

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



**IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN CYP2C9 ASOCIADAS
CON LA RESISTENCIA A ANTICOAGULANTES ORALES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO

P R E S E N T A:

Arturo Flores Tufiño

Director de tesis: M. en c. Beatriz Eugenia Villegas Torres

Asesor de tesis: Q.F.B. Patricia Vidal Millán

México, D.F. Marzo 2014.



**Instituto Nacional de
Medicina Genómica**
MÉXICO

Proyecto desarrollado en:

Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)

Laboratorio de Diagnóstico Genómico (LDG)

Julio 2012-Enero 2014

D e d i c a t o r i a

A la memoria de mi bisabuela Consuelo Gutiérrez y abuelo José Tufiño

La añoranza quizá nunca se aherrumbre con el tiempo,
pero siempre la opulencia de mis memorias será más grata.
A mis grandes abuelos, descollantes, conspicuos, aquellos
que otrora trocaron mi infancia en la más envidiable.
Aunque el cierzo inevitable los haya cobijado, permanecen
perennes para mí, continúan siendo parte del resol en los
pasos de mi vida.

A mis padres: Margarita Tufiño y Arturo Flores

A ustedes que desde que tengo memoria han bregado en su
vida para darme lo mejor, debo lo que soy a su esfuerzo
loable. Ustedes que con sus valores de herencia atávica, han
sido el velamen que me ha colocado en los vientos correctos.
A ustedes que han tañido con la armonía de su ser mis
principios. Mis años de esfuerzo son para ustedes,
enguirnalдарlos es poco, porque seguirán rutilando en cada
victoria mi vida.

A g r a d e c i m i e n t o s

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México:
abrevadero de mi agnosticismo, de mi filosofía positivista e idealista.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, cuna de gran aprendizaje académico y
de vida.

A mi familia:

A mis padres y hermanas por siempre estar
detrás de mí, apoyándome y cuidándome.

A mi director de tesis:

Mtra. Beatriz Villegas por compartir su conocimiento y
experiencia académica, laboral y de vida. Gracias por
sus consejos y regaños.

A mis amigos:

Aquellos que siempre me recordaron que nunca la
acabaría (aunque luego me apoyaron): Areli, Rodrigo,
Patricia, Hugo, Cindy, Oscar, Carolina, Alejandro, Alicia,
Edgar, Karla, Abraham, Midori, Fernando, Michel.

“Las personas debemos el
progreso a los insatisfechos”.
Aldous Huxley

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	I
INTRODUCCIÓN.....	II

CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO

1.1. PROMESAS Y OPORTUNIDADES DE LA FARMACOGENÓMICA	1
1.1.1. Polimorfismos de un solo nucleótido.....	2
1.1.1.1. Importancia de los SNPs.....	2
1.1.2. Farmacogenómica en México.....	3
1.2. ANTICOAGULANTES ORALES.....	5
1.2.1. Aspectos Químicos de los Anticoagulantes Cumarínicos.....	6
1.2.2. Farmacología de los ACO.....	8
1.2.3. Efectos adversos de los ACOs.....	10
1.3. FARMACOGENÓMICA DE ANTICOAGULANTES ORALES.....	11
1.3.1. Gen <i>CYP2C9</i>	12
1.3.1.1. Enzima <i>CYP2C9</i>	12
1.3.1.2. Metabolismo de los ACOs.....	13
1.3.1.3. Polimorfismos en <i>CYP2C9</i>	14
1.3.2. Otros Genes Asociados a la Respuesta de los ACOs.....	20
1.3.2.1. <i>VKORC1</i>	20
1.3.2.2. <i>CYP4F2</i>	21
1.3.3. Factores Clínicos Asociados a Dosis de ACOs.....	22
1.3.3.1. Edad.....	22
1.3.3.2. Condiciones comórbidas.....	22
1.3.3.3. Co-medicación.....	22
1.3.3.4. Factores nutricionales.....	23
1.3.3.5. Otros.....	23
1.4. RESISTENCIA A ANTICOAGULANTES ORALES.....	24
1.4.1. ¿Qué es la Resistencia a los ACOs?.....	24
1.4.2. ¿Cuáles son las Causas de la Resistencia?.....	25

CAPÍTULO 2: DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
2.2. HIPÓTESIS.....	28
2.3. OBJETIVOS	
2.3.1. Generales.....	29
2.3.2. Particulares.....	29
2.4. MATERIAL Y MÉTODO.....	30
2.4.1. Población de Estudio.....	30
2.4.2. Criterios de inclusión.....	30
2.4.2.1. Selección de pacientes resistentes.....	30
2.4.3. Criterios de exclusión.....	31
2.4.4. Extracción del DNA.....	31
2.4.5. Genotipificación.....	31
2.4.6. Secuenciación.....	31
2.4.6.1. PCR de amplificación.....	32
2.4.6.2. Verificación de productos amplificados.....	32
2.4.6.3. Purificación de productos amplificados.....	32
2.4.6.4. PCR de secuenciación.....	33
2.4.6.5. Purificación de secuencias.....	34
2.4.6.6. Lectura de las secuencias.....	34
2.4.7. Secuenciación.....	34
2.4.8. Análisis de datos.....	34

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RESULTADOS.....	37
3.2. DISCUSIÓN.....	47
3.3. CONCLUSIONES.....	50
3.4. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES.....	51

REFERENCIAS.....	III
-------------------------	------------

ANEXO.....	VII
-------------------	------------

ABREVIATURAS

ACO = Anticoagulante Oral

AINE = Antiinflamatorio No Esteroideo

CYP = Citocromo P-450

ddNTP = Dideoxyribonucleotide Triphosphates (*didesoxirribonucleótido trifosfatado*)

DNA = Desoxyribonucleic Acid (*Ácido Desoxirribonucleico*)

dNTP = Deoxyribonucleotide Triphosphates (*desoxirribonucleótido trifosfatado*)

ECV = Enfermedad Cardiovascular

IMSS = Instituto Mexicano del Seguro Social

INC = Instituto Nacional de Cardiología

INMEGEN = Instituto Nacional de Medicina Genómica

INR = International Normalized Ratio (*Relación Normalizada Internacional*)

MAF = Minor Allele Frequency (*Frecuencia del alelo menor*)

mRNA = Messenger Ribonucleic Acid (*Ácido Ribonucleico Mensajero*)

NCBI = National Center for Biotechnology Information (*Centro Nacional para la Información Biotecnológica*)

IEHS = National Intitute of Enviromental Health Sciences (*Instituto Nacional de Ciencias de Salud Ambiental*)

OMS = Organización Mundial para la Salud

pb = Pares de bases

PCR = Polymerase Chain Reaction (*Reacción en Cadena de la Polimerasa*)

RAM = Reacción Adversa por Medicamento

RNA = Ribonucleic Acid (*Ácido Ribonucleico*)

rs = Ref SNP cluster (*grupo referencia del SNP*)

SNP = Single Nucleotide Polymorphisms (*Polimorfismos de un Solo Nucleótido*)

SRS = Substrate Recognition Site (*Sitio de Reconocimiento de Sustrato*)

TP = Tiempo de Protrombina

UTR = Untranslated Region (*Región no Traducible*)

V_{Max} = Tasa Máximo de Metabolismo

VKA = Vitamin K Antagonist (*Antagonista de la Vitamina K*)

VKORC1 = Vitamin K Epoxide Reductase Complex Subunit 1(subunidad 1 del Complejo de la Vitamina K Epóxido Reductasa)

RESUMEN

Introducción. El acenocumarol y la warfarina son los anticoagulantes orales (ACO) cumarínicos más utilizados en la prevención de eventos tromboembólicos en pacientes con enfermedades cardiovasculares (ECV) del Instituto Nacional de Cardiología (INC). Estos fármacos poseen un estrecho rango terapéutico, por lo que se observa una enorme variabilidad interindividual, dónde el fondo genético juega un papel muy importante. La enzima codificada por el gen *CYP2C9* es el principal metabolizador de los anticoagulantes orales. Pacientes portadores de variantes alélicas en este gen, pueden expresar una proteína con actividad alterada que afecta la farmacocinética de los ACOs, lo que puede ocasionar un fracaso terapéutico y poner en peligro la vida del paciente portador.

Objetivo. Identificar variantes genéticas novedosas en el gen *CYP2C9* característicos de pacientes que requieren una dosis alta de acenocumarol o warfarina, que pudieran servir de marcadores farmacogenómicos óptimos para el Mexicano-Mestizo.

Material y método. En este estudio, se identificaron y estudiaron 7 pacientes Mexicanos-Mestizos con fenotipo de resistencia a ACOs, se les secuenció la región promotora y codificante del gen *CYP2C9* siguiendo los protocolos de Seattle SNPs Variant Discovery Resource utilizando un analizador genético 3130xl de Applied Biosystems, el análisis de las secuencias se realizó con SeqmanPro™ de Lasergene® utilizando las secuencias de referencia del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y el International Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS).

Resultados. Se encontraron 4 SNPs o polimorfismos de un solo nucleótido en el intron y exón 9, así como en la región UTR-3', los cuales ya han sido reportados, ninguno de ellos tiene asociación clínica.

Conclusiones. No se identificaron variantes novedosas en el gen *CYP2C9* sugiriendo que pueden existir otros factores clínicos o variantes genéticas que expliquen la resistencia a anticoagulantes orales en estos pacientes, sin embargo los resultados obtenidos enriquecen la información genómica de nuestra población (Mestizos Mexicanos).

INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo y en nuestro país ¹. Los anticoagulantes orales de tipo cumarínico son la terapia más común para el tratamiento y prevención en los eventos tromboembólicos. Estos medicamentos tienen una ventana terapéutica muy estrecha, por lo cual se observa una gran variabilidad en la respuesta en los pacientes que los toman, lo que dificulta lograr un nivel terapéutico adecuado, por un lado, se encuentra la hemorragia como principal reacción adversa por medicamento (RAM) asociada y en por otro lado la ineficacia del anticoagulante que deja desprotegido de tromboembolismo al paciente, ambos puede poner en peligro la vida del paciente ².

Los anticoagulantes cumarínicos más utilizados son: la warfarina, el acenocumarol y fenprocumon, una de las herramientas para mejorar la respuesta a estos medicamentos es la Farmacogenómica, donde se puede estimar la dosis individual óptima de cada paciente para alcanzar los efectos terapéuticos y minimizar los riesgos de sangrado o eventos tromboembólicos en función de las características clínicas y genéticas del paciente ³. Los polimorfismos genéticos más utilizados en la farmacogenómica son los que afectan el metabolismo o el sitio de acción de los cumarínicos, que están en los genes: *CYP2C9*, *VKORC1* y *CYP4F2*. Hoy en día, el gen *CYP2C9* ha sido ampliamente estudiado, este gen codifica al citocromo P450 2C9, cuya función es metabolizar los cumarínicos. Existen muchos polimorfismos en este gen que expresan proteínas con una actividad metabólica disminuida o nula, las variantes alélicas más comunes son *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3*, por lo que los pacientes portadores de estas variantes genéticas requieren una menor dosis de acenocumarol y warfarina.

Una característica importante en nuestra población es su reciente mestizaje entre los grupos Amerindios, Caucásicos provenientes de Europa y Africanos traídos en condición de esclavos en el siglo XVI con la conquista. Debido a esta particularidad es necesario conocer cuales alelos están presentes en nuestra

población y su frecuencia, con la finalidad de conocer la asociación y efectividad de los medicamentos que se prescriben.

Hasta la fecha, no sé a podido comprender la resistencia de individuos a anticoagulantes orales como acenocumarol o warfarina desde la perspectiva genómica; hasta hoy día, son pocos los trabajos publicados donde se estudia la resistencia a algún ACO desde una base farmacogenómica, y es inexistente trabajo alguno de investigación farmacogenómica que estudie el problema en población Mexicana-Mestiza

Este estudio se enfoca en identificar la existencia de características genéticas que caractericen a los pacientes Mexicanos-Mestizos que presentan resistencia a acenocumarol y warfarina. Los pacientes con resistencia a los anticoagulantes de tipo cumarínico como la warfarina y el acenocumarol requieren una dosis mucho más alta, de la que por sus características y antecedentes personales deberían, para alcanzar un INR terapéuticamente estable y así protegerles contra complicaciones tromboembólicas.

Se buscaron variantes genéticas novedosas en el gen *CYP2C9* (proteína encargada del metabolismo de los ACO) que pudieran explicar el por qué de la resistencia en estos individuos; para esto se realizó secuenciación capilar por método de Sanger de la región promotora y codificante del gen *CYP2C9*. La técnica de secuenciación es considerada como el “estándar de oro” para la detección de mutaciones.

.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO.

1.1. PROMESAS Y OPORTUNIDADES DE LA FARMACOGENÓMICA

Con el Proyecto Genoma Humano (1990-2003), se pretendía que el conocimiento genómico diera lugar a una nueva medicina, enfocada principalmente a la prevención, lo que marca el inicio de la era de la medicina “predictiva e individualizada”.

Basado en el “Dogma Central de la Biología” (el ADN se transcribe en ARN, el ARN mensajero se traduce en proteínas, las proteínas participan en procesos biológicos) la farmacogenómica toma la premisa de que la información genética del individuo tiene un papel determinante en la respuesta a fármacos y por tanto, era posible explicar una respuesta farmacológica a partir de un genotipo ⁴.

Por lo cual la farmacogenómica surge a partir de la secuenciación del genoma humano, para identificar las variaciones genéticas presentes en el DNA de un paciente, que asociadas con sus características personales, como: edad, tipo de alimentación, peso, estilo de vida, enfermedades concomitantes, se pueda explicar la respuesta a un medicamento en particular.

De ahí que una de las promesas de la farmacogenómica es mejorar la eficacia y seguridad de los medicamentos o fármacos, de una manera individualizada. Es importante señalar que los términos farmacogenómica y farmacogenética son conceptos diferentes pese a que son utilizados por algunos autores como sinónimos. La Farmacogenética nace en los años 50's y se enfoca en estudiar la relación de las variantes genéticas y su asociación con la respuesta a los fármacos, mientras que la Farmacogenómica no sólo estudia la asociación de las variantes genéticas con la respuesta a fármacos, ya que integra los factores medioambientales, comorbilidad del paciente, su raza, edad, género, las interacciones farmacológicas que se pudieran presentar, factores nutricionales, patogénesis y severidad de una enfermedad, que pudieran modificar la sensibilidad, respuesta y seguridad del fármaco.

Tanto la farmacogenética y la farmacogenómica se enfocan en el estudio de variantes y la expresión del gen que codifica a las proteínas transportadoras de fármacos, receptores en donde se une el fármaco (farmacodinámica) o enzimas responsables del metabolismo (farmacocinética), las cuales se asocian con las diferentes respuestas que pueden presentar los pacientes a un mismo fármaco.

Lo cual puede proporcionar la información necesaria para prescribir el mejor tratamiento, a la dosis necesaria, que cause menos toxicidad para cada paciente, con lo que se pueden evitar algunas reacciones adversas causadas por fármacos.

La variabilidad que se observa en respuesta a los fármacos pueden estar asociadas a variantes genéticas, conocidos como polimorfismos genéticos, a través de los cuales se puede explicar las variaciones tanto en cantidad como en actividad que puede presentar una proteína que participa en la actividad que realiza el fármaco.^{5,6}

1.1.1.1 LOS POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO

Nuestro genoma costa de aproximadamente 30 mil genes, de los cuales aproximadamente el 10% tiene asociación con la farmacogenómica⁷. Entre humanos compartimos el 99.9% de similitud en las letras que forman la secuencia del ADN o genoma humano; y aun así, es remarcable la extraordinaria diversidad en los seres humanos a nivel genético, ya que nuestras diferencias que nos dan identidad, se deben a la variación de menos del 0.1% del DNA⁸. En este sentido, estas variantes genéticas son las que se estudian en farmacogenética y farmacogenómica⁹.

La forma más común de las variantes en el DNA se conoce como “polimorfismos de un solo nucleótido” o SNP (por sus siglas en inglés, *single nucleotide polymorphisms*), los cuales comprenden las sustituciones de una base nitrogenada en un nucleótido (A, C, G ó T) por otra letra. Los SNPs pueden presentarse dentro de los exones, intrones o región promotora de un gen. Los SNPs dan cuenta aproximadamente del 90% de la variación y se encuentran dispersos por todo el genoma humano (1 SNP cada 100 a 1000 pares de bases) que contiene aproximadamente 6.4 millones de pares de bases¹⁰. Se han estimado de 10 a 30 millones de SNPs en los humanos, de los cuales menos del 1% codifican un cambio en el aminoácido de la proteína⁷.

1.1.1.1.1 Importancia de los SNPs

Los SNPs, son las variantes genéticas que se presentan con una frecuencia mayor al 1% en una población, algunos son utilizados como biomarcadores farmacogenómicos, teniendo una mayor utilidad aquellos asociados con alguna reacción adversa a medicamentos o efectos adversos a medicamentos (RAM).

Una reacción adversa a un medicamento se define como: cualquier reacción nociva no intencionada que se presenta a la dosis que normalmente se usa en el ser humano para profilaxis, diagnóstico o tratamiento o para modificar funciones fisiológicas.

En el tratamiento con anticoagulantes orales de origen cumarínico, se pretende determinar la dosis óptima para alcanzar los niveles terapéuticos e identificar a los pacientes que pudieran estar en riesgo elevado de experimentar alguna RAM, y así mismo, determinar mejor los enfoques terapéuticos en estos pacientes ^{4, 11-12}.

Diversos estudios han reportado que la variabilidad en respuestas a un fármaco se debe a diferencias interétnicas entre las personas, por la diferencia de frecuencias alélicas de polimorfismos funcionales relacionados con la absorción, distribución, metabolismo, y excreción de fármacos, así como sus blancos terapéuticos. ¹³

Pese a las bondades que la farmacogenómica puede ofrecer, entre las razones por las cuales la implementación clínica de la información farmacogenómica ha sido mínima hasta ahora, se encuentran: la resistencia del médico para abandonar la estrategia de “ensayo y error”, su inexperiencia para elegir el fármacos correcto, o simplemente su ignorancia para ajustar dosis con base al perfil genético del paciente. Es preciso admitir que existen una gran cantidad de medicamentos con una ventana terapéutica amplia lo que se traduce en un margen de seguridad más grande, con efectos terapéuticos fácilmente medibles a través de pruebas o herramientas de laboratorios que son sencillos y que ante un evento inesperado o una falla terapéutica, en muchos casos, existe la opción de recurrir a medicamentos alternativos, sin mayores secuelas para el paciente; en tales circunstancias las pruebas farmacogenéticas y farmacogenómica no ofrecen un costo-beneficio que justifique su utilidad. En contraste, la terapia anticoagulante con ACOs puede tener mayores ventajas, integrando estudios genéticos, donde ciertos SNPs pueden ser útiles en la predicción de dosis, pudiendo evitar efectos adversos que pueden poner en peligro la vida del paciente.

1.1.2 FARMACOGENÓMICA EN MÉXICO

En los últimos 10 años, México se ha comprometido con el desarrollo de una infraestructura humana y tecnológica, con un especial énfasis en el desarrollo de una plataforma nacional de medicina genómica para mejorar el cuidado de la salud de los mexicanos ¹⁴. Es así como nace el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en el 2004 ¹⁵.

El objetivo de la investigación genómica en nuestro país, es contribuir al cuidado de la salud de los mexicanos a través del desarrollo de proyectos de investigación científica con tecnología de vanguardia, formación de recursos humanos de excelencia y generación de aplicaciones genómicas para mejorar la atención de la salud, con apego a principios éticos universales y de respeto a los Derechos Humanos.

