MD, Poterucha JJ, Talwalkar JA. Drug-Induced Liver Injury. *Mayo Clin Proc*. 2014;89(1):95–106.
60. Habdous M, Siest G, Herbeth B, Vincent-Viry M, Visvikis S. Polymorphismes des glutathion S-transférases et pathologies humaines: bilan des études épidémiologiques. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2004;62:15–24.
61. Soto-Quintana O, Zúñiga-González GM, Ramírez-Patiño R, Ramos-Silva A, Figuera LE, Carrillo-Moreno DI, et al. Association of the GSTM1 null polymorphism with breast cancer in a Mexican population. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):13066–13075.
62. Wang G, Zhang L, Li Q. Genetic polymorphisms of GSTT1, GSTM1, and NQO1 genes and diabetes mellitus risk in Chinese population. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341(2):310–3.
63. Idrovo V, Gonzalo L. Enfermedad hepática grasa no alcohólica: NAFLD. *Rev Colomb Gastroenterol*. 2004;19(1):44–9.

ANEXO. Constancias y resumen de participación en eventos científicos:

- Reunión Anual de investigación Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
- Simposio Iberoamericano de Farmacia Social, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Manuel Velasco Suárez

Otorga la presente

Constancia

A:

Manuel Alejandro Barrón Cruz¹, Iris Enriqueta Martínez Juárez³, Helgi Helene Jung Cook⁴, Nancy Monroy Jaramillo², Alberto Ortega Vázquez¹, Ingrid Fricke Galindo¹, Marisol López López¹.

Por su participación en la **XXXI Reunión Anual de Investigación**, llevada a cabo en la Ciudad de México durante los días 19 y 20 de mayo de 2016, con el cartel:

RELACIÓN DE MARCADORES DE DAÑO HEPÁTICO Y GENOTIPOS DE GSTM1 Y GSTT1.

México D.F., a 20 de mayo de 2016.

DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN

LIC. CLAUDIA PATRICIA ARCE REYES
COORDINADORA GENERAL



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA

MANUEL VELASCO SUÁREZ

Dirección de Investigación

Departamento de Apoyo a la Investigación

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



XXXI REUNIÓN ANUAL DE INVESTIGACIÓN FORMATO PARA PRESENTACIÓN DE TRABAJOS 2016

Título:

Relación de marcadores de daño hepático y genotipos de *GSTM1* y *GSTT1*.

Autores:

Manuel Alejandro Barrón Cruz¹, Iris Enriqueta Martínez Juárez³, Helgi Helene Jung Cook⁴, Nancy Monroy Jaramillo², Alberto Ortega Vázquez¹, Ingrid Fricke Galindo¹, Marisol López López¹

Instituciones:

¹Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-X, ²Departamento de Neurogenética, INNNMVS, ³Departamento de Investigación Clínica INNNMVS, ⁴Departamento de Neuropsicofarmacología, INNNMVS.

Categoría:

Investigación Básica

Investigación Clínica

Investigación Socio-Médica

Resumen: (El formato sólo permite visualizar máximo 300 palabras)

Introducción:

La epilepsia es una enfermedad multifactorial caracterizada por convulsiones recurrentes no provocadas, debidas a un descontrol en la actividad eléctrica de un grupo de neuronas. El ácido valproico (VPA) es un antiepiléptico ampliamente usado, ha sido reportado que puede generar alteraciones hepáticas. Los factores genéticos contribuyen a la variabilidad en la respuesta a los fármacos antiepilépticos y al desarrollo de las reacciones adversas a medicamentos derivadas de su uso. Entre las enzimas metabolizadoras de fármacos se encuentra la familia glutatión-S-transferasa (GST) cuya función es la de eliminar de sustancias endógenas y xenobióticos que entran en el organismo y que de otra manera generarían toxicidad.

Objetivo:

Observar la correlación entre el genotipo de *GSTM1* y *GSTT1* de pacientes bajo tratamiento con VPA, y la alteración de marcadores de daño hepático.

Pacientes y Métodos:

Se estudiaron 74 pacientes bajo tratamiento con VPA. Los datos del perfil hepático de cada paciente se tomaron de los expedientes clínicos. La determinación del número de copias de *GSTM2* y *GSTT1* se realizó por Multiplex ligation-dependent probe amplification[®], siguiendo el protocolo del fabricante, y los resultados se analizaron mediante el software *coffalyser*[®]. El análisis estadístico se realizó mediante SPSS Statistics 22.

Resultados:

Se identificaron 21 individuos con deleciones o duplicaciones en ambos genes *GSTM1* y *GSTT1*, los cuales tuvieron mayores niveles de marcadores de daño hepático, transaminasa glutámico-oxalacética (TGO), transaminasa glutámico-pirúvica (TGP) y bilirrubinas totales (BT), en comparación con los que solo tuvieron alteración en uno de los dos genes o un genotipo silvestre (ANOVA TGO $p=0.002$, $\alpha=0.95$, TGP $p=0.008$, $\alpha=0.95$, BT $p=0.001$ $\alpha=0.95$).

