



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRIA EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O.D.**

**ANÁLISIS DE LAS VARIANTES GÉNICAS DE *CYP2C9* Y SUS EFECTOS EN LA
FARMACOCINÉTICA DEL DICLOFENACO EN SUJETOS MEXICANOS**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS**

PRESENTA: MÓNICA DENNISE MARTÍN DE SARO

**TUTOR: DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**COTUTOR: DR. OCTAVIO AMANCIO CHASSIN
FACULTAD DE MEDICINA**

MÉXICO D. F. JUNIO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
MAESTRIA EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O.D.**

**Análisis de las Variantes Génicas de *CYP2C9* y sus efectos en la
Farmacocinética del Diclofenaco en Sujetos Mexicanos**

**Firma del Tutor
Dr. Sergio Alberto Cuevas Covarrubias**

**Firma del Profesor Titular
Dr. Fiacro Jiménez Ponce**

**Firma del Alumno
Mónica Dennise Martín de Saro**

“Basta un poco de espíritu aventurero para estar siempre satisfechos, pues en esta vida, gracias a Dios, nada sucede como deseábamos, como suponíamos, ni como teníamos previsto”

Noel Clarasó

Resumen estructurado	1
Abstract	2
Marco teórico	3-11
Farmacogenómica	3
Citocromos P450	3
Función de los CYPs	4
<i>CYP2C9</i>	5
Polimorfismos de <i>CYP2C9</i>	5
<i>CYP2C9</i> y fármacos	8
Diclofenaco	10
Planteamiento del problema	11
Objetivos	13
Justificación	13
Hipótesis	13
Tipo de estudio	13
Muestra	14
Metodología	14-22
Fase 1	14-17
Fase 2	17-22
Criterios de inclusión	17
Criterios de exclusión	18
Criterios de eliminación	19
Análisis estadístico	22
Definición de variables operativas	22
Conflicto bioético en el estudio	23
Resultados	24-30
Discusión y conclusiones	30
Agradecimientos	32
Bibliografía	33-35

Anexo 1. Carta de consentimiento informado

Índice de imágenes

Página

Imagen 1. Esquema del cromosoma 10q24	5
---------------------------------------	---

Imagen 2. Principales polimorfismos en <i>CYP2C9</i>	6
Imagen 3. Análisis de la curva generada por HRM	24
Imagen 4. Electroferograma del exón 3	25
Imagen 5. Electroferograma del exón 7	25

Índice de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos para ambos exones	15
Tabla 2. Condiciones de HRM para el exón 3	16
Tabla 3. Condiciones de HRM para el exón 7	16
Tabla 4. Horarios de la toma de muestras sanguíneas	21
Tabla 5. Variables operativas	22
Tabla 6. Variables demográficas de los 100 sujetos	24
Tabla 7. Variables registradas al inicio de la fase de farmacocinética en las 25 voluntarias	26
Tabla 8. Medias de los parámetros de farmacocinética en cada voluntaria después de las 12 tomas	26
Tabla 9. ABC infinito y grupos de metabolizadores	29

Índice de gráficas

Gráfica 1. Tiempo máximo (horas)	27
Gráfica 2. Concentración máxima (ng/ml)	27
Gráfica 3. ABC 0-t (ng*h/ml)	28
Gráfica 4. ABC 0-infinito (ng*h/ml)	28
Gráfica 5. Vida media (h)	29
Gráfica 6. Diferencias entre grupos	30

Resumen Estructurado

Antecedentes: El citocromo P450 2C9 (CYP2C9) es una enzima importante que participa en la biotransformación de muchos fármacos, incluyendo los antiinflamatorios no esteroideos, antidepresivos y anticoagulantes. Estudios *in-vitro* e *in-vivo*, han demostrado que los polimorfismos del gen *CYP2C9* modifican la actividad enzimática de CYP2C9 y alteran la biotransformación de distintos medicamentos. Las frecuencias alélicas en la población mestiza de México son 0.051 para el alelo *2 y 0.039 para el alelo *3.

Objetivo: Caracterizar la respuesta farmacocinética del diclofenaco dependiendo del genotipo de *CYP2C9*.

Método: Se realizó un estudio prospectivo, longitudinal y comparativo con 100 sujetos sanos a quienes se les genotipificó mediante la técnica High Resolution Melting. Se llevó a cabo la fase de farmacocinética con una sola dosis de 50 mg de diclofenaco administrada vía oral a 25 voluntarias sanas con el genotipo silvestre de CYP2C9. Se tomaron 12 muestras en diferentes tiempos para poder obtener los parámetros farmacocinéticos.

Resultados: En los 100 sujetos se encontró la forma silvestre de *CYP2C9* (*1/*1). Con base en el ABC 0-inf, se clasificó a las 26 voluntarias como metabolizadores lentos, intermedios y rápidos y se compararon las medias correspondientes (2285.421, 3217.442, 4637.450), obteniendo que existen diferencias entre cada uno de los grupos, específicamente entre los metabolizadores lentos contra los intermedios y rápidos.

Conclusiones: En este estudio no encontramos los polimorfismos buscados pero sí diferencias farmacocinéticas. Estos datos nos indican que CYP2C9 no es el único que metaboliza el diclofenaco, por lo que es importante genotipificar más citocromos, e incluso otras enzimas, potencialmente implicadas el metabolismo de este fármaco.

Palabras clave: Farmacogenética, Diclofenaco, *CYP2C9*, citocromo p450.

Abstract

Background. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) is an important enzyme in the metabolism of many drugs, including NSAIDs, antidepressants and anticoagulants. *In-vitro* and *in-vivo* studies have demonstrated that CYP2C9 polymorphisms modified the activity of the enzyme and altered the metabolism of different drugs. The allelic frequencies in Mexican population are 0.051 for CYP2C9*2 and 0.039 for CYP2C9*3.

Objective. Characterize the diclofenac pharmacokinetics depending on CYP2C9 genotype.

Methods. We studied the CYP2C9*2 and CYP2C9*3 allelic frequencies in a sample of 100 healthy Mexican subjects using the High Resolution Melting methodology. A single dose of diclofenac (50mg) was administered orally to 25 healthy women whose genotype was CYP2C9*1/*1. We took 12 samples at different times for the pharmacokinetic analyses.

Results. The CYP2C9*1/*1 allele was found in all the subjects. Using the AUC_{0-inf} parameter, we classified the 25 volunteers as poor, intermediate and extensive metabolizers and compared the values (2285.421, 3217.442, 4637.450), finding differences between the groups, specially between poor metabolizers versus intermediate and extensive metabolizers.

Conclusions. We did not find the *2 and *3 variants but did find differences in the pharmacokinetic parameters. This might indicate that CYP2C9 is not the only enzyme responsible for the metabolism of diclofenac, so it is important to genotype other cytochromes, even other enzymes, potentially involved in the metabolism of this drug.

Key words. Pharmacogenomic, diclofenac, CYP2C9, cytochrome p450.

Marco Teórico

Farmacogenómica

La farmacogenómica es un área de la farmacología que se encuentra en pleno desarrollo y que estudia la contribución de factores genéticos a las diferencias interindividuales en la respuesta a fármacos. Aunque el ámbito de estudio de la farmacogenómica implica también la variabilidad farmacodinámica, por ejemplo, a través del estudio de polimorfismos en genes que codifican receptores, es en el ámbito de la farmacocinética, y en particular en la biotransformación de fármacos, donde la farmacogenómica ha adquirido un desarrollo pleno y donde se están obteniendo los primeros resultados de utilidad clínica¹.

La variabilidad interindividual en la respuesta a los fármacos es una importante causa de efectos adversos. En muchos casos esta variabilidad está ligada al polimorfismo de genes que codifican las enzimas responsables de la biotransformación de dichos fármacos. La mayoría de estas enzimas son polimórficas debido a la presencia de polimorfismos en los genes que las codifican. Estas mutaciones, que consisten en la ausencia completa del gen, polimorfismos de un solo nucleótido, aislados o combinados y duplicaciones génicas, causan ausencia, reducción, alteración o incremento de la actividad enzimática².

Los portadores de mutaciones en genes codificadores de enzimas metabolizadoras de fármacos, cuando son tratados con dosis estándar de un fármaco que sea sustrato de la enzima afectada, suelen presentar niveles plasmáticos más elevados, cifras de depuración más bajas, y un incremento en la frecuencia y severidad de reacciones adversas secundarias al uso de dicho fármaco¹.

Citocromos P450

La actividad de muchos fármacos depende de su interacción con enzimas localizadas predominantemente en el hígado, y secundariamente en los pulmones e intestino delgado. El metabolismo juega un papel importante en la disposición de los fármacos, con implicaciones farmacológicas y toxicológicas³.

La superfamilia del citocromo P450s (CYP) comprende enzimas que se encargan del metabolismo de sustancias endógenas y de la biotransformación de fármacos⁴. El genoma humano contiene 57 genes CYP funcionales y 59 pseudogenes divididos en 18 familias y 57 subfamilias⁵. Dentro del hígado, se encuentran en los siguientes porcentajes: CYP1A2 (13%), 2A6 (4%), 2C (20%), 2D6 (2%), 2E1 (7%) y 3A4 (30%)⁶.

Función de los CYPs

El mecanismo catalítico de todos los CYPs es similar debido a la función conservada tipo heme tiolato, las variaciones de aminoácidos dentro de los sitios de unión confieren selectividad al metabolismo. Cerca del 90% de la oxidación de fármacos se atribuyen a esta familia: CYP1A2 (4%), 2A6 (2%), 2C9 (10%), 2C19 (2%), 2E1 (2%), 2D6 (30%) y 3A4 (50%)^{3, 7}. Estos porcentajes pueden cambiar cuando se identifican varios sustratos para los CYPs. En humanos, alrededor del 50% de la eliminación de los fármacos más utilizados se puede atribuir a una o más de las enzimas CYP.

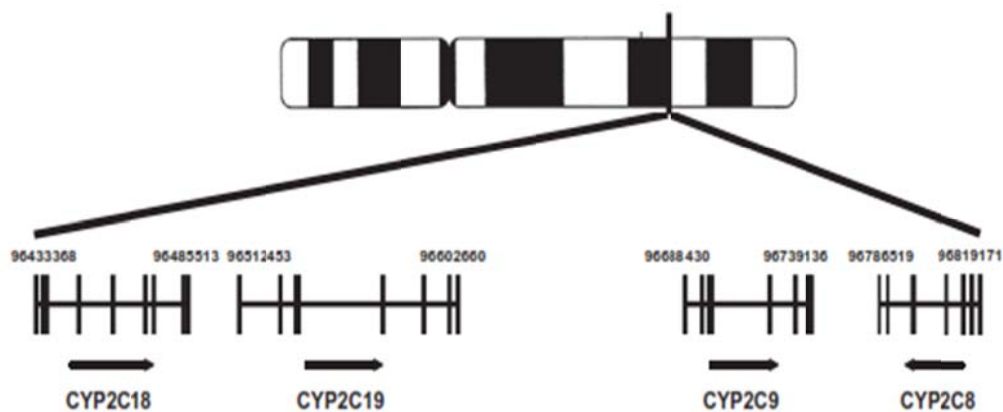
La actividad de CYP varía entre individuos de la misma población. Esta variabilidad puede influenciar la respuesta *in vivo* a ciertos fármacos. La mayoría de las CYPs están sujetas a inducción e inhibición, y las mutaciones genéticas juegan un papel importante o un rol dominante en la actividad enzimática de muchos CYPs, en particular CYP2A6, 2C9, 2C19 y 2D6.

