



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES
NEUROLÓGICAS

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN-SIGLO XXI

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN:
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

P R E S E N T A

M en C. MIGUEL ÁNGEL LÓPEZ GARCÍA

***“ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS EN LAS
REGIONES CODIFICANTES DE LOS GENES
CYP450 ASOCIADOS AL METABOLISMO DE
FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS EN PACIENTES
PEDIÁTRICOS CON EPILEPSIA FOCAL
FARMACORRESISTENTE”***

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Sandra Orozco Suárez. Co-Directora
Dr. Héctor Fernando Serrano. Co-Director
Dra. Iris A. Feria Romero. Asesora

AGRADECIMIENTOS:

- El presente trabajo fue realizado en el Laboratorios de la “Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades CMN-SIGLO XXI IMSS”, bajo la dirección del Dr. Héctor Fernando Serrano del Departamento de Ciencias de la Salud, CBS, UAM-I. y de la Dra. Sandra Orozco Suarez del Laboratorio Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades CMN-SIGLO XXI IMSS. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo de la Dra. Iris Angélica Feria Romero.

- El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 103937, que comprendió del periodo del 2010 al 2013. El doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de excelencia del CONACyT y, además, cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyecto 248513.
- Al Instituto de Ciencia y Tecnología del GDF. PIFUTP/08-127.
- Al Instituto Mexicano del Seguro Social por la beca otorgada 99095955.

El Jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado Ciencias Biológicas y de la Salud, de la división de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: “Estudio de los polimorfismos en las regiones codificantes de los genes *CYP450* asociados al metabolismo de fármacos antiepilépticos en pacientes pediátricos con epilepsia focal farmacorresistente”, que presentó

Miguel Ángel López García

El día 30 de marzo de 2020.

Sinodales:

PRESIDENTE: Dr. Héctor Fernando Serrano
Departamento de Ciencias de la Salud, CBS, UAM-I

SECRETARIO: Dra. Sandra Orozco
Dra. Sandra Orozco Suarez
Laboratorio Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades CMN-SIGLO XXI IMSS

VOCAL 1: Dra. Iris Angélica Feria Romero
Laboratorio Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades CMN-SIGLO XXI IMSS

VOCAL 2: Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero
Departamento de Ciencias de la Salud, CBS, UAM-I

VOCAL 3: Dra. Petra Yescas Gómez
Departamento de Genética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velazco Suárez”.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
Desarrollo histórico.....	9
Definición de epilepsia.....	11
Clasificación de las crisis.....	12
Epidemiología.....	14
Etiología de las crisis.....	15
Etiología estructural.....	15
Etiología genética.....	16
Etiología infecciosa.....	17
Etiología metabólica.....	17
Etiología inmunitaria.....	18
Etiología desconocida.....	18
Fisiopatología.....	18
Diagnóstico.....	20
Tratamiento de la epilepsia.....	23
Farmacogenética.....	27
Polimorfismos SNVS y variabilidad genética.....	29
ANTECEDENTES.....	31
CYP2D6.....	32
CYP2C9.....	35
CYP2C19.....	36
CYP23A4.....	38
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	39
JUSTIFICACIÓN.....	40
HIPÓTESIS.....	41
OBJETIVO GENERAL.....	41
OBJETIVOS PARTICULARES.....	41
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	42
MATERIAL Y MÉTODOS.....	43

Población de estudio.....	43
Criterios de inclusión.....	43
Criterios de no inclusión.....	44
Criterios de exclusión.....	44
Toma de muestra.....	44
Procesamiento de las muestras.....	45
Obtención de DNA.....	45
Amplificación de los genes seleccionados.....	46
Análisis estadístico.....	49
RESULTADOS (Datos clínicos).....	50
Población de estudio.....	50
Amplificación de los genes seleccionados.....	50
DISCUSIÓN.....	68
Polimorfismos en los genes <i>CYP2D6</i> , <i>CYP2C9</i> , <i>CYP2C19</i> y <i>CYP3A4</i>	69
CONCLUSIONES.....	75
BIBLIOGRAFÍA.....	76
ANEXOS.....	87
ANEXO 1. Carta de Consentimiento Informado.....	87
ANEXO 2. Carta de Asentimiento Informado.....	90
ANEXO 3. Publicaciones.....	93

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
BHE	Barrera hematoencefálica
BZD	Benzodiazepina
CBZ	Carbamazepina
CLB	Clobazam
CZP	Clonazepam
CC	Crisis Convulsivas
CE	Crisis Epilépticas
CP	Crisis Parciales
CTCG	Crisis Tónico-Clónicas Generalizadas
CTR	Control
<i>CYP-450</i>	<i>Citocromo P450</i>
<i>CYP2D6</i>	<i>Citocromo P450-2D6</i>
<i>CYP2C9</i>	<i>Citocromo P450-2C9</i>
<i>CYP2C19</i>	<i>Citocromo P450-2C19</i>
<i>CYP3A4</i>	<i>Citocromo P450-3A4</i>
FAE's	Fármacos antiepilépticos
DEI	Descarga Epileptiforme Interictal
EA	Efectos Adversos
ECA	Ensayos Controlados Aleatorios
EDTA	etilendiaminotetraacético
EE	Estado Epiléptico
EEG	Electroencefalograma.
EMDs	Enzimas Metabolizadoras de drogas
EMJ	Epilepsia Mioclónica Juvenil.
ERTAFAR	Epilepsia Refractaria al Tratamiento
EVC	Enfermedad Vasculat Cerebral
FPIA (siglas en inglés)	Inmunoensayo de Polarización Fluorescente
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GBP	Gabapentina
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GPC	Guías de Prácticas Clínicas
HPLC (siglas en inglés)	Cromatografía líquida de alta resolución
ILAE (siglas en inglés)	Liga Internacional Contra la Epilepsia
INN	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
LEV	Levetiracetam
LTG	Lamotrigina
MI	Metabolizadores Intermedios
ML	Metabolizadores Lentos

MR	Metabolizadores Rápidos
MU	Metabolizadores Ultrarrápidos
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Oficina panamericana de la salud
OXC	Oxcarbazepina
PB	Fenobarbital
PCR (siglas en inglés)	Reacción en cadena de la polimerasa
PHT	Fenitoína
PPE	Programa Prioritario de Epilepsia
PRM	Primidona
RAM	Reacciones adversas a los medicamentos
RF	Resistente a fármacos
SNVs (siglas en inglés)	Polimorfismos de un sólo nucleótido
SE	<i>Status epilepticus</i>
TC	Tomografía computarizada
TCE	Traumatismo craneoencefálico
TGB	Tiagabina
TPM	Topiramato
UTR (siglas en inglés)	Región no traducida
VGB	Vigabatrina
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VPA	Ácido Valproico
ZNS	Zonisamida

RESUMEN

Diversos factores, incluida la farmacogenética, contribuyen a la variabilidad interindividual en las respuestas a los medicamentos. Muchos fármacos antiepilépticos (FAE's) son metabolizados por una variedad de reacciones enzimáticas que son catalizadas en su mayoría por miembros de la familia del citocromo P450 (CYP-450) y por ello se les da una atención considerable. Algunos genes CYP existen como variantes genéticas (alelos), también afectan las concentraciones de las FAE's en sangre, lo que altera la biodisponibilidad del fármaco. Los genes *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2D19* y *CYP3A4* son los que están ampliamente implicados en el metabolismo de la mayoría de los fármacos antiepilépticos. Las evidencias experimentales indican que la composición de la frecuencia de los alelos en la población muestra una posible relación con la variabilidad asociada a la respuesta clínica.