Al igual que otras poblaciones latinas, los mexicanos constituyen una población mestiza de reciente formación conformada principalmente por orígenes ancestrales Amerindio y Europeos y en menor proporción Africano y Asiático, lo cual representa diversos y serios desafíos para los estudios genéticos, pero también representan un poderoso recurso para el análisis de las bases genéticas de enfermedades complejas.

Estudios recientes en poblaciones latinoamericanas han demostrado la existencia de patrones de contribución ancestral diferenciales entre e intra grupos, que correlacionan con la densidad poblacional indígena antes de la conquista de América y con los patrones de crecimiento demográfico actuales en dichas regiones^{16, 17-18}.

El conocimiento de la frecuencia de las variantes genéticas, a través de la investigación genómica, dará lugar a aplicaciones predictivas y con tratamientos más efectivos, que ayudaría a reducir el costo en la atención de los pacientes. A través de este nuevo enfoque en la genómica poblacional, se pretende predecir la susceptibilidad de los individuos a desarrollar alguna enfermedad, implementar estrategias preventivas, encontrar blancos terapéuticos específicos, así como individualizar los tratamientos farmacológicos, basadas en las necesidades clínicas y las características genéticas de las poblaciones.

La promesa de la farmacogenética y la farmacogenómica es: convertirse en un instrumento que contribuya a identificar el fármaco adecuado, a la dosis adecuada, en el individuo adecuado, y únicamente se irá logrando a medida que se entienda de qué manera las variantes genómicas se traducen en la asociación a la respuesta a los fármacos y éstas a su vez, tengan un impacto clínico que permita mejorar la relación de seguridad-eficacia de un fármaco.

1.2. ANTICOAGULANTES ORALES

Un fármaco ideal es aquel que trate y prevenga efectivamente enfermedades además de que no tenga efectos adversos. Sin embargo, un fármaco es raramente efectivo y totalmente seguro en todos los pacientes. Una constante de la farmacoterapia es la forma variable en cómo las personas responden a los medicamentos. En efecto, siempre que se emplean fármacos se encuentran individuos que responden de manera esperada, otros con falla terapéutica y en algunos se presentan efectos indeseables que superan los beneficios.

Los anticoagulantes cumarínicos más utilizados son: la warfarina, el acenocumarol y fenprocumon. La warfarina es el anticoagulante más utilizado a nivel mundial, en nuestro país se prescribe en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), así como en la práctica clínica privada, el acenocumarol es el anticoagulante más utilizado en Europa, Argentina, Chile, India, Ucrania, Israel, Canadá, en nuestro país se prescribe en los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de la Secretaría de Salud ¹⁹.

Los anticoagulantes orales de tipo cumarínico son empleados de manera profiláctica en el paciente con el fin protegerlo de eventos tromboembólicos en distintas condiciones clínicas y patológicas como: síndrome coronario agudo, cardiopatías congénitas, enfermedad tromboembólica venosa, coagulación intravascular diseminada, enfermedad vascular cerebral, trombosis venosa profunda, embolismo pulmonar, fibrilación auricular, síndrome antifosfolipídico, en remplazo de válvulas cardíacas mecánicas y biológicas ^{2, 20-21}.

Éstas patologías antes mencionadas, forman parte del extenso grupo de Enfermedades Cardiovasculares (ECVs), entendiéndose como todo tipo de enfermedades relacionadas con el corazón y los vasos sanguíneos, las cuales son la principal causa de muerte en el mundo (40%). En el 2008, en nuestro país más de 87 mil personas fallecieron a causa de alguna ECV, representando esto el 26% de muertes totales para ese año ^{22, 23}. Las ECVs con mayor porcentaje de muertes en México fueron: Enfermedades Isquémicas Cardíacas con 11.1% del total de muertes, seguido de las Enfermedades Cerebrovasculares (5.6%) y en tercer lugar las Enfermedades Hipertensivas con 2.9 % de las muertes totales registradas en el 2008 ²⁴.

La anticoagulación basada en fármacos cumarínicos es definitivamente el tratamiento de elección en nuestro país debido a que son baratos y son accesibles para nuestra población. Estos fármacos tienen un estrecho intervalo terapéutico debido a la gran sensibilidad al fármaco, producto de la variabilidad interindividual

del paciente. Algunos de ellos no alcanzan los niveles terapéuticos, otros tienen una respuesta excesiva (niveles supratrapéuticos) que incrementa el riesgo de efecto adverso de hemorragia, especialmente en las primeras semanas de iniciada la terapia. El tratamiento con cumarínicos está asociado al incremento en la incidencia de hemorragia, la cual es una complicación reconocida que afecta aproximadamente el 1% de los pacientes y cerca de la mitad de esos pacientes mueren anualmente debido a complicaciones hemorrágicas ²⁵.

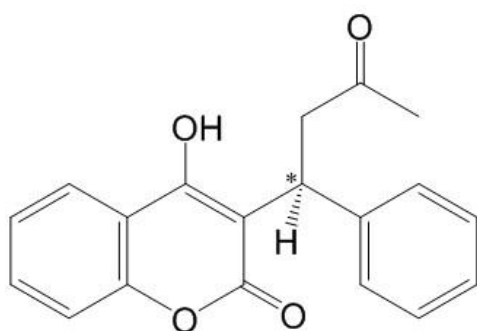
Es por esto, que existe la necesidad de vigilar el efecto terapéutico mediante pruebas de laboratorio para establecer la eficacia y seguridad en el tratamiento anticoagulante. El método de referencia es la prueba de Tiempo de Protrombina (TP) en plasma pobre en plaquetas con citrato de sodio, que expresado en el sistema INR propuesto por la Organización Mundial para la Salud (OMS) hace más de 20 años, permite evaluar la eficacia del tratamiento de los anticoagulantes cumarínicos ²¹.

La expectativa anual de hemorragias durante terapias a largo plazo con anticoagulantes cumarínicos es de 2% - 5% para hemorragias graves, 0.5% - 1% para hemorragias fatales, y 0.2% - 0.4% para hemorragias intracraneales; convirtiéndose en una de las principales causas de emergencias médicas por reacción adversa a estos fármacos ²⁻³.

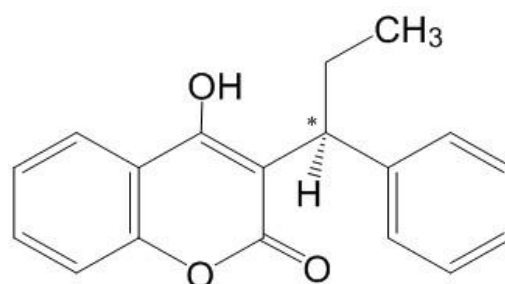
1.2.1 ASPECTOS QUÍMICOS DE LOS ANTICOAGULANTES CUMARÍNICOS

La warfarina fue la primer cumarina sintetizada en 1948 y desde 1953 comenzó a ser prescrita para el mantenimiento de un estado de anticoagulación prolongado en tratamientos a largo plazo. La estructura mínima necesaria para la actividad anticoagulante, es el esqueleto 4-hidroxycumarína con un subsiguiente carbono no-polar en la posición 3' (*fig.1.1*) ²⁶.

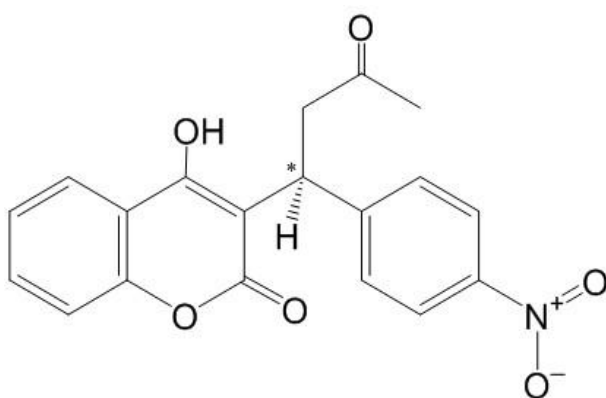
La síntesis de estos compuestos origina productos racémicos, por lo que los preparados de tales anticoagulantes en el mercado son ofrecidos como un racemato, es decir una mezcla de cada enantiómero y cabe mencionar que no se han identificado ventajas para administrar sólo un enantiómero. Los enantiómeros (*R*)- y (*S*)- de los anticoagulantes de tipo cumarínico difieren entre sí tanto en actividad y potencia anticoagulante, metabolismo, eliminación e interacciones con otros medicamentos. ²⁶⁻²⁷



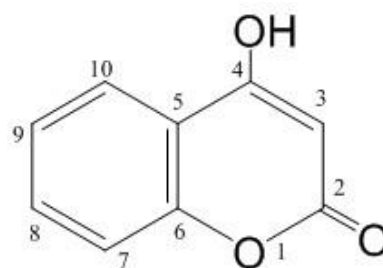
(*R,S*)-Warfarina



(*R,S*)-Fenprocumon



(*R,S*)-Acenocumarol



4-Hidroxicumarina

* Carbono quiral

Fig. 1.1. Anticoagulantes 4-hidroxicumarínicos más empleados. Comparten estructura 4-hidroxicumarina y difieren en el sustituyente en posición 3'. La warfarina es el más utilizado a nivel mundial y el mejor documentado.

1.2.2 FARMACOLOGÍA DE LOS ANTICOAGULANTE CUMARÍNICOS ORALES

Los anticoagulantes de tipo cumarínico, como el acenocumarol y la warfarina inhiben el ciclo de la vitamina K de su forma oxidada a reducida, lo que genera que se disminuya la forma reducida de la vitamina K (KH_2). Como la vitamina K reducida es un cofactor para la carboxilación de los residuos de glutamato en la región N-terminal de los factores de coagulación, la catálisis de dicha reacción post-ribosómica se ve limitada, esto afecta su funcionalidad en la coagulación (**fig. 1.2 y 1.3**). Aun y cuando los anticoagulantes cumarínicos inducen la síntesis defectuosa de todas las proteínas y factores de coagulación dependientes de la vitamina K, su mecanismo de acción se debe principalmente a la disminución de los niveles plasmáticos de protrombina funcional y, a la disminución de la cantidad de trombina, que se puede unir a la fibrina, lo que reduce la trombogenicidad de los coágulos.

Tanto el acenocumarol como la warfarina son rápidamente absorbidos después de su administración oral, aproximadamente un 99% se une a proteínas principalmente a albumina, la mayoría de sus metabolitos son excretados por la orina, solo en el caso de la warfarina algunos de sus metabolitos son excretados por la bilis.

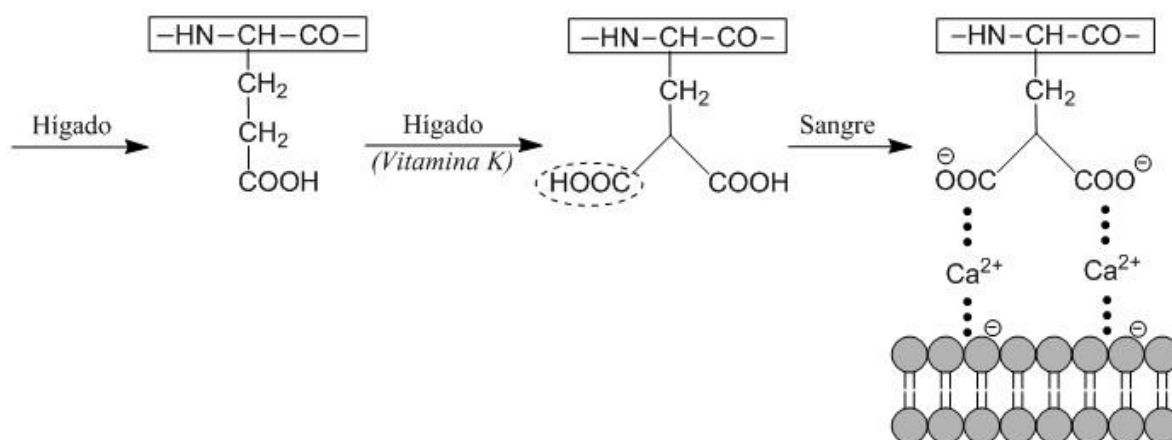


Fig.1.2. Activación de los factores mediante γ -carboxilación. La vitamina K es necesaria para dar funcionalidad a los factores de coagulación sintetizados en el hígado, catalizando la adhesión de un grupo $-COOH$ (carboxilo) extra al carbono en posición γ de los residuos de ácido glutámico en el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica de los factores II, VII, IX y X; a esto se le denomina γ -carboxilación. Esta modificación postribosómica permite la unión a Ca^{2+} , el cual es esencial para el enlace del factor a la superficie ácida de los fosfolípidos expuestos por las plaquetas y el endotelio vascular ²⁷.

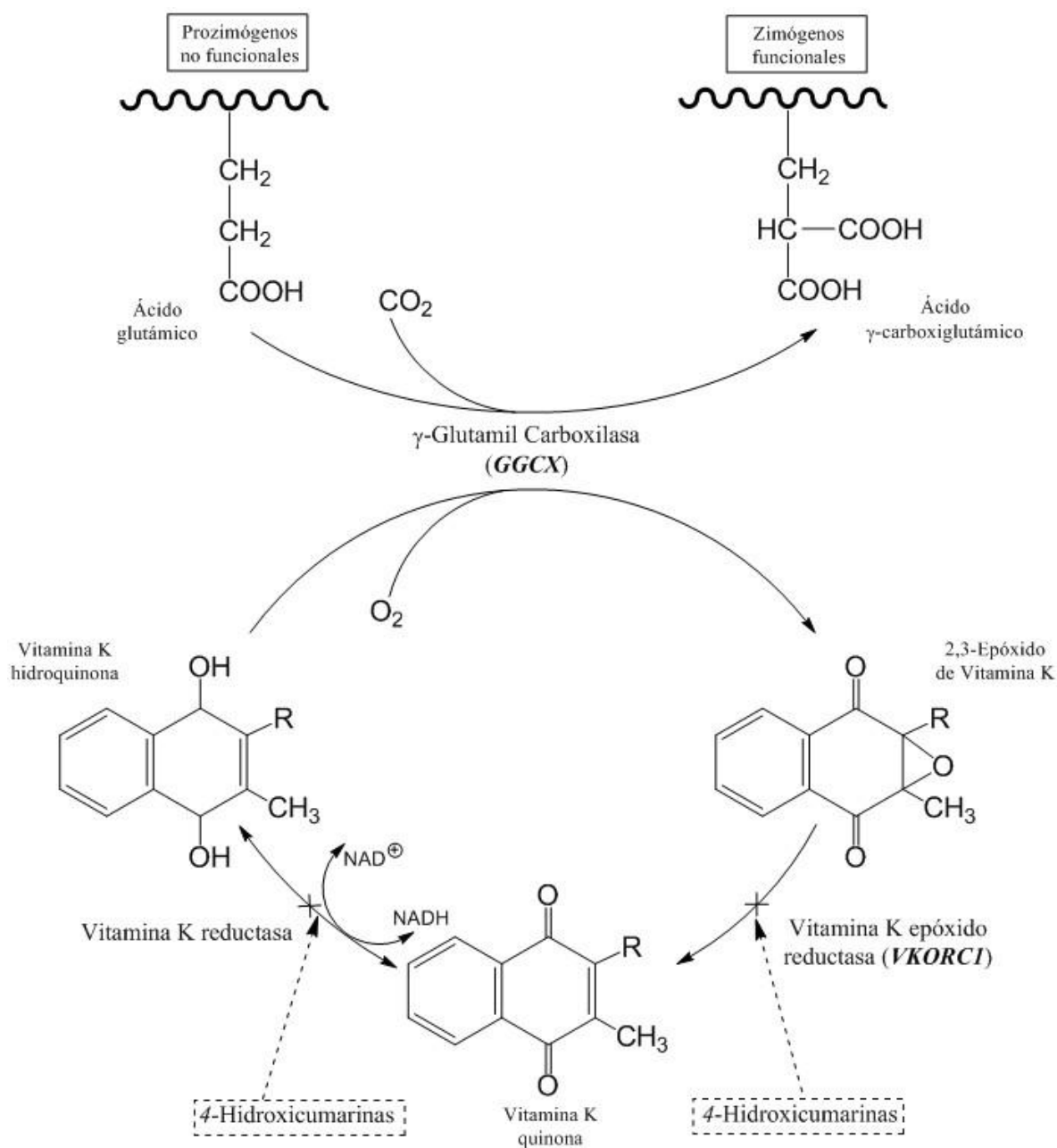


Fig. 1.3. Ciclo de la vitamina K y acción de los VKAs. Las 4-hidroxicumarinas inhiben la enzima VKORC1 involucrada en la regeneración de la forma reducida de la vitamina K, necesaria como coenzima de GGCX en la γ -carboxilación de factores no funcionales (prozimógenos) a factores funcionales (zimógenos). Esto detiene indirectamente la producción de las formas funcionales biológicamente de los factores de coagulación II, VII, IX, X, así como las proteínas anticoagulantes C, S y Z ^{35,49}.

1.2.3 EFECTOS ADVERSOS DE LOS ACOs

Fármacos como los Anticoagulantes orales (ACO) cumarínicos son sometidos a ajuste de dosis *a priori* de acuerdo con características clínicas del paciente y ajustes *a posteriori*, con base en la respuesta del paciente. Esta estrategia de “ensayo y error” puede entrañar riesgos en la seguridad del paciente, en base a un ajuste empírico de las dosis. A pesar del extenso uso por más de seis décadas, la terapia con cumarínicos continúa siendo muy desafiante debido a la seguridad y efectividad de la dosis que debe ser determinada durante los primeros meses y segundo, el mantenimiento de dosis debe ser ajustada por cambios en los pacientes como peso, dieta, estado de enfermedad y, uso concomitante con algún otro medicamento. La gran cantidad de factores que interactúan con los ACOs ocasionan su estrecho índice terapéutico, haciendo complicada la estabilización de dosis en el paciente, eso se traduce en malos resultados en la terapia que van desde la subcoagulación (incrementando el riesgo de trombosis) a la sobrecoagulación (incrementando el riesgo de serias y fatales hemorragias)²⁸⁻²⁹. En el 2011 la warfarina fue el fármaco número 1 en producir hospitalizaciones debido a RAMs³⁰.

La eficacia y seguridad en la dosificación de ACOs necesita ser determinada en cada paciente que inicia en tratamiento con anticoagulantes cumarínicos mediante pruebas de laboratorio que permitan llegar a una terapia óptima sin presentar efectos adversos. El método para determinar la eficacia de los cumarínicos es la prueba de Tiempo de Protrombina (TP) en plasma pobre de plaqueta con citrato de sodio como anticoagulante, expresado en el sistema INR (*International Normalized Ratio*) propuesto por la Organización Mundial para la Salud (OMS) hace más de 20 años. El nivel óptimo del INR terapéutico depende de la enfermedad que padece. Para los pacientes en los que desea prevenir eventos de trombosis venosa profunda y en cirugía de alto riesgo trombótico el INR debe ser de 2.0 a 2.5; para los pacientes en tratamiento de trombosis venosa profunda, embolia pulmonar y cirugía de cadera se deben anticoagular entre 2.0 y 3.0 de INR; para los pacientes con trombosis venosa recurrente, embolia pulmonar, prótesis valvular cardíaca, infarto del miocardio, oclusión arterial distal e injertos arteriales se debe manejar un INR de 3.0 a 4.5. El riesgo de hemorragia es particularmente elevado cuando el INR es igual o mayor a 4.5, particularmente en los primeros 90 días de tratamiento^{2, 21}.