En 1969, Alexanderson et al. realizaron un estudio en gemelos donde encontraron evidencia directa de que la depuración de nortriptilina estaba influenciada por factores genéticos. Fenotípicamente, una específica población está compuesta de metabolizadores ultra-rápidos (MU), metabolizadores rápidos (MR), metabolizadores intermedios (MI) y metabolizadores pobres (MP). La distribución de las variantes génicas y de los fenotipos es dependiente de etnicidad. El fenotipo MP se debe a la presencia de 2 alelos no funcionales o a la delección del gen completo, mientras que los MR se deben a que uno o los 2 alelos conservan su función. El fenotipo MI se encuentra usualmente en individuos con un alelo nulo y otro con actividad reducida, mientras que los MU tiene más de un gen funcional⁶.

CYP2C9

La subfamilia CYP2C consiste en 4 miembros en clúster en el cromosoma 10q24 de Cen- *CYP2C18-CYP2C19-CYP2C9* y *CYP2C8*-Tel (imagen 1), y constituyen aproximadamente 20% de todas las enzimas P450 en el hígado. También se expresan en otros tejidos como riñón, intestino, cerebro, corazón, aorta y pulmón. Las enzimas CYP2C son bien conocidas por metabolizar poco más de 20% de todos los fármacos^{4, 8, 9, 10, 11, 12}.

Imagen 1. Esquema del cromosoma 10q24⁶.

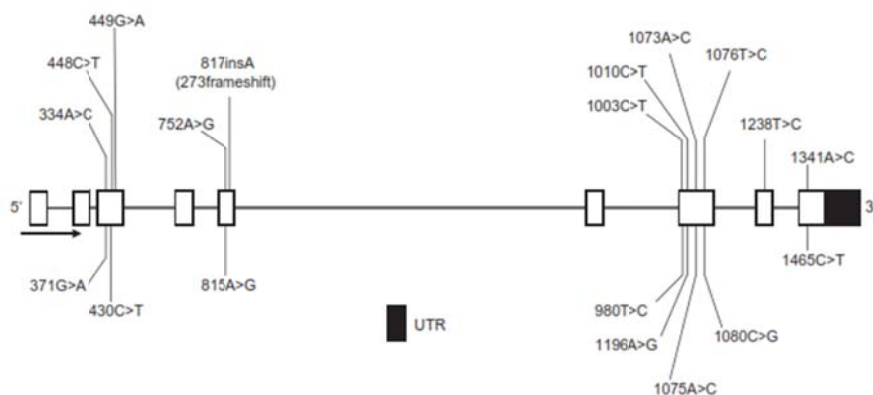


Polimorfismos de CYP2C9

CYP2C9 es una enzima genéticamente polimórfica compuesta por 490 aminoácidos y con un peso de 55.6 kDa³. Está involucrada en la biotransformación de muchos fármacos (10%) como la fenitoína, losartán, torasemida, antagonistas de la vitamina K como warfarina y acenocumarol, tolbutamida, glipizida, glibenclamida, nateglinida, ibuprofeno, naproxeno, celecoxib y diclofenaco^{3, 6, 9, 13}.

Hasta la fecha se han descrito 31 alelos diferentes (imagen 2). Los más estudiados son *CYP2C9*2* (R144C) y *CYP2C9*3* (I359L), que conllevan a una disminución en la actividad enzimática^{9, 12, 14}.

Imagen 2. Principales polimorfismos en *CYP2C9*⁶.



Existen 3 alelos de *CYP2C9* que se encuentran con mayor frecuencia en la población caucásica y tienen diferentes actividades. *CYP2C9**1 codifica para la enzima silvestre con actividad del 100%; *CYP2C9**2, se cambia una arginina por una cisteína en la posición 144 (Arg144Cys, 430 C>T) en el exón 3 y el alelo *CYP2C9**3, se cambia isoleucina por leucina (Ile359Leu, 1075 A>C)^{11, 12, 14}. De acuerdo a estudios *in vitro* y de farmacocinética en humanos, la actividad de la enzima codificada por *CYP2C9**2 está ligeramente disminuida comparada con la enzima silvestre, mientras que la actividad de *CYP2C9**3 se encuentra de 5 a 10 veces más disminuida dependiendo del sustrato estudiado. Las frecuencias en la población caucásica son de 82% para *CYP2C9**1, 11% para *CYP2C9**2 y 7% para *CYP2C9**3. Se han descrito otros alelos de este gen con baja frecuencia en la población caucásica como *CYP2C9**6, único alelo descrito sin actividad enzimática. Recientemente, se describieron 7 variantes localizadas en la región 5' del gen *CYP2C9* que aparentemente tiene influencia en la actividad *in vivo* de la enzima³.

El alelo *CYP2C9**4 es extremadamente raro y consiste en una mutación de sentido equivocado 1076 T>C identificada originalmente en población japonesa. *CYP2C9**5 contiene una transversión 1080 C>G en el exón 8 casi exclusiva de población afro-americana. *CYP2C9**6 es un alelo nulo por una delección de adenina en el nucleótido 818 en el exón 5 también identificada en afro-americanos^{9, 12, 13}. *CYP2C9**13 se ha identificado en pacientes chinos considerados metabolizadores

pobres y consiste en una transversión en el exón 2. También se han reportado haplotipos que disminuyen la actividad del promotor hasta en 65%.

Los individuos con genotipo *CYP2C9**2/*2 y *3/*3 muestran cambios más evidentes en los parámetros de farmacocinética. El área bajo la curva (ABC) es un parámetro confiable de las repercusiones clínicas de estos polimorfismos. En los portadores del alelo *CYP2C9**3, incluso los heterocigotos, es donde se han observado mayores diferencias. En el resto de los alelos, los porcentajes varían dependiendo del sustrato. Por ejemplo, la presencia del haplotipo *CYP2C9**2/*2 tiene valores de depuración del 21% comparado con *CYP2C9**1/*1 cuando el sustrato es acenocumarol, y de 68-90% cuando los sustratos son ibuprofeno, tolbutamida y lovastatina. Por lo tanto, se sabe que el porcentaje de depuración es mayor en los pacientes con *CYP2C9**2. Sin embargo, se sabe que existe amplia correlación con *CYP2C8**3 y con las variantes promotoras de *CYP2C9* por lo que el aumento en la actividad debe estar relacionada con ellas³.

Los diferentes genotipos de *CYP2C9* se han estudiado en distintos grupos étnicos. A pesar de que los hispanos constituyen uno de los más grandes grupos a nivel mundial, incluyendo Estados Unidos, existen muy pocos estudios de farmacogenética en esta población. Llerena et al (2004) realizaron un estudio con la intención de comparar genotipos entre población México-americana y caucásicos españoles, encontrando diferencias significativas en la frecuencia del alelo *2 solamente. Como parte de su discusión mencionan que la población México-americana es compleja en cuanto a su mezcla, con un componente genético proveniente de grupos de Indios Nativos americanos provenientes de Asia y europeos de España, por lo que sus resultados nos podrían representar las migraciones realizadas por estos grupos étnicos⁹.

Este mismo grupo de autores publicó un artículo en 2010 reportando las diferencias en frecuencias alélicas entre poblaciones México-mestizas (MM), México-tepehuanos (MT) y españoles (SP). Encontrando menor frecuencia del alelo *2 en MT comparado con los otros 2 grupos y la frecuencia del alelo *3 fue menor en

MM que en MT. Estos hallazgos muestran que la diversidad genética en las poblaciones hispanas se relaciona con su ancestría¹⁵.

Un grupo de investigadores de la ciudad de Monterrey reportó las frecuencias de los alelos *2 y *3 en una muestra de 100 sujetos mexicanos de tres generaciones, encontrando 0.1 para el alelo *2, con 14% y 3% de heterocigotos y homocigotos. Para el alelo *3 reportaron una frecuencia de 0.03 con 7% de heterocigotos sin encontrar homocigotos².

La publicación más reciente sobre frecuencias alélicas en mexicanos se realizó en 2013 por Castelán Martínez et al., quienes estudiaron a 483 sujetos de 5 poblaciones indígenas: Nahuatl (212), Teenek (98), Tarahumara (52), Purépecha (48) y Huichol (73) y una muestra mestiza de la ciudad de México (947). Los alelos *2 y *3 no se encontraron entre la población Tarahumara, Purépecha y Huichol. Las frecuencias en la muestra mestiza, Nahuatl y Teenek para el alelo *2 fueron 0.051, 0.007 y 0.005, respectivamente. Mientras que para el alelo *3 fueron 0.039, 0.004 y 0.005. Sólo se encontraron 4 homocigotos *2/*2, 2 homocigotos *3/*3 y 7 heterocigotos *2/*3 dentro de la muestra de mestizos. Sus resultados concuerdan con los estudios anteriores que muestran que la presencia de estos alelos es baja incluso en la población mestiza, e incluso ausente en la población indígena mexicana¹⁶.

CYP2C9 y Fármacos

CYP2C9 es altamente polimórfico y existen estudios que puntualizan el impacto de estos polimorfismos en la depuración y/o la respuesta terapéutica de fármacos que son sustratos de esta enzima. Los fármacos más estudiados son los anticoagulantes, sulfonilureas, inhibidores de angiotensina II, fenitoína y AINEs. Para muchos de estos fármacos existe una clara relación gen-dosis y gen-efecto. Por lo tanto, se considera el estudio de los alelos de *CYP2C9* como un importante biomarcador en el monitoreo de la respuesta y presencia de efectos adversos de estos medicamentos³.

Existe un importante grupo de fármacos donde los polimorfismos de *CYP2C9* juegan un papel primordial, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Se sabe que al menos 16 de estos medicamentos son metabolizados por esta vía, incluyendo al aceclofenaco, ácido acetilsalicílico, azapropazona, celecoxib, diclofenaco, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, lornoxicam, ácido mefenámico, meloxicam, naproxeno, fenilbutazona, piroxicam, suprofen y tenoxicam.

Debido a que la mayoría de los AINEs son biotransformados *in vitro* por *CYP2C9*, su genotipo puede ser considerado como clínicamente relevante. Algunas variantes de *CYP2C9* son menos eficientes catalíticamente y se podría suponer que la exposición sistémica y el riesgo de eventos adversos es elevado en personas que expresan una o más de estas variantes¹⁷. Hay evidencia de que existen diferencias farmacocinéticas significativas entre los distintos genotipos como para hacer recomendaciones de dosis en medicamentos como celecoxib, flurbiprofeno, ibuprofeno y tenoxicam^{11, 18}.

Se sabe que la enzima óxido-reductasa P450 (POR) es la encargada de aportar electrones a *CYP2C9* para su adecuada función. *POR*, también es polimórfico, con su variante A503V presentándose en 19-37% en diferentes poblaciones. Existen estudios que demuestran que los polimorfismos en *POR* pueden alterar la función de *CYP2C9*, en conjunto con los polimorfismos *2 y *3 del gen¹⁹.