En este estudio se evaluó la variabilidad génica de los SNVs (variaciones de un solo nucleótido, por sus siglas en inglés) de los genes *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* y *CYP3A4*, dentro de una población rigurosamente seleccionada de pacientes pediátricos con epilepsia parcial compleja. Se analizaron las secuencias genéticas de 23 pacientes con epilepsia farmacorresistente y 7 pacientes control con buena respuesta a FAE's y con el mismo diagnóstico. Seis exones y tres intrones en estos cuatro genes fueron secuenciados, y se determinaron las concentraciones de fármaco en saliva y en plasma sanguíneo. Los SNVs más relevantes con relaciones farmacogenómicas fueron *CYP2D6**2 (rs16947) que disminuyó su actividad metabolizadora y *CYP2D6**4 (rs1065852), *CYP2C19**2 (rs4244285) y *CYP3A4**1B (rs2740574) con un comportamiento de metabolizador deficiente. Los factores de riesgo más importantes se encontraron en el genotipo AA y el alelo homocigoto mutado del SNV rs3892097 del gen *CYP2D6*, seguidos por los alelos A y T de los SNV rs2740574 y rs2687116, respectivos, del gen *CYP3A4*.

La asociación más importante fue entre homocigotos, genotipo AA de rs3892097 y genotipo AA de rs2740574 con una frecuencia del 78.3% en pacientes con epilepsia resistente a fármacos en comparación con 14.3% en pacientes control. Los resultados demostraron el importante papel de la variante alélica homocigoto mutado *CYP3A4**1B como factor de riesgo para desarrollar resistencia a los

fármacos y los SNV del gen *CYP2D6* y *CYP2C19* que pueden afectar la respuesta a los fármacos antiepilépticos.

ABSTRACT

Several factors, including pharmacogenetics, contribute to inter-individual variability in responses to drug treatment. Many antiepileptic drugs are metabolized by a variety of enzymatic reactions that are mostly catalyzed by members of the cytochrome *P450* family (*CYP-450*) and are therefore given considerable attention. Some CYP genes exist as genetic variants (Alleles), which may also affect the concentrations of FAE's in the blood, altering the bioavailability of the drugs. Experimental evidence indicates a clear involvement between *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2D19* and *CYP3A4* genes and the metabolism of most antiepileptic drugs along with the associated variability in clinical responses with the allele frequency.

In this study, the polymorphisms of *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* and *CYP3A4*, within a rigorously selected population of pediatric patients with drug-resistant epilepsy were analyzed. The genetic sequences of 23 patients with drug-resistant epilepsy, and 7 control patients with good response to FAE's and with the same diagnosis were analyzed.

Six exons and three introns in these four genes were genotyped, and the drug concentrations in saliva and plasma were determined. The most relevant SNVs with pharmacogenomics relationships were *CYP2D6**2 (rs16947) showed decreased metabolizing activity and *CYP2D6**4 (rs1065852), *CYP2C19**2 (rs4244285) and *CYP3A4**1B (rs2740574) with a poor metabolizer behavior. The most substantial risk factors were found in the AA genotype mutated homozygote and the rs3892097 SNV allele of the *CYP2D6* gene, followed by the A and T alleles of the respective rs2740574 and rs2687116 SNV, of the *CYP3A4* gene.

The most significant association was between AA homozygotes for rs3892097 and rs2740574, with 78.3% patients with in drug-resistant epilepsy compared with 14.3% in control patients. The results demonstrated the critical role of the *CYP 3A4**1B allelic variant mutated homozygote as risk factor for developing drug resistance and the *CYP2D6* and *CYP2C19* SNVs that may affect the response to antiepileptic drugs.

INTRODUCCIÓN

Desarrollo histórico de la epilepsia.

El significado de la palabra epilepsia proviene del griego “*Epilambanein*” y se traduce como “ser sobrecogido bruscamente”, los episodios paroxísticos que presentan los individuos que la padecen, han trascendido históricamente y fueron interpretados como fenómenos sobrenaturales que crearon temor, sorpresa e incertidumbre en la sociedad. El desconocimiento de la enfermedad también provocó choques ideológicos entre el desarrollo científico y las creencias religiosas al generar conceptos erróneos y calificarla como una “enfermedad sagrada”. En la Biblia, en el Talmud y el Corán se menciona este padecimiento donde se describen episodios paroxísticos y periodos de sueño profundo (Tardemah) que se apoderaban de Abraham en el génesis, y posteriormente de profetas como Isaías, Daniel, Ezequiel y Jeremías. En el nuevo testamento, el libro de las revelaciones describe el “mal de San Juan” debido a que lo padecía este apóstol, y cuyas características clínicas fueron interpretadas por Dostoievski como convulsiones, sin embargo, sólo se pueden interpretar como posibles crisis epilépticas (CE). Así hay múltiples ejemplos que no han hecho más que difundir un entendimiento erróneo de la epilepsia (Rosner, 1975). Existen reportes desde Hipócrates a la fecha que consideraron poseído al enfermo epiléptico. Por tal motivo, frecuentemente estos pacientes eran rechazados por la sociedad y por su familia. Aún en la actualidad, los enfermos epilépticos son sometidos a exorcismos para ser liberados de supuestas posesiones demoniacas y estas conductas desafortunadas se dan tanto en países no desarrollados como desarrollados (Temkin,1971).

Desde hace aproximadamente 4000 años, en la época de la medicina babilónica este padecimiento fue llamado “antashuba” que significa “enfermedad de las caídas” y fueron descritos diferentes variedades de crisis epilépticas como: las crisis tónico-clónicas generalizadas (CTCG), crisis de ausencia, y las crisis gelásticas que se acompañan de risas incontrolables. Ya en el siglo XIX había evidencias de errores y aciertos en la interpretación del fenómeno epiléptico, siempre relacionados con grandes personajes de la ciencia o de las artes. Por ejemplo, se creía que Vincent Van Gogh sufría crisis convulsivas (CC) y que

padecía epilepsia, incluso diagnosticado por epileptólogos. Sin embargo, actualmente se sabe que estos episodios convulsivos no eran crisis epilépticas sino CC asociadas a la ingestión de Absinte, un tipo de bebida alcohólica que se obtiene del ajeno y que contiene terpenos que provocan CC en animales de laboratorio (Ryan y cols., 1980).