En estas circunstancias es deseable incorporar en la práctica médica, nuevas estrategias que contemplen variables (clínicas y genéticas) que aumenten el valor predictivo de dosis que requiere el paciente, para identificar a aquellos que se beneficiarán o no del tratamiento farmacológico.

1.3. FARMACOGENÓMICA DE LOS ACOs

Actualmente la dosis de los cumarínicos es determinada de acuerdo a las características clínicas de cada paciente y en base al resultado de INR (obtenido días después de iniciado el tratamiento), en ese momento se puede realizar un ajuste en la dosis, hasta obtener el INR terapéutico óptimo en cada paciente.

La farmacogenómica es una herramienta en el tratamiento con anticoagulantes cumarínicos que puede estimar la dosis inicial más cercana a la óptima en cada paciente, para que logre el nivel terapéutico óptimo y minimice los riesgos de sangrado. La dosis inicial de cada paciente se calcula en función al genotipo del paciente con polimorfismos genéticos que están asociados al metabolismo o el sitio de acción del fármaco, en conjunto con sus características clínicas, estadio de la enfermedad, enfermedades concomitantes y otros medicamentos prescritos. Las variantes genéticas de cada paciente, que están asociados o que afecta a la respuesta de un fármaco, no cambiará durante toda la vida del paciente, sólo en caso de trasplante de órganos o tejidos o en caso de transfusión de sangre.

Se han asociado variantes en los genes que codifican al citocromo P450 2C9 y en la subunidad 1 del complejo de la vitamina K epóxido reductasa que pueden afectar la respuesta tanto a acenocumarol como de la warfarina. Los SNPs presentes en el gen del citocromo P450 2C9 (*CYP2C9*) afectan la actividad de la principal proteína involucrada en el metabolismo de estos fármacos. Por otra parte el gen que codifica la subunidad 1 del complejo de la vitamina K epóxido reductasa (*VKORC1*) es sitio blanco de los cumarínicos influyendo en la farmacocinética y farmacodinámica respectivamente; los SNPs en *VKORC1* están asociados con la sensibilidad a los ACOs, mientras que los polimorfismos en *CYP2C9* se asocian en el tiempo que puede tardar un paciente en lograr el nivel terapéutico con la dosis que requiere. Los genes *CYP2C9* y *VKORC1* tienen una influencia de aproximadamente un 40% de la variabilidad en los requerimientos de dosis de los cumarínicos ³¹.

Existe una nomenclatura para referir a genes, variantes genéticas o alelos y productos proteicos codificados. Por convención cuando se hace referencia al gen que codifica la enzima se emplea la misma nominación proteica (*CYP2C9*) pero en letra itálica (*CYP2C9*). Cada una de las variantes o alelos del gen se representan con un numero separado por un asterisco del correspondiente gen; por ejemplo los alelos *CYP2C9**3 y *CYP2C9**2.

1.3.1 GEN *CYP2C9*

A mediados del siglo pasado se descubrieron cúmulos de pigmentos en los hepatocitos, los cuales absorben luz a 450 nm, por lo que se les denominó citocromos P450 (CYP), luego se esclareció que tales pigmentos correspondían a un enorme grupo de enzimas localizadas en la fracción microsómica (membranas del retículo endoplásmico liso) de los hepatocitos. Todas las enzimas tienen una naturaleza hemoprotéica y comparten similitudes estructurales entre sí, por la cual fueron clasificadas como una superfamilia, y tienen como función el metabolismo de compuestos exógenos y endógenos del organismo.

Las enzimas de la superfamilia CYP450 tienen una clasificación y nomenclatura propia. Las enzimas de una misma familia designadas por un número arábigo (CYP1, CYP2) tienen una homología en la secuencia de aminoácidos no menor de 40%; cada familia se divide en subfamilias (designadas por una letra después del número arábigo: CYP1A, CYP3A) cuya homología es mayor al 77% en su secuencia de aminoácidos. Cada enzima específica se designa por un segundo número arábigo (CYP1A2, CYP2C9)⁴¹. En humanos se han descrito al menos 18 familias y 44 subfamilias de enzimas CYP, de las cuales sólo las familias CYP1, CYP2 y CYP3 tienen importancia en el metabolismo de fármacos³³⁻³⁴.

El metabolismo hepático de los fármacos mediante CYP P450 involucra la síntesis de residuos polares en la estructura del fármaco como vía principal de eliminación. En el 2008 Zanger *et al*³² revisaron la ruta de eliminación de los 200 medicamentos más vendidos en los EEUU y se encontró que cerca de 80% de los fármacos son metabolizados por las familias 1, 2 y 3 del CYP450 y que la mayor contribución la hacen las isoenzimas CYP3A4/5 (37%), CYP2C9 (17%), CYP2D6 (15%), CYP2C19 (10%), CYP1A2 (9%), CYP2C8 (6%) y CYP2B6 (4%). Las enzimas CYP1A2, CYP2C8 y CYP3A4, que carecen de polimorfismos funcionales, son responsables del metabolismo de la mitad de estos fármacos, mientras la otra mitad se metaboliza por la ruta de las isoenzimas CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 y CYP2D6, cuyos genes son ricos en polimorfismos que causan cambios en la expresión, selectividad o actividad de la enzima, lo que se refleja en la variabilidad de respuesta a un fármaco sustrato.

1.3.1.1 Enzima CYP2C9

Las enzimas de la subfamilia 2C actúan como monooxigenasas que catalizan el metabolismo oxidativo de muchos sustratos endobióticos (hormonas esteroideas sexuales, derivados de los ácidos grasos y vitaminas) y xenobióticos (fármacos, contaminantes y carcinógenos). Después de la enzima CYP3A4, CYP2C9 es la

enzima más predominantemente expresada en el hígado humano responsable de aproximadamente 18% del total del contenido proteico microsomal CYP del hígado humano³³⁻³⁵.

La actividad de CYP2C9 frente a fármacos es la de transformarlos a metabolitos inactivos mediante hidroxilación, para posteriormente ser excretados principalmente por orina. Los sustratos de CYP2C9 son moléculas débilmente ácidas con un aceptor de enlace de hidrogeno. Actualmente más de 100 fármacos han sido identificados como sustratos de CYP2C9, lo que corresponde del 10% al 20% de los fármacos prescritos actualmente. CYP2C9 metaboliza todos los antagonistas de vitamina K, casi todas las sulfonilureas orales, fármacos hipoglucemiantes, la mayoría de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, y muchos antagonistas del receptor de la angiotensina^{32, 34, 36}.

1.3.1.2 Metabolismo de los ACOs

La warfarina es un medicamento que se presenta como racemato, la (S)-warfarina es tres veces más potente que la (R)-warfarina. El enantiómero (S)- en la warfarina es el responsable principal del efecto anticoagulante. La warfarina por vía oral se absorbe por completo, en plasma se une a la albumina en un 99%, en el hígado se absorbe como warfarina libre, donde ejerce su efecto anticoagulante, su metabolismo se realiza por varias enzimas del citocromo P450³².

Sin embargo, desde un punto de vista clínico, la (R)-warfarina es más activa como anticoagulante, debido a que la (S)-warfarina es metabolizada por el citocromo P450 2C9 en el primer paso y de forma muy eficiente, convirtiéndolo en 6 - y 7 - hidroxí-warfarina que se excreta en la bilis; a diferencia de la (R)-warfarina que se metaboliza por CYP1A1, CYP1A2 y CYP3A4 en un metabolito tipo alcohol que es inactivo y se excreta por la orina³⁴.

Los pacientes con un alelo *2 o *3 del CYP2C9, tienen un metabolismo disminuido para eliminar al enantiómero más activo que es la (S)-warfarina, comparados con los pacientes que no poseen ningún alelo variante (CYP2C9 *1/*1), por lo que la eliminación del metabolito activo de (S)-warfarina, es 3 veces menor para los portadores de un genotipo CYP2C9 *1/*3 y 10 veces menor en los portadores de CYP2C9 *3/*3. Por lo que los pacientes portadores de los alelos *2 y *3 del CYP2C9 se han asociado con un aumento en la respuesta a la warfarina.

Al igual que (S)-warfarina, en el acenocumarol, el enantiómero (S)- es más potente que el (R)-acenocumarol y es metabolizado por CYP2C9. Las enzimas CYP1A2, 3A4, 2C9 y 2C19 metabolizan (R)-acenocumarol, pero una diferencia entre la

farmacocinética de warfarina y acenocumarol es que (S)- y (R)-warfarina tiene una vida media de aproximadamente 32 y 43 horas, mientras que (S)- y (R)-acenocumarol tienen una vida media de 2 y 8 horas, por lo que el (R)-acenocumarol es en gran parte responsable de la respuesta anticoagulante, debido a la vida media tan corta del (S)-acenocumarol³⁷⁻³⁹.

Los pacientes con un alelo variante *CYP2C9* tienen un mayor riesgo de presentar una sobrecoagulación al inicio de la terapia, es curioso que los pacientes que poseen *CYP2C9* *3, requieren una menor dosis de mantenimiento de acenocumarol, pero no sucede lo mismo con los pacientes con *CYP2C9* *2. La eliminación del (S)-acenocumarol en un paciente con un alelo *3 del *CYP2C9* es más de 15 veces menor que un paciente sin alelos variantes (*CYP2C9* *1/*1), lo que hace que la vida media se prolongue en estos pacientes (*CYP2C9* *1/*3). Por lo que el efecto del genotipo de *CYP2C9*, se traduce en el tiempo necesario para lograr la estabilidad de la terapia con acenocumarol y warfarina^{38, 39}.

Por lo tanto la farmacocinética de warfarina y acenocumarol por el *CYP2C9* se considera un ejemplo clásico de la farmacogenética, donde las dos variantes que han demostrado tener más implicaciones clínicas para su dosificación y la prevención de los eventos adversos son *CYP2C9* *2 y *CYP2C9* *3. Los pacientes portadores de los alelos *2 y *3 tienen más probabilidad de necesitar una dosis más baja de warfarina y acenocumarol, y requieren un tiempo más largo para llegar a un INR estable al iniciar el tratamiento además, de que poseen un mayor riesgo de complicaciones hemorrágicas. Además de estos dos alelos, se ha demostrado que los alelos *4, *5 y *11 también afectan la eliminación de los anticoagulantes cumarínicos.

1.3.1.3 Polimorfismos en *CYP2C9*

De los 57 genes que conforman todo el sistema citocromo P450 en los humanos⁴⁰, aproximadamente media docena de genes que codifican para alguna enzima CYP son polimórficos, ocasionando las principales determinantes en la variabilidad interindividual en la farmacocinética y respuesta a los fármacos, por lo que son responsables (en parte) de las principales RAMs que se presentan por warfarina, acenocumarol o fenprocumon³². El gen que codifica para *CYP2C9* es rico en polimorfismos, estas variantes genéticas (SNPs) pueden ser causa de una marcada variabilidad interindividual en la expresión, selectividad y actividad catalítica de la proteína; lo que puede resultar en una baja protección antitromboembólica o en complicaciones hemorrágicas, produciendo el fracaso terapéutico en algunos pacientes; *CYP2C9* explica solo el 17% de la varianza en la dosis en warfarina³¹.

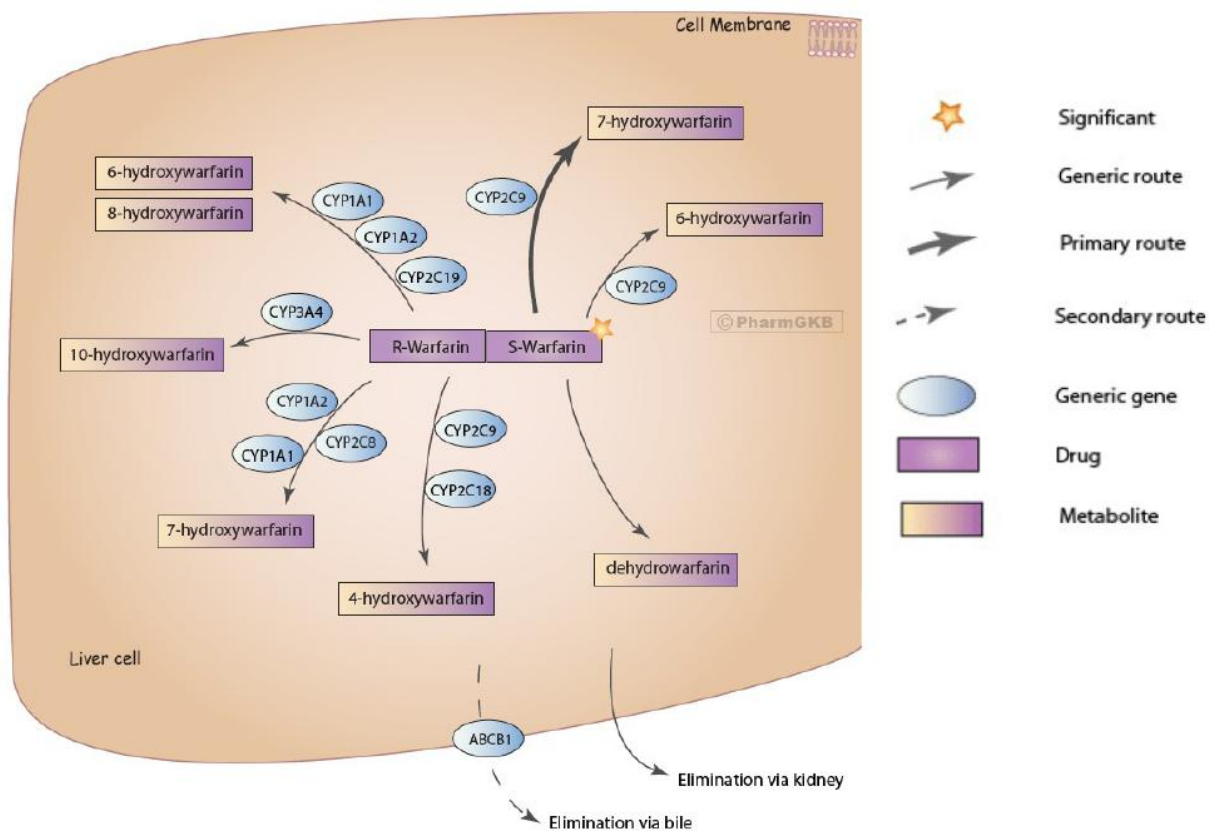


Fig. 1.4. Metabolismo de la warfarina. Representación de los genes candidatos involucrados en el transporte, metabolismo y eliminación de la Warfarina³⁹.

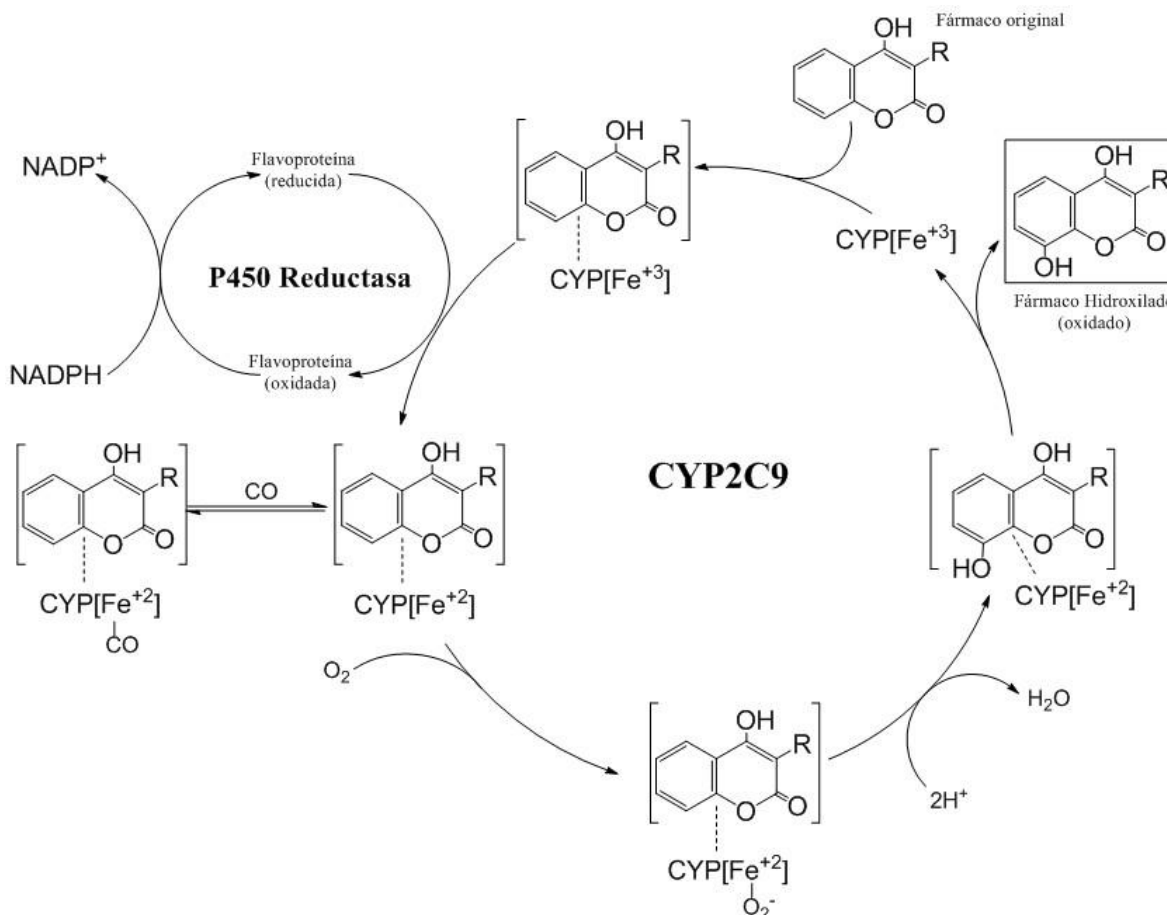


Fig. 1.5. Ciclo oxidativo del esqueleto cumarínico por CYP2C9. Para la oxidación de los (S)-enantiómeros en los microsomas, se requiere de las enzimas CYP2C9 y P450-reductasa, además de O_2 (oxígeno molecular). En pocas palabras, la enzima CYP oxidada $[\text{Fe}^{3+}]$ se combina con el (S)-sustrato para formar un complejo binario. El NADPH dona $1e^-$ a la flavoproteína P450 reductasa, la cual a su vez, reduce el complejo oxidado de CYP-cumarina. Se introduce un segundo e^- procedente del NADPH a través de la misma P450 reductasa, lo que permite reducir el O_2 y formar un complejo de oxígeno "activado"-CYP-cumarina. Este complejo a su vez transfiere el oxígeno activado al fármaco sustrato para formar el producto cumarínico oxidado. Las enzimas CYP se encuentran adosadas a la estructura membranosa del retículo. Utilizan una molécula de O_2 , pero sólo emplean un átomo para la oxidación del sustrato (*monooxigenasas*) mientras que el otro será reducido para formar agua.

El alelo conocido como **CYP2C9*1** es denotado como el alelo ancestral, alelo silvestre o *wild type* y es el más común entre todos los grupos étnicos estudiados, por lo que es considerado el alelo de referencia. El gen *CYP2C9* presenta numerosos SNPs principalmente en la región promotora y codificante del gen, se han descrito hasta la fecha más de 58 SNPs que producen una alteración en la funcionalidad de la proteína expresada, *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* son las variantes alélicas más comunes, en ellas la simple sustitución de una base en la región codificante produce la expresión de proteínas no sinónimas que son asociadas con disminución en la actividad catalítica, por lo que la eliminación de los ACOs se ve profundamente reducida entre pacientes portadores, por tal razón, requieren de dosis menores para evitar el riesgo de hemorragias. Las diferencias interétnicas pueden ser responsables de respuesta de un medicamento entre grupos étnicos por las diferencias en la frecuencia alélica entre los grupos como Africanos, Asiáticos, Caucásicos y Mestizos (como nuestra población) ^{36, 41}.