Existe controversia en los estudios que investigan la relación entre *CYP2C9* y los efectos gastrointestinales de los AINEs¹⁸. Algunos reportan que no existe diferencia entre los pacientes que presentan sangrado de tubo digestivo y que poseen diferentes alelos del gen, y hay otros estudios que reportan que los genotipos *CYP2C9**2 y *3 se asocian con mayor riesgo de sangrado gástrico después de tomar AINEs hasta de 2.6, debido principalmente a *2 el cual se detectó en el 23.4% de los pacientes con sangrado en comparación con 13.7% de los controles. Pilotto et al. (2007) reportaron mayor frecuencia de *CYP2C9**1/*3 (34.6% vs 5.8%; odds ratio: 12.9) y *CYP2C9**1/*2 (26.9% vs 15.4%; odds ratio: 3.8) en

pacientes con sangrado gastroduodenal versus los controles (*1/*1) después de tomar AINEs como celecoxib, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno o piroxicam, mientras que no se encontraron diferencias entre los controles y los pacientes con sangrado heterocigotos *CYP2C9**2/*3³.

Diclofenaco

El diclofenaco es un antiinflamatorio no esteroideo ampliamente utilizado, actúa como un potente inhibidor de las isoenzimas COX-1 y COX-2. Se utilizado como tratamiento de enfermedades crónicas como artritis reumatoide, osteoartritis y espondilitis anquilosante, y en enfermedades agudas como daño musculoesquelético, dolor postquirúrgico y dismenorrea. El diclofenaco produce reacciones adversas en el 20% de los pacientes, siendo los más comunes los datos gastrointestinales, también se han descrito disminución en la función renal y elevación de las enzimas hepáticas. Se elimina predominantemente por biotransformación hepática con menos del 1% de excreción por vía renal.

El metabolito principal del diclofenaco es 4'-hidroxiciclofenaco (4'-OH diclofenaco), con 3'-OH y 5'-OH en menor proporción. Tanto el diclofenaco como sus metabolitos hidroxilados pasan por glucuronidación y sulfatación²⁰.

El citocromo P450 (CYP) 2C9 ha demostrado ser casi exclusivamente el encargado de catalizar la 4'-hidroxilación del diclofenaco, así como la hidroxilación en 3'-OH. El metabolito 5'-OH es formado por CYP3A4 y en menor proporción por CYP2C19, CYP2C8 y CYP2C18. Se sugiere que la 5'-hidroxilación está implicada en la hepatotoxicidad del diclofenaco¹⁴.

Yasar et al en 2001 publicaron que el genotipo de CYP2C9 no influía en el metabolismo del diclofenaco tanto *in vivo* como *in vitro*²¹. Tampoco se encontraron diferencias entre los parámetros de farmacocinética y la depuración de 4-hidroxiciclofenaco entre los genotipos CYP2C9*1/*3 y *1/*1 en sujetos sanos²². En 2003, Kirchheiner no encontró asociación entre el genotipo y la depuración del diclofenaco en voluntarios sanos²³. Por el contrario, Dorado et al., en el 2003,

publicaron que el cociente urinario diclofenaco/4-hidroxiciclofenaco, pero no la relación diclofenaco/3-hidroxiciclofenaco y el índice diclofenaco/5-hidroxiciclofenaco, se asociaban al genotipo de CYP2C9 en sujetos sanos²⁴.

El cociente diclofenaco/4-hidroxiciclofenaco fue significativamente mayor en sujetos con genotipo CYP2C9*1/*3 y CYP2C9*2/*3 comparado con los sujetos CYP2C9*1/*1 y aproximadamente 3 veces mayor en sujetos homocigotos para CYP2C9*3. Estos hallazgos *in vivo* concordaron con los resultados en investigaciones *in vitro* que evaluaban la actividad metabólica del alelo CYP2C9*3 (I359L) usando 7 sustratos diferentes. La variante I359L tenía valores Km mayores en los 7 sustratos estudiados. La mayor diferencia se encontró en los valores V_{máx} de la 5-hidroxicilación del piroxicam (408 pmol/min/nmol vs 19 pmol/min/nmol P450), mientras que no hubo diferencias entre los valores de V_{máx} de la 4-hidroxicilación del diclofenaco y la metilhidroxicilación de tolbutamida³.

En la actualidad, se desconoce la farmacocinética de los medicamentos y su asociación con el genotipo de los distintos citocromos responsables de su biotransformación en población mexicana. Motivo por el cual el propósito de este estudio es incursionar en esta área.

Planteamiento del Problema

Más de 50 años de investigación en farmacogenética en el campo de la biotransformación de fármacos muestran el impacto de la variabilidad en la reacción de medicamentos pero no nos han permitido usar este conocimiento para mejorar el manejo individual de los pacientes.

En la clínica, el diagnóstico de las variantes génicas nos puede ayudar a mejorar la eficacia y seguridad de los medicamentos, y hasta la fecha, se ha intentado difundir el conocimiento del diagnóstico farmacogenético para validar su beneficio en los pacientes.

La importancia clínica de las variantes génicas depende de la frecuencia de los alelos y también de los efectos de los parámetros clínicos. También depende del rango terapéutico y seguridad de cada fármaco, sobre todo aquellos medicamentos que a bajas dosis tienen alto riesgo de efectos adversos.

La importancia de genotipificar es mayor en terapias donde los efectos no se pueden predecir con claridad. Por ejemplo, en la terapia con antidepresivos, 30% de los pacientes no responderán adecuadamente al tratamiento, y los efectos terapéuticos se esperan 2 semanas después de administrar el medicamento. En este caso, es importante conocer los factores que predicen la respuesta individual (actividad metabólica medida por monitoreo, éxito de tratamientos previos y factores genéticos), y las diferencias causadas por alteraciones en la actividad de las enzimas metabolizadoras ya que son un punto importante a considerar antes de tener falla en el tratamiento.

Los beneficios que tendría genotipificar serían: ajustar la dosis dependiendo del genotipo, escoger la estrategia terapéutica o incluso, otro medicamento.

El citocromo P450 2C9 (CYP2C9) es una enzima importante que participa en la biotransformación de muchos fármacos, incluyendo los antiinflamatorios no esteroideos, antidepresivos y anticoagulantes.

Estudios *in-vitro* e *in-vivo*, han demostrado que los polimorfismos del gen *CYP2C9* modifican la actividad enzimática de CYP2C9 y alteran la biotransformación de distintos medicamentos, por lo que en este estudio nos proponemos caracterizar la respuesta farmacocinética del diclofenaco y su asociación con los genotipos de *CYP2C9*.

Objetivos

General

Analizar la farmacocinética del diclofenaco y su asociación con el genotipo de *CYP2C9* en una muestra de sujetos sanos mexicanos.

Específicos

- Genotipificar el gen *CYP2C9* en una muestra de sujetos mexicanos.
- Determinar la farmacocinética del diclofenaco en una muestra de sujetos sanos mexicanos.

Justificación

En la actualidad, se desconocen la farmacocinética de los medicamentos y su asociación con el genotipo de los citocromos en población mexicana. Por lo que en el presente estudio se pretende estudiar la farmacocinética del diclofenaco y su asociación con el genotipo de *CYP2C9*, para que de este modo se pueda caracterizar la respuesta a los medicamentos y así personalizar los tratamientos evitando las reacciones adversas o favorecer que el tratamiento funcione.

Hipótesis

Los parámetros farmacocinéticos del diclofenaco se ven afectados por el genotipo del gen *CYP2C9*.

Tipo de Estudio

Prospectivo, longitudinal y comparativo.

Muestra

Se realizó genotipificación de 100 sujetos, no relacionados entre sí, de los cuales se escogieron 26 para el análisis de farmacocinética²⁵.

Metodología

Fase 1

Se solicitó la participación de 100 voluntarios no relacionados, de sexo indistinto, quienes firmaron una carta de consentimiento informado con los motivos del estudio, el procedimiento y los posibles riesgos. Se identificó la muestra con nombre completo, institución de procedencia, médico que solicitó el estudio y datos clínicos de cada voluntario, se eligió una vena adecuada en miembro torácico y previa asepsia y antisepsia se tomaron 5ml de sangre periférica con sistema Vacutainer utilizando como anticoagulante EDTA. La muestra obtenida fue procesada de la siguiente manera:

Extracción de DNA de sangre periférica:

Se lisó el paquete eritrocitario y plaquetario con solución de Tris-Triton-Sacarosa, la membrana celular también se lisó y se extrajo la capa bilipídica con solución hipotónica (Na Cl 5 mM) y detergente (duodesil sulfato de sodio al10%). Las proteínas se precipitaron con medio hipertónico a baja temperatura (cloruro de sodio saturado a 4°C). El material nuclear se resuspendió en agua estéril y se creó el banco de DNA, almacenando el ácido nucléico a -20°C. El material nuclear se validó como se describe a continuación:

- Volumen 50 ml.
- Para calidad de DNA –gel al 0.8 % con 0.4 g de agarosa.
- Para productos de PCR – gel al 1.5 % con 0.75 g de agarosa.

1.- En un matraz Erlenmeyer se disolvió agarosa en 50 ml de TAE 1 X (Tris, ácido acético glacial y EDTA), calentando la mezcla en un horno de microondas, después

de enfriar la solución hasta aproximadamente 50°C, se colocó 1 gota de bromuro de etidio (0.625 mg/ml).

2.- Se dejó solidificar en el porta gel colocando el peine.

3.- Se preparó TAE 1X para llenar la cámara.

4.- Se colocó una mezcla con 10 µl de producto de PCR con 3 µl de amortiguador de carga.

5.- la muestra fue colocada en el pozo y se usó una escalera de 100 pb como referencia.

6.- Se observó en el transiluminador de luz ultra violeta.

Se diseñaron oligonucleótidos para delimitar la región codificante mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) considerando la base de datos de NCBI del gen *CYP2C9*, quedando los siguientes primers (tabla 1):

Tabla 1. Oligonucleótidos para ambos exones

EXÓN	OLIGONUCLEÓTIDO
Exón 3 (polimorfismo *2)	F: AGGAATTGTTTTTCAGCAATGG R: AGTAGGGTCACCCACCCTTG
Exón 7 (polimorfismo *3)	F: AGCTAAAGTCCAGGAAGAGATT R: TTGGGAATGAGATAGTTTCTGA

Se realizó cuantificación de DNA de la siguiente manera:

1. Se colocó 995µL de agua inyectable y 5 µL de DNA en un tubo de 1ml y se mezclaron.
2. Se calibró el aparato con 1ml de agua inyectable para después someter a cuantificación cada una de las muestras.
3. Teniendo la concentración de DNA se realizaron diluciones para obtener una concentración de 50ng/mL.