En años recientes, los avances en biología molecular han aclarado los mecanismos básicos de la descarga epiléptica, particularmente en relación a los fenómenos sinápticos, tanto de tipo inhibitorio como excitatorio que han permitido conocer y diferenciar mejor las epilepsias con crisis recurrentes y fenómenos convulsivos aislados o sin relación a otras patologías como crisis febriles, psicosis, trastornos de personalidad, migraña o trastornos del sueño. Se ha demostrado la intervención en el desarrollo de la epilepsia de mutaciones que cambian la secuencia aminoacídica tienen como consecuencia alteraciones en canales iónicos o variaciones estructurales en los receptores GABA del hipocampo y del cerebelo (Annegers, 1994). Adicionalmente, se han descubierto diversas mutaciones cromosómicas en varios tipos de epilepsia como en la epilepsia mioclónica juvenil (EMJ) (Sander, 1987).

Por otro lado, se ha reportado que los mecanismos inmunológicos pueden ser causa del desarrollo de factores epileptogénicos, por la aparición de autoanticuerpos que interactúan con proteínas receptoras de glutamato; anticuerpos que produce lisis neuronal por la acción de células T lo que facilita la liberación de glutamato. Es importante tener suficiente información desde el punto de vista molecular, genético y ambiental, para poder analizar un padecimiento multifactorial como la epilepsia. Actualmente, los conocimientos sobre el desarrollo de la epileptogénesis han cambiado los criterios de clasificación de las epilepsias y síndromes epilépticos, y con ello definir la terapéutica farmacológica o quirúrgica más recomendable para el paciente (Berg y cols, 2010).

Definición de epilepsia.

La Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE), asociación que agrupa neurólogos interesados en la epilepsia, y la OMS publicaron en 2014 la definición conceptual más aceptada actualmente. De acuerdo a ellos **“La epilepsia es un trastorno cerebral caracterizado por la predisposición permanente a generar convulsiones epilépticas y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de este trastorno”**.

La definición de epilepsia exige que ocurra por lo menos una convulsión epiléptica (Fisher y cols., 2014). Sin embargo, la definición pragmática de epilepsia como “dos convulsiones no provocadas” ha sido útil, pero es insuficiente en algunas circunstancias.

Para que la definición clínica práctica (operativa) de epilepsia concuerde con lo que los epileptólogos identifican en la epilepsia, el Grupo de trabajo de la ILAE recomienda ampliarla para incluir las siguientes circunstancias y agregar un límite temporal a la definición. La epilepsia es una enfermedad cerebral definida por cualquiera de los siguientes trastornos:

1. Por lo menos dos convulsiones no provocadas producidas con más de 24 horas de intervalo entre cada una.
2. Una convulsión no provocada y la probabilidad de otras convulsiones similar al riesgo general de recidiva (por lo menos el 60%) tras dos convulsiones no provocadas, producidas durante los 10 años siguientes.
3. Diagnóstico de un síndrome epiléptico.

La epilepsia se considera que se resolvió si una persona no sufrió convulsiones durante los últimos 10 años y no recibió medicación anticonvulsiva por lo menos durante los últimos 5 años, o cuando esa persona superó la edad del síndrome epiléptico dependiente de la edad (Fisher y cols., 2014).

Clasificación de las crisis.

La Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE), a través de la Comisión de Clasificación y Terminología, ha desarrollado un trabajo de clasificación de las crisis y epilepsias. En 2010, se incorporaron las características que con mayor frecuencia se encontraron en la práctica clínica (Engel, 2006; Berg y cols., 2010) de tal manera que la clasificación de 2017 es interpretativa, permitiendo el uso de datos adicionales para clasificar los tipos de crisis teniendo como característica común **“la aparición transitoria de signos y / o síntomas debido a una actividad neuronal excesiva o sincrónica en el cerebro”** (Fisher y cols., 2005). Así pues, se cuenta con dos clasificaciones, la Clasificación Operacional Básica (Fig. 1) y la Clasificación Extendida de los tipos de crisis (Fig. 2) (ILAE 2017). Ambas figuras representan la misma clasificación, la síntesis de las subcategorías forma la versión básica. El uso de una u otra depende del grado del detalle deseado, las variaciones individuales de la crisis pueden agregarse a los tipos de crisis según el nivel de conciencia (Fisher y cols., 2017).

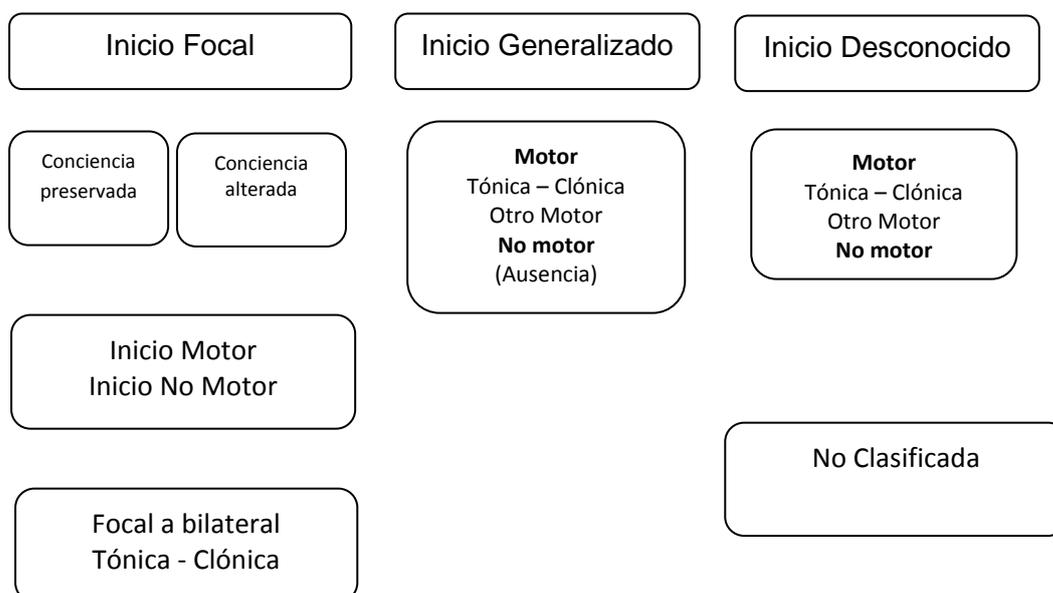


Figura 1. Clasificación Operacional Básica de los Tipos de Crisis, ILAE 2017.

