



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
SUBDIVISIÓN DE ESPECIALIZACIONES MÉDICAS  
SECRETARÍA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**VARIANTES ALÉLICAS DE CYP3A4 Y SU RELACIÓN CON EL  
METABOLISMO DE MIDAZOLAM EN UNA POBLACIÓN  
PEDIÁTRICA MEXICANA: UN POSIBLE ACERCAMIENTO A  
ESQUEMAS TERAPÉUTICOS PERSONALIZADOS.  
RESULTADOS PRELIMINARES**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:  
MEDICINA CRÍTICA PEDIÁTRICA  
PRESENTA:**

**DRA. GABRIELA MONTESINOS GÓMEZ**

**M. en C. SANDRA LUZ LIZÁRRAGA LÓPEZ**  
TUTORA DE TESIS

**DRA. PATRICIA ZÁRATE CASTAÑÓN**  
CO-TUTORA DE TESIS

**M. en C. CARMEN FLORES PÉREZ**  
CO-TUTORA DE TESIS

**M. en C. LUISA DÍAZ GARCÍA.**  
TUTORA DE METODOLOGÍA



CIUDAD DE MÉXICO, 2018



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.

**VARIANTES ALÉLICAS DE CYP3A4 Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO DE  
MIDAZOLAM EN UNA POBLACIÓN PEDIÁTRICA MEXICANA: UN POSIBLE  
ACERCAMIENTO A ESQUEMAS TERAPÉUTICOS PERSONALIZADOS.  
RESULTADOS PRELIMINARES**



DR. JOSE NICOLAS REYNES MANZUR  
DIRECTOR DE ENSEÑANZA



DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



DRA. MARTHA PATRICIA MÁRQUEZ AGUIRRE  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE LA ESPECIALIDAD EN MEDICINA CRÍTICA  
PEDIÁTRICA



M. EN C. SANDRA LUZ LIZARRAGA LÓPEZ  
TUTORA DE TESIS



DRA. PATRICIA ZÁRATE CASTAÑÓN  
CO-TUTORA DE TESIS



M. EN C. CARMEN FLORES PEREZ  
CO-TUTORA DE TESIS



M. EN C. LUISA DIAZ GARCÍA  
TUTORA DE METODOLOGÍA

## AGRADECIMIENTOS:

A Dios porque siempre ha estado en cada uno de mis actos y mis pensamientos, porque soy un instrumento que guía cada día y me ha enviado a los mejores ángeles en la tierra.

A mis padres, mis pilares principales, esos dos seres increíbles llenos de amor, que con su luz me han iluminado, les agradezco la vida, el amor, el tiempo, las enseñanzas y los sacrificios, sin ellos nada sería posible; son mi ejemplo, mi soporte y mi impulso para seguir adelante.

A mi hermana, Rosa el regalo más maravilloso que mis padres pudieron darme, mi mejor amiga, mi confidente inseparable, quien siempre ha estado cerca de mi para motivarme, apoyarme y consentirme, hizo cada día de mi residencia mejor con sus cuidados y amor.

A mi sobrino, Octavio, que con su alegría, inocencia y comprensión a pesar de su corta edad me impulsa a superarme día a día para trabajar y dar lo mejor de mi por cada paciente.

A mis maestros, les agradezco cada minuto que invirtieron en mi educación, el camino no es sencillo, pero ustedes me prepararon para sortear cualquier adversidad, gracias por mostrarme el bello arte de la terapia intensiva que se construye con trabajo, responsabilidad, coraje, perseverancia, honestidad y ética.

# ÍNDICE

Contenido	Página
Resumen estructurado	5
Introducción	6
Antecedentes	6
Planteamiento del problema	10
Justificación	11
Objetivos	11
Clasificación de la investigación	11
Material y métodos	11
Criterios de inclusión	12
Criterios de exclusión	12
Criterios de eliminación	12
Ubicación del estudio	13
Descripción del método	14
Descripción de las variable	16
Consideraciones éticas	17
Resultados	18
Discusión	22
Conclusiones	23
Referencias bibliográficas	24
Anexos	28

## RESUMEN

**Introducción:** La eficacia y seguridad de un fármaco está claramente influenciada por la variabilidad interindividual de una población, determinando diferencias en la respuesta clínica, éxito o falla terapéutica, o en la aparición de efectos adversos. Los polimorfismos de un sólo nucleótido en los genes (SNP) son una fuente de heterogeneidad, por asociarse con cambios en la expresión, estructura y/o función de las proteínas; sobre todo de enzimas metabolizadoras de fármacos, como los citocromo P450 (CYP). El midazolam es metabolizado en más del 95% por CYP3A4. Se considera que el 15% de la población mexicana podría portar al menos una variante de CYP3A4, de las cuales se han reportado a CYP3A4\*1B en frecuencias del 6 al 9%, CYP3A4\*10 en el 5% y CYP3A4\*2 en el 0.005%. En un estudio realizado con voluntarios sanos se observó que al utilizar dosis de 15 mg de midazolam administrado i.v., se obtuvieron valores promedio de Área Bajo la Curva (ABC) 10 veces más altos a los observados en caucásicos provenientes de E.U.A, Países Bajos, Finlandia y Suiza; datos que coinciden además con menores tasas de depuración (Cl). Estudios con omeprazol y nifedipino han permitido identificar a individuos que se comportan como metabolizadores ultraextensivos, extensivos y lentos

**Objetivo:** Clasificar de acuerdo con el metabolismo de midazolam a individuos rápidos, intermedios y lentos; según los resultados de: Tiempo de vida media del medicamento ( $t_{1/2}$ ), Volumen de distribución (Vd) y Depuración (Cl). **Material y métodos:** Etapa del estudio farmacológico: Estudio transversal prospectivo, observacional y descriptivo: De la población estudiada, se obtuvieron los parámetros farmacocinéticos de midazolam: Tiempo de vida media de eliminación ( $t_{1/2}$ ), volumen de distribución (Vd), Depuración (Cl) y los individuos se clasificaron en rápidos, intermedios o lentos. Para el análisis, se consideraron factores demográficos, clínicos y de laboratorio.

**Resultados:** Se muestran resultados preliminares de tipo descriptivo. Durante el periodo de Julio de 2014 a febrero de 2017, se captaron 29 pacientes que cumplieron con los criterios de ingreso, se eliminaron 7 pacientes debido a que el muestreo fue incompleto, quedando en total 22 pacientes. La edad promedio de los pacientes fue de 8.4, el 45.5% de los pacientes fueron femeninos y el 54.5% masculinos. Los principales aparatos y sistemas involucrados, fueron el respiratorio seguido del gastrointestinal, sistema nervioso central, afecciones óseas y finalmente el cardiovascular. La dosis de midazolam que se infundió a los pacientes al ingreso al protocolo fue en promedio 249  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  (100-600  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ). De acuerdo a las variables farmacocinéticas la vida media de eliminación promedio fue de 32.9 hrs (1.97 hrs - 173.25 hrs); el volumen de distribución promedio se encontró en 7.17 L/kg (0.0000002 L/kg - 28.72 L/kg), y la tasa de depuración promedio de 0.56 L/kg/hr (0.000000017 L/kg/hr-2.35 L/kg/hr), lo que refleja un metabolismo y eliminación del midazolam mas lento, de acuerdo a lo que hasta ahora se tiene reportado.

**Conclusión:** Para una sedación adecuada en cada uno de los pacientes se debe de individualizar cada caso hasta conseguir la sedación deseada. El estudio continúa en proceso hasta completar el número de pacientes y entonces se realizará el análisis final así como las interacciones medicamentosas que pueden influir en el metabolismo del mismo.

**PALABRAS CLAVES:** MIDAZOLAM, EFICACIA TERAPEUTICA, NIÑOS CRITICAMENTE ENFERMOS

## INTRODUCCIÓN

La eficacia y seguridad de un fármaco está claramente influenciada por la variabilidad interindividual de una población, determinando diferencias en la respuesta clínica, éxito o falla terapéutica, o en la aparición de efectos adversos. Los polimorfismos de un sólo nucleótido en los genes (SNP) son una fuente de heterogeneidad, por asociarse con cambios en la expresión, estructura y/o función de las proteínas; sobre todo de enzimas metabolizadoras de fármacos, como los citocromo P450 (CYP)

En esta tesis se trata de identificar los factores que intervienen en el metabolismo del midazolam como una estrategia innovadora para establecer esquemas terapéuticos personalizados. Comprende varias fases, en esta ocasión solo se va a clasificar de acuerdo con el metabolismo de midazolam a individuos rápidos, intermedios y lentos; según los resultados de: Tiempo de vida media del medicamento ( $t_{1/2}$ ), Volumen de distribución (Vd) y Depuración (Cl).

## ANTECEDENTES

### Enzimas del citocromo P450

Los citocromos P450 (CYP) son una superfamilia de genes que codifican para una gran diversidad de enzimas hemotioladas presentes en todos los organismos de la clasificación biológica (Enzyme Commission number [EC number]: 1.14.14.1), que metabolizan a distintas sustancias químicas; desde compuestos endógenos con importancia biológica y fisiológica, así como un vasto grupo de compuestos químicos exógenos, conocidos como xenobióticos. Su papel en procesos de desintoxicación es relevante, porque además de llevar a cabo reacciones de oxidación que incrementan la hidrofiliidad de los compuestos para facilitar su excreción (desintoxicación); también participan en la activación e inactivación metabólica de distintos fármacos, incidiendo de forma directa en su efectividad y por lo tanto en su índice terapéutico.