Las 100 muestras fueron sometidas a HRM (High Resolution Melting) con la siguiente técnica:

1. Se realizó una mezcla para cada muestra de los 100 sujetos con los siguientes componentes:
 - a. Agua 4 μL
 - b. Mix 4 μL
 - c. DNA 2 μL
 - d. Oligonucleótidos forward y reverse 0.5 μL de cada uno
2. Las muestras se introdujeron en el aparato para HRM LightScanner 32 y se corrieron 50 ciclos bajo las siguientes condiciones (tablas 2 y 3):

Tabla 2. Condiciones de HRM para el exón 3.

FASE		TEMPERATURA	CICLOS		
Pre-desnaturalización	1	95°C por 60 segundos	1	R AMP	
	Amplificación	1	95°C por 5 segundos	45	R AMP
		2	57°C por 20 segundos		R AMP
	3	72°C por 30 segundos		R AMP	
Pre-melt	1	95°C por 5 segundos	1	R AMP	
	2	40°C por 30 segundos		R AMP	
Melt	1	60°C por 6 segundos		2.30	
	2	70°C		0.30	
	3	95°C continua		0.30	

Tabla 3. Condiciones de HRM para el exón 7.

FASE		TEMPERATURA	CICLOS		
Pre-desnaturalización	1	95°C por 60 segundos	1	R AMP	
	Amplificación	1	95°C por 5 segundos	45	R AMP
		2	55°C por 20 segundos		R AMP
	3	72°C por 30 segundos		R AMP	
Pre-melt	1	95°C por 5 segundos	1	R AMP	
	2	40°C por 30 segundos		R AMP	
Melt	1	60°C por 6 segundos		2.30	
	2	70°C		0.30	
	3	95°C continua		0.30	

Para corroborar los resultados se utilizó la técnica de secuenciación bajo las siguientes condiciones:

1. Cada reacción se realizó con la mezcla de los siguientes reactivos en un microtubo de 200 μl previamente etiquetado: Mezcla de reacción "BigDye Terminator" 2.0 μL , templado 100 ng/ μL 1 μL , oligonucleótido 1 μL (10 μM), agua destilada 16 μL , volumen final de la reacción: 20 μL .
2. La Mezcla de reacción BigDye Terminator contiene:

- ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP marcados por fluorescencia
 - Los cuatro desoxiribonucleotidos trifosfatados (dNTPs)
 - Tris-HCl (pH 9.0), MgCl₂
 - AmpliTaq DNA polimerasa
3. Ciclos de temperatura 25 ciclos: 96°C 5 minuto; 96°C 35 segundos; 50°C 25 segundos; 60°C 4 minutos; enfriar a 4 °C.
 4. Para eliminar el exceso de los dideoxinucleótidos las muestras de PCR de secuenciación se sometieron a un proceso de cromatografía por columna Centri Sep (applied Biosystems).
 5. El producto puro fue analizado utilizando un secuenciador automatizado de un capilar bajo las especificaciones del equipo ABI 3100.

Fase 2

Para la selección de los sujetos que participaron en esta fase, además del genotipo, se tomaron en cuenta los siguientes criterios:

Criterios de Inclusión

- Edad entre 18 y 45 años, género femenino.
- No fumadores o que hayan dejado de fumar 72 h previas al estudio.
- Índice de masa corporal no menor de 19.9 y no mayor de 26.9 Kg/m².
- Hallazgos normales en la historia clínica.
- Signos vitales normales.
- Electrocardiograma (ECG) y telerradiografía de tórax normales.
- Resultados de exámenes de laboratorio clínico considerando el criterio clínico del médico ante los siguientes estudios considerando su compatibilidad con

pequeñas desviaciones que serán consideradas dentro si hay significancia clínica de:

- Biometría hemática completa (BH).
- Pruebas de función hepática (PFH) que incluya: bilirrubina directa e indirecta, TGO y TGP.
- Proteínas totales, albúmina, globulina y relación albúmina/globulina.
- Química sanguínea (QS) que incluya por lo menos: glucosa, urea, creatinina y ácido úrico, colesterol total y triglicéridos.
- Examen general de orina (EGO).
- Pruebas para detectar la presencia de virus de inmunodeficiencia humana (VIH), de Hepatitis B (HVB) y de Hepatitis C (HVC), todas ellas negativas.
- Prueba de embarazo en orina negativa para las mujeres previa al internamiento de cada periodo.
- Prueba antidoping en orina el día de internamiento el 50% en cada fase de manera aleatoria.

Nota: Los exámenes de laboratorio se realizarán en el Laboratorio Central del Hospital General de México de acuerdo a sus procedimientos internos, con vigencia de 3 meses.

Criterios de Exclusión

- Hipersensibilidad conocida al medicamento.
- Antecedentes de Hepatopatía.
- Antecedente de Alcoholismo y drogadicción.
- Presencia de enfermedad renal, hepática, cardíaca, pulmonar, gastrointestinal, endocrina, neuromuscular, neurológica, hematológica.
- Alguna condición que muestre espasmo bronquial.

- Cualquier enfermedad clínicamente significativa previa al estudio y que se determine en la revisión Clínica del Internamiento y durante las fases del estudio clínico.
- Uso de medicación prescrita por médico o de libre venta dentro de cualquiera de los 7 días anteriores al inicio del estudio, y/o dentro la ejecución del estudio, lo cual será justificado con la respectiva desviación siempre y cuando ésta sea significativa para los resultados de análisis de fármaco.
- Mujeres embarazadas y en lactancia.

Criterios de eliminación

- Presencia de signos y síntomas de hipotensión grave que lleve a la presencia de síncope o shock.
- Antidoping positivo.
- Prueba de embarazo positiva.
- Falta de dos o más muestras consecutivas dentro de la fase de absorción y alrededor del $C_{m\acute{a}x}$.
- Reacción adversa grave debida al medicamento o por otro tipo de riesgo que comprometa la salud o la vida del voluntario.
- Indisciplina por incumplimiento de las normas y reglamentos.
- Trascresión dietética por ingesta de alimentos o líquidos previa al periodo de ayuno.
- Enfermedades concomitantes o tratamientos que dificulten el análisis químico de los medicamentos.
- Presencia de vómito entre la administración del medicamento y el tiempo en que se presenta la concentración plasmática máxima ($T_{m\acute{a}x}$) del fármaco.
- Eventos adversos serios para la vida.

- Por retiro del consentimiento informado por parte del voluntario que así lo decida.

Una vez valorados los criterios anteriores, los voluntarios firmaron una segunda carta de consentimiento informado donde se explicó esta fase del estudio, los motivos y posibles complicaciones. La fase 2 se dividió en 2 días.

DÍA 1:

- Se internó al sujeto entre las 19:00 h y 20:00 h. el día previo al estudio. Al registrarse en el Servicio, se realizó revisión de las pertenencias de los voluntarios por parte del personal.
- De las 20:00 -21:00 h, valoración médica de los voluntarios y pruebas de antidoping y embarazo.
- Cena a las 21:00 h.
- A las 21:30 h inició hora de descanso nocturno.

DIA 2:

- De las 7:00 h hasta las 7:45 h instalación del catéter, toma de signos vitales y toma de la muestra 0.
- De las 8:00 h y con diferencia de 3 minutos entre cada uno de los grupos se administró 1 gragea con 50 mg de Diclofenaco sódico (lote M8429, caducidad enero 15), con 250 ml de agua.
- De 8:00 a 10:00 h, toma de muestras en los tiempos 0.33, 0.66, 1.0, 1.33, 1.66, 2.00 h.
- 10:00 h Desayuno.
- De 10:00 h a 12:00 h toma de muestras en los tiempos 2.5, 3.0, 4.0 h.
- 11:00 h toma de signos vitales.
- 14:00 h toma de la muestra del tiempo 6.0 h.

- 14:00 h Comida.
- 16:00 h toma de signos vitales.
- 17:00 h toma de muestra del tiempo 9.0 h.
- Alta del Servicio.

Tabla 4. Horarios de la toma de muestras sanguíneas

Número de muestra	Tiempo de muestreo	Horario
1	0.0	08:00
2	0.33	08:20
3	0.66	08:40
4	1.0	09:00
5	1.33	09:20
6	1.66	09:40
7	2.0	10:00
8	2.5	10:30
9	3.0	11:00
10	4.0	12:00
11	6.0	14:00
12	9.0	17:00

Se obtuvieron las muestras de sangre en los tiempos establecidos para la determinación del diclofenaco, cada muestra fue de aproximadamente de 6 ml en tubos al vacío con heparina. Cada muestra se centrifugó a 3 500 rpm durante 10 minutos a 4° C. El volumen de plasma resultante fue dividido en dos crioviales de 2 ml cada uno. Los crioviales con el plasma se identificaron perfectamente con el número de estudio, el número de voluntario, número de muestra y la fecha y se mantuvieron en congelación entre -70°C a -50°C, hasta su entrega a la Unidad Analítica.

Las muestras biológicas fueron adicionadas con 10µL de estándar interno²², posteriormente se adicionaron 1ml de éter etílico, se agitaron por un minuto y se centrifugaron a 13,500 rpm por 5 minutos, se transfiere el sobrenadante a otro tubo limpio, se evaporan las muestras a sequedad con nitrógeno. Ya secas se reconstituyen con la fase de reconstitución. El reconstituido se transfiere a viales para inyectar al sistema cromatográfico con las siguientes condiciones:

- Fase móvil: acetonitrilo: agua (62:38 v/v)
- Velocidad de flujo: 0.5ml/min
- Temperatura de columna: 35°C

- Temperatura automuestreador: 13°C
- Volumen de inyección: 5 µL
- Columna: Acquity UPLC C₁₈

El método cumplió con los criterios de aceptación para los parámetros de validación, establecidos en la NOM 177-SSA1-1998²⁵.

Análisis Estadístico

Se realizó análisis estadístico primero descriptivo en la muestra de 100 sujetos para las variables de sexo, edad, peso, talla, IMC. Posteriormente, también en la muestra de 26 voluntarias para las mismas variables y para tensión arterial sistólica y diastólica, frecuencia cardíaca y respiratoria.

Posteriormente se realizó Análisis mediante la prueba de ANOVA de la variable ABC 0-∞.

Definición de Variables Operativas

Tabla 5. Variables operativas

VARIABLE	TIPO	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ANÁLISIS ESTADÍSTICO
Sexo	Cualitativa nominal	Femenino/masculino	Porcentaje
Edad	Cuantitativa continua	Años	Media, desviación estándar
Polimorfismo	Cualitativa nominal	Presente/ausente	
C_{máx}	Cuantitativa continua	ng/ml	
ABC 0-t	Cuantitativa continua	ng*h/ml	
ABC 0-∞	Cuantitativa continua	ng*h/ml	Media, desviación estándar, ANOVA
T_{máx}	Cuantitativa continua	Horas	Media, desviación estándar
T ½	Cuantitativa continua	Horas	

Edad. Tiempo transcurrido desde el nacimiento de un ser vivo.

Sexo. Condición orgánica, masculina o femenina, de los animales y las plantas.

Talla. Estatura de una persona desde la planta del pie hasta el vértice de la cabeza, medio en metros.

Peso. Fuerza con la que la tierra atrae un cuerpo, medido en kilogramos²⁶.

Índice de masa corporal, peso entre la talla al cuadrado.