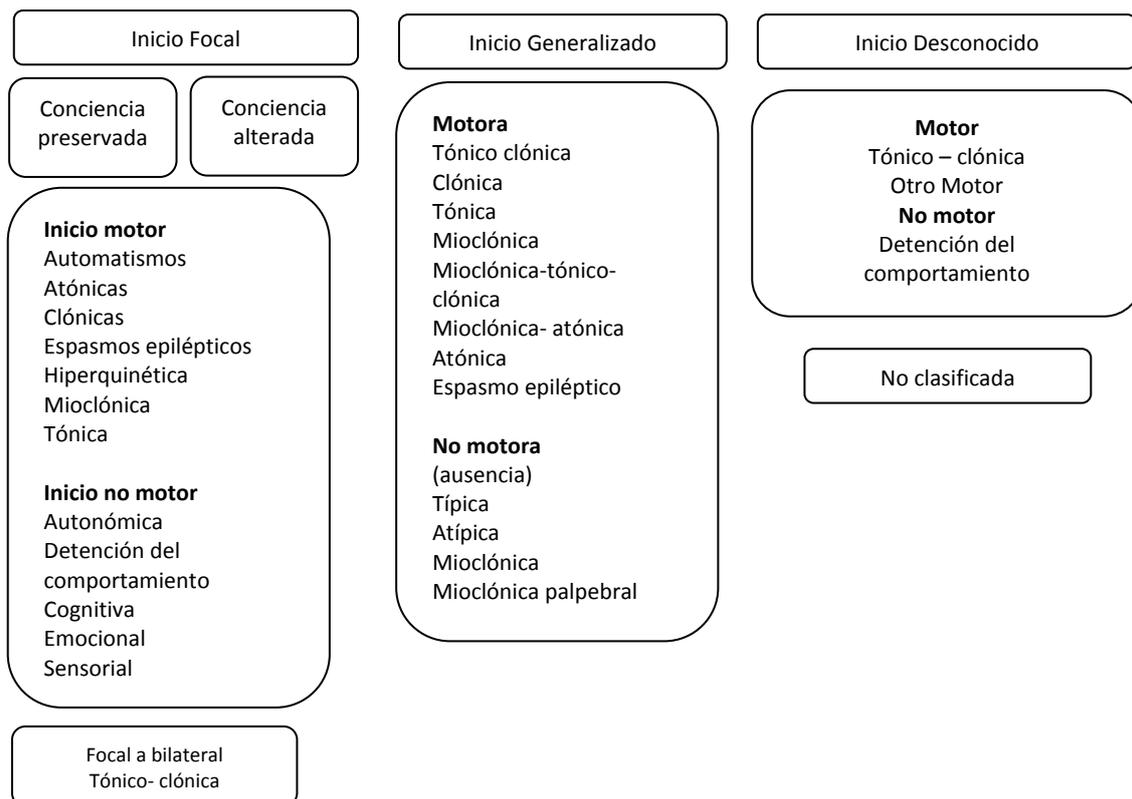


Figura 2. Clasificación Operacional Extendida de los Tipos de Crisis, ILAE 2017. La siguiente clasificación debería guiar la selección del tipo de crisis. En las crisis focales, especificar el nivel de alteración de conciencia es opcional.

Algunas de las ventajas que ha brindado este algoritmo es que se evitan términos ambiguos que no solo causan confusión, sino que aumentan el grado de error tanto en la determinación del daño como en el tratamiento. Así pues, en la clasificación de 1981, la palabra “parcial” alude a que el inicio de la crisis se circunscribe a una parte de la corteza. Pero puede resultar ambigua e interpretarse en el sentido de “incompleta”, dando idea de que es una crisis que no presenta características de haber concluido, con más manifestaciones de las descritas. Por eso se cambia por el término focal, que evoca más fácilmente a un foco, una zona concreta de la corteza.

En la nueva clasificación se denomina “crisis focal” a la que se inicia en uno solo de los dos hemisferios cerebrales, y “generalizada” cuando su origen sucede en los dos hemisferios a la vez. El origen es “desconocido” si no puede asegurarse que su inicio sea en un solo hemisferio o en ambos.

A diferencia de la clasificación de 1981, ahora sabemos que ciertos tipos de crisis pueden tener un origen focal o generalizado, como es el caso de las crisis tónicas, clónicas, mioclónicas, tónico-clónicas, acinéticas y los espasmos (Wolf

y cols., 2015). Actualmente es incorrecto indicar que estas crisis sean exclusivamente generalizadas.

Otro término ambiguo que ha sido aclarado por la nueva clasificación es el término “secundariamente generalizada”, y ahora cuando una crisis focal empieza en un hemisferio y se proponga al contrario se determina como focal que pasa a bilateral tónico-clónica, puesto que sus manifestaciones son siempre así.

La disminución de la conciencia ahora se define a partir de la conciencia como “capacidad de estar alerta” manteniendo la percepción tanto de uno mismo como de lo que sucede en el entorno. Cualquier modificación de la alerta se considerará una alteración de la conciencia (Scheffer, 2012). En las crisis focales, la persona puede o no mantenerse en estado de alerta, por lo que se definirá como una “crisis focal en alerta” o una “crisis focal con disminución del estado de alerta” (Korff y Scheffer, 2013).

En las crisis generalizadas en estado de alerta siempre está disminuido, por lo que no es necesario especificarlo. De esta manera la alerta se convierte en un elemento clasificador de las crisis.

Las crisis motoras están caracterizadas por cualquier cambio en la actividad muscular ya sea por un aumento o disminución. Cuando las manifestaciones de la crisis no suponen un cambio en esta actividad muscular se dice que la crisis es no motora (Fisher y cols., 2017).

Epidemiología.

Según la OMS, la epilepsia es el trastorno neurológico crónico más común (Cruz y cols., 2017). Existen reportes de 50 millones de personas con la enfermedad en el mundo. La incidencia de la epilepsia en los países desarrollados oscila entre 42 y 61 por 100 000 habitantes (Hauser y Beghi, 2008). La cifra suele acercarse al doble o más en los países en vías de desarrollo. La epilepsia afecta a todos los grupos etarios con mayor incidencia en la población infantil (Kotsopoulos y cols., 2012).

En México, la prevalencia estimada es entre 349 a 680 por 100 000 habitantes en la población general y entre 180 a 400 por 100 000 habitantes en la población infantil. La epilepsia es considerada dentro de las principales enfermedades

vinculadas a la mortalidad por enfermedades no infecciosas de la población infantil en México (Cruz y cols., 2017). La mayor frecuencia de la epilepsia es en la edad pediátrica, y el sexo masculino el más afectado. En México, cada año se reportan de 400 a 800 casos nuevos por 100 000 niños (Cruz y cols., 2017).

Etiología de las crisis.

Desde el momento en que el paciente presenta una primera crisis epiléptica, el médico debe intentar determinar la etiología de la epilepsia. Se han reconocido diversos grupos etiológicos, con hincapié en los que tienen implicaciones para el tratamiento. En general, la primera investigación que se lleva a cabo incluye neuroimágenes, idealmente de Resonancia Magnética si está disponible. Esto le permite al médico determinar si existe una etiología estructural para la epilepsia del paciente. Los otros cinco grupos de etiología son genética, infecciosa, metabólica, inmunitaria y desconocida (Fig. 3). La epilepsia de un paciente puede clasificarse en más de una categoría etiológica. Las etiologías no son jerárquicas, y la importancia dada al grupo etiológico del paciente puede depender de las circunstancias (Scheffer y cols., 2017).