Fig. 1.6. Gen CYP2C9 y SNPs de relevancia. El esquema muestra la distribución de los exones del gen, así como posición de las variantes alélicas *2 y *3 que son las de mayor importancia clínica.

Cuadro 1.1. Características de gen CYP2C9

Ubicación	10q24.1	Longitud Proteína	490 aminoácidos
Longitud gen	55 734 pb	Longitud RNA_m	1876 pb

Cuadro 1.2. Frecuencia de variantes alélicas CYP2C9

Alelo	Frecuencia Alélica			
	Africanos	Asiáticos	Caucásicos	Mestizos Mexicanos
CYP2C9*2	4%	0%	11%	5.1%
CYP2C9*3	2%	3%	7%	3.9%

Fuentes: Kircheiner et al (34) y Castelán-Martínez et al (42).

Cuadro 1.3. Longitud de exones y SNPs reportador en el gen CYP2C9

Exón	Longitud pb	# SNP reportados
1	193	4
2	163	13
3	150	89
4	161	142
5	177	4
6	142	6
7	188	112
8	142	6
9	545	32

Cuadro 1.4. Variaciones en el gen CYP2C9

Variante	Localización			
	R. promotora	R. codificante	R. intrónica	Región UTR-3'
Sustitución	548	399	15	6
Deleción	11	2	0	1

Fuentes: The Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee (41) y Mendelian genes/Cytochrome P450 (43)

Cuadro 1.5. Variantes alélicas en CYP2C9

Alelo	Cambio de nucleótido	NCBI dbSNP rs#	Localización	Variación protéica	Actividad comparada con CYP*1/*1
CYP2C9*2	430C>T	rs1799853	Exón 3	Arg144Cys	Decrece
CYP2C9*3	1075A>C	rs1057910	Exón 7	Ile359Leu	Decrece
CYP2C9*4	1076T>C	rs56165452	Exón 7	Ile359Thr	-
CYP2C9*5	1080C>G	rs28371686	Exón 7	Asp360Glu	Decrece
CYP2C9*6	818delA	rs9332131	Exón 5	Alelo nulo	No tiene actividad
CYP2C9*7	55C>A	rs67807361	Exón 1	Leu19Ile	-
CYP2C9*8	449G>A	rs7900194	Exón 3	Arg150His	Decrece

Fuente: The Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee (41), Kircheiner *et al* (34) y Kircheiner *et al* (36)

CYP2C9*2

La variable alélica CYP2C9*2 se debe a una transversión de citocina por timina en el nucleótido 430; lo que codifica la sustitución de arginina por cisteína en el residuo de aminoácido 144. La sustitución de aminoácidos no se encuentra localizada en ninguno de los 6 sitios SRS (sitio de reconocimiento de sustrato) conocidos del centro activo de la proteína, por lo que no está asociado con la disminución en la capacidad de unión de los sustratos cumarínicos como CYP2C9*3. Sin embargo, la variante *2 juega un rol en la interacción de CYP2C9 con la enzima CYP-reductasa para oxidar el fármaco sustrato, por lo que la tasa máxima de metabolismo (V_{Max}) es reducido al 40% frente al alelo ancestral ⁴⁰. La frecuencia de CYP2C9*2 es mucho mayor en población Europea y del 0% en poblaciones Asiáticas (**tabla 1.5**) ⁴⁴.

CYP2C9*3

La variable alélica CYP2C9*3 se produce por la transversión de adenina por citocina en el nucleótido 1075, esto se traduce en la sustitución de leucina por isoleucina en el aminoácido 359. Esta variación está localizada en proximidad al centro activo de la enzima (así como las variaciones *4 y *5) conocido como 5-SRS (sitio 5 de reconocimiento de sustrato), lo cual causa una disminución en la capacidad de unión al sustrato cumarínico, así como disminución de acceso al centro catalítico. Esto ocasiona que la capacidad metabólica de CYP2C9*3 sea de 3-11%, con respecto al alelo *1. Principalmente portadores del genotipo *3/*3, tienen riesgo más elevado de experimentar una severa hemorragia durante el tratamiento con ACOs ^{34, 40, 45}.

CYP2C9*5

El alelo *5 es una transversión en el nucleótido 1080 (exón 7) que se da por el cambio de la base pirimidica citosina y por una guanina, una base de purina; esto produce el cambio de ácido aspártico por ácido glutámico en la posición 360 de la proteína, lo que trae la consecuente alteración de la funcionalidad proteica. Los portadores del alelo CYP2C9*5 tienen una efectividad catalítica reducida, por lo que eliminan fármacos sustratos de una manera más lenta en comparación con las personas que expresan la proteína *wild type*. Ha sido identificada entre Africanos Americanos ⁴⁶.

CYP2C9*6

La variable alélica *CYP2C9* *6 es un polimorfismo nulo derivado de la delección de una base de adenina en el nucleótido 818, con lo que resulta en un codón de “Stop” temprano y la producción truncada e inactiva de la proteína *CYP2C9*. Este hallazgo indicó que la ausencia de la actividad *CYP2C9* es compatible con la vida. Se ha descubierto en poblaciones Africanas principalmente, y ya ha sido reportado en Mexicanos⁴⁷⁻⁴⁸.

1.3.2 OTROS GENES ASOCIADOS A LA RESPUESTA DE ACOs

1.3.2.1 *VKORC1*

El gen *VKORC1* codifica el principal componente sensible a los ACOs, la subunidad 1 del complejo de la vitamina K epóxido reductasa (*VKORC1*), un sistema de enzima multicomponente lípido-proteína localizado en la membrana del retículo endoplásmico del hepatocito está asociado a la variabilidad en los requerimientos de dosis^{35, 49}. SNPs en *VKORC1* alteran los niveles de expresión y funcionalidad de la enzima codificada, afectando los requerimientos de cumarínicos, los cuales ejercen su efecto farmacodinámicos por inhibición de dicha enzima⁵⁰. El efecto de las variantes alélicas es relativamente similar para los 3 cumarínicos más empleados. El genotipo *VKORC1* explica el 23% de la varianza en la respuesta de la terapia anticoagulante con cumarinas³¹.

En el 2005 Rieder *et al.*⁵¹ identificaron 5 principales haplotipos que podrían estar evolutivamente conformados en 2 grupos principales: uno de requerimientos de dosis baja conocido como haplotipo del Grupo A (*H1*, *H2*) , y uno de requerimiento de altas dosis conocido como haplotipo del Grupo B (*H7*, *H8*, *H9*). Demostraron que ciertos haplotipos en el gen *VKORC1* serían útiles en la estratificación de pacientes en grupos según el requerimiento de ACO en: bajas, intermedias y alta dosis; ayudando a explicar la asociación entre origen ancestral de alelos y la dosis en un paciente. La dosis en el grupo A se debe a una reducción en la expresión del mRNA, mientras que en el grupo B existe incremento en la expresión de mRNA. La variante alélica -1639G>A ha sido propuesta para imputar el grupo que pueden ayudar a predecir el requerimiento de dosis de anticoagulantes orales cumarínicos en cada paciente^{40, 50, 52}.

Cuadro 1.6. Variantes alélicas en VKORC1

Cambio de nucleótido	Nombre sinónimo	Localización	NCBI dbSNP rs#	Variante presente en Haplotipo	Fenotipo
-1639G>A	3673G>A	Promotor	rs9923231	H3, H4, H6, H7, H8, H9	Dosis baja
1137C>T	6484C>T	Intrón 1	rs9934438	H3, H4, H6, H7, H8, H9	Dosis baja
3730G>A	9041GA	3'-UTR	rs7294	H7, H8,	Dosis alta

Fuente: NCBI/Gene (53) y Pharm GKB (39)

1.3.2.2 CYP4F2

Recientemente se descubrió el gen que codifica la isoenzima CYP4F2, la cual se encarga del metabolismo de la vitamina K; demostrando así mismo un impacto en los requerimientos de una dosis estable en los anticoagulantes orales. La variante genética *CYP24F2* V433M (rs2108622; Val433Met, 1347 C>T) resulta en una capacidad decrecida del metabolismo de la vitamina K, resultando en un incremento en los requerimientos de dosis estable ³.

El SNP V433M ha sido agregado a la breve lista de genes con un efecto clínico relevante en los requerimientos de warfarina y acenocumarol, aunque el mecanismo de su efecto es actualmente investigado. El efecto del polimorfismo V433M puede ser solo clínicamente evidente cuando los pacientes necesitan de dosis altas de ACO, la variante incrementa el promedio de dosis en homocigotos al compararse con homocigotos portadores de alelo salvaje. Este SNP da cuenta de ~1 mg/día de diferencia en los requerimiento de dosis entre pacientes con genotipo T/T y portadores C/C ⁵⁴.

1.3.3 FACTORES CLÍNICOS ASOCIADOS A LA DOSIS DE ACOs

La sensibilidad a los ACO es un rasgo multifactorial dependiente de factores clínicos como: el peso, altura, edad, índice de masa corporal, factores nutricionales, uso concomitante de fármacos, enfermedades asociadas, medio ambiente, estado de fumador, consumo de alcohol y que junto con los factores genéticos contribuyen al requerimiento de dosis en un individuo, así como al riesgo de ineficacia o adversidad en la terapia anticoagulante ⁵⁵.

1.3.3.1 Edad

La edad avanzada ha demostrado incrementar los riesgos de sangrado. Pacientes de edad avanzada tienen aproximadamente 5 veces más incidentes de hemorragias graves y fatales con ACOs. Los pacientes de edad avanzada están en un mayor riesgo de hemorragia debido principalmente a que su requerimiento de dosis de anticoagulante es menor, ya que tienen una depuración metabólica reducida. Adicionalmente, tienen una alta prevalencia de condiciones comórbidas y, un probable consumo de medicamentos que interactúan farmacológicamente con los cumarínicos ^{2, 56}.

1.3.3.2 Condiciones comórbidas

La presencia de comorbilidades representa otro factor potencial en el incremento de riesgo a hemorragia durante la terapia con ACO. La insuficiencia cardíaca, hepática o renal, el abuso de etanol, cáncer, conteo/función reducido de plaquetas, hipertensión sin controlar, anemia, y diabetes, entre otras enfermedades, han sido asociadas con riesgo de una hemorragia peligrosa al estar en tratamiento con anticoagulantes orales ^{2, 57}.

1.3.3.3 Co-medicación

Entre los medicamentos concomitantes que frecuentemente son consumidos por pacientes en terapia con ACO son los agentes antiplaquetarios como la aspirina o clopidogrel, debido al efecto inhibitorio adicional en el sistema de anticoagulación, provocando un mayor riesgo de una hemorragia severa. Otros medicamentos que potencian el efectos de los anticoagulantes cumarínicos son los antibióticos (cotrimoxazol, eritromicina, isoniazida, metronidazol y miconazol), medicamentos utilizados en padecimientos cardíacos (amiodarona, clofibrato, propafenona,

propranolol y sulfipirazona), la fenilbutazona, piroxicam, cimetidina, omeprazol y rifampicina. Algunos medicamentos que inhiben la actividad de los anticoagulantes cumarínicos son: alopurinol, fluoroquinolonas, barbitúricos, AINEs, griseofulvina, nafcilina, carbamazepina, clordiazepóxido, colestiramina sulfametoxazol y fluconazol³⁹.

1.3.3.4 Factores nutricionales

Los alimentos de hojas verdes ricos en vitamina K tales como: la espinaca, la col rizada, la lechuga, aguacate, pueden modificar la actividad del acenocumarol y warfarina, por lo que su consumo debe ser establecido, sin necesidad de eliminarlos de la dieta del paciente. Alimentos que contienen coenzima Q, Gingko biloba y vitamina E pueden influir también en el efecto de los cumarínicos. El consumo excesivo de suplementos alimenticios puede resultar en valores fluctuantes de INR. El consumo excesivo de alcohol conduce a disfunción hepática con lo que puede incrementar el efecto de ACOs al disminuir el metabolismo hepático⁵⁸.

1.3.3.5 Otros

Personas con mayor área de superficie corporal o índice de masa corporal requieren mayor dosis de anticoagulante cumarínico. Se ha encontrado que personas con género femenino están asociadas con un mayor riesgo de hemorragia durante la terapia anticoagulante con cumarínicos o también llamados antagonistas de la vitamina K (VKAs)^{2, 59}.

1.4. RESISTENCIA A ANTICOAGULANTES ORALES

Algunos pacientes necesitan de dosis mayores a las esperadas para lograr un INR dentro de rango terapéutico. Son raros los casos de resistencia a cumarínicos y, hasta la fecha no se han podido diseñar herramientas para la identificación de pacientes que requieren de dosis elevadas de warfarina o acenocumarol para lograr un efecto terapéutico estable.

1.4.1 ¿QUÉ ES LA RESISTENCIA A LOS ACOs?

La resistencia a los anticoagulantes cumarínicos ha sido descrita como la inhabilidad de prolongar el tiempo de protrombina o elevar la relación normalizada internacional dentro de un rango terapéutico, cuando el fármaco es dado en dosis prescritas normales. Sin embargo, un alto requerimiento de dosis de acenocumarol o warfarina no establece por sí mismo el diagnóstico de resistencia a ACOs. La prevalencia de resistencia a los cumarínicos varía por población de pacientes y es difícil de determinar. La dificultad radica en gran parte en contabilizar los factores en la dieta y en definir las variaciones metabólicas entre los individuos.

El rango de dosis normal recomendado diaria o semanalmente de acenocumarol o warfarina para mantener en intervalo terapéutico el TP o INR depende de la población estudiada. Sin embargo pacientes que necesitan dosis de 5 a 20 veces mayor a la dosis estándar pueden ser considerados resistentes. Para la warfarina (la más estudiada) se ha definido un valor de dosis particular para considerar a un paciente con resistencia, está es de 105 mg por semana (15 mg/día, siendo la dosis de mantenimiento diaria normal de 2-10 mg/día⁶⁰.

1.4.2 ¿CÚALES SON LAS CAUSAS DE LA RESISTENCIA?

Se ha postulada que la resistencia heredada es causada por factores genéticos que dan como resultado, ya sea un rápido metabolismo del fármaco (una forma de resistencia farmacocinética) o disminución de la actividad del fármaco (resistencia farmacodinámica).

Los polimorfismos en *VKORC1* y *CYP2C9* pueden jugar un rol importante y estar asociados al incremento en la sensibilidad a warfarina o acenocumarol. Sin embargo, el mecanismo genético de la resistencia aún no es del todo entendido, a pesar de varios casos reportados de personas con resistencia heredada confirmada por patrones similares de resistencia en miembros de la familia inmediata del individuo. Más de un mecanismo es probable. Esto se convierte entonces, en un amplio campo de búsqueda de polimorfismos genéticos (SNPs) para una mejor comprensión de la resistencia heredada.

Pérez-Andreu *et al.*³ han sugerido que la variante *CYP24F2* V433M (rs2108622; Val433Met, 1347 C>T) puede jugar un papel importante en el paciente con altos requerimientos de dosis. La variante genética resulta en una capacidad decrecida para el metabolismo de la vitamina K, resulta en el incremento de requerimientos de dosis estable de hasta 2-4% entre los portadores de la variante

Se han descrito varias mutaciones raras que inducen un cambio de aminoácidos en la proteína *VKORC1* en pacientes resistentes, pero no en una población en general; algunas variantes raras se han asociado con requerimientos altos de dosis de warfarina en algunos grupos étnicos judíos de Etiopía y descendientes del grupo judío Askenazi, con una frecuencia del 5% y 4% respectivamente⁶¹. Éstos son portadores de la variante Asp36Tyr (rs61742245), la cual ha sido asociada con mayores requerimientos de dosis de warfarina con promedio de más de 70 mg/semana⁶². También se ha encontrado en región codificante SNP que codifica el cambio Ala41Ser, donde el paciente heterocigoto tiene un requerimiento de dosis alta de warfarina de 15.5 mg/día⁶³.

Hasta la fecha, no sé a podido comprender la resistencia de individuos a anticoagulantes orales desde la perspectiva genómica. Este estudio se enfoca en identificar variantes en el gen *CYP2C9* que pudieran explicar el fenotipo en pacientes Mexicanos-Mestizos que requieren de altas dosis de acenocumarol o warfarina para alcanzar un INR terapéuticamente estable y así protegerles contra complicaciones tromboembólicas.

CAPÍTULO 2

DISEÑO EXPERIMENTAL.

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contribución del gen *CYP2C9* en la dosis y mantenimiento de los ACOs ha sido ampliamente estudiada alrededor del mundo, en diferentes poblaciones como la Asiática, Caucásica y Negra, pero muy poca en poblaciones mestizas como la nuestra. La población Mexicana en un complejo mestizaje de grupos étnicos que tiene su origen en el siglo XVI por la mezcla entre ancestros Amerindios, grupos Caucásicos provenientes de Europa (en particular desde España) y en una menor proporción de ancestros Africanos traídos a México en condición de esclavos ⁴⁷. Debido a esta particularidad de mestizaje en nuestra población, la necesidad que justifica este trabajo de investigación es la de generar y profundizar en el conocimiento farmacogenómico de nuestra población Mestiza, al secuenciar la región promotora y codificante del gen *CYP2C9* en busca de variantes novedosas en los 7 pacientes resistentes a cumarínicos que pudiera explicar el porqué del fenotipo expresado.

2.2. HIPOTESIS

Para determinar si existen variables genéticas que caractericen el fenotipo de resistencia a acenocumarol y warfarina en los pacientes que requieren de altas dosis para lograr un INR terapéutico óptimo y estable, se ha planteado la hipótesis de que pueden existir variantes genéticas novedosas en el gen *CYP2C9*, lo que ocasionaría la expresión de una proteína con una capacidad metabólica alterada asociado al fenotipo observado en dichos pacientes.

2.3. OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar variantes genéticas novedosas en el gen *CYP2C9* característicos de pacientes que requieren una dosis alta de acenocumarol o warfarina para lograr un INR terapéutico óptimo y estable.

2.2.1.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ⊙ Identificar pacientes con un INR estable que requieran de una dosis extrema de acenocumarol o warfarina en la Clínica de Anticoagulantes del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.
- ⊙ Caracterizar el fenotipo de los pacientes que requieran de una dosis extrema de acenocumarol o warfarina.
- ⊙ Determinar el genotipo de los genes *VKORC1*, *CYP2C9* y *CYP4F2* en los pacientes con una dosis extrema de acenocumarol o warfarina y un INR terapéutico óptimo y estable.
- ⊙ Secuenciar la región promotora y codificante del gen *CYP2C9*.
- ⊙ Identificar si existe alguna variante genética en *CYP2C9* que pudiera modificar la expresión y por lo tanto la actividad enzimática de la proteína *CYP2C9*, involucrada en el metabolismo del acenocumarol y la warfarina.

2.4. MATERIAL Y MÉTODO

2.4.1 POBLACION DE ESTUDIO

Este trabajo de tesis se desprende del proyecto de investigación “*Estudio comparativo entre la dosis guiada por genotipo-fenotipo y el manejo estándar en pacientes que inician anticoagulación con acenocumarol*” que se realiza en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) y en el Instituto Nacional de Cardiología (INC) desde el 2008, con la finalidad de conocer la variantes clínicas y genéticas que se asocian en los pacientes mexicanos que toman acenocumarol o warfarina donde se pretende desarrollar un algoritmo para Mexicanos Mestizos que inician terapia con anticoagulante cumarínicos. Para el desempeño del proyecto de investigación del cual se desprende este trabajo, se reclutaron un total de 350 pacientes Mestizos Mexicanos de la Clínica de Anticoagulantes del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Este trabajo de tesis es un estudio observacional, prospectivo y transversal. Utilizando la base de datos del proyecto, se revisaron los expedientes de pacientes reclutados para identificar a los que requieren de una dosis extrema para lograr con un INR terapéutico óptimo. Todos los pacientes fueron informados de los objetivos del proyecto mencionado y firmaron su consentimiento para el uso de sus muestras de sangre total en el proyecto, así como para posteriores estudios como el desarrollado de esta tesis.