Tensión arterial. Fuerza o presión que lleva la sangre a todas las partes del cuerpo. Presión que ejerce la sangre contra las paredes de las arterias. Se considera como presión arterial ideal <120mmHg de sistólica y <80mmHg de diastólica.

Signos vitales. Medidas de varias estadísticas fisiológicas frecuentemente tomadas por profesionales de la salud para así valorar las funciones corporales más básicas. Incluyen frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, temperatura, entre otras.

Polimorfismo. Variación en la secuencia de un lugar determinado del DNA entre los individuos de una población. Múltiples alelos de un gen.

Concentración máxima (C_{máx}). Representa la más alta concentración del fármaco en la sangre después de su administración oral.

Área bajo la curva de 0 a tiempo determinado (ABC 0-t). Representa la fracción del fármaco absorbido en un tiempo determinado.

Área bajo la curva de 0 a infinito (ABC 0-∞). Fracción extrapolada más allá del último tiempo de toma de muestras.

Tiempo máximo (T_{máx}). Tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima del fármaco.

Vida media (T_{1/2}). Tiempo en que una determinada concentración de fármaco se reduce a la mitad de su valor²⁰.

Conflicto Bioético en el estudio

Todos los procedimientos y acuerdos realizados durante el estudio, se apegan a los principios éticos enmarcados en la Declaración de Helsinki así como a las disposiciones del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de la Investigación Clínica y a las Buenas Prácticas Clínicas.

La muestra de DNA se utilizara única u exclusivamente para la realización de este protocolo y serán desechadas al final del mismo. No se proporcionara información a cualquier persona ajena al protocolo.

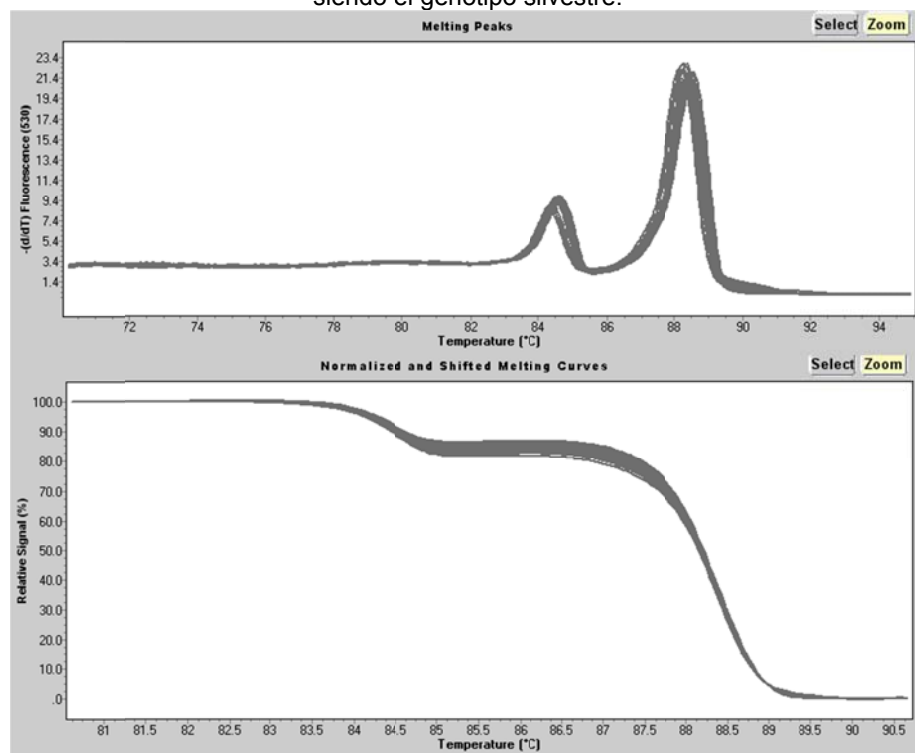
Resultados

Se recolectaron 100 muestras de sangre periférica obtenidas de 100 sujetos aparentemente sanos. Los datos demográficos se encuentran en la tabla 6.

	Media (DE), %
Sexo	50% mujeres 50% hombres
Edad	30.62 (7.25)
Peso	64.59 (9.19)
Talla	1.61 (0.07)
IMC	24.59 (2.34)

Las 100 muestras fueron analizadas por la técnica de HRM bajo las condiciones establecidas. Todos los sujetos tuvieron un genotipo *1/*1 (imagen 3) y para corroborar el resultado se realizó análisis de secuenciación en 25 muestras al azar (imágenes 4 y 5).

Imagen 3. Análisis de la curva generada por HRM. Observamos el patrón característico para rs1799853 en el gen *CYP2C9*, en el cual las 32 muestras procesadas presentan una Tm de 80grados siendo el genotipo silvestre.



muestras de sangre. La voluntaria 11 fue la única en presentar una reacción adversa que consistió en evacuaciones líquidas de las 10:00 a las 15:00.

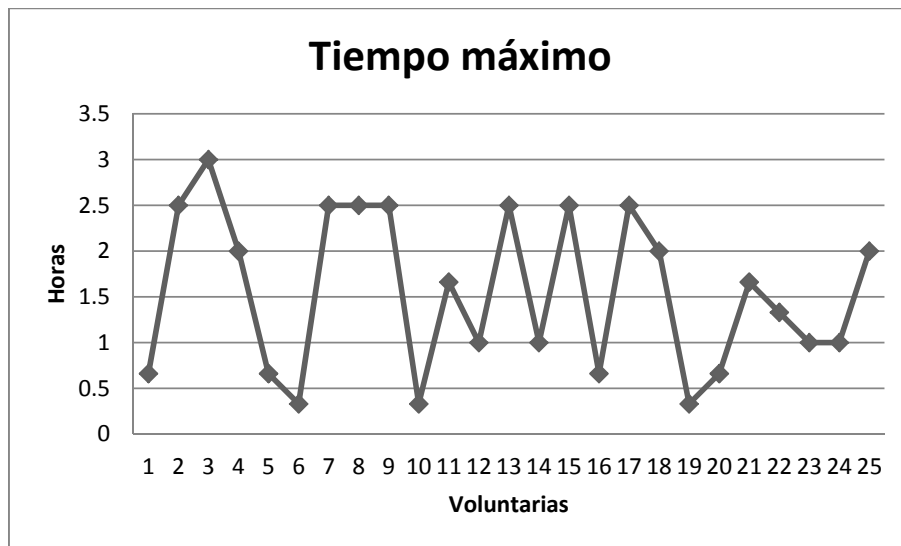
Variable	Valor (Desviación Estándar)
EDAD	30.56 (6.9)
IMC	23.63 (1.6)
TAS	113.12 (10.79)
TAD	63.76 (4.84)
FC	76.62 (5.69)
FR	19.54 (1.63)

IMC: índice de masa corporal; TAS: tensión arterial sistólica; TAD: tensión arterial diastólica, FC: frecuencia cardiaca, FR: frecuencia respiratoria.

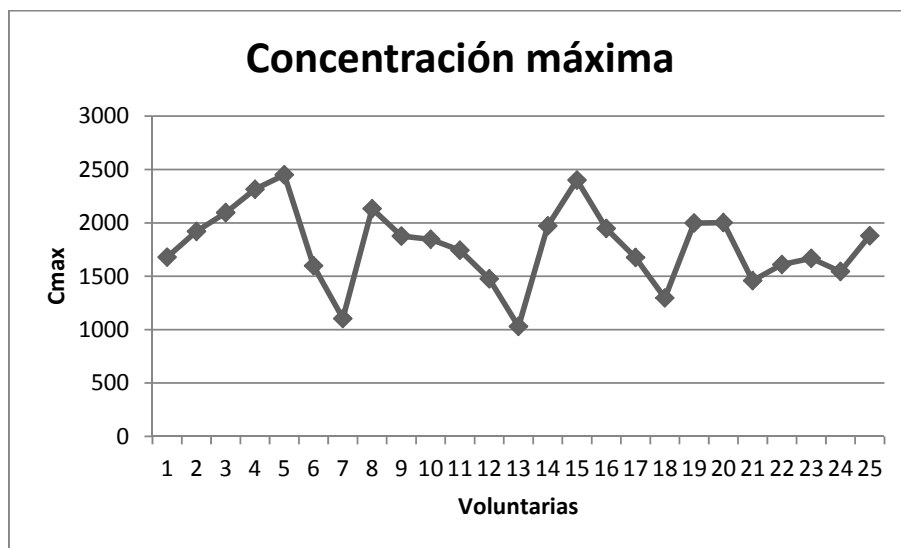
El diclofenaco fue cuantificado de las muestras plasmáticas por cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución acoplado a espectrometría de masas en tándem. Los valores de farmacocinética obtenidos se encuentran en la tabla 8 junto con su media y desviación estándar. Cada variable fue también expresada gráficamente (gráficas 1, 2, 3, 4 y 5).

Vol.	T _{máx} (h)	C _{máx} (ng/ml)	ABC0-t(ng*h/ml)	ABC0-inf(ng*h/ml)	t _{1/2} (h)
1	0.66	1679.005	3444.118	3513.307	0.81
2	2.5	1920.377	2528.011	2575.251	0.682
3	3	2095.386	3631.482	3681.439	1.264
4	2	2314.563	3380.136	3421.589	0.661
5	0.66	2449.759	3098.043	3139.731	0.892
6	0.33	1597.681	3769.828	3814.859	0.797
7	2.5	1103.725	2722.793	2776.165	0.906
8	2.5	2133.164	3124.387	3292.318	1.395
9	2.5	1876.577	2915.783	2980.335	1.187
10	0.33	1846.346	1914.808	1995.008	0.906
11	1.66	1742.913	2137.719	2184.693	0.587
12	1	1475.885	2374.576	2406.515	1.075
13	2.5	1029.477	1399.983	2019.384	6.71
14	1	1972.428	6329.641	6390.294	1.565
15	2.5	2400.558	3823.699	3874.193	1.414
16	0.66	1947.881	5058.111	5157.779	1.754
17	2.5	16.75.7	2461.388	2481.599	0.649
18	2	1296.384	2518.558	2553.332	0.875
19	0.33	1998.417	3053.967	3085.605	0.83
20	0.66	2002.755	3381.595	4380.818	0.979
21	1.66	1458.764	2588.919	2635.819	1.354
22	1.33	1609.677	3606.273	3674.145	0.864
23	1	1667.77	3264.357	3307.605	0.771
24	1	1544.26	3680.348	3743.439	1.299
25	2	1878.878	4143.015	4206.762	1.63
Media (DE)	1.551 (0.864)	1788.733 (362.315)	3214.062 (1009.1)	3334.559 (998.895)	1.274 (1.18)