Etiología estructural.

Por etiología estructural se hace referencia a anomalías visibles en la neuroimagenología estructural, en la que la evaluación electrofisiológica o electroencefalográfica y los resultados de los estudios de diagnóstico por imágenes conducen a una presunción razonable de que la anomalía en las imágenes es la causa probable de las crisis del paciente. Las etiologías estructurales pueden ser adquiridas (por ejemplo, accidentes cerebrovasculares, traumatismos e infecciones) o genéticas (como muchas malformaciones relacionadas con el desarrollo cortical). Si bien existe una base genética relacionada con dichas malformaciones, la correlación estructural sustenta el diagnóstico de epilepsia. La identificación de una lesión estructural sutil requiere estudios de Resonancia Magnética apropiados que sigan protocolos específicos para la epilepsia (Gaillard y cols., 2009).

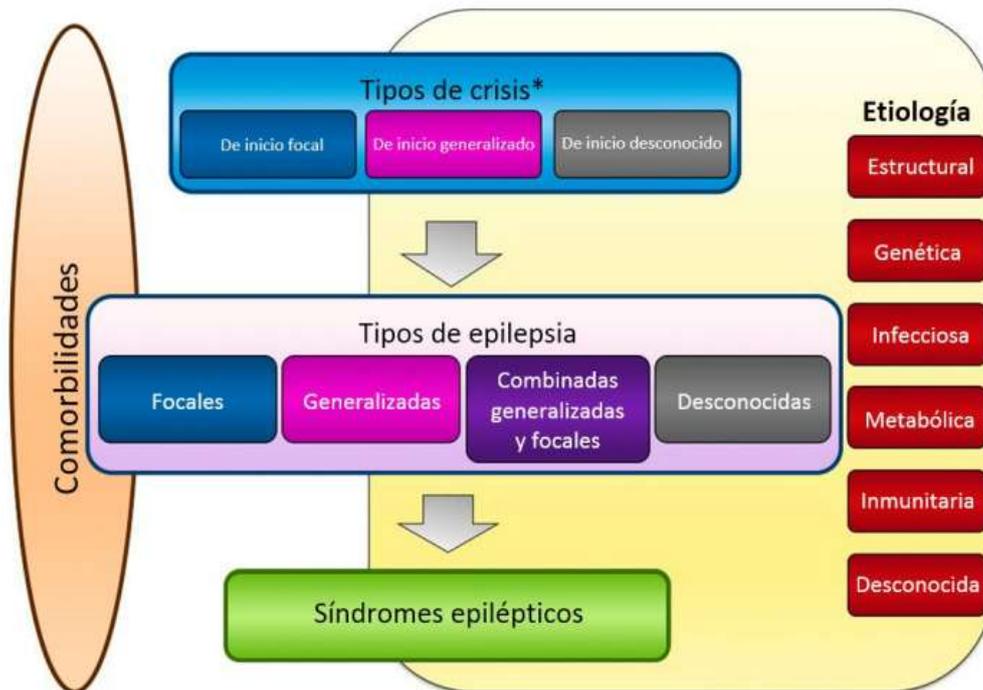


Figura 3. Marco para la clasificación de las epilepsias: esta presenta varios niveles y esta pensada para responder a la clasificación de la epilepsia en diferentes entornos clínicos. *Indica el inicio de las crisis

Etiología genética

El concepto de epilepsia genética por causas genéticas es la consecuencia directa de una mutación genética conocida o presunta en la que las crisis son uno de los principales síntomas del trastorno. Las epilepsias relacionadas con una etiología genética son muy diversas y, en la mayoría de los casos, aún se desconocen los genes subyacentes (Grinton y cols., 2015).

En primer lugar, la inferencia de una etiología genética puede basarse únicamente en los antecedentes familiares de un trastorno autosómico dominante.

En segundo lugar, la investigación clínica puede sugerir una etiología genética en poblaciones con el mismo síndrome, como crisis de ausencia infantil o epilepsia mioclónica juvenil.

En tercer lugar, puede haberse identificado una base molecular, que puede implicar un solo gen o una variante del número de copias de mayor efecto.

Cada vez son más los pacientes con anomalías genéticas conocidas causantes de epilepsias tanto graves como leves. La genética molecular ha permitido

identificar la mutación causal en un gran número de genes de la epilepsia, que se originan con mayor frecuencia de *novo*, en el 30-50 % de los niños con encefalopatías evolutivas y epilépticas severas (McTague y cols., 2016).

Etiología infecciosa

La etiología más común en todo el mundo es cuando la epilepsia es resultado de una infección. El concepto de etiología infecciosa remite al resultado directo de una infección conocida en la que las crisis son uno de los principales síntomas del trastorno. La etiología infecciosa hace referencia a un paciente que tiene epilepsia en lugar de un paciente que tiene crisis que se producen en el contexto de una infección aguda como la meningitis o la encefalitis. Algunos ejemplos comunes y que se presentan en regiones específicas del mundo incluyen neurocisticercosis, tuberculosis, VIH, malaria cerebral, panencefalitis esclerosante subaguda, toxoplasmosis cerebral e infecciones congénitas como el virus del Zika y el citomegalovirus (Vezzani y cols., 2016).

Etiología metabólica

Diversos trastornos metabólicos se asocian con la epilepsia. Esta área se está ampliando, y cada vez se comprende mejor el espectro fenotípico. El concepto de epilepsia metabólica se utiliza para designar el resultado directo de un trastorno metabólico conocido o presunto en el que las crisis son uno de los principales síntomas del trastorno. Las causas metabólicas hacen referencia a un defecto metabólico bien definido con manifestaciones o cambios bioquímicos en todo el organismo como porfiria, uremia, aminoacidopatías o crisis dependientes de piridoxina. En muchos casos, los trastornos metabólicos representan un defecto enzimático de tipo genético (Scheffer y cols., 2017).

Etiología inmunitaria

El concepto de epilepsia autoinmune refiere al resultado directo de un trastorno inmunitario en el que las crisis son uno de los principales síntomas del trastorno. Recientemente se ha reconocido una gama de epilepsias autoinmunes con

presentaciones características tanto en adultos como en niños (Vezzani y cols., 2016). Puede conceptualizarse una etiología inmunitaria en los casos en que hay evidencia de inflamación del sistema nervioso central mediada por anticuerpos.

Etiología desconocida

De etiología desconocida significa que todavía no se conoce la causa de la epilepsia. Sigue habiendo muchos pacientes con epilepsia cuya causa se desconoce. En esta categoría, no es posible establecer un diagnóstico específico aparte de la semiología electroclínica básica como la epilepsia del lóbulo frontal. El grado en que se puede determinar una causa depende del grado de evaluación disponible para el paciente. Esto difiere según los diferentes países y contextos de atención médica, y es de esperar que la situación mejore con el tiempo en los países de escasos recursos (Scheffer y cols., 2017).