Los CYP catalizan poco más de 15 reacciones de oxidación diferentes (Lewis, 2001) que en su mayor parte dependen de oxígeno ( $O_2$ ), así como de la transferencia de electrones ( $e^-$ ) a partir del NADPH y de la acción de la enzima NADPH-CYP reductasa (POR; EC number: 1.6.2.4); cuya reacción general se presenta en el siguiente esquema:



En eucariontes los CYP se localizan principalmente en la membrana del retículo endoplásmico liso y en la membrana interna de la mitocondria. El genoma humano cuenta con 57 genes distintos, cuyos niveles de RNA mensajero (RNAm), proteína y actividad enzimática, así como los mecanismos de regulación varían con respecto al tipo de células y tejidos; siendo el hígado, pulmón, riñón y tracto digestivo los órganos de mayor diversidad y abundancia (expresión tejido-específica). En hígado por ejemplo, las enzimas más abundantes son CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, CYP1A2, CYP2E1, CYP2D6, CYP2A6, CYP2C19, CYP2C8 y CYP2B6, las cuales en conjunto son responsables del metabolismo de poco más del 90% de los fármacos que se conocen.

### CYP3A4 y su importancia farmacológica

De las familias de CYP que agrupan a las enzimas humanas, destaca la subfamilia CYP3A, que incluye a cuatro isoformas: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A43; consideradas

como de las más versátiles en procesos de biotransformación y eliminación de varios fármacos (Lamba et al., 2002). De éstas, CYP3A4 es la más abundante en el hígado e intestino delgado, llegando a ocupar entre un 30 a 60% del contenido total de los CYP hepáticos; aunque también se le ha detectado en varios otros tejidos como el sistema nervioso central y en tumores (Cuadro 1) (Assis et al., 2013). CYP3A4 metaboliza poco más del 40% de los fármacos de uso en distintos procedimientos terapéuticos (Okubo et al., 2013) como la carbamazepina (antiepiléptico), claritromicina (antibiótico), tamoxifeno (antiestrogénico en cáncer de mama), omeprazol, lansoprazol, rabeprazol y pantoprazol (inhibidores de bombas de protones), midazolam (ansiolítico), ciclofosfamida, ifosfamida, vincristina, paclitaxel, (antineoplásicos), nifedepina (bloqueador de canales de calcio), ciclosporina (inmunosupresor); solo por mencionar algunos (Chávez-Teyes et al., 1999; Palma-Aguirre et al., 2007; Yun et al., 2013; Dalbøge et al., 2013; Sensorn et al., 2013; Ward and Kearns, 2013; Elens et al., 2013; Assis et al., 2013).

CYP	Loci	Expresión Tejidos Normales	Expresión Tumores	Función endógena (Metabolismo)	Metabolismo de fármacos antineoplásicos
CYP3A4	7q22.1	Hígado, intestino delgado, pulmón, estomago, colon, adrenal, cerebro	Mama, hígado, pulmón, estomago	Testosterona, Colesterol, ácido araquidónico 17-beta-estradiol	Gefitinib, erlotinib, ciclofosfamida, ifosfamida, irinotecan, vincristina

Cuadro 1. Se considera que poco más del 40% de los fármacos de importancia en la quimioterapia anticáncer, son metabolizados por CYP3A4, no sólo en el hígado, sino también en otros tejidos en los que se expresa, incluyendo a diversos tipos de tumores. Por lo que su expresión y la presencia de SNP pueden afectar la eficacia terapéutica de estos fármacos.

### CYP3A4 y polimorfismos de un solo nucleótido

Un aspecto de notar es que CYP3A4 presenta una enorme variabilidad interindividual y étnica en su actividad enzimática y en sus niveles de RNAm o proteína, lo que puede provocar alteraciones farmacocinéticas relacionadas con sobredosis y toxicidad de algunos de los fármacos que metaboliza, y/o la baja efectividad y falla terapéutica de otros (Reyes-Hernández et al., 2004). La explicación al porqué de estas variaciones no es sencilla, en parte se debe a que la enzima presenta un amplio rango de afinidades por compuestos con tamaños y estructuras químicas totalmente distintas (ver en sección anterior tipos de fármacos), y a que puede interaccionar en su sitio activo a la vez con más de una molécula de un mismo compuesto, o bien de diferentes; generando interacciones fármaco-fármaco (Sevrioukova and Poulos, 2013; Roberts et al., 2013). A su vez otros factores también pueden intervenir, y actuar en conjunto o por separado para afectar la función de la enzima; entre ellos la exposición a contaminantes ambientales, componentes de la dieta, moléculas reguladoras del desarrollo y el crecimiento y procesos inflamatorios o infecciones (Hoyo-Vadillo et al., 1989; Palma-Aguirre et al., 1997; Chávez-Teyes et al., 1999; Reyes-Hernández et al., 2004; Vet et al., 2012; Assis et al., 2013; Morcos et al., 2013). En el contexto genético, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) también ocupan un lugar relevante por los impactos que pueden tener en la expresión, estructura y/o actividad de CYP3A4; a la fecha se han detectado poco más de 100 SNP en el gen CYP3A4 (ID: 1576) según la base de datos dbSNP del Centro Nacional para la



Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI por sus siglas en inglés) y otras (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>, <http://www.imm.ki.se/CYPalleles>). Varios de los cuales se encuentran en la región promotora, intrones, exones, y en la región 3'UTR (untranslated region, en inglés), pero pocos son los estudios disponibles sobre el impacto que tienen en el metabolismo de ciertos fármacos (Sata et al., 2000; Hamzeiy et al., 2002; Hamzeiy et al., 2003; Lamba et al., 2002; Okubo et al., 2013).

Al respecto, se ha determinado que una de las variantes más comunes en CYP3A4 (Afro-americanos 35-97%, caucásicos 2-9%, 6% mexicanos, >1% asiáticos, ) se ubica en su región promotora y es designada como CYP3A4\*1B (rs2740574; -392 G>A); la cual se ha asociado con incrementos en la actividad de la enzima ya que se encuentra afectada la región de unión a una proteína represora de la expresión, conocida como elemento putativo específico para nifedipino (Reyes-Hernández et al., 2004; Assis et al., 2013; Dalbøge et al., 2013; Drögemöller et al., 2013). Este SNP tiene afecto en la expresión de CYP3A4, como muestra un estudio realizado en pacientes con cáncer cervical, en donde quienes portaban el alelo G (mutante) tuvieron una tasa de sobrevivencia menor, comparada con las portadoras del alelo silvestre; lo que se piensa pudo deberse a diferencias en la respuesta al tratamiento, derivado del metabolismo del fármaco utilizado (Assis et al., 2013). Sin embargo, es poca la información con la que se cuenta, sobre los posibles efectos que tendría el portar algunos SNP de CYP3A4 en el metabolismo y efectividad de algunos fármacos antineoplásicos en distintos tipos de neoplasias.

Se tiene conocimiento que variantes como CYP3A4\*22 (rs35599367; C>T), ubicada en el intrón 6, se ha asociado con baja respuesta al efecto del fármacos como la simvastatina, y disminuciones en el metabolismo de calcineurina, un fármaco ampliamente utilizado en pacientes sometidos a trasplante de riñón. La frecuencia de CYP3A4\*22 es de 6.1% en poblaciones caucásicas, mientras que en otras poblaciones como la japonesa, la frecuencia del polimorfismo se reporta menor al 1% (Assis et al., 2013). En un estudio reciente se reporta que individuos caucásicos con genotipo CYP3A4\*1/\*22 presentan disminuciones significativas en los niveles de proteína de CYP3A4 (28%) y también una menor actividad en el metabolismo de pruebas de referencia, tales como N-desmetilación de dextrometorfano, 1-hidroxilación de midazolam y 6-hidroxitestosterona (Okubo et al., 2013).

La frecuencia de los SNP está claramente influenciada por el grupo étnico, por ejemplo, el SNP CYP3A4\*18B (rs28371759; T>C) se ha reportado en el 28% de poblaciones japonesas; mientras que en chinos su distribución es del 91% (Fukushima et al., 2004; Chiu et al., 2013). Otros SNP presentan variaciones importantes aún en las mismas poblaciones, por ejemplo CYP3A4\*3 (rs4986910; T>C), CYP3A4\*2 (rs55785340; T>C), CYP3A4\*17 (rs4987161; T>C) y CYP3A4\*18A se presentan en frecuencias de 0.47-4%, 2.7%, 2.1% y 0%, respectivamente en poblaciones caucásicas (Lamba et al., 2002; Reyes-Hernández et al., 2004; Dalbøge et al., 2013).

En el caso de poblaciones mexicanas, sólo algunos SNP de CYP3A4 se han reportado, por ejemplo CYP3A4\*1B se encuentra en frecuencias de 6 a 9%, CYP3A4\*10 en el 5% y CYP3A4\*2 en el 0.005% (Reyes-Hernández et al., 2004; Lamba et al., 2002, Reyes-Hernández et al., 2008); mientras que otras como CYP3A4\*4, \*5 y \*18 no fueron detectadas (Reyes-Hernández et al., 2008). Se considera que al menos el 15% de la población mexicana podría portar al menos alguna variantes en el gen de CYP3A4 (Lamba et al., 2002), aunque se mantiene controversial la asociación de algunos SNP con cambios en la expresión o actividad de CYP3A4 y más aún de los impactos que podrían tener en el

metabolismo de fármacos (Assis et al., 2013; Chiu et al., 2013; Dalbøge et al., 2013).