2.4.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Los pacientes reclutados fueron pacientes anticoagulados con acenocumarol o warfarina con un INR terapéutico óptimo y estable. Se consideró en los pacientes un estado de anticoagulación con valores terapéuticos óptimos a aquellos con valores de INR dentro de un rango terapéutico indicado por lo menos en 3 visitas a la Clínica de Anticoagulantes del INC en los últimos 3 meses consecutivos. Los pacientes reclutados se autodenominaron como mestizos mexicanos al ser la tercera generación viviendo en México.

2.4.2.1 Selección de pacientes resistentes

En el proceso de reclutamiento de pacientes en la Clínica de Anticoagulantes del INC se identificaron de la base de datos pacientes que requieren de altas dosis de warfarina o acenocumarol para lograr un valor terapéutico estable de INR. Aquellos

pacientes encontrados se les realizó un consentimiento informado, después de explicarles el objetivo del estudio, se les realizó una entrevista, se les tomó una muestra de sangre total con citrato de sodio.

2.4.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

En el orden de minimizar los factores ambientales que pudieran afectar el estudio farmacogenómico, los criterios de exclusión aplicados fueron: enfermedad hepática, insuficiencia cardíaca, trombofilia, alcoholismo activo, enfermedades oncológicas, diabetes, hipercolesterolemia, obesidad mórbida y enfermedades autoinmunes.

2.4.4 EXTRACCIÓN DEL ADN

Las muestras de sangre periférica se recolectaron en tubos con citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), se centrifugaron a 3500 rpm por 10 minutos, para obtener la capa leucoplaquetaria. El DNA genómico se extrajo a partir de la capa leucoplaquetaria siguiendo las instrucciones del kit QIAamp® Mini Spin Column DNA blood kit, QIAGEN®, utilizando 200 uL de amortiguador de TE (marca Teknova), para eluir el DNA.

2.4.5 GENOTIPIFICACIÓN

Las muestras de DNA, se analizaron por PCR punto final (RT-PCR) y discriminación alélica, donde se identificaron las siguientes variantes alélicas: *CYP2C9*2* (430C>T), *CYP2C9*3* (1075A>C) y *CYP2C9*5* (42619C>G), alelo 3673 de *VKORC1* (-1639G>A) y *CYP4F2* (1297C>T) utilizando sondas Taqman® y Genotyping Master Mix de Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA, se utilizó un termociclador 9700 para realizar la PCR de punto final, el análisis de discriminación alélica se realizó en el termociclador 7900HT Fast real-time PCR System (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA).

2.4.6 SECUENCIACIÓN

Para la secuenciación del gen *CYP2C9* se utilizaron los protocolos establecidos por Seattle SNPs Variation Discovery Resource, que forman parte del National Heart Lung and Blood Institute's (NHLBI) del Programas para Aplicaciones Genómicas (PGA), en la que se realiza una PCR de amplificación, seguido de la verificación de los

productos amplificados, la purificación de los productos de amplificación, PCR de secuenciación, purificación de los productos de la secuenciación y la lectura de las secuencias.

2.4.6.1 PCR de Amplificación.

Se utilizaron *primers* o iniciadores específicos que incorporan un secuencia M13 universal *forward* y *reverse*, que cubren la región promotora y los exones del *CYP2C9* (**tabla 2.1**), reportados por NIEHS SNPs ⁶⁴. (<http://egp.gs.washington.edu/C.html>)

Se realizó una PCR *in silico* ⁶⁵ (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>), para asegurar que los *primers* tuvieran la cobertura y fueran específicos. Se utilizó para la alineación la secuencia del genoma humano en GenBank publicada en Febrero 2009 (GRCh37/hg19) ⁶⁶.

La PCR de amplificación se realizó en un volumen final de 10 µL que contenía: 10 ng de DNA, 0.5X de amortiguador eLONGase A, 0.5X de amortiguador Elongase B, 0.4 U/ µL de eLONGasetaq (Elongase® Enzyme Kit, Invitrogen™, Life Technologies®), 100 µM de desoxirribonucleótidos trifosfatados (Invitrogen™, Life Technologies®), 140 nM de cada uno de los *primers* y el agua grado biología molecular necesaria (AccuGENE®, CAMBREX).

La PCR se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) y las condiciones de ciclado fueron: 94°C por 40 segundos, seguido por 34 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 68°C por 2 minutos, con un paso de extensión final de 68°C por 5 minutos.

2.4.6.2 Verificación de productos amplificados

Para verificar la presencia de un solo producto de amplificación y del tamaño esperado, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.0% (Ultra Pure™ Agarose Invitrogen™; Life Technologies®) con EZ-Vision™ Two (AMRESCO®).

2.4.6.3 Purificación de los productos amplificados

Debido a que las condiciones de la PCR de amplificación son muy astringentes, la purificación de los amplicones se realizan por una dilución 1:4 con agua grado biología molecular (AccuGENE®, CAMBREX).

2.4.6.4 PCR de Secuenciación

La reacción de PCR de secuenciación se realizó siguiendo las instrucciones del Terminator Ready Reaction (Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) con 2 µL de amplicón diluido utilizando el *primer* M13 *Forward* o M13 *Reverse* concentración 3.2 pmol y agua grado biología molecular (AccuGENE®, CAMBREX) necesaria. La PCR de secuenciación se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) y las condiciones de ciclado fueron 96°C por 1 minuto, seguido por 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos y 60°C por 4 minutos.

Cuadro 2.1. Primers para región promotora y exones de CYP2C9

Primer <i>Forward</i>	Primer <i>Reverse</i>	Región cubierta	Amplicón pb
(1.1) <u>TGTAAAACGACGGCCAGT</u> TACCTAGG CTCCAACCAAGTACA	(1.2) CAGGAAACAGCTATGACCATGCTGG TATATCCAGTGCATTC	Exón 1 y región 5'-UTR	903
(2.1) <u>TGTAAAACGACGGCCAGT</u> TGGTCTGC TGTACATTAGCTGTGAG	(2.2) CAGGAAACAGCTATGACCTCATAAT GAAAGATATGGCCACC	Exón 2 y 3	1271
(3.1) <u>TGTAAAACGACGGCCAGT</u> CTCAGTGC CTTGCTGTCTACTGACT	(3.2) CAGGAAACAGCTATGACCAAGAATT TGGACAACCTGATTGA	Exón 4	1345
(4.1) <u>TGTAAAACGACGGCCAGT</u> AAGTCATT TAACTGCTCTGGTGC	(4.2) CAGGAAACAGCTATGACCTATATTTT TGTGGGCTCAGTGGT	Exón 5	982
(5.1) <u>TGTAAAACGACGGCCAGT</u> GCCTCTGC TATACAAGCAGTATTT	(5.2) CAGGAAACAGCTATGACCAACCAA CATGCAATCCCAG	Exón 6	962
(6.1) <u>TGTAAAACGACGGCCAGT</u> CATTGGCA GGTACTGTCTCATTC	(6.2) CAGGAAACAGCTATGACCTAGCCAA ACCAATCTGAAGAAA	Exón 7	971
(7.1) <u>TGTAAAACGACGGCCAGT</u> ACCTGATG ATCTTGACCTGAATG	(7.2) CAGGAAACAGCTATGACCATCTGGC CCAATAATTAGGATGT	Exón 8	1003
(8.1) <u>TGTAAAACGACGGCCAGT</u> TATTTGTT GAATACAGGGTGCCT	(8.2) CAGGAAACAGCTATGACCATGGCCT CCTGGAACCTATTT	Exón 9 y región 3'-UTR	944
<u>TGTAAAACGACGGCCAGT</u> = Cola M13 <i>primer Forward</i>			
<u>CAGGAAACAGCTATGACC</u> = Cola M13 <i>primer Reverse</i>			

2.4.6.5 Purificación de Secuenciación

Las secuencias se purificaron, siguiendo las instrucciones del BigDye XTerminator Purification Kit de Applied Biosystems.

2.4.6.6 Lectura de las secuencias

La lectura de la fluorescencia se realizó en un secuenciador 3130xl genetic analyzer de Applied Biosystems© (ABI, Hitachi, Foster City, CA, USA), utilizando pop-7 como polímero, un arreglo de capilares de 50 cm, en condiciones estándar para el reactivo Big Dye® Terminator v3.1 y las especificaciones del BigDye XTerminator Purification Kit.

2.4.7 ANÁLISIS DE DATOS DE SECUENCIACIÓN

Parea verificar la calidad y longitud de las secuencias obtenidas, fue utilizado el programa Sequence Scanner Software de Applied Biosystems©. Las secuencias se alinearon en Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) desarrollado por los Institutos Nacionales de Salud del gobierno de EE. UU., que es de dominio público y gratuito desde el servidor del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

Para analizar e identificar las variantes genéticas que pudieran explicar el fenotipo de los pacientes estudiados, se empleó el programa SeqMan Pro™ de LASERGENE® (DNASTAR, WI, USA), se utilizaron como secuencia de referencia para los exones (exón 1: L16877.1, exón 2 y 3: L16878.1, exón 4: L16879.1, exón 5: L16880.1, exón 7: L16881.1, exón 8: L16882.1, exón 9: L16883.1) y el RNAm (NM_000771.3) de CYP2C9, las publicadas en Gene ⁵³ del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI) y las publicadas en Mapping Date, Color Fasta del NIEHS SNPs ⁶⁴ Home de los Programas para Aplicaciones Genómicas (<http://egp.gs.washington.edu/data/cyp2c9/cyp2c9.ColorFasta.html>)

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

RESULTADOS

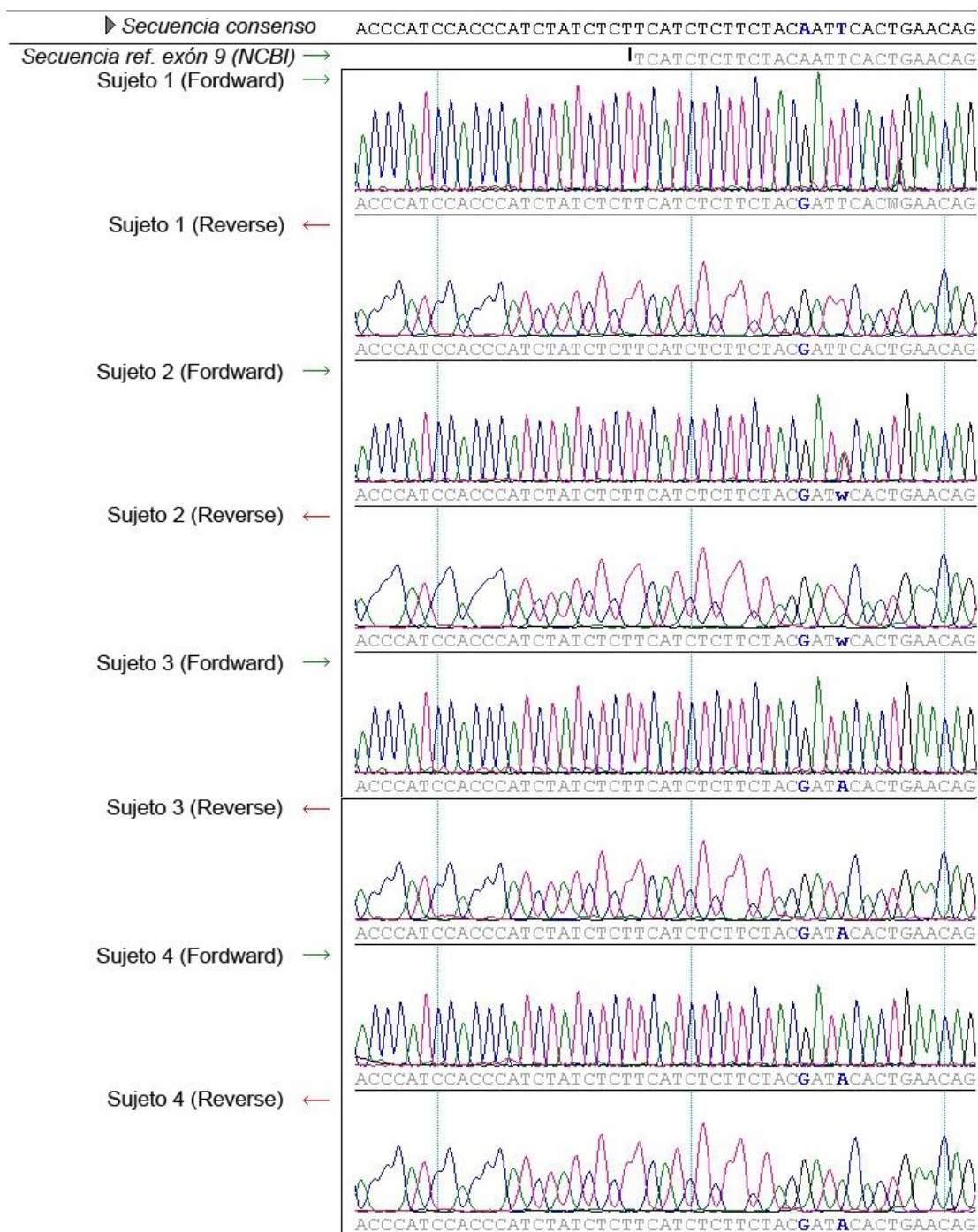
Se identificaron 7 pacientes con INR estable y requerimientos extremos de dosis de ACO (acenocumarol o warfarina) que les otorga la característica fenotípica de “resistencia a cumarínicos”. Se determinó el genotipo de las variantes más comunes para *CYP2C9*, *VKORC1* y *CYP4F2*, además de investigar características clínicas en los pacientes que pudieran afectar en la dosis de ACO (**tabla 3.1**).

Se secuencio la región promotora (5'-UTR) y codificante (9 exones) del gen *CYP2C9*, encontrándose 4 polimorfismos en el exón 9 y la UTR-3' (**fig. 3.1, 3.2 y 3.3**). Las variantes -112 A>G, 1425T>A, *369T>A están presentes de manera homocigota en los 7 individuos de estudio, mientras que el SNP -109T>A sólo está presente de forma homocigota en 5 de los individuos, forma heterocigota en 1 y, solo en uno el alelo ancestral de forma homocigota. Las 4 variantes han sido ya descritas en la literatura, y no se les ha asociado con implicación clínica alguna.

Cuadro 3.1. Datos clínicos y genotipificación de pacientes con resistencia

Sujeto	Cumarina	Dosis (mg/sem)	Genero	Edad	IMC (Kg/m ²)	<i>CYP2C9</i>	<i>VKORC1</i> -1639 G>A	<i>CYP4F2</i> 1297 C>T
1	Acenocumarol	>56	H	49	-	*1/*1	G/G	C/T
2	Acenocumarol	52	H	56	-	*1/*1	G/G	C/C
3	Acenocumarol	37	H	38	26.93	*1/*1	G/G	C/C
4	Acenocumarol	38	M	40	23.73	*1/*1	G/A	C/C
5	Acenocumarol	45	M	35	26.77	*1/*1	G/G	C/T
6	Acenocumarol	>56	H	51	-	*1/*1	A/A	C/T
7	Warfarina	67.5	H	50	-	*1/*1	G/G	C/T