Fisiopatología

Se piensa que las crisis epilépticas resultan de la falla de los mecanismos que normalmente terminan una crisis aislada. Éste puede surgir de la persistencia anormal de excitación excesiva o de una inefectiva inhibición. Los mecanismos propuestos son los siguientes:

- a. Hiperexcitabilidad hipocampal.
- b. Pérdida de la transmisión inhibitoria mediada por ácido gamma-aminobutírico (GABA) en el hipocampo.
- c. Transmisión sináptica excitatoria glutaminérgica. Se ha sugerido que en los primeros milisegundos a segundos hay fosforilación de proteínas, apertura y cierre de canales iónicos, liberación de neurotransmisores y moduladores y desensibilización de receptores (Chen y Wasterlain, 2006) En lapsos que varían de segundos a minutos, el tráfico de receptores resulta en movimiento de éstos hacia endosomas o su movilización desde sitios de almacenamiento a la membrana sináptica. Este proceso rápidamente cambia la excitabilidad y altera el número de receptores inhibidores y excitadores disponibles en la hendidura sináptica. En minutos a horas hay cambios desadaptados en neuropéptidos moduladores, lo que conduce a un estado de excitabilidad incrementada. Esto se demostró en estudios que revelaron descenso en el número de subunidades que forman el receptor GABA presentes en la membrana sináptica y un

incremento dentro de la célula. La endocitosis del receptor GABA puede explicar parcialmente la falla de la inhibición y la progresiva farmacorresistencia a las benzodiazepinas, lo que conlleva al estado epiléptico (EE) autosostenido (Nair y cols., 2011). El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro; antagonistas de sus efectos y alteraciones en su metabolismo en la sustancia negra pueden contribuir al EE (Bassin y cols., 2002).

Otros mecanismos como acumulación de cloro y bicarbonato intracelular pueden jugar un papel en la pérdida de la inhibición mediada por GABA. Al mismo tiempo, las subunidades de los receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolepropiónico y N-metil-D-aspartato (NMDA) se movilizan a la membrana sináptica, donde forman parte de receptores excitatorios adicionales (Nair y cols., 2011). Como resultado de la descarga simpática, el cuerpo responde al EE convulsivo con efectos cerebrales y sistémicos, mientras que en el no convulsivo los efectos sistémicos son más limitados. En la fase inicial del EE convulsivo, la presión arterial, glucosa y lactato se elevan y el pH disminuye. Treinta minutos después, comienza la segunda fase. En ella, la presión arterial y la glucosa se normalizan, al igual que el lactato, y sobreviene la falla respiratoria y la hipertermia.

El daño neuronal en la EE resulta de la estimulación neuronal sostenida mediada por NMDA que conduce a apoptosis. Cuando estas neuronas son despolarizadas, los iones Mg^{2+} bloquean los canales de salida y permiten la entrada celular de iones de sodio y Ca^{2+} , lo que resulta en una cascada de eventos citotóxicos mediados por Ca^{2+} y que conducen a daños a biomoléculas como el DNA, lisis y muerte celular. La muerte celular desencadenada de esta manera puede revertirse si se finaliza al EE dentro de la primera hora (Fig. 4) (Riviello y cols., 2006; Nair y cols., 2011).

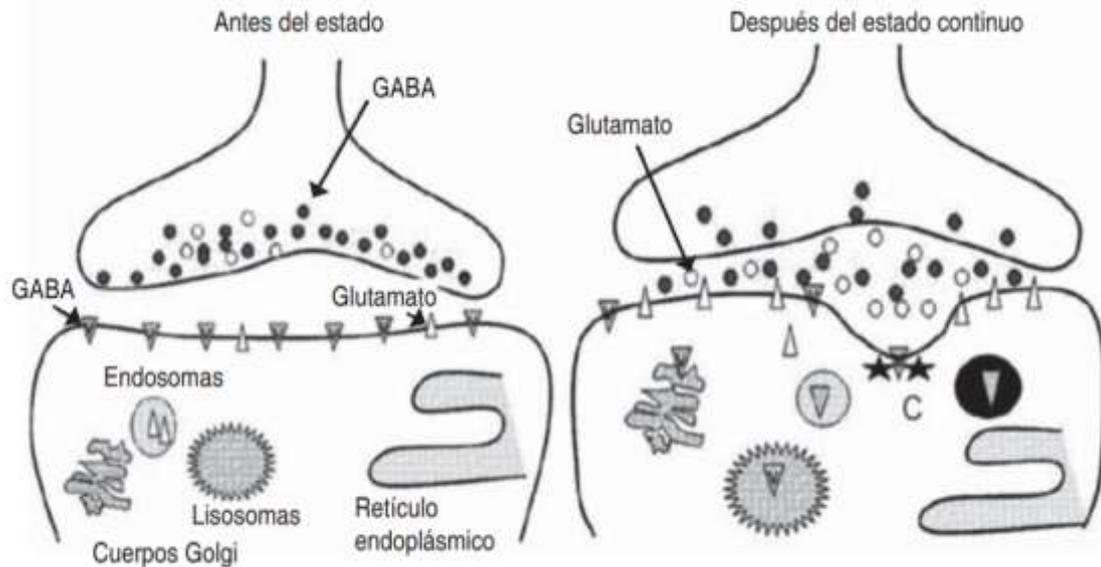


Figura 4. Diagrama que muestra cambios en los receptores postsinápticos después de estatus epiléptico continuo. Los receptores GABAérgicos son endocitados y su número es disminuido por la clatrina, las vesículas recubiertas de clatrina son destruidas por los endosomas; sin embargo, los receptores glutamato son suprarregulados. C = vesícula recubierta por clatrina.

Diagnóstico

El abordaje de una primera convulsión y la decisión de brindar o no tratamiento según el riesgo estimado de recurrencia se basa precisamente en que el médico tratante haya hecho un diagnóstico seguro de convulsión, diferenciando a la misma de múltiples imitadores (Louis y Cascino, 2016; Scheffer y cols., 2017). Un paciente con historial de convulsiones previas apoya el diagnóstico de epilepsia e indica un riesgo subyacente mayor de recurrencias. De acuerdo a esto, se desprende que la historia clínica es de vital importancia en el abordaje, así como una evaluación tanto física como neurológica al momento de presentación inicial.

Si la historia clínica está bien caracterizada se puede llegar al diagnóstico de convulsión epiléptica sin el apoyo de pruebas diagnósticas o de laboratorio. Sin embargo, es frecuente que surjan dudas debido a las similitudes entre este diagnóstico y muchas otras entidades. Se debe mencionar que a la fecha no existe ninguna prueba, hallazgo clínico o síntoma que por sí mismo de manera confiable pueda discriminar entre una convulsión epiléptica y otros tipos de eventos paroxísticos. Además de esto, el testimonio de un testigo tampoco es

infalible debido a que su recolección de los hechos puede ser variable (Krumholz y cols., 2007).