### **CYP3A4 y midazolam como sustrato modelo para estudios in vivo**

El Midazolam es una benzodiazepina (4H-Imidazol (1,5-a) (1,4) benzodiazepina, 8-cloro-6-(2-fluorofenil)-1-metil; CAS number: 59467-70-8) que ejerce su efecto clínico mediante la unión a un receptor complejo que facilita la acción de inhibición del neurotransmisor ácido gama-amino butírico (GABA). Es ampliamente utilizado por sus propiedades de sedante, ansiolítico, anticonvulsivante, relajante muscular y amnésico, tanto en adultos como en niños (Blumer, 1998; de Wildt et al., 2003). Farmacológicamente, y debido a su rápida transformación metabólica, su acción es de corta duración (Miller, 1994).

La actividad del midazolam se debe principalmente al fármaco original. La eliminación del fármaco original tiene lugar a través del metabolismo hepático de midazolam a metabolitos hidroxilados que se conjugan y se excretan en la orina. Seis estudios farmacocinéticos de dosis única que involucran adultos sanos producen parámetros farmacocinéticos para midazolam en los siguientes intervalos: volumen de distribución (Vd), 1,0 a 3,1 L / kg; semivida de eliminación, 1,8 a 6,4 horas (media aproximadamente 3 horas); depuración total (Cl), 0,25 a 0,54 L / kg / h.

En los pacientes pediátricos de 1 año y más, las propiedades farmacocinéticas tras una dosis única de midazolam informada en 10 estudios separados de midazolam son similares a los de los adultos. El aclaramiento normalizado con respecto al peso es similar o superior (0,19 a 0,80 L / kg / h) que en los adultos y la semivida de eliminación terminal (0,78 a 3,3 horas) es similar o menor que en los adultos. Las propiedades farmacocinéticas durante y después de la infusión intravenosa continua en pacientes pediátricos en el quirófano como complemento de la anestesia general y en el entorno de cuidados intensivos son similares a las de los adultos. ([www.drugs.com/pro/midazolam-injection.html](http://www.drugs.com/pro/midazolam-injection.html))

Este fármaco es metabolizado principalmente en el hígado por acción de la enzima CYP3A4, siendo su principal metabolito el 1-hidroximidazolam (90%) y en menor proporción el 4-hidroximidazolam (1-3%) (Heizmann et al., 1983) (Figura 1). La biodisponibilidad y eficacia terapéutica del midazolam depende en gran parte de su metabolismo por CYP3A4, por lo que se le considera como un sustrato altamente específico y directamente relacionado con la función de la enzima (Eap et al., 2004), por lo que también es un indicador in vivo de la actividad, niveles de proteína y la presencia de SNP en esta enzima (Eiselt et al., 2001).

Adicionalmente, está ampliamente documentado que la expresión y niveles de actividad de CYP3A4 y otros CYP, podrían estar influenciadas por procesos inflamatorios, enfermedades infecciosas, enfermedades hepáticas como cirrosis, hepatitis o procedimientos como hepactetomías parciales; así como por alcoholismo y cambios hormonales (Montero et al., 2003; Morgan, 2004; Aitken et al., 2006; Dávila-Borja et al., 2007).

En estudios realizados tanto in vivo como in vitro, se ha encontrado que sustancias como TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, INF $\gamma$ , INF $\beta$  y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, comúnmente producidos durante una respuesta inmune e inflamatoria, modifican la expresión y metabolismo de los compuestos, así como la actividad enzimática de distintas isoformas de CYP (Dinarello, 1989; Morgan, 2004). En un estudio reciente, realizado con 29 pacientes

diagnosticados con cirrosis hepática, se describen disminuciones significativas en los niveles de RNA mensajero y proteína de CYP3A4 al comparar con personas sanas; lo que está estrechamente relacionado con la inhibición del metabolismo de midazolam, como principal indicador de actividad de la enzima (Vuppalanchi et al., 2013). Este y otros estudios demuestran, que cualquier factor que modifique la expresión y actividad de CYP3A4, ya sea por regular su transcripción, síntesis de proteína o por la presencia de SNP, que tenga efecto en la actividad enzimática, también afecta a los parámetros cinéticos del metabolismo de midazolam, como sustrato modelo de CYP3A4 (Eiselt et al., 2001; Eap et al., 2004; Vuppalanchi et al., 2013).

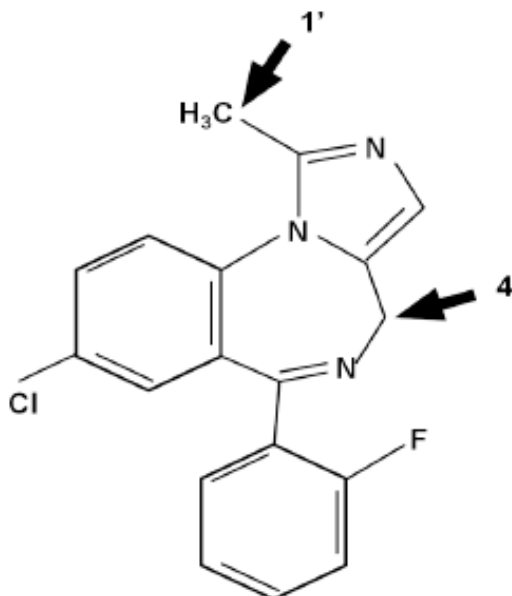


Figura 1. Estructura química del midazolam. Las posiciones 1' y 4 son los sitios en los que actúa CYP3A4 para producir los metabolitos 1'-hidroximidazolam (~ 90%) y 4-hidroximidazolam (1-3%) (Heizmann et al., 1983; Seo et al., 2010).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios realizados en poblaciones mexicanas sobre biodisponibilidad y parámetros farmacocinéticos de algunos fármacos que son metabolizados por CYP3A4, muestran una enorme variabilidad en comparación con otras poblaciones (Palma-Aguirre et al., 1997; Chávez-Teyes et al., 1999; Lamba et al., 2002; González et al., 2003; Reyes-Hernández et al., 2004; Reyes-Hernández et al., 2007). En un estudio realizado con voluntarios sanos se observó que al utilizar dosis de 15 mg de midazolam administrado i.v., se obtuvieron valores promedio de Área Bajo la Curva (ABC, que es el parámetro principal que se utiliza para determinar la biodisponibilidad de un fármaco), 10 veces más altos a los observados en caucásicos provenientes de E.U.A, Países Bajos, Finlandia y Suiza; datos que coinciden además con menores tasas de depuración (Cl) (Chávez-Teyez et al., 1999). También se han observado resultados similares en fármacos como el nifedipino y ciclosporina (Palma-Aguirre et al., 1997; Lamba et al., 2002). Estudios con omeprazol y nifedipino han permitido identificar a individuos que se comportan como metabolizadores ultraextensivos, extensivos y lentos (Hoyo-Vadillo et al., 1989; González et al., 2003; Hoyo-Vadillo et al., 2005).

## JUSTIFICACIÓN

Dado que la biodisponibilidad de distintos fármacos puede estar determinada en gran parte por componentes genéticos como los SNP, se considera relevante profundizar en el conocimiento sobre la frecuencia y distribución de variantes de CYP3A4; por lo que en el presente proyecto se pretende incorporar de forma exploratoria la determinación de la frecuencias alélicas y genotípicas de distintos SNP en el gen de CYP3A4 y su relación con parámetros farmacocinéticos de midazolam en pacientes pediátricos atendidos en el INP. Lo que consideramos es una estrategia innovadora, ya que los resultados que se obtengan podrían sentar las bases para el diseño de esquemas terapéuticos personalizados, que se traduzcan en costo-beneficio y disminución de eventos adversos para distintos fármacos que son metabolizados por CYP3A4.

### Objetivo general

Determinar el efecto que tienen algunos SNP del gen CYP3A4 en el metabolismo de midazolam como una estrategia innovadora que pudiera sentar las bases para el diseño de esquemas terapéuticos personalizados.

### Objetivo particular en esta fase de estudio.

- Clasificar de acuerdo con el metabolismo de midazolam a individuos rápidos, intermedios y lentos; según los resultados de: Tiempo de vida media del medicamento ( $t_{1/2}$ ), Volumen de distribución (Vd) y Depuración (Cl).

*(el proyecto consta de cuatro objetivos específicos, para fines de esta tesis se reportaran los resultados solo de objetivo particular mencionado)*

## CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Estudio transversal, observacional, descriptivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Población objetivo:** pacientes pediátricos mexicanos que ingresaron al departamento de terapia intensiva en un hospital de tercer nivel de atención en México

**Población elegible:** pacientes pediátricos mexicanos que ingresaron al departamento de terapia intensiva del Instituto Nacional de Pediatría en el periodo comprendido de julio de 2014 a febrero de 2017

### Cálculo del tamaño de la muestra

El cálculo de tamaño de muestra se realizó con los parámetros de prevalencia de los polimorfismos de CYP3A4 reportados en una población mestiza en México (Reyes-

Hernández et al., 2008).

Se utilizó el método de comparación de dos proporciones, basado en lo reportado por Fleiss et al. (2003), comparando las prevalencias de CYP3A4\*1B y de CYP3A4\*2.

Parámetro	Prevalencia CYP3A4*1B	Prevalencia CYP3A4*2	Alfa	Poder	n
Reyes-Hernández et al., 2008	0.088	0.005	0.05	0.90	157

Por la naturaleza del estudio, se realizaron cortes en el tiempo durante el reclutamiento de los pacientes, para evaluar si el tamaño de muestra calculado es suficiente para obtener una representatividad poblacional adecuada de las frecuencias alélicas, genotípicas y en su caso haplotípicas de interés. El presente estudio se planea realizarse en un periodo de tiempo de 4 años.