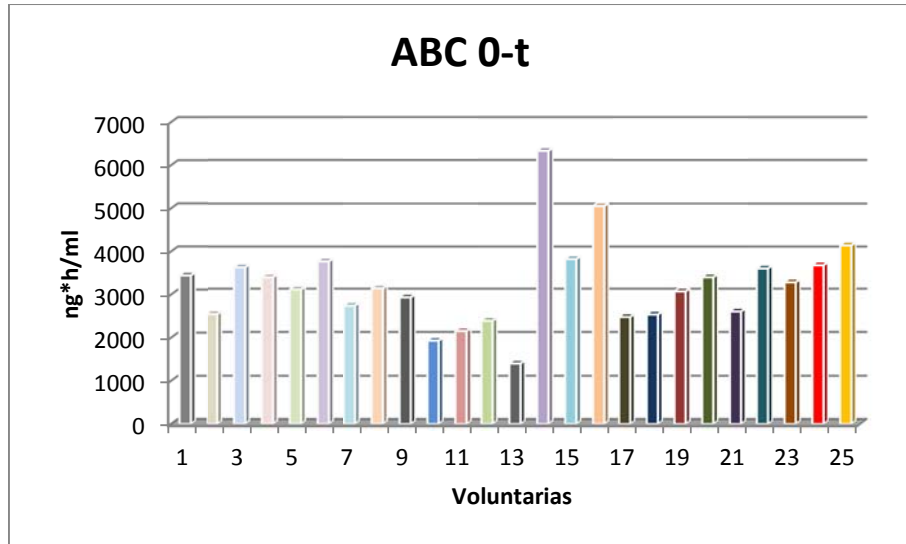
Gráfica 1. Tiempo máximo (horas)



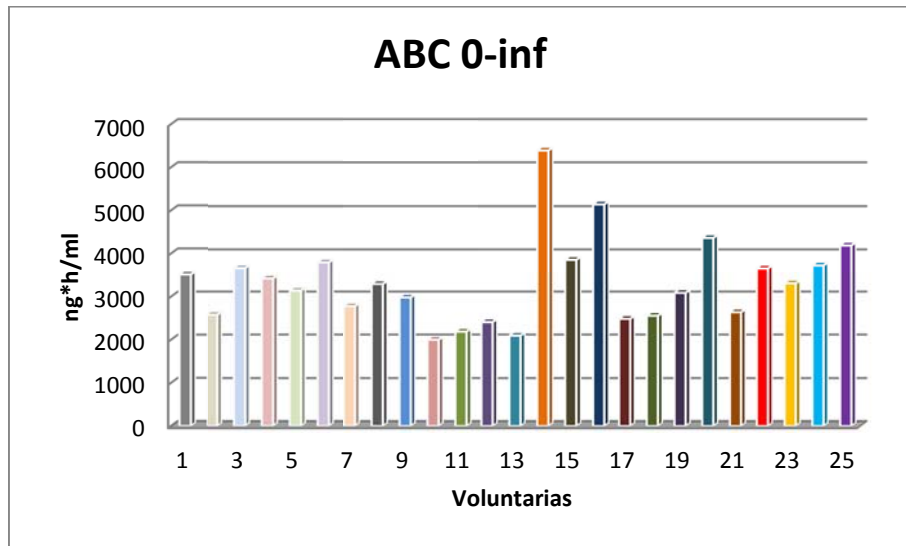
Gráfica 2. Concentración máxima (ng/ml)



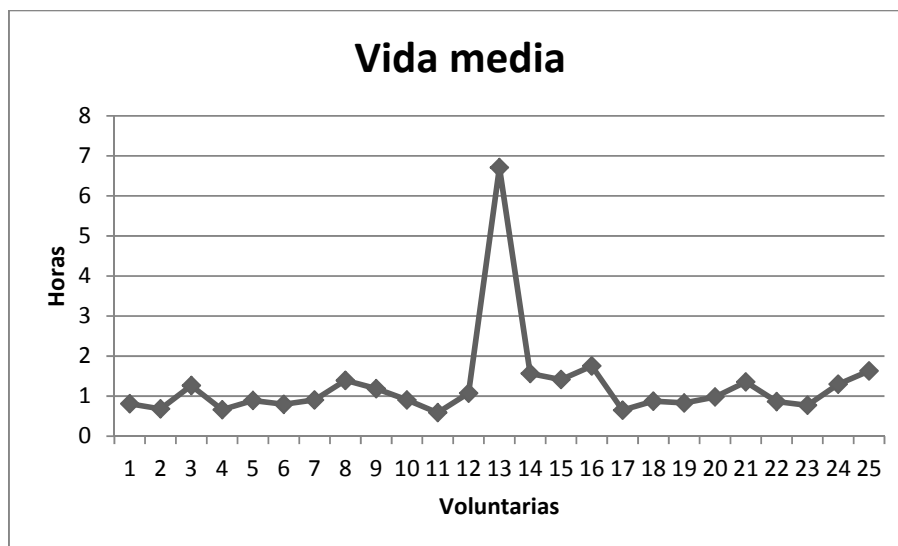
Gráfica 3. ABC 0-t (ng*h/ml)



Gráfica 4. ABC 0-infinito (ng*h/ml)



Gráfica 5. Vida media (h)



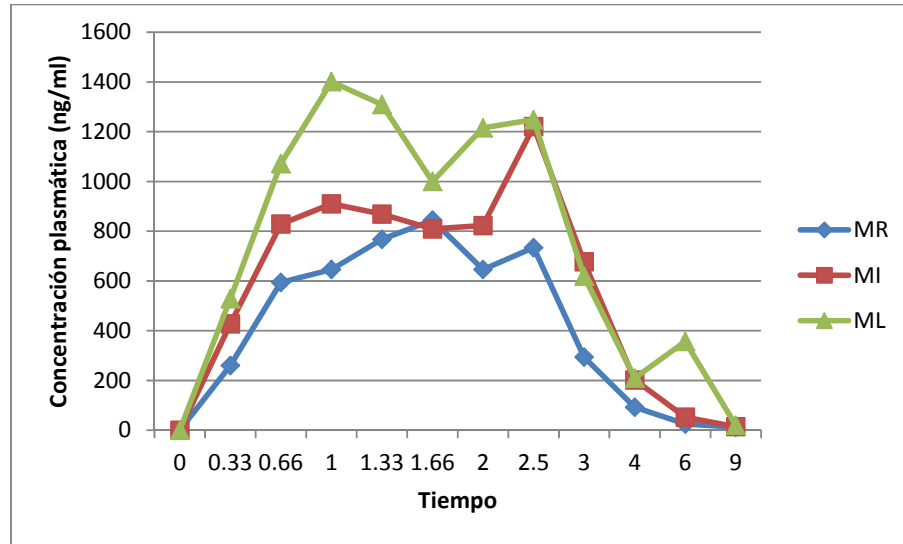
Utilizando los valores de ABC en tiempo infinito, se pudo hacer la clasificación de las voluntarias entre metabolizadoras lentas (ML), intermedias (MI) y rápidas (MR) (tabla 9).

Grupos	Media ABC _{0-inf} (ng*h/ml)	DS
ML(6)	4637.450	985.268
MI(13)	3217.442	394.604
MR(6)	2285.421	226.743

ML: metabolizadoras lentas, MI: metabolizadoras intermedias, MR: metabolizadoras rápidas, DS: desviación estándar.

Se buscó diferencias en los valores de ABC en tiempo infinito mediante ANOVA, obteniendo que existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.05$). Se realizó análisis posthoc (Scheffé) para determinar entre cuales grupos había diferencia, encontrando que el grupo de metabolizadoras lentas presentó diferencias significativas contra los de metabolizadoras rápidas e intermedias ($p < 0.05$) (Gráfica 6).

Gráfica 6. Diferencias entre grupos.



MR: metabolizadores rápidos, MI: metabolizadores intermedios, ML: metabolizadores lentos.

Discusión y conclusiones

El citocromo CYP2C9 es altamente polimórfico y se encarga de la biotransformación de múltiples fármacos como warfarina, acenocumarol, fenitoína, tolbutamida, losartán y la mayoría de los antiinflamatorios no esteroideos. El diclofenaco es biotransformado a 4-hidroxiclofenaco, su mayor metabolito, 3'-hidroxi y 3'-hidroxi-4'-metoxi por medio de esta enzima²¹. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los parámetros de farmacocinética y su asociación con el genotipo de *CYP2C9* en una muestra de sujetos mexicanos sanos.

En este estudio se reclutaron 100 voluntarios, de género indistinto, que participaron en la primera fase consistente en la genotipificación de *CYP2C9*.

Varios estudios han reportado que los alelos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* se encuentran ausentes o en muy baja frecuencia en las poblaciones de indígenas americanos en comparación con la frecuencia encontrada en poblaciones mestizas mexicanas¹⁶. Las frecuencias alélicas reportadas previamente oscilan entre 0.1 para *CYP2C9*2*, y 0.03 para *CYP2C9*3*², en poblaciones de mestizos mexicanos. A pesar de que los sujetos de nuestro estudio provenían de la ciudad de México,

considerada como ciudad con población mestiza, en ninguno se encontraron polimorfismos.

Aunque no se encontraron polimorfismos en esta muestra de sujetos, se realizó la segunda parte del estudio debido a la controversia que existe sobre si los polimorfismos realmente afectan la farmacocinética del diclofenaco, o si existen otras enzimas involucradas que pudieran tener mayor importancia^{18, 21, 24}.

Se eligieron al azar 26 sujetos con genotipo *1/*1 o silvestres de la muestra de 100, todas del sexo femenino debido a que se ha publicado que la biotransformación de algunos AINEs por CYP2C9 se ve afectada dependiendo del sexo²⁷.

Dentro de los parámetros estudiados, el que consideramos de mayor importancia para nuestro estudio fue el área bajo la curva de tiempo cero a infinito (ABC_{0-inf}) porque nos permite tener una mejor estimación de la transformación del fármaco. Con base en este resultado se realizó una separación por cuartiles que nos permitió clasificar a las voluntarias en metabolizadoras lentas (ML; >75), intermedias (MI; 25-75) y rápidas (MR; <25). Obtuvimos 6 sujetos considerados ML, 13 como MI y 6 MR. Al realizar el análisis estadístico, encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los 3 grupos y comparando el grupo de ML contra el de MI y MR ($p < 0.05$).

Los estudios realizados hasta la fecha sobre la biotransformación del diclofenaco y las variantes de CYP2C9 dividen a los sujetos en grupos dependiendo de su genotipo y comparan los parámetros de farmacocinética. Un ejemplo sería el estudio de Yasar et al en el 2001, donde administraron una dosis de 50mg vía oral de diclofenaco a 20 sujetos sanos y compararon los valores de C_{max}, ABC, tiempo y depuración de los siguientes grupos: *1/*2, *1/*3, *2/*2, *2/*3 y *3/*3, contra los sujetos *1/*1, sin encontrar diferencias significativas²⁸. No existe ningún estudio donde sólo se haya hecho la farmacocinética en sujetos silvestres.

Es importante mencionar que en este trabajo sólo se buscaron los polimorfismos que hasta la fecha han sido reportados en la población mexicana y que se conocen como variantes funcionales de *CYP2C9*. No podemos descartar la posibilidad de que en estos sujetos no exista algún otro polimorfismo en el resto del gen que esté generando las diferencias en los parámetros de farmacocinética.

Nuestros hallazgos nos llevan a coincidir con autores como Zi et al., quienes refieren en su publicación que la participación de *CYP2C9* en la biotransformación del diclofenaco puede no ser exclusiva y que podrían existir otras enzimas involucradas como *CYP3A4*, *CYP2C19*, *CYP2C8* y *CYP2C18*¹⁴. También es importante considerar las variantes en el gen *POR* que codifica para una enzima involucrada en el adecuado funcionamiento de *CYP2C9*¹⁹.