El diagnóstico diferencial debe ser amplio, debido a que múltiples desórdenes paroxísticos pueden imitar una convulsión, simulándola en aspectos tales como características fenotípicas, duración, características post-ictales e inclusive hallazgos electroencefalográficos.

Los llamados fenómenos no epilépticos son episodios de alteración en el movimiento, la sensación y la experiencia. Se distinguen de una convulsión epiléptica por su falta de asociación con anomalías eléctricas ictales. De un modo general, los fenómenos no epilépticos pueden dividirse en dos grandes grupos: entidades fisiológicas y entidades psicogénicas. A su vez, el conjunto de entidades fisiológicas se ha dividido en patologías neurológicas y no neurológicas. Los eventos psicogénicos son una fuente frecuente de confusión y son fenómenos similares a la convulsión, pero faltándole las características clínicas y electrofisiológicas de una convulsión verdadera.

Las entidades a considerar en el diagnóstico diferencial de síntomas transitorios paroxísticos son muy amplias y no serán profundizadas de manera individual. A modo de generalización, se puede decir que un inicio repentino de disfunción neurológica focal sin aviso sugiere una etiología vascular; la progresión lenta de los síntomas durante unos segundos sugiere un fenómeno ictal mientras que aquella progresión a lo largo de minutos u horas hace sospechar en una diátesis migrañosa. Sin embargo, existen excepciones a estas afirmaciones. En la tabla 1 se muestran más entidades paroxísticas dejándo fuera a la categoría de trastornos funcionales o psicogénicos, así como muchas otras patologías a considerar en este contexto clínico (Biller, 2011; Louis y Cascino 2016; Manji y cols., 2016; Shibasaki y Hallett, 2016; Scheffer y cols., 2017; Majersik, 2017;).

Las crisis psicógenas son de gran importancia en centros de atención especializados en epilepsia. Hasta el 88% de los pacientes con fenómenos no convulsivos son eventualmente diagnosticados con una etiología psicogénica como la explicación de su cuadro. El diagnóstico de estos fenómenos

psicogénicos se realiza basándose en toda la evidencia que tiene el médico tratante a disposición, incluyendo historia clínica, examen físico, la descripción y visualización si fuese posible de los eventos paroxísticos, así como los hallazgos (o falta de) en EEG ictal e interictal. No existe un punto único en el abordaje clínico que por sí solo sea patognomónico, lo que dificulta el diagnóstico. Sin embargo, retrasar el diagnóstico de convulsiones psicogénicas empeora el pronóstico del paciente. Actualmente se favorece un abordaje integral e integrado, lo cual podría ayudar en el diagnóstico, por lo que la terapia cognitiva pudiese ser de utilidad (Tabla 2) (Brumholz y Wiebe, 2015).

Tabla 1: *Diagnóstico diferencial de síntomas y signos neurológicos paroxísticos.*

Diagnósticos Neurológicos	Diagnósticos No Neurológicos
<ul style="list-style-type: none"> •Desórdenes psicológicos, psiquiátricos y del comportamiento (ataques de pánico, estado disociativo, alucinaciones en desórdenes psiquiátricos, reacciones de ira/berrinche entre otros) •Ataque Isquémico Transitorio •Migraña •Delirio •Trastornos hipercinéticos del movimiento •Parasomnias •Cataplejía •“Amiloid Spells” •Mioclono espinal 	<ul style="list-style-type: none"> •Síncope vasovagal •Hipotensión ortostática. •Convulsiones anóxicas reflejas. • Valsalva convulsiva •Obstrucción impuesta de vía aérea. • Síncope cardíaco. •Ataques hipercianóticos •Síndrome de Sandifer

Tabla 2: *Diferencias entre crisis convulsivas y crisis psicogénicas o pseudocrisis.*

	Signos	Hallazgos a la examinación
Convulsiones psicogénicas no epilépticas	<ul style="list-style-type: none"> • Larga duración. • Curso fluctuante. • Movimientos asincrónicos. • Movimientos pélvicos. • Movimientos de cabeza de lado a lado. • Cierre de ojos ictal. • Llanto/sollozo ictal, • Recuerdos activos del supuesto período de no respuesta 	<ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a la apertura palpebral • Protección activa de recibir golpes a la cara, • Evidencia de fijación visual.
Convulsiones Epilépticas	<ul style="list-style-type: none"> • Ocurrencia durante sueño confirmado por EEG. • Confusión/obtundación postictal • Respiración dificultosa postictal. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mordeduras linguales laterales severas • Reflejo corneal perdido • Respuesta plantar extensora

Tratamiento de la epilepsia

La finalidad del tratamiento farmacológico en la epilepsia es tener al paciente libre de crisis o con una reducción en su frecuencia y severidad, así como con mejoría en su calidad de vida. En los últimos años se han incrementado las opciones terapéuticas en el tratamiento de la epilepsia. A pesar de todo esto, aún no se ha podido encontrar un fármaco antiepiléptico ideal. Si bien es cierto que hay muchos estudios que muestran evidencia para el uso de los fármacos nuevos en epilepsia focal en pacientes resistentes, muchos de ellos aún no han sido probados en pacientes de diagnóstico reciente. En epilepsia generalizada

el número de trabajos es limitado, y se necesita más evidencia para realizar recomendaciones específicas en esta población (Consalvo y cols., 2013).

Los estudios clínicos han demostrado que fármacos de nueva generación tienen igual eficacia, mayor tolerabilidad, mayor espectro de acción y menos interacciones en relación con los fármacos clásicos. Sin embargo, estos estudios analizan poblaciones seleccionadas de pacientes, y muchos de ellos resultan complejos al intentar correlacionarlos con la práctica clínica diaria. En países subdesarrollados el costo económico de estos medicamentos, es aún alto. Es por ello que la valoración de un fármaco no solo debe sustentarse en la eficacia demostrada en los ensayos clínicos, sino en la tolerabilidad, que mide la incidencia, severidad e impacto de los eventos adversos causados por el medicamento en el paciente. La combinación de ambos conceptos es la efectividad (Glauser y cols.,2013), que es lo que determina que el paciente continúe tomando la medicación a lo largo del tiempo. Por lo tanto, para evaluar el verdadero impacto de los fármacos en el tratamiento deberían realizarse análisis de costo-efectividad.

Teniendo en cuenta la definición de la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) de 2005 (Glauser y cols.,2013), que para realizar el diagnóstico de epilepsia se requiere al menos la ocurrencia de una crisis epiléptica, se ha decidido considerar a los 2 primeros ítems de forma conjunta y realizar una discusión acerca de la decisión terapéutica. También se cambia la denominación de epilepsia refractaria por resistente a fármacos (Kwan y cols., 2010) y se elimina del análisis el grupo de pacientes no respondedores a fármacos de primera línea, considerando que esta discusión se realizará en los pacientes resistentes. En consecuencia, los grupos a considerar serán solo 1) Pacientes que inician el tratamiento, 2) Pacientes con epilepsia resistente a fármacos.