### **Criterios de inclusión**

- Pacientes de 1 a 18 años de cualquier sexo.
- Pacientes en los que el familiar o tutor responsable acepte la participación en el estudio a través de la firma del consentimiento bajo información.
- Pacientes que sean tratados en el Instituto Nacional de Pediatría, de los Servicios de Terapia Intensiva y Oncología, que requieran administración de midazolam con fines de sedación y que mantengan una infusión continua del fármaco durante su estancia hospitalaria.

### **Criterios de inclusión para toma de muestra de mucosa oral**

- Se incluirán pacientes con:
- Antecedente de transfusión de hemoderivados durante los últimos 6 meses.
- Antecedente de trasplante de médula ósea.
- Diagnóstico de leucemia y/o choque séptico.
- Leucopenia y linfopenia.
- Recaída hematológica.
- Neutropenia febril.

### **Criterios de exclusión**

- Pacientes en los que se sospeche de alguna alteración hepática o renal. Se excluirán aquellos pacientes que presenten valores de AST y ALT superior al doble del valor aceptado como normal; bilirrubina, creatinina y urea aumentados.
- Pacientes que hayan sido sometidos a hepatectomía parcial o nefrectomía parcial o total.
- Pacientes con valores de albúmina menores de 2.5 g/dL.
- Pacientes que presenten falla orgánica múltiple.
- Pacientes que tengan el antecedente de hipersensibilidad a benzodiazepinas.
- Criterios de eliminación

- Pacientes cuyo muestreo sea incompleto.
- Pacientes que presenten efectos adversos a midazolam serios durante el tratamiento.
- Pacientes con disfunción renal o hepática aguda desarrollada durante el estudio.
- Los pacientes eliminados serán considerados hasta el tiempo en que permanecieron en el estudio.

**Ubicación del estudio:** Departamento de Terapia Intensiva del Instituto Nacional de Pediatría

## **Descripción del método:**

El proyecto consta de dos tipos de estudio el farmacológico y el genético. Lo que compete a este trabajo es el estudio farmacológico, el cual se desarrolló de la siguiente manera:

### **Estudio farmacológico**

Una vez iniciado el tratamiento, se tomará una muestra de 3 mL de sangre en un tubo heparinizado al ingresar al Servicio de Terapia Intensiva (UTI). Para conocer los parámetros farmacocinéticos de midazolam, se tomarán dos muestras adicionales de 3 mL en tubos heparinizados, a las 3h y 24h de que se haya suspendido el tratamiento. Posteriormente, las muestras se conservarán a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis mediante una técnica por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

**Estudio genético (corresponde a otra etapa del proyecto, y no se incluye en esta tesis).**

### **Determinación de los niveles plasmáticos de midazolam**

El análisis de las muestras se llevará a cabo por un método desarrollado y validado en nuestro Laboratorio mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) de acuerdo a lo que establece la Norma Oficial Mexicana NOM 177-SSA1-1998. El método está basado en Flores-Pérez et al. (2017).

A un tubo se le adicionarán 200  $\mu\text{L}$  de plasma y 100  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sodio 1N, dicha mezcla se agitará en un vórtex durante 30 seg y se agregan 3 mL de éter, se agitará nuevamente en vórtex por 1 min y se centrifugará a 800 g durante 10 min, separando la fase orgánica y se evapora a sequedad en baño de agua a  $40^{\circ}\text{C}$ , se resuspende la muestra en 190  $\mu\text{L}$  de fase móvil y se agregan 10  $\mu\text{L}$  de propranolol (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) como estándar externo, se agita con vórtex durante 40 seg y se inyectan 100  $\mu\text{L}$  al sistema cromatográfico.

El sistema cromatográfico consta de una columna Pursuit C18 marca Varian (150 x 3.9 mm de diámetro), fase móvil de buffer de fosfatos 35 mM pH 4.4 y acetonitrilo (70:30 v/v) a un flujo de 1mL/min y detección por UV a una longitud de onda de 220 nm.

Se obtendrán los parámetros de Tiempo de vida media del medicamento ( $t_{1/2}$ ), Volumen de distribución (Vd) y Depuración (Cl) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$t_{1/2} = 0.693/ke \text{ (en unidades de horas (h))}$$

$$ke = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1} \text{ donde los valores de } Y_2 \text{ y } Y_1 \text{ equivalen a las concentraciones determinadas a los tiempos 3 y 12 h, respectivamente (en unidades de h}^{-1}\text{)}$$

$$Vd = \text{dosis} / C_{p0}, \text{ donde, } C_{p0} \text{ es la concentración del fármaco hipotéticamente a tiempo cero (en unidades de L/kg)}$$

$$Cl = Vd \times ke \text{ (en unidades de L/h)}$$

### **Registro de datos clínicos y de laboratorio**

Los datos clínicos y de laboratorio se tomarán del expediente clínico y son estudios de rutina en los pacientes pediátricos que ingresan a los Servicios de Terapia Intensiva, se registrarán en los formatos (**véase Anexo 2, hojas 1 y 2**), no representarán toma de muestras adicionales a las consideradas en el presente estudio.



## DESCRIPCION DE LAS VARIABLES DEL ESTUDIO: Cuadro 3

**Cuadro 3. Variables del estudio**

<b>VARIABLE</b>	<b>DEFINICIÓN OPERACIONAL</b>	<b>TIPO Y ESCALA</b>
<b>Edad</b>	Basado en la fecha de nacimiento del paciente	Cuantitativa, continua, se mide en años
<b>Sexo</b>	Característica biológica del paciente	Cualitativa, nominal, dicotómica: femenino o masculino
<b>Peso</b>	Volumen del cuerpo expresado en kilogramos	Cuantitativa, continua, se mide en kilogramos
<b>Talla</b>	Es la medición desde el talón hasta la parte más elevada de la cabeza	Cuantitativa, continua, se mide en metros
<b>Dosis</b>	Cantidad de medicamento administrado al paciente por infusión continua comenzando en 0.2 mg de midazolam/kilogramo/hora	Cuantitativa, nominal, se mide en mg/kg/h
<b>Concentración plasmática del midazolam</b>	Cantidad de fármaco en la circulación sistémica después de su administración con vía I.V. (infusión continua)	Cuantitativa, continua, se mide en ng de midazolam/ml
<b>Tiempo de muestreo</b>	Toma de muestras sanguíneas a diferentes tiempos para un estudio farmacocinético	Cuantitativa, continua, se mide en horas
<b>Tiempo de vida media de eliminación (<math>t_{1/2}</math>)</b>	Se refiere al tiempo en que se ha eliminado la mitad de la concentración del fármaco en la sangre	Cuantitativa, continua, se mide en horas
<b>Volumen de distribución (Vd)</b>	Es la relación que hay entre la dosis y la concentración plasmática con respecto al peso del paciente	Cuantitativa, continua, se expresa en l/kg
<b>Depuración (Cl)</b>	Es la tasa de eliminación del fármaco en relación con su concentración en plasma	Cuantitativa, continua, se expresa en l/kg/h
<b>Área Bajo la Curva (ABC)</b>	Área que se obtiene al graficar la concentración plasmática del fármaco con respecto al tiempo, nos da una idea de la biodisponibilidad del fármaco en la sangre	Cuantitativa, continua, se expresa en mg/ml/h

## HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS (anexo 2)

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO E INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS**

Se obtendrán los parámetros de Tiempo de vida media del medicamento ( $t_{1/2}$ ), Volumen de distribución (Vd) y Depuración (Cl) de acuerdo a las siguientes ecuaciones, los cuales se reportaran con medidas de resumen y de dispersión dependiendo de su distribución.

Las variables de Tiempo de vida media del medicamento ( $t_{1/2}$ ), Volumen de distribución (Vd) y Depuración (Cl) se transformaron a variables categóricas ocupando puntos de corte para identificar que individuos se encontraban dentro del rango normal, quienes por debajo y quienes por arriba de dicho rango.

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Toda la información referente al desarrollo del protocolo, se otorgará verbalmente y en forma escrita mediante la carta de consentimiento bajo información (Ver anexo 3 ), se aclararán todas las dudas relacionadas con el proceso del estudio y se ampliarán los datos referentes a la toma de muestra del estudio genético, así como su conservación y manejo.

El paciente que acepte participar en el protocolo estará bajo supervisión del personal médico y paramédico de terapia intensiva. Cabe mencionar que los padres de los pacientes tienen todo el derecho de que sus hijos puedan abandonar el estudio cuando así lo consideren, sin que esto tenga alguna repercusión en la atención que recibe en el Instituto.

ANEXO 1.

## RESULTADOS

Se exponen de acuerdo a las etapas que tiene el proyecto:

### Etapa 1. De laboratorio:

Se realizó en cada uno de los pacientes (hasta el momento incluido en el proyecto) las siguientes determinaciones con respecto al midazolam: el tiempo de vida media de eliminación ( $t_{1/2}$ ), su volumen de distribución (Vd), la depuración del mismo (Cl) y el área bajo la curva (ABC).