El hallazgo en la variabilidad de la biotransformación del diclofenaco presente en el mismo genotipo de distintos sujetos sanos, nos permite inferir asertivamente que *CYP2C9* no es el único metabolizador de este medicamento, ya que esperaríamos encontrar una misma respuesta, o al menos similar en todos los sujetos. Distintas respuestas con un mismo genotipo significa que otros citocromos podrían participar en la biotransformación del diclofenaco o coadyuvar con *CYP2C9*. De este modo, sería importante caracterizar las variantes de los distintos citocromos, potencialmente relacionados en la biotransformación del diclofenaco, en los sujetos estudiados para conocer cuál o cuáles de ellos pudieran influir en su metabolismo.

En conclusión, en la población estudiada no encontramos polimorfismos de *CYP2C9* pero sí diferencias en los parámetros de farmacocinética, lo cual podría deberse a la influencia de las otras enzimas como *CYP2C8*, *CYP2C18*, *CYP2C19* y *CYP2B6*¹⁴ o incluso de *POR*.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Biología Molecular y al servicio de Farmacología Clínica del Hospital General de México por su apoyo, ayuda y atenciones.

Este fue realizado con ayuda de DGAPA PAPIIT IN211612-2.

Referencias

1. Martínez C, Blanco G, García E, et al. Farmacogenómica clínica de CYP2C8 y CYP2C9: conceptos generales y aplicación al uso de AINE, Farmacia Hospitalaria 2006; 30: 240-248.
2. Aguilar B, Rojas JC, Collados MT. Prevalence of CYP2C9 Variants in the Mexican Population, Arch Med Res 2008; 39: 463.
3. Zhou S, Zhou Z, Huang M. Polymorphisms of human cytochrome P450 2C9 and the functional relevance, Toxicology 2010; 278: 165–188.
4. Smith G, Stubbins MJ, Harries LW, et al. Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily, Xenobiotica 1999; 28 (12): 1129-65.
5. Miksys S, Tyndale R. Cytochrome P450-mediated drug metabolism in the brain. J psychiatry neurosci 2013; 38(3): 152-163
6. Zhou SF, Liu JP, Chowbay B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impacts, Drug Metab Rev 2009; 41(2): 89-295.
7. Galli E, Feijoo L. Citocromo P-450 y su Importancia Clínica, Rev neuro-psiquiatr 2002; 65: 187-201.
8. Yuping Chen, Joyce A. Goldstein. The transcriptional regulation of the human CYP2C genes. Curr Drug Metab 2009; 10(6): 567–578.
9. Llerena A, Dorado P, O´Kirwan F et al. Lower frequency of CYP2C9*2 in Mexican-Americans compared to Spaniards, Pharmacogenomics J 2004; 4: 403-406.
10. Goldstein JA, de Morais SM. Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily, Pharmacogenetics 1995; 4 (6): 285-99.
11. Miners JO, Birkett DJ. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism, Brit J Clin Pharmacol 1998; 45 (6): 525-38.
12. Xie HG, Prasad HC, Kim RB et al. CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance, Adv Drug Deliv Rev 2003; 54 (10): 1257-70.
13. García-Martín E, Martínez C, Ladero JM, et al. Interethnic and intraethnic variability of CYP2C8 and CYP2C9 polymorphisms in healthy individuals, Mol Diagn Ther 2007; 10 (1): 29-40.

14. Zi J, Liu D, Ma P, et al. Effects of CYP2C9*3 and CYP2C*13 on Diclofenac Metabolism and Inhibition-based Drug-Drug Interactions, *Drug Metab Pharmacokinet* 2010; 25(4): 343-350.
15. Dorado P, Sosa-Macías MG, Peñas-Lledó EM et al. CYP2C9 allele frequency differences between populations of Mexican-Mestizo, Mexican-Tepehuano, and Spaniards, *Pharmacogenomics J* 2011; 11(2): 108-12.
16. Castelán O, Hoyo C, Sandoval E et al. Allele frequency distribution of CYP2C9*2 and CYP2C9*3 polymorphisms in six Mexican populations, *Gene* 2013; <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.128>.
17. Rodríguez A. Impact of CYP2C9 genotype on Pharmacokinetics: are all Cyclooxygenase Inhibitors the same?, *Drug Metab Dispos* 2005; 33, 1567-1575.
18. Kirchheiner J, Seeringer A. Clinical implications of pharmacogenetics of cytochrome P450 drug metabolizing enzymes, *Biochim Biophys Acta* 2007; 1770: 489-494.
19. Subramanian M, Agrawal V, Sandee D, Tam HK, Miller WL, Tracy TS. Effect of P450 oxidoreductase variants on the metabolism of model substrates mediated by CYP2C9.1, CYP2C9.2, and CYP2C9.3. *Pharmacogenet genomics* 2012; 22(8): 590-597.
20. Hardman J, Limbird L. Goodman and Gilman. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Mc Graw Hill, 10^a ed, 2003, pp 2150.
21. Yasar U, Eliasson E, Forslund-Bergengren C et al. The role of CYP2C9 genotype in the metabolism of diclofenac in vivo and in vitro, *Eur J Clin Pharmacol* 2001; 57(10): 729-35.
22. Shimamoto J, Leiri I, Urae A et al. Lack of differences in diclofenac (a substrate for CYP2C9) pharmacokinetics in healthy volunteers with respect to the single CYP2C9*3 allele, *Eur J Clin Pharmacol* 2000; 56: 65–68.
23. Kirchheiner J, Meineke I, Steinbach N et al. Pharmacokinetics of diclofenac and inhibition of cyclooxygenases 1 and 2: no relationship to the CYP2C9 genetic polymorphism in humans, *Br J Clin Pharmacol* 2003; 55: 51–61.

24. Dorado P, Berecz R, Norberto M et al. CYP2C9 genotypes and diclofenac metabolism in Spanish healthy volunteers, *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59: 221–225.
25. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
26. Diccionario de la Real Academia Española de la Lengua, 22 edición.
27. Scandlyn M, Stuart E, Rosengren R. Sex-specific differences in CYP450 isoforms in humans, *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; 4(4):413-424.
28. Wang B, Wang J, Huang S et al. Genetic Polymorphism of the Human Cytochrome P450 2C9 Gene and Its Clinical Significance, *Curr Drug Metab* 2009; 10: 781-834.



**“2011, Año del Turismo en México”
SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA**

“Análisis de las Variantes Génicas de CYP2C9 y sus Efectos en la Farmacocinética del Diclofenaco en Sujetos Mexicanos”

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O.D.

SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA Y FARMACOLOGÍA CLÍNICA

CONSENTIMIENTO INFORMADO

INFORMACIÓN DEL ESTUDIO

México D.F. a de de 2011

Título del estudio: **“Análisis de las Variantes Génicas de CYP2C9 y sus Efectos en la Farmacocinética del Diclofenaco en Sujetos Mexicanos”.**

Investigadores: Dr. Sergio Alberto Cuevas Covarrubias, Dr. Octavio Amancio Chassin.

Nombre del voluntario: _____ Credencial IFE: _____

Recuerde que puede preguntar al investigador cualquier duda que tenga la leer esta carta, las veces que sea necesario, con el fin de que se comprenda completamente su contenido.

He sido invitado(a) a participar en este estudio de investigación en Genética Médica y Farmacología Clínica que tiene como propósito investigar si las diferencias que existen en el gen *CYP2C9* intervienen en los procesos a los que el diclofenaco es sometido en su paso por el organismo. La justificación para realizar el estudio consiste determinar que tanto influyen los genes y sus variaciones en los cambios que sufre un fármaco dentro del organismo para poder disminuir los eventos adversos de los medicamentos y establecer dosis terapéuticas adecuadas a cada paciente, así como conocer el comportamiento del principio activo en el organismo de la población mexicana.

Población en Estudio: sujetos mexicanos que acuden al Hospital General de México y deseen participar en el estudio.

Al participar como voluntario/a en este estudio me han informado y explicado que el procedimiento a seguir en la fase de genotipificación es:

1. Se realizará en el servicio de Genética Médica del Hospital General de México.
2. Se me entregará una copia de este documento al ser incluido/a en el estudio.
3. Que tengo la libertad de retirar mi consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se creen prejuicios sobre mi persona. En tal caso, el Hospital General de México queda liberado de cualquier responsabilidad con mi persona.
4. Que tengo la garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgo, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento del voluntario.
5. Los resultados de las muestras de sangre que se me tomen durante el estudio se utilizarán en análisis especializados, cuyos resultados conocerán el médico responsable y el laboratorio de genética. Se garantiza que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con mi privacidad.
6. Si mi salud resultara afectada durante el estudio, el Hospital General de México me atenderá hasta mi completa recuperación.
7. Así mismo, reitero que el Coordinador del Estudio Clínico me ha informado y aclarado debidamente que el riesgo al que me expongo al participar en este estudio de investigación en genética médica es mayor que el mínimo; lo que significa que puede haber dolor, inflamación y/o infección en el sitio de punción.



**“2011, Año del Turismo en México”
SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA**

“Análisis de las Variantes Génicas de CYP2C9 y sus Efectos en la Farmacocinética del Diclofenaco en Sujetos Mexicanos”

- 8. Que no recibiré ningún beneficio médico directo por mi participación.
- 9. En caso de tener alguna molestia durante el estudio, avisaré de inmediato al investigador responsable.
Para cualquier duda o aclaración relacionada con este estudio, ponerse en contacto con los investigadores responsables del proyecto: Dr. Sergio Alberto Cuevas Covarrubias al tel: 27892000 ext. 1279, 1279; Dr. Octavio Amancio Chassin al tel: 27892000 ext. 1385; Dra. Mónica D. Martín de saro tel 24 horas: 044 55 28992217 o con el Presidente de la Comisión de Ética: Dr. Carlos Ibarra Pérez tel: 27892000 ext. 1369.

Me han explicado amplia y detalladamente que el día que acuda al servicio se realizarán los siguientes procedimientos:

- a) Que se elegirá una vena adecuada para punción, de preferencia en el brazo que menos utilizo.
- b) Que se realizarán técnicas de limpieza del área a puncionar.
- c) Que se tomará una muestra de sangre de 5ml y seré informado/a en caso de que se requiera extraer una cantidad de sangre un poco mayor.
- d) Que en caso de presentarse problemas para la obtención de la muestra, se tomarán una o más muestras mediante punción directa en la vena con aguja hipodérmica para evitar que la muestra se pierda.
- e) Que una vez que se tome la muestra podré retirarme del servicio.
- f) Que existe la posibilidad de ser seleccionado para completar la segunda fase del estudio donde se me dará otra carta donde se explique el procedimiento y los riesgos.
- g) Que puedo no aceptar participar en la segunda fase en caso de no desearlo.