IMC= Índice Masa Corporal



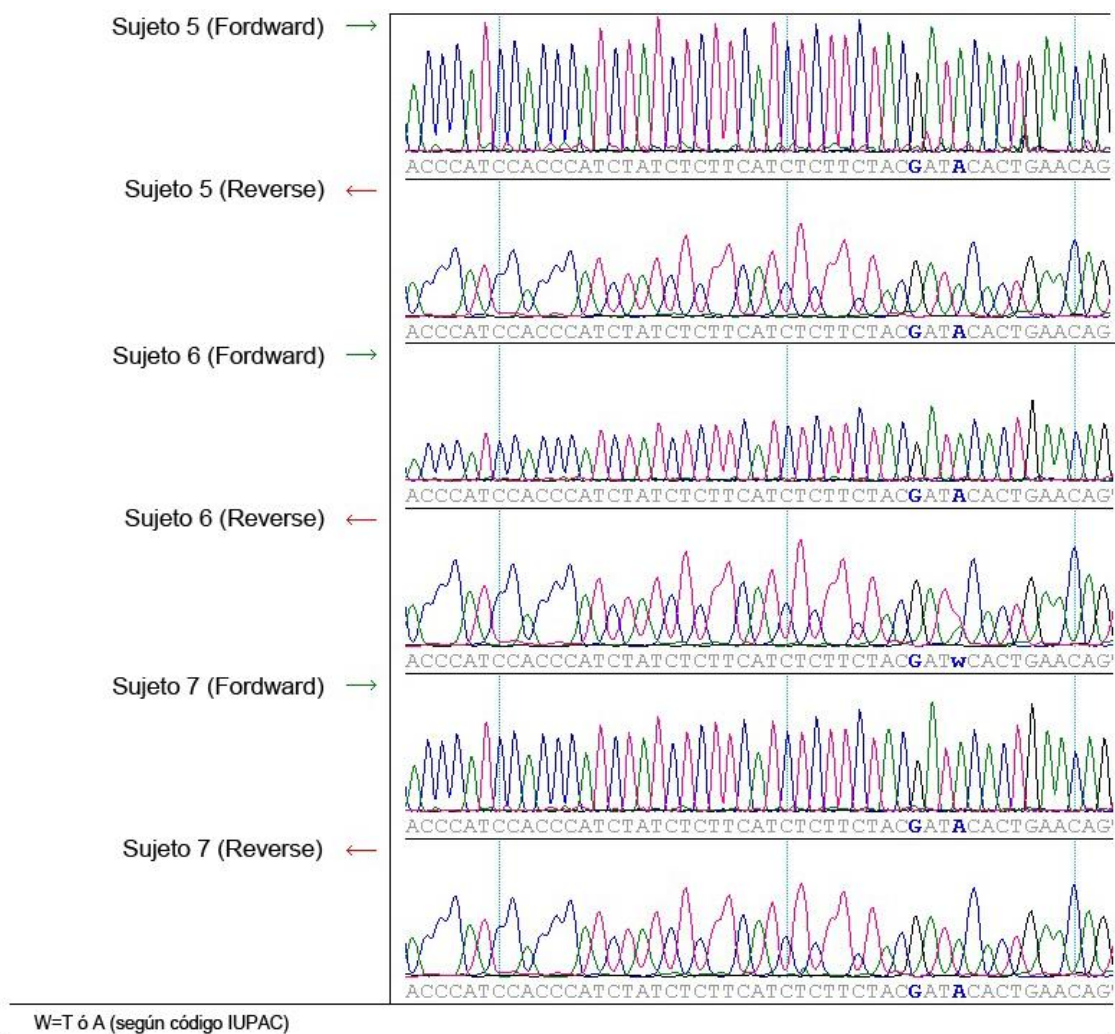


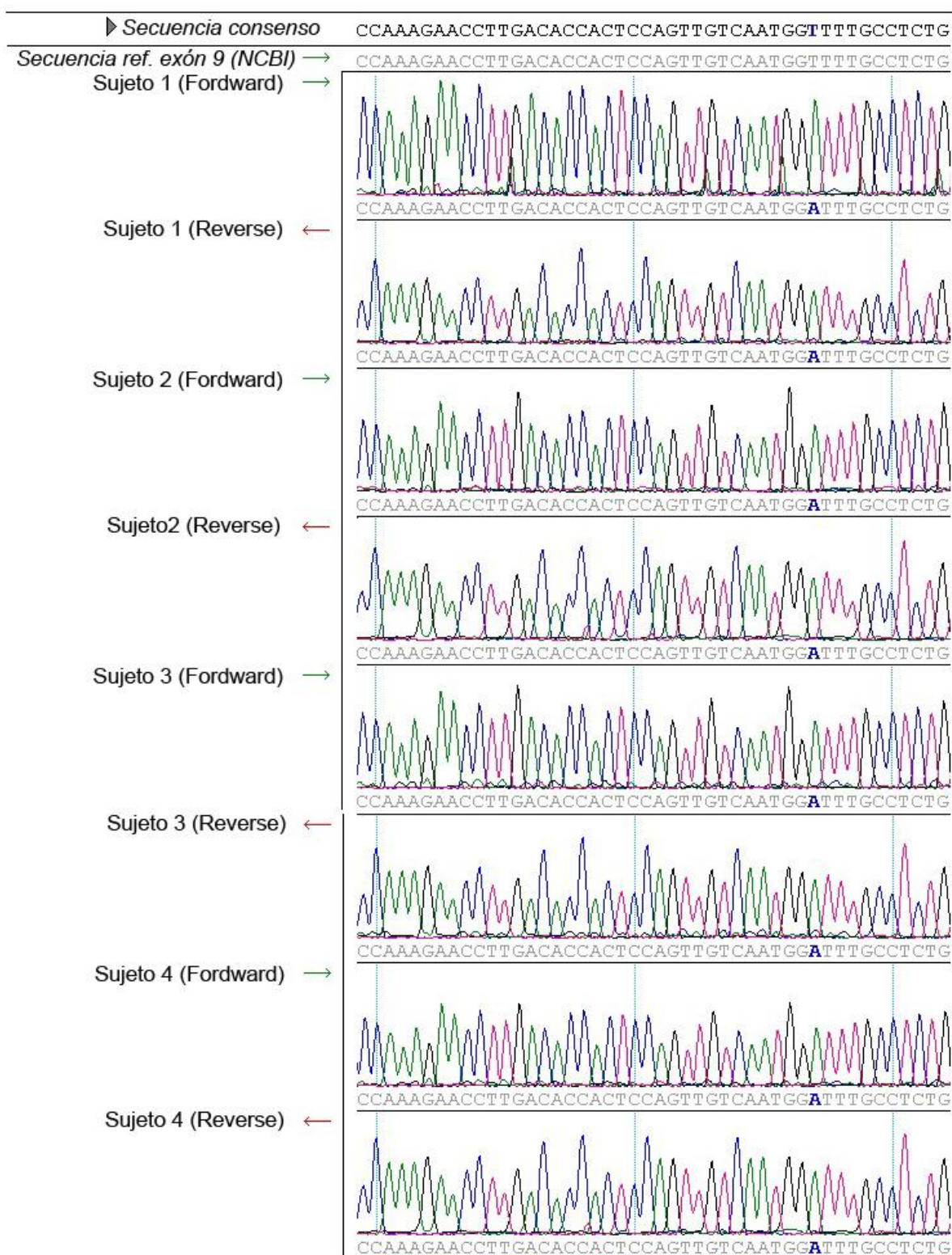
Fig. 3.1 Secuenciación exón 9 (CYP2C9). Variantes -112A>G y -109T>A

En el **Cuadro 3.2** se representan las características de los 2 SNPs encontrados en el intrón 9 (con solo 2 bases de distancia entre ellos), se representan las posiciones de los SNPs con respecto al RNAm y el gen, así como el cambio de base y el grupo de referencia del SNP, ya que ambos han sido ya descritos en la literatura. El **Cuadro 3.3** contiene el genotipo de los SNPs -112 A>G y -109T>A en los 7 pacientes con fenotipo resistente a acenocumarol y warfarina.

Cuadro 3.2 Características de variantes -112 A>G y -109T>A		
Variante SNP	-112 A>G*	-109T>A
Alelo Ancestral	Guanina (G)	Timina (T)
Cambio de nucleótido	A por G	T por A
Tipo de sustitución	Transición	Transversión
NCBI dbSNP rs#	rs9332238	rs1934969
Localización	Intrón	Intrón
Posición en gen	55078	55 081
Posición respecto al RNAm	-112	-109
MAF	A=0.09	A=0.4711
Significancia Clínica	Sin reportar	Sin reportar

MAF=Frecuencia del Alelo Menor (*Minor Allele Frequency*)

Cuadro 3.3 Genotipo de variantes -112 A>G y -109T>A			
Sujeto	Genotipo -112 A>G	Sujeto	Genotipo -109T>A
1	G/G	1	T/T
2	G/G	2	T/A
3	G/G	3	A/A
4	G/G	4	A/A
5	G/G	5	A/A
6	G/G	6	A/A
7	G/G	7	A/A



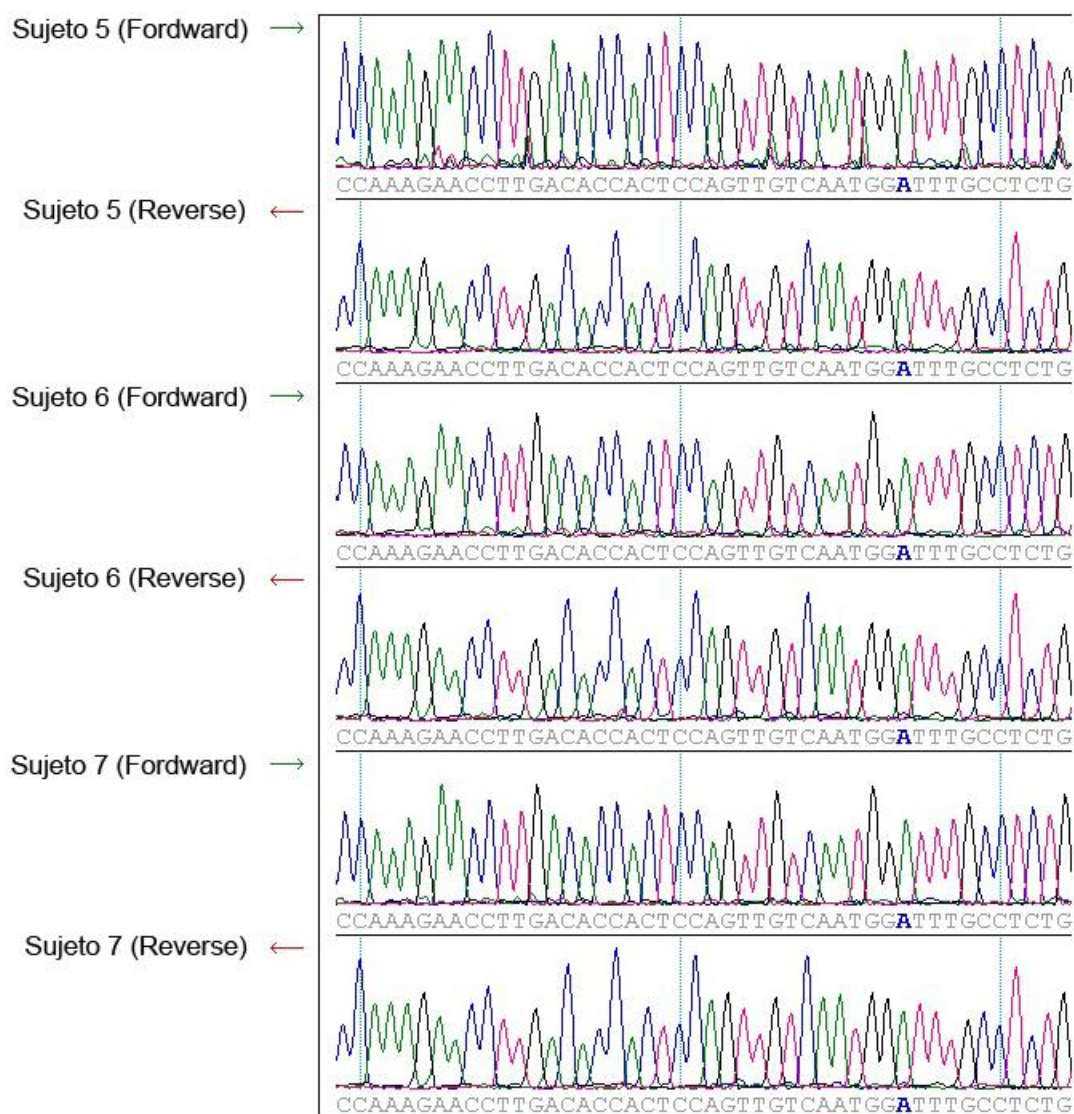


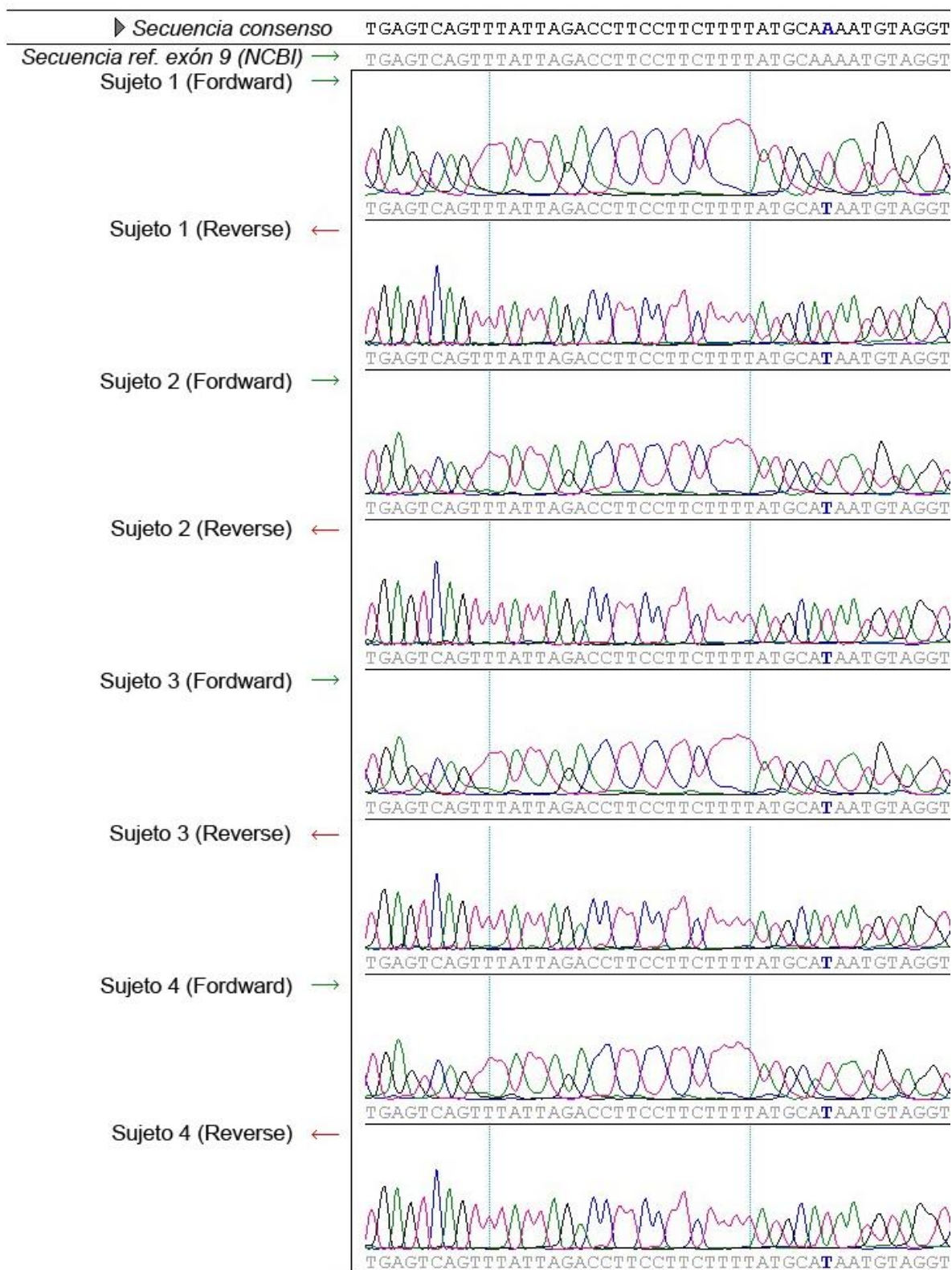
Fig. 3.2 Secuenciación exón 9 (CYP2C9). Variante 1425T>A

El SNP 1425T>A presente dentro del exón 9, produce el cambio de una base (Timina por Adenina) que produce la expresión del mismo aminoácido (glicina). El **Cuadro 3.4** contiene la información del cambio sinónimo, así como la localización del SNP y con respecto al RNA y gen, así como la posición de aminoácido de la proteína. Este SNP ha sido ya reportado y no se le ha asociado con significancia clínica alguna. El **Cuadro 3.5** representa el genotipo para la variante en los sujetos de estudio.

Cuadro 3.4 Características de variante 1425T>A	
Variante SNP	1425 T>A
Alelo Ancestral	Adenina (A)
Cambio de nucleótido	T por A
Tipo de sustitución	Transversión
NCBI dbSNP rs#	rs1057911
Localización	Exón 9
Posición en gen	55 323
Posición respecto al RNAm	1 425
MAF	T=0.0427
Consecuencia funcional	Codón sinónimo GGA=Gly (G) GGT=Gly (G)
Posición aminoácido	475
Significancia Clínica	Sin reportar

MAF= Frecuencia del Alelo Menor (*Minor Allele Frequency*)
Gly=Glicina (G según código IUPAC)

Cuadro 3.5 Genotipo de variante 1425T>A	
Sujeto	Genotipo 1425T>A
1	A/A
2	A/A
3	A/A
4	A/A
5	A/A
6	A/A
7	A/A



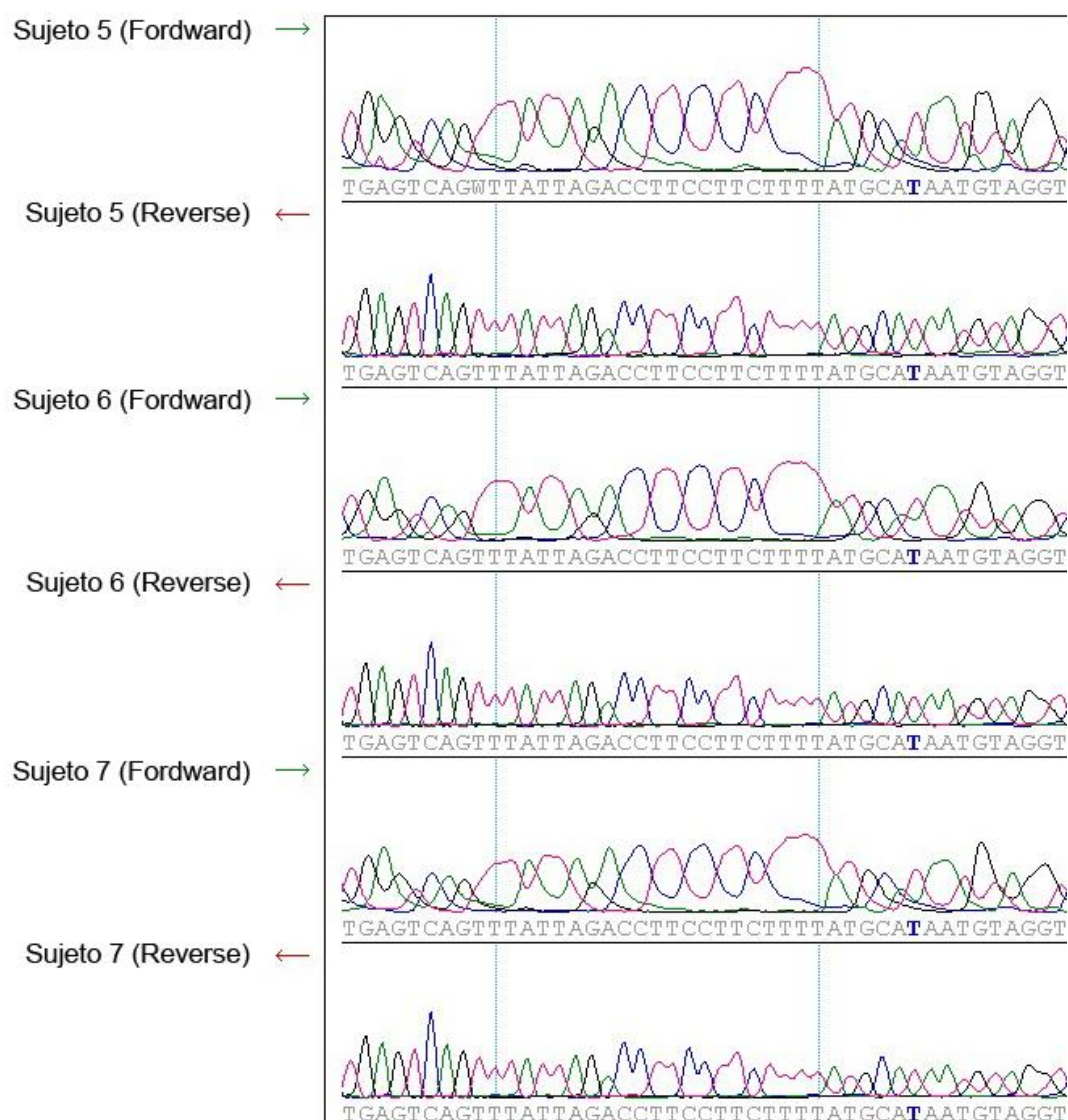


Fig. 3.3 Secuenciación exón 9 (CYP2C9). Variante *396T>A

El SNP *369T>A no se le ha asociado significancia clínica alguna, éste es un SNP que ya ha sido reportado (**Cuadro 3.6**). El genotipo de los pacientes resistentes para este SNP se encuentra en el **Cuadro 3.7**.

Cuadro 3.6 Características de variante *369T>A	
Variante SNP	*369T>A
Alelo Ancestral	Timina (T)
Cambio de nucleótido	T por A
Tipo de sustitución	Transversión
NCBI dbSNP rs#	rs9332245
Localización	Downstream a región UTR-3'
Posición en gen	55 767
Posición respecto al RNAm	*396
MAF	A=0.0427
Significancia Clínica	Sin reportar

MAF= Frecuencia del Alelo Menor (*Minor Allele Frequency*)

Cuadro 3.7 Genotipo de variante *369T>A	
Sujeto	Genotipo *369T>A
1	A/A
2	A/A
3	A/A
4	A/A
5	A/A
6	A/A
7	A/A

DISCUSIÓN

El gen *CYP2C9* es rico en polimorfismos ³², las diferencias interétnicas pueden ser responsables, encontrándose frecuencias diferentes entre poblaciones tales como Africana, Asiática y Caucásica, las cuales han sido extensamente estudiadas; sin embargo más del 80% de nuestra población consiste de mestizos con diferencias en las proporciones ancestrales ¹⁷. La contribución de Caucásicos europeos, Amerindios nativos y Africanos en el *pool* genético de la población Mexicana es la consecuencia de los cientos de años de mestizaje. México fue conquistado y colonizado principalmente por españoles quienes arribaron en el temprano siglo XVI ¹⁶, la ancestría Africana fue heredada por los esclavos traídos después de una notable reducción de la población Amerindia debido a epidemias entre 1545 y 1548 ⁶⁷. Desde entonces, el proceso de mestizaje en regiones geográficamente distantes ha sido afectada por las diferentes condiciones geográficas e históricas, conformando la estructura genómica de los Mexicanos. Estos factores han generado la heterogeneidad genómica entre y dentro de las subpoblaciones de las diferentes regiones en todo México ⁴⁷. Por ejemplo, en regiones del norte las personas están más cerca de los Europeos, mientras que en Guerrero y Veracruz las personas tienen una elevada ancestría Africana, ya que fueron ahí los principales puntos de entrada de esclavos ¹⁷.