<b>Tiempo de muestreo</b>	Toma de muestras sanguíneas a diferentes tiempos para un estudio farmacocinético
---------------------------	--

<b>Tiempo de vida media de eliminación (<math>t_{1/2}</math>)</b>	Se refiere al tiempo en que se ha eliminado la mitad de la concentración del fármaco en la sangre
---	---

<b>Volumen de distribución (Vd)</b>	Es la relación que hay entre la dosis y la concentración plasmática con respecto al peso del paciente
-------------------------------------	---

<b>Depuración (Cl)</b>	Es la tasa de eliminación del fármaco en relación con su concentración en plasma
------------------------	--

<b>Área Bajo la Curva (ABC)</b>	Área que se obtiene al graficar la concentración plasmática del fármaco con respecto al tiempo, nos da una idea de la biodisponibilidad del fármaco en la sangre
---------------------------------	--

Se determinó el contenido de midazolam en:

### Etapa 2. Clínica:

Durante el periodo de Julio de 2014 a febrero de 2017, se captaron 29 pacientes que cumplieron con los criterios de ingreso, se eliminaron 7 pacientes debido a que el muestreo fue incompleto, quedando en total 22 pacientes.

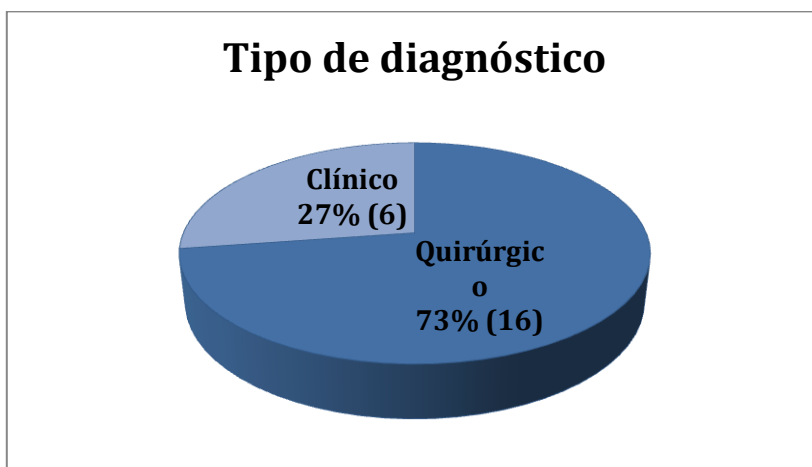
La edad promedio de los pacientes fue de 8.4, con un rango entre 2 y 16 años; el 45.5% de los pacientes fueron femeninos y el 54.5% masculinos.

Los principales aparatos y sistemas involucrados, fueron el respiratorio seguido del gastrointestinal, sistema nervioso central, afecciones óseas y finalmente el cardiovascular de acuerdo con los principales diagnósticos de ingreso los cuales se muestran en la Cuadro 1.

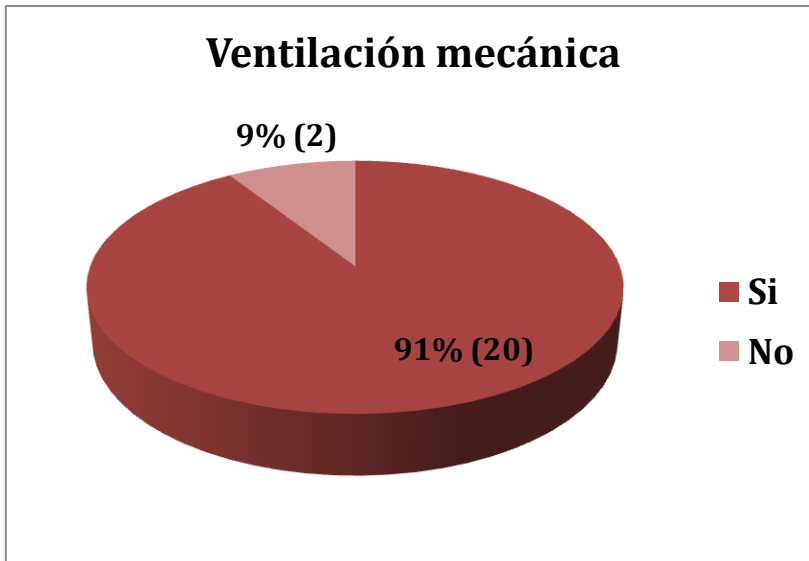
Cuadro 1: Diagnósticos por aparatos y sistemas

Aparato y sistema	n (%)	Diagnósticos principales
Respiratorio	9 (40.9%)	Toracotomía Neumonía adquirida en la comunidad Traqueostomía Lobectomía;
Gastrointestinal	6 (27.3%)	Esofagoplastía Sepsis abdominal Laparotomía exploradora
Sistema Nervioso Central	4 (18.2%)	Excéresis de tumor de fosa posterior Ventriculostomía Colocación de sistema de derivación ventrículo-peritoneal
Óseo	2 (9.1%)	Resección de tumor de maxilar Descompresión occipito-cervical
Cardiovascular	1 (4.5%)	Colocación de stent en Fístula sistémico pulmonar

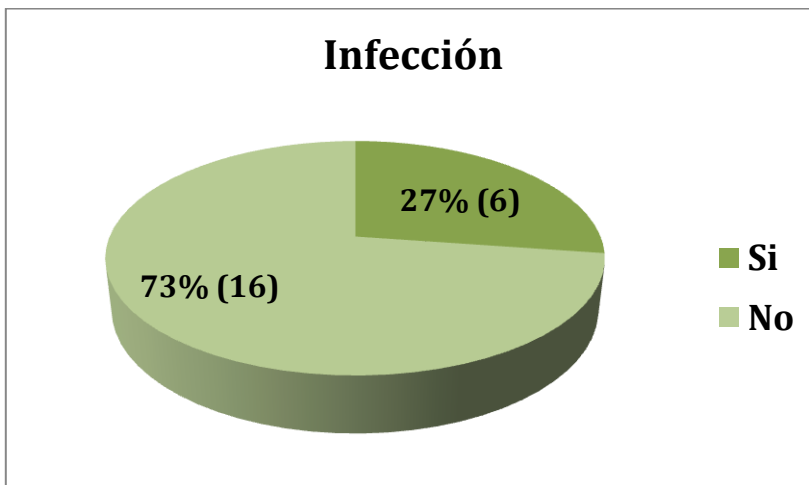
La mayor parte de los paciente ingresaron posterior a un evento quirúrgico (gráfica 1), con ventilación mecánica (gráfica 2) y solo algunos presentaron en algún momento de su estancia datos de infección (gráfica 3).



Gráfica 1: Tipo de diagnóstico.



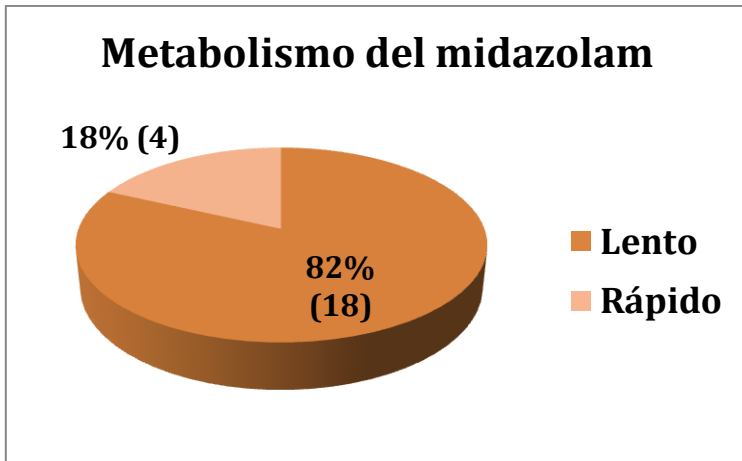
Gráfica 2: Ventilación mecánica.



Gráfica 3: Infección.

La dosis de midazolam que se infundió a los pacientes al ingreso al protocolo fue en promedio 249  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  (100-600  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ).

De acuerdo a las variables farmacocinéticas la vida media de eliminación promedio fue de 32.9 hrs (1.97 hrs - 173.25 hrs), el volumen de distribución promedio de 7.17 L/kg (0.0000002 L/kg -28.72 L/kg) encontrándose el 50% (11) por arriba del rango normal descrito en la literatura, solo el 13.6% (3), dentro del rango y el 36.4% (8) por debajo. De acuerdo a la tasa de depuración se evidenció que en un 77.3% (17) fue menor lo que refleja una eliminación del midazolam más lenta, en un 9.1% (2) una tasa de depuración fue normal y en un 13.6% (3) mayor, lo cual muestra relación con la vida media de eliminación, ya que se observó que ambos parámetros muestran un metabolismo y excreción más lento del midazolam de acuerdo a lo que hasta ahora se tiene reportado. (Gráfica 4)



Gráfica 4: Metabolismo del midazolam de acuerdo a la vida media de eliminación.

## DISCUSIÓN

El midazolam es una benzodiazepina que es ampliamente utilizada como sedante en pacientes pediátricos atendidos en unidades de cuidados intensivos. Este fármaco ejerce su efecto clínico mediante la unión a un receptor complejo que facilita la acción de inhibición del neurotransmisor ácido gama-amino butírico (GABA). A través de este mecanismo, midazolam ejerce su efecto sedante, ansiolítico, anticonvulsivante, relajante muscular y amnésico, tanto en adultos como en niños. (Blumer, 1998; De Wildt et al, 2003).

La acción farmacológica del midazolam se caracteriza por un rápido inicio de efecto, y debido a su rápida transformación metabólica, tiene una acción de corta duración. Debido a su baja toxicidad, tiene un amplio rango terapéutico. Tiene un efecto inductor del sueño y sedante muy rápidos, con intensidad pronunciada. Es soluble en agua en la formulación comercial (parenteral) pero se vuelve liposoluble a pH fisiológico y puede entonces atravesar la barrera encefálica.