Discusión y Conclusiones:

Los individuos portadores de alteraciones en el número de copias ambos genes estudiados presentaron mayores niveles de marcadores de daño hepático lo que sugiere que los genotipos *GSTM1* y *GSTT1* están asociados con la susceptibilidad para desarrollar daño hepático.



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA

MANUEL VELASCO SUÁREZ

Dirección de Investigación

Departamento de Apoyo a la Investigación

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



XXXI REUNIÓN ANUAL DE INVESTIGACIÓN FORMATO PARA PRESENTACIÓN DE TRABAJOS 2016

Gráfico o tabla:



Correlación de la variación en el número de copias de GSTM1 y GSTT1 con marcadores de daño hepático.

Solicita una presentación de tipo: **Póster**

Expositor: Barrón Cruz, Manuel Alejandro¹, Responsable: Marisol López López^{2*}, Iris Enriqueta Martínez Juárez³, Helgi Jung Cook⁴, Nancy Monroy Jaramillo⁵, Alberto Ortega Vázquez⁵, Ingrid Fricke Galindo⁵.

¹Maestría en Ciencias Farmacéuticas, UAM-X

²Departamento de Sistemas Biológicos UAM-X

³Departamento de Investigación Clínica INNNMVS

⁴Departamento de Neuropsicofarmacología, INNNMVS

⁵Departamento de Neurogenética, INNNMVS

*E-mail Responsable de la investigación: mlopez@correo.xoc.uam.mx

1. INTRODUCCIÓN

La epilepsia es una enfermedad multifactorial caracterizada por convulsiones recurrentes no provocadas, debidas a un descontrol en la actividad eléctrica de un grupo de neuronas. El ácido valproico (VPA) es un antiepiléptico de primera línea que puede ocasionar hepatotoxicidad con una frecuencia de 1/500 en pacientes <2 años y 1/37000 en pacientes adultos, no obstante, cuando la falla hepática se presenta suele ser muy grave. Los factores genéticos contribuyen a la variabilidad en la respuesta a los fármacos antiepilépticos y al desarrollo de las reacciones adversas a estos medicamentos. Entre las enzimas metabolizadoras de VPA se encuentran las glutatión-S-transferasas (GST), la cual, es una enzima detoxificadora que tiene gran importancia para la eliminación de 4-eno-VPA el cual es el principal metabolito hepatotóxico de VPA.

2. OBJETIVOS

Evaluar la relación entre el genotipo de GSTM1 y GSTT1 de pacientes bajo tratamiento con VPA y la alteración de marcadores de daño hepático.

3. METODOLOGÍA

Siguiendo los requerimientos éticos, se estudiaron 74 pacientes tratados con VPA. Los datos del perfil hepático se tomaron de los expedientes clínicos. La determinación del número de copias de

GSTM1 y GSTT1 se realizó por Multiplex ligation-dependent probe amplification®. Para el análisis estadístico se realizó la prueba U de Mann-Whitney.

4. RESULTADOS

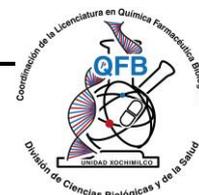
Se conformaron dos grupos: uno con 21 pacientes portadores de alteraciones (deleciones y duplicaciones) en ambos genes y otro con 53 pacientes portadores de una o ninguna alteración. Las medias aritméticas de los valores de perfil hepático en cada grupo están dentro de los intervalos de referencia, sin embargo se encontró una relación significativa entre las alteraciones de GSTT1 y GSTM1 y mayores niveles de bilirrubina total ($p=0.002$), bilirrubina directa ($p=0.034$), bilirrubina indirecta ($p=0.003$) y transaminasa glutámico pirúvica ($p=0.007$).

5. CONCLUSIONES

Los genotipos GSTM1 y GSTT1 podrían estar asociados con alteraciones del funcionamiento hepático.



10 Y 11 DE JUNIO, 2016 UAM-X, MÉXICO, D.F.



Otorga la Presente:

CONSTANCIA

*Barrón Cruz Manuel Alejandro, Marisol López López, Iris
Enriqueta Martínez Juárez, Helgi Jung Cook, Nancy Monroy
Jaramillo, Alberto Ortega Vázquez, Ingrid Fricke Galindo*

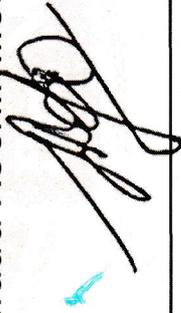


Por su participación como EXPOSITOR del Cartel titulado:

*“Correlación de la Variación en el Número de Copias de GSTM1 y
GSTT1 con Marcadores de Daño Hepático” con el eje temático
Farmacogenómica en el 4to. Simposio Iberoamericano en Farmacia
Social Dra. Marina Altigracia Martínez “Farmacoterapia”*



Realizado en la Unidad Xochimilco, Ciudad de México, 10 y 11 de Junio de 2016



Dr. Salvador Vega y León
Rector General de UAM



Dra. Patricia E. Alfaro Moctezuma
Rectora de la Unidad Xochimilco