Debido a la particularidad mestiza de nuestra población, son necesarios más estudios farmacogenómicos hechos por mexicanos para mexicanos, y así, optimizar las recomendaciones en las dosis de fármacos, especialmente, medicamentos con estrecho índice terapéutico como los cumarínicos. La Secretaria de Salud ha incluido al acenocumarol y la warfarina en el cuadro básico de medicamentos debido a la gran demanda, causa de las ECVs que se han convertido en la primera causa de muerte en nuestro país ⁶⁸.

Este trabajo de investigación se enfocó en identificar las características clínicas, conocer el genotipo de las variantes genéticas más utilizadas en el ajuste de dosis

(*CYP2C9*, *VKORC1* y *CYP4F2*) de ACO y, el análisis de exones y región promotora del gen *CYP2C9* para identificar si existían variantes genéticas novedosas que pudieran explicar el fenotipo de “resistencia a cumarínicos” en pacientes Mexicanos-Mestizos bajo tratamiento anticoagulante en la Clínica de Anticoagulantes del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Se encontraron 4 SNP's en los pacientes estudiados, la variante *-109T>A* (*rs9332238*) y *-112 A>G* (*rs1934969*) se encuentran en región intrónica, a unas cuantas bases de inicio al exón 9 (*fig. 3.1*), no se les ha asociado con implicación clínica, ya que si bien podrían encontrarse en un sitio de *splicing*, no codifican debido a su localización. La variante *1425T>A* (*rs1057911*) se localiza en el exón 9, se trata de una transversión de una timina por una adenina en la posición 1425 del mRNA que se esperaría produzca un cambio en el marco de lectura para la traducción en aminoácido, sin embargo, la consecuencia funcional protéica de *CYP2C9* no se altera ya que el cambio de base es sinónimo, el triplete GGT que se traduce en glicina (Gly) en posición 475, produce lo mismo que el triplete del alelo ancestral GGA. La variante **369T>A* se encuentra *downstream* (rio abajo) al exón 9 por 369 pb, este SNP no ha sido asociado a implicación clínica alguna.

No se encontraron variantes novedosas en la región codificante del gen *CYP2C9* que conduzca un cambio en la actividad metabólica de la proteína expresada que pudiera explicar el fenotipo en los 7 pacientes que requieren de dosis extremas de acenocumarol o warfarina. Cabe destacar que la presencia de tres de las variantes encontradas (*-112 A>G*, *1425T>A*, **369T>A*) se hallan en estado homocigoto en los 7 individuos de estudio, y para el SNP *-109T>A* homocigoto en 5 de ellos; si bien no se puede conjeturar asociación de estos SNPs en pacientes que pudieran requerir dosis elevadas de ACOs, podría inferirse que son variantes alélicas presentes en población Mestiza- Mexicana; para esto sería importante replicar este estudio en pacientes con

características semejantes pero con un requerimiento de ACOs normal o el esperado por su fenotipo y genotipo.

Existen numerosos trabajos donde se han estudiado variantes alélicas *CYP2C9**2 y *3 por sus implicaciones clínicas además de ser las más comúnmente encontradas en diferentes poblaciones a lo largo del mundo (incluyendo Mexicana), pero no existe trabajo alguno en el que se analice la resistencia a anticoagulantes orales en población Mestiza-Mexicana desde el aspecto farmacogenómico. Los resultados de este trabajo son difícilmente comparables con otros debido a la nula información para la población de estudio, como ejemplo, las frecuencias en el alelo menor (MAF) que se han reportado para los 4 SNPs encontrados, ya que estos han sido calculados para poblaciones con una base ancestral distante a la Mexicana, pero eso no hace desdeñable lo encontrado en el trabajo presente, si no lo contrario, permite conocer más del perfil genómico del paciente Mexicano-Mestizo que padecen de ECV.

Con los resultados obtenidos nuevas preguntas son abiertas para comprender el fenotipo expresado en las personas resistentes a ACOs. Es importante el análisis mediante secuenciación de los genes *VKORC1* y *CYP4F2* para la búsqueda de variantes que pudieran explicar el requerimiento de dosis extremas de cumarínicos, ya que se han reportado en ellos SNPs asociados al requerimiento de dosis mayores a lo normal en personas portadoras de al menos una variante alélica^{3, 61- 63}.

El valor de la información genómica de nuestra población va más allá del establecimiento de una idiosincrasia particular del mexicano, se extiende al desarrollo de una terapia individual, una intervención farmacológica adecuada y, la prevención de complicaciones por medicamentos con estrecha ventana terapéutica como los anticoagulantes orales cumarínicos.

CONCLUSIONES

- Se Identificaron 7 pacientes con fenotipo de resistencia a ACOs.
- La hipótesis se rechaza al no identificarse variantes novedosas en *CYP2C9* que expliquen el fenotipo de “resistencia a ACO” en ninguno de los 7 sujetos. Quizá las variaciones que pudiesen explicar el requerimiento de dosis extremas en estos pacientes se encuentren en los genes *VKORC1* o *CYP4F2*, ya que han sido asociados con altas dosis de consumo.
- Cuatro polimorfismos de un solo nucleótido sin asociación clínica fueron identificados en el exón 9 y en la región UTR del gen *CYP2C9* en el grupo de estudio, debido quizás a una frecuencia alélica característica en la población Mestiza del centro de nuestro país.

PROPUESTAS

1. Es necesaria la secuenciación de los genes *VKORC1* y *CYP4F2* para la búsqueda de variantes nuevas que pudieran estar asociadas al requerimiento de dosis extremas en los pacientes Mexicanos-Mestizos con fenotipo de resistencia a ACOs.
2. Es importante tener secuencias de comparación para el análisis genómico de los pacientes con resistencia, debe secuenciarse paralelamente un grupo de individuos que presenten un fenotipo normal en los requerimientos de dosis diaria de ACO. Esto podrá clarificar la presencia de variantes que pudiesen ser exclusivas en nuestra población Mestiza de estudio.

REFERENCIAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION, WORLD HEART FEDERATION, WORLD STROKE ORGANIZATION. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Policies, strategies and interventions [Sede Web]. Geneva **2011**. [Acceso 4 Enero 2013].
Disponible para descargar en:
http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564373_eng.pdf
2. RUBBOLI A, BECATTINI C, VERHEUGHT F. Incidence, clinical impact and risk of bleeding during oral anticoagulation therapy. *World J Cardiol*. **2011**; 3(11): 351-8.
3. PÉREZ-ANDREU V, ROLDÁN V, LÓPEZ-FERNÁNDEZ MF, ANTÓN AI, *et al*. Pharmacogenetics of acenocoumarol in patient with extreme dose requirements. *J Thromb Haemost* **2010**; 8: 1012-17
4. ISAZA C, SEPÚLVEDA-ARIAS JC, HENAO J. La farmacogenómica en Medicina. *Colomb Med*. **2009**; 40: 327-46.
5. DAVED SP. Pharmacogenetics. *Prim Care*. **2004**; 31(3): 543-39.
6. ALTMAN RB, KLEIN TE. Challenges for biomedical informatics and pharmacogenomics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **2002**; 42: 113-33.
7. VENTER JC, ADAMS MD, MEYERS EW, LI PW, *et al*. The sequence of the human genome. *Science*. **2001**; 291:1304-51.
8. SACHIDANANDAM R, WEISSMAN SC, KAKOL JM, *et al*. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. **2001**; 409: 928-33.
9. LICINO J, WONG M-L. Pharmacogenomics: The search for individualized therapies. Weinheim: Wiley VCH; **2002**.
10. PALMER LJ, CARDON LR. Shaking the tree: mapping complex disease genes with linkage disequilibrium. *Lancet*. **2005**; 366: 1223-34.
11. MEYER UA. Genotype or phenotype: the definition of a pharmacogenetic polymorphism. *Pharmacogenetics*. **1991**; 1: 66-67.
12. BHATHENA A, SPEAR BB. Pharmacogenetics: improving drug and dose selection. *Curr Opin Pharmacol*. **2008**; 8: 639-46.
13. EVANS, W.E., MCLEOD, H.L. Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med*. **2003**; 348, 538-49.
14. JIMENEZ-SANCHEZ G. Developing a platform for genomic medicine in Mexico. *Science*. **2003**; 300:295-6.
15. SEGUIN B, HARDY BJ, SINGER PA, DAAR AS. Genomics, public health and developing countries: The case of the Mexican Institute of Genomic Medicine (INMEGEN). *Nat Rev Genet*. **2008**. Suppl 1: S5-S9.
16. JUÁRES-CEDILLO T, ZUÑIGA J, ACUÑA-ALONZO V, PÉREZ-HERNÁNDEZ N, *et al*. Genetic Admixture and diversity estimations in the Mexican Mestizo population from Mexico City using 15 STR polymorphic markers. *Fores Sci Inter: Genetics*. **2008**; 2: e37-e39.
17. SILVA-ZOLEZZI I, HIDALGO-MIRANDA A, ESTRADA-GIL J, FERNANDEZ-LÓPEZ JC, *et al*. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genetic medicine in Mexico. *PNAS Genetics*. **2009**.
18. OLIVA-SÁNCHEZ PF, SIQUEIROS-GARCÍA JM, VÁZQUEZ-GONZÁLEZ JR, CARNEVALE A, *et al*. La medicina genómica en las políticas de salud pública: una perspectiva de investigadores mexicanos del área biomédica. *Salud Públ Méx*. **2013**; 55: 124-35.
19. BOROBIA MA, LUBOMIROV R, RAMÍREZ E, LORENZO A, *et al*. An Acenocoumarol dosing algorithm using clinical and pharmacogenetic data in spanish patients with thromboembolic disease. *PLoS ONE*. **2012**; 7(7): e41360.
20. MANCERA MC, LÓPEZ PA, PARRA BT, CORTÉS VG. Anticoagulación oral *Rev Mex Enf Card*. **2008**; 16 (1): 11-19.
21. IZAGUIRRE ÁR, CORTINA R. El papel del laboratorio en el control del tratamiento antitrombótico. *Rev Hematol Mex*. **2011**; 12(Supl.1): S61-S65
22. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD/ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD/MARTÍNEZ R. Enfermedades Cardiovasculares [Sede Web]. Washington: OPS, **2012** [Actualizada Abril 2004; Acceso 17 Diciembre 2012].
Disponible en:
http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6682&Itemid=2391&
23. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Non-communicable Diseases [Sede Web]. Country Profiles 2011. Washington: OPS **2012**. [Acceso 20 Diciembre 2012].

Disponible para descargar en:

http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241502283_eng.pdf

24. SECRETARÍA DE SALUD DE MÉXICO/DIRECCIÓN GENERAL DE INFORMACIÓN EN SALUD. Base de datos de defunciones 1979-2008.1ª ed, INEGI/SS: D.R©. México **2009**.
25. SØLBECK S, SISSE R, OSTROWSKI RS, JAHANSSON LP. A review of the clinical utility of INR to monitor and guide administration prothrombin complex concentrate to orally anticoagulated patients. *Throm Jour*. **2012**; 10:5.
26. GOODMAN LS, GILMAN A. *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11ª ed. McGraw- Hill; **2006**. p. 93-115.
27. FLÓREZ J; ARMIJO JA, MEDIAVILLO Á. *Farmacología Humana*. 5ª ed. Madrid: Elsevier-Masson; **2008**.
28. VAN DER MEER FJ, ROSENDAAL FR, VANDENBROUCKE JP, *et al*. Assessment of a bleeding risk index in two cohorts of patients treated with oral anticoagulants. *Throm Haemost*. **1996**; 76: 12-16.
29. TORN M, BOLLEN WL, VAN DER MEER FJ, *et al*. Risk of anticoagulant therapy with increasing age. *Arch Intern Med*. **2005**; 165: 1527-32.
30. BUDNITZ S, LOVEGROVE C, SHEHAB N, RICHARDS L. Emergency hospitalization for adverse drug events in older Americans. *N Engl J Med*. **2011**; 365:2002-12.
31. MCCLAIN M, PALOMAKI G, PIPER M, HADDOW J. A rapid-ACCE review of CYP2C9 and VKORC1 alleles testing to inform warfarin dosing in adults at elevated risk for thrombotic events to avoid serious bleeding. *Genet Med*. **2008**; 10(2):89-98.
32. ZANGER UM, TURPEINEN M, KLEIN K, SCHWAB M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem*. **2008**; 392: 1093-108.
33. RENDIC S, DI CARLO FJ. Human cytochrome P450 enzymes; a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev*. **1997**; 29:413-580.
34. KIRCHHEINER J, TSAHURIDU M, JANBRANE W, ROOTS I, *et al*. The CYP2C9 polymorphism: from enzyme kinetics to clinical dose recommendations. *Personalized Med*. **2004**; 1(1): 63-84.
35. SHIMADA T, YAMAZAKI H, MIMURA M, *et al*. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*. **1994**; 270: 414-23.
36. KIRCHHEINER J, BROCKMÖLLER J. Clinical Consequences of cytochrome P4502C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther*. **2005**; 77:1-16.
37. VISSER LE, TRIENEKENS PH, DE SMET PA, VULTO AG, HOFMAN A, *et al*. Patients with an APOE epsilon 4 allele require lower doses of coumarin anticoagulants. *Pharmacogenet Genomics*. **2005**; 15(2): 69-74.
38. RIEDER MJ, REINER AP, RETTIE AE. Gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) tags SNPs have limited utility for predicting warfarin maintenance dose. *J Thromb Haemost*. **2007**; 5: 2227-34.
39. M. WHIRL-CARRILLO, E.M. MCDONAGH, J. M. HEBERT, L. GONG, K. SANGKUH, C.F. THORN, R.B. ALTMAN AND T.E. KLEIN. Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmGKB) [Base de datos en línea]. California: Stanford University. **2012** [actualizada Agosto 2013; acceso 13 enero 2013].
Disponible en:
<http://www.pharmgkb.org/index.jsp>
40. LAL S, RAO JS, XIANG X, LIM W-T, *et al*. Pharmacogenetics of target genes across the warfarin pharmacological pathway. *Clin Pharmacokinet*. **2006**; 45(12): 1189-1200.
41. SIM SC. CYP2C9 allele nomenclature [Base de datos en línea]. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee: Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Nebert DW, Sim SC, [actualizada en Abril 2013; acceso 20 Febrero 2013].
Disponible en:
<http://www.cypalleles.ki.se/>
42. CASTELÁN-MARTÍNEZ OD, HOYO-VADILLO C, SANDOVAL-GARCÍA E, *et al*. Allele frequency distribution of CYP2C9*2 and CYP2C9*3 polymorphisms in six Mexican population. *Gene*. **2013**; 523 (2): 167-72.
43. LEIDEN OPEN VARIATION DATABASE. Mendelian genes: Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9 (CYP2C9) [Base de datos en línea]. Leiden (Países Bajos): Leiden University Medical Center. **2004** [acceso 26 Abril 2012].
Disponible en:
https://grenada.lumc.nl/LOVD2/mendelian_genes/home.php?select_db=CYP2C9
44. BARRET JC, FRY B, MALLER J, DALY MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. **2005**; 21:263-5.
45. LLERENA A, DORADO P, O'KIRWAN F, JEPSON R, *et al*. Lower frequency of CYP2C9*2 in Mexican-

- Americans compared to Spaniards. *Pharmacogen J*. **2004**; 4: 403-6.
46. DICKMANN LJ, RETTIE AE, KNELLER MB, KIM RB, *et al*. Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9*5) expressed among African Americans. *Mol Pharmacol*. **2001**;60(2):382-7.
 47. DORADO P, SOSA-MACIAS MG, PEÑAS LE, ALANIS BR, *et al*. CYP2C9 allele frequency differences between populations of Mexican-Mestizo, Mexican-Tepehuano, and Spaniards. *Pharm J*. **2011**; 11: 108-12
 48. KIDD RS, CURRY TB, GALLAGHER S, ADEKI T, *et al*. Identification of a null allele of CYP2C9 in an African-American exhibiting toxicity to phenytoin. *Pharmacogenetics*. **2001**; 22:803-8.
 49. LI T, CHANG CY, JIN AY, KHVOROVA A, *et al*. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature*. **2004**; 427: 541-44.
 50. D'ANDREA G, D'AMBROSIO RL, DI PERNA P, *et al*. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood*. **2005**; 105:645-9.
 51. RIEDER JM, REINER PA, GAGE FB, NICKERSON AD, *et al*. Effect of VKORC1 Haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med*. **2005**; 352: 2285-93.
 52. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (HHS)/NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **Gene**. [Base de datos en línea]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); **2002** [acceso 27 Diciembre 2012].
Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1559>
 53. BURMESTER KJ, BERG LR, GLURICH I, YALE HS, *et al*. Absence of Novel CYP4F2 and VKORC1 Coding Region DNA Variants in Patients Requiring high warfarin doses. *Clin Med & Res*. **2011**; 9: 119-24
 54. BEINEMA M, BROUWERS J, SCHALEKAMP T, WILFFERT B. Pharmacogenetic differences between warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon. *Thromb Haemost*. **2008**; 100: 1052-7.
 55. YUAN HY, CHEN JJ, WUNG JC, CHEN YF, *et al*. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum. Mol. Genet*. **2005**; 14: 1745-51.
 56. PALARETTI G, COSMI B. Bleeding with anticoagulation therapy- who is at risk, and how best to identify such patients. *Thromb Haemost*. **2009**; 102: 268-78.
 57. MCMAHAN DA, SMITH DM, CAREY MA, ZHOU XH. Risk of major hemorrhage for outpatients treated with warfarin. *J Gen Intern Med*. **1998**; 13: 311-316)
 58. RATHORE SS, AGARWAL SK, PANDE S, SINGH SK, *et al*. Pharmacogenetic Aspects of coumarinic oral anticoagulant therapies. *Ind J Clin Biochem*. **2011**; 26(3); 222-29.
 59. SAM C, MASSARO JM, D'AGOSTINO RB, LEVY D, *et al*. Warfarin and aspirin use and the predictors of major bleeding complications in atrial fibrillation. *Am J Cardio*. **2004**; 94: 947-51.
 60. LEFRERE J, HORELLOU M, CONARD J, SAMAMA M. Proposed classification of resistance to oral anticoagulant therapy. *J Clin Pathol*. **1987**; 40:242.
 61. SCOTT S, EDELMANN L, KORNREICH R, DESNICK R. Warfarin pharmacogenetics: CYP2C9 and VKORC1 genotypes predict different sensitivity and resistance frequencies in the Ashkenazi and Sephardi Jewish Populations. *Amer J Human Gen*. **2008**; 82: 495-500.
 62. LOEBSTEIN R, DVOSKIN I, HALKIN H, VECSEI M, LUBETSKY A, LUBETSKY A, RECHAVI G, AMARIGLIO N, COHEN Y, KEN-DROR G, ALMOG S, *et al*. A coding VKORC1 Asp36Tyr polymorphism predisposes to warfarin resistance. *Blood*. **2007**; 109: 2477-80.
 63. ROST S, FREGIN A, IVASKEVICIUS P, *et al*. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*. **2004**; 427: 537-41.
 64. NATIONAL HEART, LUNG AND BLOOD INSTITUTE'S (NHLBI) PROGRAM FOR GENOMIC APPLICATIONS (PGA). **Seattle SNPs**: Variation Discovery [Base de datos en línea]. Seattle, WA: [acceso 25 Abril 2013].
Disponible en:
http://pga.gs.washington.edu/genotyping_methodology.html
 65. University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser. In-Silico PCR. [Base de datos en línea]. Kent WJ. *Genome Res*. **2002** Apr;12(4) 656-64. [acceso 25 Septiembre 2013]
Disponible en:
<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>
 66. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (HHS)/NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **GeneBank** [Base de datos en línea]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); **2002** [acceso 2 Mayo 2013].
Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

67. GERHARD P. Historical geography of New Spain, 1519-1821. México: Universidad Nacional Autónoma de México **1986**.
68. MANCERA MC, LÓPEZ PA, PARRA BA, CORTÉS VG. Anticoagulación oral. *Rev Mex Enf Card*. **2008**; 16(1): 11-9
69. VILLA-VERDE N. Genética humana: Conceptos, mecanismos y aplicaciones de la genética en el campo de la biomedicina. Madrid: Pearson Educación **2007**.
70. COLEMAN WB, TSONGALIS GJ. A historical perspective on the clinical diagnostic laboratory. In from: *Molecular diagnostics for the clinical laboratories*. Totowa, NJ: Humana Press. **2006**:1-12.
71. GRAHAM A, ALISON J. DNA. Introducing to DNA Sequencing. In from: *Methods in Molecular Biology*, vol. 167: *Sequencing Protocols*. Ed by: Graham CA y A JM. 2^{da} ed. Totowa, NJ: Humana Press. **2001**.
72. STRACHAN T, READ AP. . Human Molecular Genetics. 2^{da} ed. New York: Wiley-Liss **1999**.
73. LEEL G, SPURGEON SK, HEINER CR, *ET AL*. New energy transfer dyes for DNA sequencing. *Nuclic Acids Res*. **1997**; 25: 2816-22.
74. HUANG XC, QUESADA MA, MATHIES RA. DNA sequencing using capillary array electrophoresis. *Anal. Chem*. **1991**. 64: 2149-54

ANEXO No 1
SECUENCIACIÓN CAPILAR.