En el Servicio de Terapia Intensiva del Instituto Nacional de Pediatría, se atienden niños críticamente enfermos tanto médicos como quirúrgicos, y la sedación es imprescindible para facilitar el cuidado y el manejo del paciente pediátrico en estado crítico, disminuyendo la respuesta al estrés, controlar la ansiolisis y mantener una sincronía con el soporte ventilatorio y con ello facilitar tanto los cuidados de enfermería así como el tratamiento instituido en la terapia intensiva.

Las determinaciones farmacocinéticas en nuestro estudio mostraron que la dosis inicial de midazolam que se infundió a los pacientes al ingreso al protocolo fue en promedio 249  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  (100-600  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ), la cual fue mayor a la que se usa por algunos autores como Blumer (1998) que reporta la dosis de midazolam para una sedación efectiva entre 60 a 120  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ . Tobias y colaboradores (2005), refieren que la sedación debe ser iniciada con una dosis en bolo antes de empezar una infusión continua, debido a que en estos pacientes, el promedio de tiempo de vida media es de 5.5 h, la concentración sérica en estado estacionario no será alcanzada por aproximadamente 20 h después de iniciada la infusión (4 a 5 vidas medias de la medicación); lo que explica por qué algunos de los pacientes incluidos hasta el momento han necesitado dosis extra del medicamento sobre todo durante la intubación endotraqueal y en los procesos de aspiración de secreciones. Hasta el momento no hemos documentado efectos adversos que se atribuyera al uso del midazolam en los pacientes que ingresaron al estudio, esta información contrasta con la literatura ya que se ha evidenciado efectos adversos especialmente hemodinámicos con dosis mayor 200  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ .

Nuestra población incluyó pacientes entre 2 y 16 años. La vida media de eliminación promedio en fue de 32.9 hrs (1.97 hrs - 173.25 hrs) mucho más larga a lo reportado previamente, con una tasa de depuración menor promedio de 0.56 L/kg/hr (0.00000017 L/kg/hr-2.35 L/kg/hr), que en conjunto nos habla de un metabolismo lento del fármaco; Blumer (1998), cita variables farmacocinéticas similares a la de nuestros pacientes en niños menores de 6 meses de edad con una vida media de eliminación prolongada y una disminución del aclaramiento de midazolam, probablemente consecuencia del tiempo

requerido para la maduración del sistema oxidante microsomal hepático durante los 6 meses posteriores al nacimiento, el metabolismo general de cada paciente, la presencia de disfunciones orgánicas y los medicamentos conexos, sin embargo se necesitan más estudios para conocer la causa de estas alteraciones en las variantes farmacocinéticas.

### **CONCLUSIONES:**

La mayoría de nuestros pacientes del estudio mostraron un metabolismo lento del midazolam, con requerimiento de dosis más altas de administración para lograr el efecto deseado del fármaco; resultados diferentes a lo observado en otros estudios de poblaciones pediátricas en la terapia intensiva, sin embargo debido a su complejidad, se deberá ahondar en las causas que podrían incluir enfermedades como falla renal, falla hepática y tratamientos concomitantes como la administración de inhibidores del CYP3A; así como variables genéticas que se integrarán en la segunda parte del estudio como predictores que alteran el midazolam y sus metabolitos en los pacientes en estado crítico pediátricos para establecer alternativas en las estrategias de dosificación de este fármaco.

Para una sedación adecuada en cada uno de los pacientes se debe de individualizar cada caso hasta conseguir la sedación deseada. El estudio continúa en proceso hasta completar el número de pacientes y entonces se realizará el análisis final así como las interacciones medicamentosas que pueden influir en el metabolismo del mismo.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Assis J, Pereira D, Gomes M, Marques D, Marques I, Nogueira A, Catarino R, Medeiros R. 2013. Influence of CYP3A4 genotypes in the outcome of serous ovarian cancer patients treated with first-line chemotherapy: implication of a CYP3A4 activity profile. *Int J Clin Exp Med* 6(7):552-561.
2. Blumer JL. 1998. Clinical pharmacology of midazolam in infants and children. *Clin Pharmacokinet* 35(1): 37-47.
3. Chávez-Teyes L, Castañeda-Hernández G, Flores-Murrieta FJ. 1999. Pharmacokinetics of midazolam in Mexicans evidence for interethnic variability. *Pharmacokinetics* 17(3):233-239.
4. Chiu KW, Hu TH, Nakano T, Chen KD, Lai CY, Hsu LW, Tseng HP, Chiu HC, Cheng YF, Goto S, Chen CL. 2013. Biological interactions of CYP2C19 genotypes with CYP3A4\*18, CYP3A5\*3, and MDR1-3435 in living donor liver transplantation recipients. *Transplant Res* 23;2(1):6.
5. Dalbøge CS, Nielsen XC, Dalhoff K, Alffenaar JW, Duno M, Buchard A, Uges DR, Jensen AG, Jürgens G, Pressler T, Johansen HK, Høiby N. 2013. Pharmacokinetic variability of clarithromycin and differences in CYP3A4 activity in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* S1569-1993(13)00145-8.
6. Dávila-Borja VM, Belmont JA, Espinosa JJ, Moreno-Sánchez R, Albores A, Montero RD (2007) Induction of CYP1A1 and CYP2E1 in rat liver by histamine: binding and kinetics studies. *Arch Toxicol* 81:697-709.
7. De Wildt SN, de Hoog M, Vinks AA, van der Giesen E, van den Anker JN. 2003. Population pharmacokinetics and metabolism of midazolam in pediatric intensive care patients. *Crit Care Med* 31(7):1952-1958.
8. Dinarello, C (1989) Interleukin-1 and biologically related cytokines. *Adv Immunol* 25:246-351.
9. Drögemöller B, Plummer M, Korkie L, Agenbag G, Dunaiski A, Niehaus D, Koen L, Gebhardt S, Schneider N, Olckers A, Wright G, Warnich L. 2013. Characterization of the genetic variation present in CYP3A4 in three South African populations. *Front Genet* 18;4:17.
10. Elens L, Nieuweboer A, Clarke SJ, Charles KA, de Graan AJ, Haufroid V, Mathijssen RH, van Schaik RH. 2013. CYP3A4 intron 6 C>T SNP (CYP3A4\*22) encodes lower CYP3A4 activity in cancer patients, as measured with probes midazolam and erythromycin. *Pharmacogenomics* 14(2):137-149.
11. Fleiss, J. L., B. Levin, and M. C. Paik. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 2003. 3rd ed. New York: Wiley.
12. Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Watanabe H, Shiseki K, Saeki M, Nakamura T, Kurose K, Sai K, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Hanai S, Nakajima T, Matsumoto K, Saito H, Goto Y, Kimura H, Katoh M, Sugai K, Minami N, Shirao K, Tamura T, Yamamoto N,

Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Kitamura Y, Kamatani N, Ozawa S, Sawada J. 2004. Haplotypes of CYP3A4 and their close linkage with CYP3A5 haplotypes in a Japanese population. *Hum Mutat* 23(1):100.

13. González HM, Romero EM, Peregrina AA, de J Chávez T, Escobar-Islas E, Lozano F, Hoyo-Vadillo C. 2003. CYP2C19- and CYP3A4-dependent omeprazole metabolism in West Mexicans. *J Clin Pharmacol* 43(11):1211-1215.

14. Greenblatt DJ, Shader RI, Harmatz JS. Benzodiazepines: a summary of pharmacokinetic properties. *Br J Clin Pharmacol* 1981; 11(Suppl 1): 11S-16S.

15. Hamzeiy H, Bombail V, Plant N, Gibson G, Goldfarb P. 2003. Transcriptional regulation of cytochrome P4503A4 gene expression: effects of inherited mutations in the 5'-flanking region. *Xenobiotica* 33(11):1085-1095.

16. Hamzeiy H, Vahdati-Mashhadian N, Edwards HJ, Goldfarb PS. 2002. Mutation analysis of the human CYP3A4 gene 5' regulatory region: population screening using non-radioactive SSCP. *Mutat Res* 500(1-2):103-110.

17. Heizmann P, Eckert M, Ziegler WH. 1983. Pharmacokinetics and bioavailability of midazolam in man. *Br J Clin Pharmacol* 16 (suppl 1): 43S-49S.

18. Holland NT, Pflieger L, Berger E, Ho A, Bastaki M. 2005. Molecular epidemiology biomarkers sample collection and processing considerations. *Toxicol Appl Pharmacol* 206(2):261-268.

19. Hoyo-Vadillo C, Castañeda-Hernández G, Herrera JE, Vidal-Gárate J, Salazar LA, Moreno-Ramos A, Chávez F, Tena I, Hong E. 1989. Pharmacokinetics of oral nifedipine: relevance of the distribution phase. *J Clin Pharmacol* 29(3):251-256.

20. Hoyo-Vadillo C, Venturelli CR, González H, Romero E, Cervantes R, Mata N, Ortiz AC, Rincón V, Zarate F, Sosa C, Ramírez-Mayans J. 2005. Metabolism of omeprazole after two oral doses in children 1 to 9 months old. *Proc West Pharmacol Soc* 48:108-109.

21. Karolinska Institutet: CYPalleles [Internet]. Stockholm, Sweden; [consultado el 20 de julio de 2017]. Disponible en: <http://www.imm.ki.se/CYPalleles>

22. NCBI: Database of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and multiple small-scale variations that include insertions/deletions, microsatellites, and non-polymorphic variants [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); [consultado el 20 de julio de 2017]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

23. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. 2002. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 54(10):1271-1294.

24. Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25(14):1754-1760.

25. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25(16):2078-2079.
26. Miller's Anesthesia, 4th edition, Ed. Churchill Livingstone, 1994, Chapters 11, 28.
27. Montero R, Serrano L, Dávila VM, Ito A and Plancarte A (2003) Infection of rats with *Taenia taeniformis* metacestodes increases hepatic CYP450, induces the activity of CYP1A1, CYP2B1 and COH isoforms and increases the genotoxicity of the procarcinogens benzo[a]pyrene, cyclophosphamide and aflatoxin B1. *Mutagenesis* 18:211-216.
28. Morgan ET (2004) Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev* 29:1129-1188.
28. Morgan ET (2004) Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev* 29:1129-1188.
29. Morcos PN, Moreira SA, Brennan BJ, Blotner S, Shulman NS, Smith PF. 2013. Influence of chronic hepatitis C infection on cytochrome P450 3A4 activity using midazolam as an in vivo probe substrate. *Eur J Clin Pharmacol* 69(10):1777-1784.
30. Okubo M, Murayama N, Shimizu M, Shimada T, Guengerich FP, Yamazaki H. 2013. CYP3A4 intron 6 C>T polymorphism (CYP3A4\*22) is associated with reduced CYP3A4 protein level and function in human liver microsomes. *J Toxicol Sci* 38(3):349-354.
31. Palma-Aguirre JA, González-Llaven J, Flores-Murrieta FJ, Castañeda-Hernández G. 1997. Bioavailability of Oral Cyclosporine in Healthy Mexican Volunteers: Evidence for Interethnic Variability. *J Clin Pharmacol* 37(7):630-634.
32. Reves JG. Benzodiazepines. In Prys-Roberts C, Hug CC, editores. *Pharmacokinetics of Anaesthesia*. Boston, MA: Blackwell Scientific Publications; 1984: 157.
33. Reyes-Hernández OD, Arteaga-Illán G, Elizondo G. 2004. Detection of CYP3A4\*1B and CYP3A4\*2 polymorphisms by RFLP. Distribution frequencies in a Mexican population. *Clin Genet* 66(2):166-168.
34. Reyes-Hernández OD, Lares-Asseff I, Sosa-Macias M, Vega L, Albores A, Elizondo G. 2008. A comparative study of CYP3A4 polymorphisms in Mexican Amerindian and Mestizo populations. *Pharmacology* 81(2): 97-103.
35. Flores-Pérez C, Flores-Pérez J, Zárate-Castañón P, Lizárraga- López S, Rivera-Espinosa L, Juárez-Olguín H, Díaz-García L. A Reliable HPLC Method for Monitoring Midazolam Plasma Levels in Critically Ill Pediatric Patients. *Curr Pharm Anal* 2017, 13, DOI:10.2174/1573412913666170621110407.
36. Roberts AG, Yang J, Halpert JR, Nelson SD, Thummel KT, Atkins WM. 2011. The structural basis for homotropic and heterotropic cooperativity of midazolam metabolism by human cytochrome P450 3A4. *Biochemistry* 50(50):10804-10818.
37. Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W, Raunio H, Crespi CL,

Gonzalez FJ. 2000. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin Pharmacol Ther* 67(1):48-56.

38. Sensorn I, Sirachainan E, Chamnanphon M, Pasomsub E, Trachu N, Supavilai P, Sukasem C, Pinthong D. 2013. Association of CYP3A4/5, ABCB1 and ABCC2 polymorphisms and clinical outcomes of Thai breast cancer patients treated with tamoxifen. *Pharmgenomics Pers Med* 6:93- 98.

39. Seo KA, Bae SK, Choi YK, Choi CS, Liu KH, Shin JG. 2010. Metabolism of 1'- and 4-hydroxymidazolam by glucuronide conjugation is largely mediated by UDPglucuronosyltransferases 1A4, 2B4, and 2B7. *Drug Metab Dispos* 38(11):2007-13.

40. Sevrioukova IF, Poulos TL. 2013. Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: recent advances and remaining problems. *Dalton Trans* 42(9):3116-3126.

41. Vet NJ, de Hoog M, Tibboel D, de Wildt SN. 2012. The effect of critical illness and inflammation on midazolam therapy in children. *Pediatr Crit Care Med* 13(1):e48-50.

42. Vuppalanchi R, Liang T, Goswami CP, Nalamasu R, Li L, Jones D, Wei R, Liu W, Sarasani V, Janga SC, Chalasani N. 2013. Relationship between differential hepatic microRNA expression and decreased hepatic cytochrome P450 3A activity in cirrhosis. *PLoS One*. 2013 Sep 13;8(9):e74471.

43. Ward RM, Kearns GL. 2013. Proton pump inhibitors in pediatrics: mechanism of action, pharmacokinetics, pharmacogenetics, and pharmacodynamics. *Paediatr Drugs* 5(2):119-131.

44. Yun W, Zhang F, Hu C, Luo X, Xue P, Wang J, Ge Y, Meng H, Guo Y. 2013. Effects of EPHX1, SCN1A and CYP3A4 genetic polymorphisms on plasma carbamazepine concentrations and pharmacoresistance in Chinese patients with epilepsy. *Epilepsy Res* 107(3):231-237.

45. "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". Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. *Diario Oficial de la Federación*, 18 de noviembre de 1998.

46. Tobias JD. Sedation and analgesia in the Pediatric Intensive Care Unit. *Pediatric Annals* 2005; 34(8): 636-45.



INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

ANEXO 2. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Hoja 1

**Protocolo No. 068/2014:** "Variantes alélicas de CYP3A4Y y su relación con el metabolismo de midazolam en una población pediátrica mexicana: Un posible acercamiento a esquemas terapéuticos personalizados"

DATOS DEL PACIENTE	
Nombre: _____	Servicio: _____
Edad (Meses/Días) _____	Registro: _____
Sexo (M/F) _____	Fecha de ingreso: _____
Fecha de nacimiento: _____	Peso actual: _____
Talla Actual: _____	IMC: _____
Diagnóstico nutricional: _____	
Diagnósticos principales: _____	

RESULTADOS DE LABORATORIO		
Albúmina: _____	AST: _____	ALT: _____
Bilirrubina total: _____	Urea: _____	Creatinina: _____
Glucosa: _____	PCR: _____	

CONDICIONES CLINICAS					
Temperatura: _____	FC: _____	FR: _____	TA: _____	PAM: _____	
Sepsis: SI _____	NO _____	Especifique: _____			
Deshidratación: SI _____	NO _____	Especifique: _____			

DATOS DE MUESTREO		
Fecha de inicio _____	Dosis inicial _____	Dosis final _____
Estudio farmacológico		
<i>Al ingreso a la UTI:</i>		
Fecha _____	Hora _____	
<i>3hrs suspendido el tratamiento:</i>		
Fecha _____	Hora _____	
<i>24hrs suspendido el tratamiento:</i>		
Fecha: _____	Hora _____	
Estudio genético:		
<i>Muestra Sanguínea o de Mucosa Oral:</i>		
Fecha _____	Hora _____	
Observaciones _____		

**INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS\***

Hoja 2

<b>ANTIBIÓTICOS/ANTIVIRALES/ANTIFÚNGICOS</b>					
	Dosis		Dosis	<b>OTROS</b>	Dosis
FLUCONAZOL		VANCOMICINA		BUPRENORFINA	
ITRACONAZOL		ERITROMICINA		VECURONIO	
KETOCONAZOL		AZITROMICINA		ERGOTAMINA	
MICONAZOL		CLARITROMICINA		ALOPURINOL	
CLOTRIMAZOL					
EFAVIRENZ		ERTAPENEM			
RITONAVIR		MEROPENEM			
INDINAVIR					
		TAZOBACTAM			
PIPERACICLINA		SULBACTAM			
CAPOFUNGINA					
<b>AMINAS</b>		<b>ANTICONVULSIVOS</b>			
DOBUTAMINA		CARBAMAZEPINA			
ADRENALINA		FENITOINA			
<b>ANTIÁCIDOS</b>		<b>ANALGÉSICOS/ANTIINFLAMATORIOS</b>			
RANITIDINA					
OMEPRAZOL		PARACETAMOL			
ESOMEPRAZOL		IBUPROFENO			
PANTOPRAZOL		INDOMETACINA			
CIMETIDINA		ACIDO ACETIL SALICILICO			
<b>ANTINEOPLÁSICOS</b>		<b>ESTEROIDES</b>			
VINCRISTINA		DEXAMETASONA			
		PREDNISONA			
		METILPREDNISOLONA			

**\*Nota:** Anotar la dosis de los medicamentos concomitantes en el cuadro correspondiente, en caso de que el paciente se encuentre en tratamiento con el fármaco.

MUESTRA	FECHA Y HORA	CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE MIDAZOLAM (ng/ml)	TIEMPO DE VIDA MEDIA DE ELIMINACIÓN $t_{1/2}$ (h)	VOLUMEN DE DISTRIBUCIÓN $V_d$ (L/kg)	DEPURACIÓN Cl (L/kg/h)
Al ingreso a la UTI					
3h después de suspendido el tratamiento					
24h después de suspendido el tratamiento					



INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

### ANEXO 3. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Protocolo No. 068/2014:** *“VARIANTES ALÉLICAS DE CYP3A4 Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO DE MIDAZOLAM EN UNA POBLACIÓN PEDIÁTRICA MEXICANA: UN POSIBLE ACERCAMIENTO A ESQUEMAS TERAPÉUTICOS PERSONALIZADOS”*

**Investigador principal:** Q.A. Carmen Flores Pérez  
Investigador en Ciencias Médicas “D”  
Laboratorio de Farmacología  
Torre de Investigación “Dr. Joaquín Cravioto”  
Av. Imán no. 1, 3er piso, Col. Insurgentes Cuicuilco,  
Delegación Coyoacán, CP 04530, México D.F.