El Médico responsable me informó que:

- 1. Todos los procedimientos y acuerdos aquí descritos se apegan a los principios éticos enmarcados en la Declaración de Helsinki así como a las disposiciones del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de la Investigación Clínica.
- 2. Que este estudio es una investigación científica con riesgo mayor que el mínimo para incrementar el conocimiento en el área de la Genética Médica y Farmacología, el cual tiene como finalidad conocer si las diferencias en el gen CYP2C9 afectan los cambios que sufre el diclofenaco mientras está en el organismo.
- 3. Que el estudio ha sido autorizado por las Comisiones de Ética e Investigación del Hospital General de México.
- 4. Este estudio tiene por objetivo: demostrar que los polimorfismos en el gen CYP2C9 intervienen con los parámetros de absorción, concentración máxima, área bajo la curva y eliminación del diclofenaco.

Por todo lo anterior he sido debidamente informado/a sobre mi participación en este estudio y todas mis dudas han sido aclaradas a satisfacción por el/los responsable/s del mismo. Por tanto, de manera libre y voluntaria, doy mi consentimiento para participar en este Estudio de Investigación en Genética y Farmacología Clínica, el cual deberá apegarse fielmente a este Consentimiento Informado y al protocolo de Investigación aprobado por las Comisiones de Ética e Investigación con el No. de Registro _____.

Voluntario:

Nombre completo	Clave de elector:	Firma



“2011, Año del Turismo en México”
SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA

“Análisis de las Variantes Génicas de *CYP2C9* y sus Efectos en la Farmacocinética del Diclofenaco en Sujetos Mexicanos”

Testigo uno:

Nombre: _____

Dirección: _____

Relación: _____

Testigo dos:

Nombre: _____

Dirección: _____

Relación: _____

Médico Responsable

Dr. Sergio Alberto Cuevas Covarrubias
Cédula profesional 5357256



**“2011, Año del Turismo en México”
SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA**

“Análisis de las Variantes Génicas de CYP2C9 y sus Efectos en la Farmacocinética del Diclofenaco en Sujetos Mexicanos”

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O.D.

SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA Y FARMACOLOGÍA CLÍNICA

CONSENTIMIENTO INFORMADO

INFORMACIÓN DEL ESTUDIO

México D.F. a de de 201

Título del estudio: **“Análisis de las Variantes Génicas de CYP2C9 y sus Efectos en la Farmacocinética del Diclofenaco en Sujetos Mexicanos”.**

Investigadores: Dr. Sergio Alberto Cuevas Covarrubias, Dr. Octavio Amancio Chassin.

Nombre del voluntario: _____ Credencial IFE: _____

Recuerde que puede preguntar al investigador cualquier duda que tenga la leer esta carta, las veces que sea necesario, con el fin de que se comprenda completamente su contenido.

He sido invitado(a) a participar en este estudio de investigación en Genética Médica y Farmacología Clínica que tiene como propósito investigar si las diferencias que existen en el gen *CYP2C9* intervienen en los procesos a los que el diclofenaco es sometido en su paso por el organismo. La justificación para realizar el estudio consiste determinar que tanto influyen los genes y sus variaciones en los cambios que sufre un fármaco dentro del organismo para poder disminuir los eventos adversos de los medicamentos y establecer dosis terapéuticas adecuadas a cada paciente, así como conocer el comportamiento del principio activo en el organismo de la población mexicana.

Población en Estudio: sujetos mexicanos que acuden al Hospital General de México y deseen participar en el estudio.

Información del Medicamento:

El medicamento es: Diclofenaco.

Forma Farmacéutica: Grageas.

Vía de Administración: Oral.

Sus indicaciones son: Analgésico, antiinflamatorio, antineurítico.

Su dosis terapéutica es de hasta 150 mg al día, dependiendo del padecimiento a tratar.

Sus reacciones adversas:

Sistema gastrointestinal: dolor abdominal, náusea, vómito, diarrea, indigestión, gases, falta de hambre. Rara vez: sangrado en estómago, evacuaciones de color negro, vomito con sangre, diarrea con sangre.

Ocasionalmente: inflamación del colon, inflamación de las encías y mucosa oral, lesiones esofágicas, inflamación de la lengua, estreñimiento.

Sistema nervioso central: mareo, aturdimiento, dolor de cabeza, fatiga. Rara vez: hormigueo en manos, alteración de la sensibilidad y de la vista, problemas de memoria, desorientación, insomnio, alteraciones del sentido del gusto.

Piel (casos aislados): ronchas, lesiones con descamación de la piel, enrojecimiento de la piel, caída de pelo, reacciones de la piel hacia la luz solar, manchas violáceas.

Riñón (rara vez): orina con presencia de sangre, presencia de proteínas en orina, insuficiencia renal aguda.

Hígado (rara vez): hepatitis (inflamación del hígado) con o sin ictericia (coloración amarillenta de la piel).



“2011, Año del Turismo en México” SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA

“Análisis de las Variantes Génicas de *CYP2C9* y sus Efectos en la Farmacocinética del Diclofenaco en Sujetos Mexicanos”

Sangre (casos aislados): trombocitopenia (disminución en el número de plaquetas), leucopenia (disminución en glóbulos blancos), anemia.

Por alergia al medicamento (rara vez): presión arterial baja, hinchazón.

Al participar como voluntario/a en este estudio me han informado y explicado que el procedimiento a seguir en el estudio de genotipificación y farmacocinética es:

- 1.- Se realizará en un periodo con una duración de 24 horas de internamiento, el cual será cubierto en su totalidad por los servicios de Genética Médica y Farmacología Clínica.
- 2.- Que debo presentarme en la Unidad de Farmacología Clínica del Hospital General de México a las 7 de la noche del (día/mes/año _____), acompañado/a de este documento, sin haber fumado, tomado café o bebidas alcohólicas durante las 72 horas previas.
- 3.- Se me ofrecerán y consumiré los alimentos en cantidad y tipo uniforme a lo largo del estudio.
- 4.- Que debo internarme esa misma noche en la Unidad de Farmacología Clínica del Hospital General de México.
- 5.- Que permaneceré internado/a en la Unidad de Farmacología Clínica durante aproximadamente veinticuatro horas.
- 6.- Que debo permanecer en ayuno después de cenar el día del internamiento hasta la hora que me den de desayunar el siguiente día.
- 7.- Que debo acudir a la Unidad de Farmacología Clínica siete días después de terminadas todas las pruebas, para ser valorado/a médicamente y se determine mi estado de salud. De no presentarme, libero de toda responsabilidad al personal del Servicio de Investigación de Genética Médica y Farmacología Clínica y al Hospital General de México.
- 8.- Se me entregará una copia de este documento al ser incluido/a en el estudio.
- 9.- Que tengo la libertad de retirar mi consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se creen prejuicios sobre mi persona. En tal caso, el Hospital General de México queda liberado de cualquier responsabilidad con mi persona.
- 10.- Que tengo la garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento del voluntario.
- 11.- Los resultados de las muestras de sangre que se me tomen durante el estudio se utilizarán en análisis especializados, cuyos resultados conocerán el médico responsable y el laboratorio patrocinador. Se garantiza que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con mi privacidad.
- 12.- Si mi salud resultara afectada durante el estudio, el Hospital General de México me atenderá hasta mi completa recuperación.
- 13.- Así mismo, reitero que el Coordinador del Estudio Clínico me ha informado y aclarado debidamente que el riesgo al que me expongo al participar en este estudio de investigación en farmacología clínica es mayor que el mínimo; lo que significa que puede haber dolor, inflamación, infección por la permanencia del catéter, así como también puede provocar el medicamento una o varias de las reacciones adversas que me explicaron previamente y se encuentran señaladas en la información del medicamento.
- 14.- Que no recibiré ningún beneficio médico directo por mi participación.
- 15.- En caso de tener alguna molestia durante el estudio, avisaré de inmediato al investigador responsable.

Para cualquier duda o aclaración relacionada con este estudio, ponerse en contacto con los investigadores responsables del proyecto: Dr. Sergio Alberto Cuevas Covarrubias al tel: 27892000 ext. 1279, 1279; Dr. Octavio Amancio Chassin al tel: 27892000 ext. 1385; Dra. Mónica D. Martín de saro tel 24 horas: 044 55 28992217 o con el Presidente de la Comisión de Ética: Dr. Carlos Ibarra Pérez tel: 27892000 ext. 1369.

Me han explicado amplia y detalladamente que durante el día del estudio (toma del medicamento) se realizarán los siguientes procedimientos:

- a) Que a partir de las 7 de la mañana del día del estudio se me colocará un catéter en el brazo que menos utilizo.
- b) Que tomaré una gragea una sola vez en cada fase del estudio con 250 mililitros de agua.
- c) Que posterior a la administración oral del medicamento se me tomarán por el catéter **once** muestras de sangre, de seis mililitros cada una.
- d) Que la cantidad total de sangre que me será extraída será aproximadamente de **80** mililitros (que equivalen a menos de medio vaso) y seré informado/a en caso de que se requiera extraer una cantidad de sangre un poco mayor.
- e) Que en caso de presentarse problemas para la obtención de las muestras a través del catéter se tomarán una o más muestras mediante punción directa en la vena con aguja hipodérmica para evitar que la muestra se pierda.
- f) Que una vez que se tomen todas las muestras en la fase del internamiento se me dará de alta temporalmente.



**“2011, Año del Turismo en México”
SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA**

“Análisis de las Variantes Génicas de CYP2C9 y sus Efectos en la Farmacocinética del Diclofenaco en Sujetos Mexicanos”

El Médico responsable me informó que:

1. Todos los procedimientos y acuerdos aquí descritos se apegan a los principios éticos enmarcados en la Declaración de Helsinki así como a las disposiciones del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de la Investigación Clínica.
2. Que este estudio es una investigación científica con riesgo mayor que el mínimo para incrementar el conocimiento en el área de la Genética Médica y Farmacología, el cual tiene como finalidad conocer si las diferencias en el gen CYP2C9 afectan los cambios que sufre el diclofenaco mientras está en el organismo.
3. Que el estudio ha sido autorizado por las Comisiones de Ética e Investigación del Hospital General de México.
4. Este estudio tiene por objetivo: demostrar que los polimorfismos en el gen CYP2C9 intervienen con los parámetros de absorción, concentración máxima, área bajo la curva y eliminación del diclofenaco.

PAGO POR PARTICIPACIÓN

Recibiré hasta el término de la(s) sesión(es) experimental(es) contemplada(s) en este proyecto, la cantidad de \$1, 500.00 (mil quinientos pesos 00/100 M.N.) como una compensación por mi participación.

Por todo lo anterior he sido debidamente informado/a sobre mi participación en este estudio y todas mis dudas han sido aclaradas a satisfacción por el/los responsable/s del mismo. Por tanto, de manera libre y voluntaria, doy mi consentimiento para participar en este Estudio de Investigación en Genética y Farmacología Clínica, el cual deberá apegarse fielmente a este Consentimiento Informado y al protocolo de Investigación aprobado por las Comisiones de Ética e Investigación con el No. de Registro _____.

Voluntario:

Nombre completo	Clave de elector:	Firma

Testigo uno:

Nombre: _____

Dirección: _____

Relación: _____

Testigo Dos:

Nombre: _____

Dirección: _____

Relación: _____

Médico Responsable

Dr. Octavio Amancio Chassin
Cédula profesional 832892