SECUENCIACIÓN CAPILAR AUTOMATIZADA

Desde el descubrimiento de la estructura del DNA y del código genético, una de las herramientas más importantes para identificar genes y predecir su función ha sido determinar la secuencia de los nucleótidos que constituyen cada gen. En las últimas décadas la tecnología de secuenciación del DNA ha logrado llevar a cabo proyectos como el “Genoma Humano”, culminado en el 2003, cuya finalidad fue obtener la secuenciación completa de nucleótidos de la especie humana ⁶⁹.

El desarrollo de métodos más fiables y simples técnicamente para la detección de variaciones en la secuencia en genes específicos, está siendo cada vez más importante. La secuenciación del DNA es la forma conceptualmente más directa de explorar la existencia de polimorfismos de un gen particular, por lo que es considerada el “Estándar de Oro” para la caracterización de alteraciones específicas de nucleótidos que resultan en enfermedad genética o un fenotipo asociado a la ineficacia en el tratamiento farmacológico ⁷⁰.

Los primeros métodos de secuenciación fueron descritos hace más de 30 años, se publicaron dos trabajos con metodológicamente distintos, conocidos como secuenciación Maxim-Gilbert (basada en un método químico), y la secuenciación Sanger (basada en un método enzimática), la más utilizada ⁷¹. El método original fue ideado por Fred Sanger y Alan Coulson a finales de los años 70's, convirtiéndose en el método más comúnmente citado en la literatura para la secuenciación de DNA. La técnica es también llamada método de “terminación de cadenas” o “di-desoxi” por el uso de didesoxinucleótidos que inhiben la elongación de un cadena por la DNA polimerasa en una reacción de PCR asimétrica (PCR de secuenciación), esto da lugar a cadenas de todas las posibles longitudes con diferencia de un solo nucleótido, la separación de las cadenas de distintos tamaños y la detección de nucleótidos marcados del extremo 3', permite deducir la secuencia de la molécula original ^{69, 72}.

1.1 PCR AMPLIFICACIÓN

El primer elemento de toda reacción de secuenciación es, lógicamente, el **fragmento de DNA** cuya secuencia queremos leer; este fragmento se obtiene del DNA total mediante el uso de un juego *primers* específicos que limitan la región deseada, estos se une a ella por complementariedad de bases, y mediante una polimerasa y nucleótidos se elonga y se obtienen muchas copias de la región. Aunque inicialmente era necesario convertir el fragmento a su forma monocatenaria, clonándolo en un tipo

especial de vectores, hoy en día puede utilizarse DNA de doble cadena, bien sea en forma de plásmidos (cuyo inserto queremos secuenciar) o como producto de PCR.

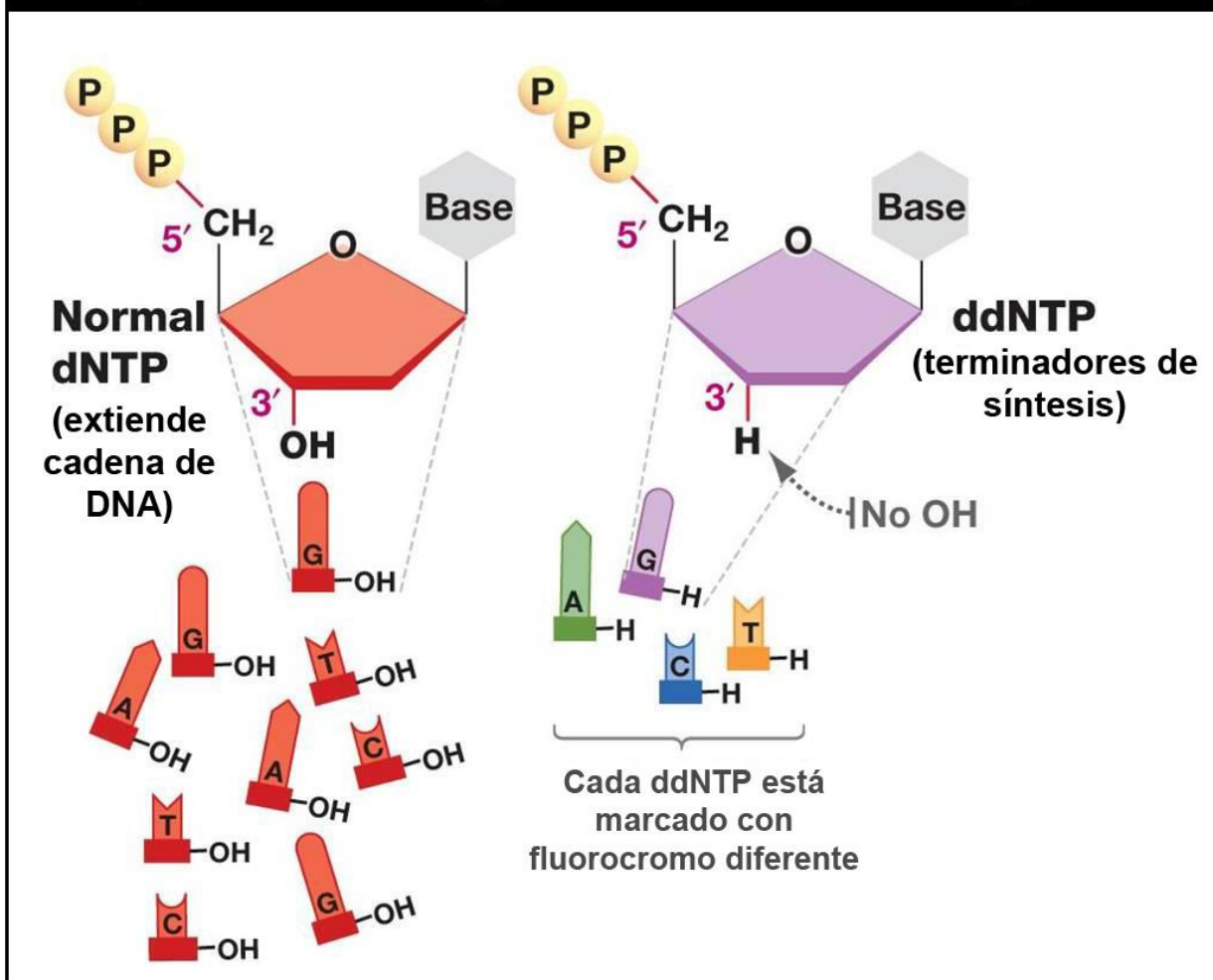
1.2 PCR SECUECIACIÓN

Un elemento necesario es el **primer**, que va a iniciar la síntesis de DNA desde el punto donde queremos empezar a leer la secuencia del fragmento original. Nótese que aquí sólo se utiliza un *primer reverse* o *forward* (en vez de dos, como en la PCR normal) ya que no queremos amplificar una región, sino simplemente sintetizar nuevas cadenas de DNA a partir de un punto concreto. Como toda reacción de síntesis de DNA, también es necesaria la presencia de una **polimerasa de DNA** que tenga buena fidelidad; es decir, que no introduzca errores en la nueva cadena. Algunas enzimas como la *Taq* polimerasa, son termoestables y fácilmente permite el ser usadas en reacciones de secuenciación automatizada.

1.2.1 Terminadores de cadena

Además de los nucleótidos libres 2'-desoxi-nucleótidos típicos en su forma trifosfato (**dNTPs**) que se van ir incorporando a la nueva cadena sintetizada por la polimerasa (a partir del extremo 3' del *primer*), se incorpora a la mezcla de reacción unos nucleótidos especiales que actúan como "terminadores" de la síntesis, que son el punto clave del método Sanger. Los terminadores son nucleótidos modificados químicamente que además de carecer del grupo hidroxilo 2', carecen del hidroxilo 3', de ahí su nombre de di-desoxi-NTP (**ddNTP**). El grupo 3'-OH es necesario para la extensión de la cadena por adhesión del siguiente nucleótido mediante enlace fosfodiéster al carbono 5' de éste; por lo tanto, la DNA polimerasa no puede extender la cadena copia del templado más allá de las incorporaciones de ddNTPs (**Fig. A1**)⁶⁹. En la PCR de secuenciación, el fragmento a secuenciar se desnaturaliza para separar las dos cadenas y permitir al *primer* acceda a su región complementaria específica. Tras permitir la hibridación del *primer* con la cadena molde respectiva, la polimerasa comienza a elongarlo incorporando nucleótidos complementarios a los de la cadena molde. Es una reacción en la que dNTPs y ddNTPs competirán entre sí por incorporarse al DNA, la cadena seguirá extendiéndose normalmente siempre que se incorpore un dNTP, ya que el nucleótido proporciona el grupo 3'-OH necesario para formar un nuevo enlace fosfodiéster con el grupo de un nuevo nucleótido; en cambio, si el nucleótido incorporado es un ddNTP, la síntesis de la cadena terminara en esa posición, ya que no existe el grupo hidroxilo 3' necesario para continuar la elongación. Lógicamente, esto sucederá para cada posición, de modo que mientras la síntesis avanza (por que se ha incorporado dNTPs) en cada nueva posición existe la posibilidad de que la cadena se termine en ese punto.

Figura A1. Fundamento químico de la secuenciación Sanger



1.2.2 Marcado de Terminadores de cadena

Cuando la reacción de secuenciación ha sido completada, sólo resta separar todos los fragmentos de los distintos tamaños y ver en qué nucleótido está terminado cada uno de ellos, y así reconstruir la secuencia original. Los métodos para separar los fragmentos y leer el nucleótido terminal han cambiado bastante desde la descripción original del método. Hoy en día, lo más habitual es utilizar **terminadores marcados** con algún fluorocromo (o fluoróforo) específico: se trata de ddNTPs que llevan unido un grupo químico que produce fluorescencia cuando es excitado por una luz de una determinada longitud de onda (λ). Como cada terminador lleva un fluorocromo distinto, es fácil saber en qué nucleótido terminó una cadena concreta, dependiendo del tipo de fluorescencia que produzca. Los 4 **fluoróforos** más comúnmente utilizados son: la carboxifluoresceína (FAM), carboxi-4',5'-dicloro-2',7',-dimetoxifluoresceína (JOE), carboxitetrametil-rodamina (TAMRA), y la carboxi-X-

rodamina (ROX). Estos colorantes son particularmente útiles debido a que sus longitudes de onda de emisión están espaciadas uniformemente, lo que facilita la discriminación entre colores y dan una elevada precisión de bases ⁷⁰. Si cada uno de los 4 ddNTP porta un marcaje distinto, es posible mezclarlos todos y llevar a cabo una reacción en un simple tubo y analizar en una sola línea. Esto reduce drásticamente el tiempo requerido y los costos de secuenciación ⁷³. Los 4 ddNTPs han sido adaptadas en una química de colorante terminador, y es comercializado por Applied Biosystems (Foster City, CA) bajo el nombre de BigDye®.

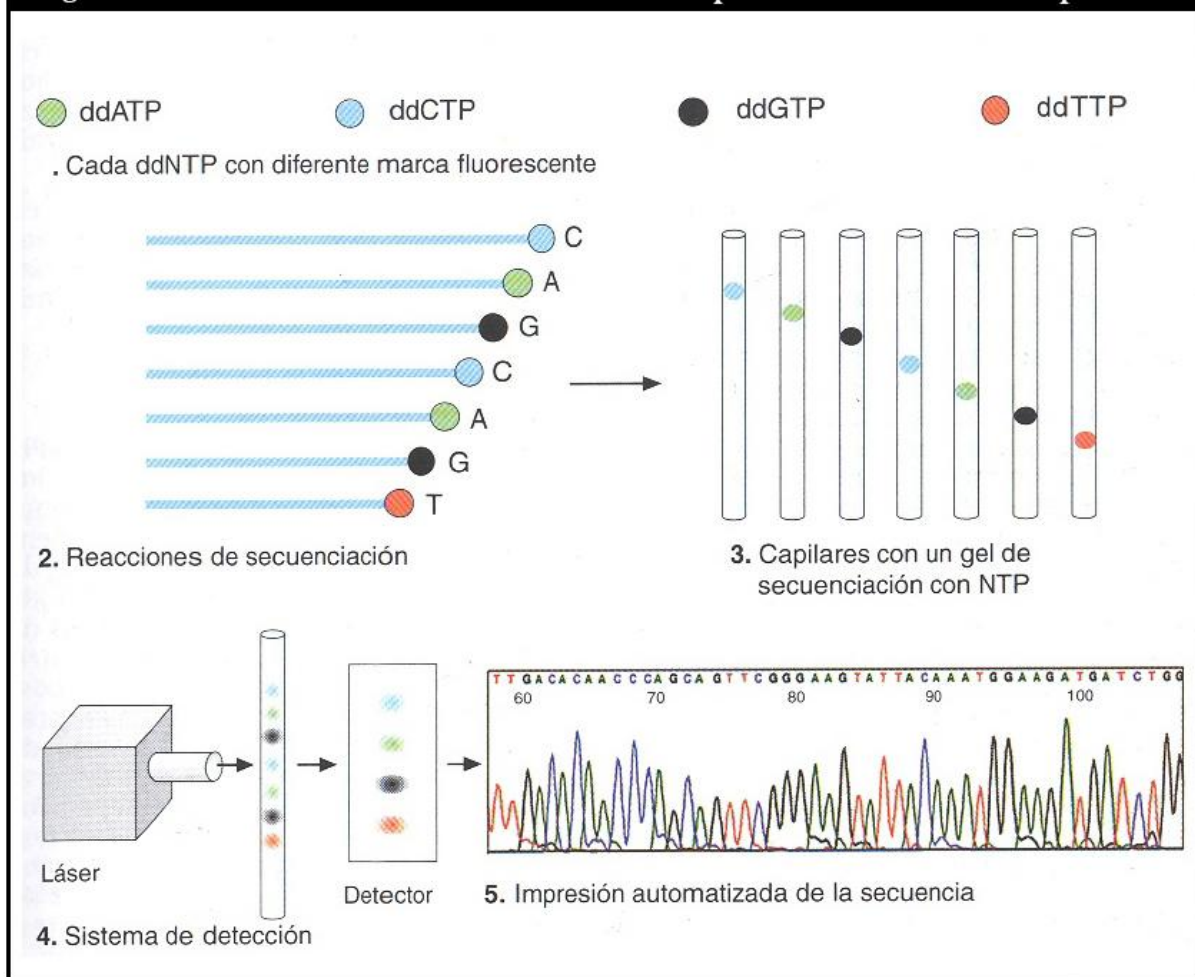
1.3 SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA POR ELECTROFORESIS CAPILAR

Para la separación de los fragmentos en la secuenciación automatizada de DNA se utilizan técnicas de **electroforesis capilar**, éste concepto se introdujo en 1991 como electroforesis en arreglo capilar (CAE, *Capillary Array Electrophoresis*) ⁷⁴. Este sistema utiliza capilares paralelos y un sistema de inyección y detección que permite analizar paralelamente tantas muestras de reacciones de secuenciación de DNA como tanto capilares cuente el equipo. La mezcla de reacción va pasando por unos finos capilares que contienen una matriz porosa (lleno con poliacrilamida o algún polímero especial desarrollado), las muestras corren en electroforesis, la matriz es capaz de resolver fragmentos de ADN que se diferencian en tamaño de tan sólo 1 nucleótido. De este modo, cuando la reacción de secuenciación ya completada pasa por el capilar, los fragmentos pequeños pasan fácilmente y salen del capilar antes que los fragmentos mayores, que tienen más dificultad para atravesar los poros y por eso quedan retenidos temporalmente.

1.3.1 Lectura de Marcadores Terminadores

Todos los fragmentos de la mezcla de reacción van saliendo del capilar comenzado por el más corto. A la salida del capilar se sitúa una fuente de luz, habitualmente un láser, que excita los fluorocromos (488 nm para la excitación de los colorantes de fluoresceína FAM y JOE, 543 nm para las rodaminas TAMRA y ROX) lo que produce un tipo de fluorescencia específico de cada ddNTP, lo cual es detectado por un dispositivo especial ⁷⁰. El orden en que van apareciendo los 4 distintos colores correspondientes a cada ddNTP se puede conocer la secuencia del fragmento de DNA sintetizado. Los resultados son representados esquemáticamente en un electroferograma que representa desde el fragmento más pequeño hasta el fragmento más largo, con azul (por ejemplo) los picos que se leen como una A, un pico rojo que se lee como una C, y así sucesivamente (**Fig. A2**). La secuencia se puede comparar con una secuencia consenso mediante el uso de programas informáticos y bases de datos ⁶⁹.

Figura A2. Secuenciación automatizada por electroforeis capilar



Aunque la secuenciación fue considerada por mucho tiempo complicado y cara para un laboratorio clínico, una combinación de necesidades clínicas y el mejoramiento de la tecnología han traído una secuenciación automatizada del DNA hacia el uso clínico de rutina. Es importante señalar que la secuenciación no es perfecta, y ciertamente no es mágica. Como cualquier otro método analítico, uno puede encontrarse con falsos positivos y falsos negativos. Sin embargo, cuando es apropiadamente realizada y apropiadamente interpretada, la secuenciación de un fragmento de DNA revelara casi siempre un alto porcentaje cercano al 100% de variaciones presentes en la secuencia. Las tecnologías de secuenciación están evolucionando rápidamente habiéndose reducido sustancialmente tanto el tiempo de secuenciación como sus costos.