Se le invita a usted (a su hijo) a participar en un estudio de investigación. Lea cuidadosamente este formato; puede comentarlo con alguien con quien usted se sienta cómodo y preguntarle al médico cualquier duda con respecto al estudio en este momento o posteriormente. Tómese el tiempo necesario para reflexionar y decida si usted (su hijo) participará o no en el estudio.

#### **¿Para qué se efectúa este estudio?**

El citocromo P450 (abreviado CYP) es una enorme superfamilia de enzimas que funcionan como “tijeritas” para utilizar y eliminar del organismo un gran número de medicamentos de uso regular en pacientes con infecciones o cáncer, entre otras enfermedades. La manera en la que estos citocromos actúan en el cuerpo está determinada por los genes (ADN), que son las estructuras encargadas de la herencia y de regular funciones en el cuerpo. En el presente estudio se pretende determinar el efecto que tienen algunas modificaciones a la forma del gen CYP3A4, para ver como asimila el organismo el medicamento midazolam que nos permitirá adecuar el tratamiento a su hijo(a).



### **¿En qué consiste el estudio?**

El paciente recibirá una dosis inicial de manera continua a través de la vena de 0.2 mg/kg/h de midazolam. Cabe mencionar que si el paciente requiere de dosis mayores para la sedación, el médico responsable procederá a aumentar dicha dosis de acuerdo a un procedimiento preestablecido en los Servicios de Terapia Intensiva y Oncología. Se tomarán 3 muestras de 3 mL de sangre cada una (aproximadamente media cucharadita) a través del catéter, que ya tiene colocado el paciente, posterior a la administración del medicamento a diferentes tiempos: a las 24 horas de iniciado el tratamiento y a las 3 y 24 horas después de suspendido el medicamento. Además a las primeras 24 horas le solicitaremos 4 ml extras de sangre (aproximadamente una cucharadita) para el estudio genético. En aquéllos pacientes en los que por su condición clínica no podamos recolectar la muestra de sangre, se realizará un raspado del interior de la boca con un pequeño cepillo estéril para obtener células de la mucosa para la extracción de ADN y llevar a cabo el estudio de los genes; este procedimiento no causa dolor ni tiene riesgo para el paciente. Simultáneamente, se llevará a cabo el reporte de las reacciones adversas al medicamento que pudieran presentar los pacientes durante el estudio.

### **¿Quiénes pueden participar en el estudio?**

Pacientes de 1 a 18 años, de cualquier sexo, en los que el familiar o tutor responsable acepte la participación en el estudio a través de la firma del consentimiento informado, que sean tratados en el Instituto Nacional de Pediatría y que requieran administración o infusión continua de midazolam con fines de sedación durante su internamiento.

### **¿Quiénes no deben participar en el estudio?**

Pacientes en los que se documente insuficiencia o mal funcionamiento hepático o renal crónico, infecciones hepáticas (en el hígado, como hepatitis), o que hayan sido sometidos a hepatectomía (cirugía para quitar una porción o la totalidad del hígado), que cursen con desnutrición, que presenten falla orgánica múltiple (que dejen de funcionar algunos órganos vitales), que tengan hipersensibilidad a benzodiazepinas (alergia a este grupo de sedantes).

### **¿Qué se conoce acerca de esta prueba a realizar?**

Hasta el momento no hay estudios similares donde se evalúe la relación de las concentraciones de midazolam en la sangre y los componentes genéticos que determinan las posibles diferencias en la población mexicana, por lo que es importante realizarlo en su hijo(a) y que usted conozca más acerca de cómo se comporta el medicamento en el organismo, ya que el efecto que tiene es diferente en cada persona cuando se utiliza a la misma dosis.

### **¿Quién sufragará los gastos del estudio?**

Los costos del medicamento, la realización de las mediciones en sangre y del estudio genético serán absorbidos por la Institución o los investigadores. Usted sólo pagará todos los demás costos relacionados con la hospitalización del paciente.

### **¿Qué efectos indeseables pueden pasar a su hijo al participar en el estudio?**

Los efectos adversos del medicamento más comunes son: hipo, náusea, vómito, espasmo laríngeo (contracción prolongada de la laringe), disnea (dificultad para respirar), alucinaciones, mareo, ataxia (disminución de la capacidad de coordinar movimientos), movimientos involuntarios. También produce baja de la presión arterial y cambios en el ritmo del corazón y de la respiración. El procedimiento de la toma de muestra de sangre, no representa ningún riesgo adicional al paciente porque está con un catéter, pero si se llegarán a provocar molestias menores como un ligero dolor en el sitio de la punción o un ligero moretón, se otorgara atención inmediata por parte del médico responsable del estudio. La toma de muestra de células de la mucosa oral no presenta efectos indeseables.

### **¿Qué debo hacer en caso de que tenga mi hijo alguna molestia después del estudio?**

Usted deberá contactarse con los médicos responsables del estudio al teléfono 1084-0900:: Al Extensiones 1273 y 1289, al Servicio de Terapia Intensiva, con la Dra. Patricia Zárate o con la Dra. S Dra. Sandra Lizárraga, o al celular de la Dra. Lizárraga al 553475-3958. O bien a la extensión 1339, al Sde al Servicio de Oncología, con la Dra. Rocío Cárdenas o con la Dra. Liliana Velasco, o al celular de la Dra. la Dra. Velasco al 551732-5249.

### **¿Qué beneficios puedo esperar?**

El beneficio inmediato esperado de este estudio es personalizar la dosis del medicamento (midazolam) que requiere su hijo(a) para mantenerlo sedado durante su estancia, en el Servicio de Terapia Intensiva o en el Servicio de Oncología. Posteriormente, con los datos obtenidos a partir del estudio genético se podrá obtener el perfil individualizado de metabolización (uso y eliminación) de fármacos, que será útil para administrar de manera más segura el midazolam y otros medicamentos, en futuros internamientos o tratamientos. Al finalizar el estudio se le entregará la lista de dichos medicamentos y la información completa sobre su uso seguro.

### **¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?**

En caso de dudas o preguntas comunicarse al Laboratorio de Farmacología del Instituto Nacional de Pediatría al teléfono 10840900 extensiones 1426 ó 1428 o al cel. 551798-5507 con la Q.A. Carmen Flores Pérez, investigadora responsable de este estudio. En caso de dudas sobre los derechos del participante como paciente del Instituto, puede comunicarse al teléfono 10840900, extensión 1581 con la Dra. Matilde Ruiz García, Presidente del Comité de Ética del Instituto Nacional de Pediatría.

### **¿Puedo negarme a participar en este estudio y se me puede pedir que abandone el estudio?**

La participación en este estudio es voluntaria, por lo cual desde el inicio o en el momento en que lo desee puede abandonar el estudio sin perder ninguno de los derechos que actualmente tiene como paciente del Instituto Nacional de Pediatría y sin perder la atención de sus médicos. Sin embargo, el médico responsable del estudio puede solicitarle que su paciente abandone el estudio si a su consideración la salud de su hijo(a) se ve comprometida.

### **¿Quiénes van tener información de mi hijo?**

Los datos que se obtengan de este estudio sólo serán conocidos por los investigadores y el personal médico directamente involucrado en este estudio. Todos los datos serán manejados por el personal médico y de investigación bajo estricta confidencialidad y codificados, por lo que no habrá posibilidad de que se asocien a su hijo(a), ya que en las publicaciones que se generen o la difusión de los resultados obtenidos, no se va a incluir ningún nombre o siglas que pudieran asociarse con los participantes del estudio. Los resultados genéticos serán confidenciales y usted puede conocerlos si lo desea al finalizar el protocolo de investigación.

### **¿Qué se va a hacer con las muestras biológicas?**

Las 3 muestras de 3 ml de sangre (aproximadamente media cucharadita) programadas en tres tiempos distintos, para el monitoreo de niveles del medicamento, serán procesadas en el Laboratorio de Farmacología del Instituto Nacional de Pediatría y una vez obtenida la información, serán destruidas. La muestra de células de mucosa oral será procesada en el Laboratorio de Oncología Experimental para la obtención de ADN; dichas muestras serán almacenadas hasta su análisis y una vez concluido el estudio serán destruidas, por lo que no se utilizarán para otro fin o estudio distinto al descrito en este documento.

### **¿Puedo conocer los resultados del estudio?**

Los resultados del estudio los podrá consultar con el investigador responsable de manera directa o a los teléfonos previamente indicados, al finalizar el protocolo de investigación.

### **Al firmar a continuación, acepto que:**

- He leído este formato de consentimiento informado.
- He tenido la oportunidad de formular preguntas y éstas han sido contestadas satisfactoriamente. Consiento voluntariamente la participación de mi hijo(a) en este estudio.
- Concedo permiso para que se use y comparta la información referente a mi hijo (a) como se describe en este formato.
- Puedo elegir que mi hijo(a) no participe en el estudio o que lo abandone en cualquier momento, comunicándolo al médico del estudio sin que esto afecte su cuidado médico.

Nombre del niño participante:

\_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre y firma del Padre o Tutor: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

Nombre y firma de la Madre o Tutor: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

- He sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre y firma del testigo 1: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Relación que tiene con el paciente: \_\_\_\_\_

Nombre y firma del testigo 2: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Relación que tiene con el paciente: \_\_\_\_\_

Nombre y firma del investigador o quien recoge el consentimiento informado:

\_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

- Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de consentimiento informado \_\_\_\_\_ (iniciales del investigador)
- Recibí copia de este consentimiento

Nombre y firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_