1. Pacientes que inician el tratamiento

Cuando un paciente se presenta en la consulta por una primera crisis no provocada se debe confirmar primeramente la naturaleza epiléptica del episodio realizando un interrogatorio detallado del evento y apoyarse en los exámenes complementarios, tales como el EEG y las IRM.

Muchos estudios epidemiológicos han analizado los parámetros de recurrencia en los pacientes tras el primer evento. Un examen físico neurológico anormal y/o una IRM anormal, mostrando una lesión epileptogénica; la presencia de espigas, poliespigas, espiga-onda y ondas agudas, especialmente si el patrón en el EEG es de espiga-onda son característicos de un EEG anormal con actividad epileptiforme. Otras variables que indican un mayor riesgo de recurrencia de crisis son la historia —en un familiar de primer grado— de epilepsia; la presencia de crisis durante el sueño y crisis focales (Fisher y cols., 2008).

Analizando también la evidencia que existe con relación al tratamiento de una primera crisis se encuentran 2 estudios abiertos: *el First Seizure Trial Group (FIRST)* y *el Multicentre Study of Early Epilepsy and Single Seizures (MESS)*. En ellos, los pacientes fueron divididos en 2 grupos, aquellos que fueron asignados a recibir tratamiento farmacológico de forma inmediata y aquellos que fueron asignados a recibirlo de forma diferida (Marson y cols., 2005). Ambos estudios demostraron que diferir el tratamiento no modifica el pronóstico a largo plazo de la enfermedad. A pesar de haber diferencias en cuanto a los resultados, siendo más favorable el beneficio del tratamiento precoz en el FIRST con respecto al MESS, no sería de mala práctica diferir el tratamiento hasta que ocurra una segunda crisis, excepto que el paciente tenga alguna de las variables que se asocian con un pronóstico desfavorable, o que diferir el tratamiento sea, desde el punto de vista del médico y del paciente, razonablemente inaceptado. Con esta idea fue que la ILAE entonces consideró que para realizar el diagnóstico de epilepsia el paciente debería tener al menos una crisis y con un solo episodio podría iniciarse un tratamiento farmacológico (Fischer y cols., 2005).

La elección de un fármaco para un paciente en particular debe basarse en las evidencias aportadas por la literatura sobre la eficacia, evaluada a través de los

estudios clínicos controlados, aleatorizados y bien diseñados, teniendo en cuenta además el perfil de tolerabilidad (Peruca, 2011).

Como ya se mencionó, la elección definitiva de un fármaco para un paciente con epilepsia recientemente diagnosticada o no tratada no solo debe analizar la eficacia, sino también otras variables tales como:

- Específicas del fármaco: perfil de seguridad (potencial de generar efectos adversos como reacciones de idiosincrasia, efectos teratogénicos y efectos crónicos secundario; las propiedades farmacocinéticas (potencial de inducción enzimática, interacciones con otros medicamentos), el tipo de formulaciones existentes (por ejemplo, disponibilidad de formulaciones endovenosas u orales, tiempo en alcanzar la dosis objetivo eficaz), el coste y la disponibilidad.
- Específicas del paciente: pacientes en edad gestante, si se trata de un individuo añoso y las enfermedades coexistentes o comorbilidades que presenta. Estas últimas deben tenerse en cuenta no solo debido a las interacciones con los otros fármacos utilizados para tratarlas, sino también porque algunos antiepilépticos pueden afectar positiva o negativamente a los trastornos comórbidos (Peruca 2011).

2. Pacientes con epilepsia resistente a fármacos

La ILAE ha establecido recientemente que debe considerarse farmacorresistente a aquel paciente en el cual no se haya logrado la reducción de las crisis epilépticas después del uso de al menos 2 fármacos anticomiciales apropiados, ya sea que hayan sido utilizados en monoterapia o en combinación (Kwan y cols., 2010). Esto se fundamenta en que las posibilidades de responder al tratamiento farmacológico con la sucesiva incorporación de otros fármacos se reducen de forma significativa. Según estudios prospectivos controlados y aleatorizados, la posibilidad de remisión en pacientes que no respondieron al uso de varios fármacos previos es menor al 10% (Perucca 2011, Kwan y Brodie 2000; Brodie y cols., 2012). No se encuentran en la literatura análisis de combinaciones farmacológicas que puedan utilizarse como guía en pacientes resistentes.

Los aspectos que deberían ponerse en consideración al intentar un nuevo fármaco en este grupo de pacientes son: espectro y mecanismos de acción,

eficacia, perfil de eventos adversos, el efecto esperado en función de las características del paciente y la posibilidad de interacciones, ya sean farmacocinéticas o farmacodinámicas (Perucca 2011). Para pacientes farmacorresistentes es imprescindible realizar una detallada anamnesis de la historia farmacológica, conociendo qué fármacos tomó, a qué dosis, cuáles fueron las causas por las cuales debió suspenderse cada uno, qué grado de respuesta presentó con cada fármaco, cómo fueron los esquemas en combinación, cómo fueron incorporados y titulados los fármacos, cómo se suspendieron y cuál fue la adherencia del paciente al tratamiento indicado. Tampoco es conveniente que esta situación se convierta en inercial y perdure a lo largo del tiempo, evitando así el beneficio potencial de otros tratamientos, como puede ser la posibilidad de una cirugía, tal como se plantea en la guía de definición de epilepsia resistente de la ILAE (Kwan y cols., 2010).

El manejo de los pacientes que no responden a los fármacos en monoterapia debe establecerse utilizando una cuidadosa politerapia individualizada. La mayor amenaza en este grupo de pacientes es el uso excesivo de fármacos en politerapia, ya que el sobret ratamiento también puede afectar la calidad de vida.

Farmacogenética

La farmacogenética se define como el estudio de variaciones en la secuencia de ADN en relación con la respuesta a fármacos, y el término "farmacogenómica" se usa para definir las repercusiones de estas variaciones desde el ADN, ARN y los productos para los que codifican en relación con la respuesta a los fármacos (The United States Food and Drug Administration; The European Medicines Agency) El objetivo de la farmacogenómica es individualizar el tratamiento farmacológico identificando el fármaco y dosis óptimas para cada individuo en función de la información genética, reduciendo así las reacciones adversas a los medicamentos (RAM) y los costos del tratamiento. Hoy en día, se reconoce que las fallas terapéuticas o las RAM pueden estar asociadas directamente a un componente genético (Meyer, 2004).

La farmacogenética como disciplina se remonta a la década de los 50s, cuando Alf Alving y colaboradores en 1952 observaron que el medicamento antipalúdico

primaquina producía hemólisis intravascular en aproximadamente el 10% de los afroamericanos, pero rara vez en los caucásicos. Unos años más tarde, Hockwald y colaboradores (1956), demostraron que esto era causado por una deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). También, se describió la variación genética en respuesta a la succinilcolina, que se usa como relajante muscular en anestesia. Se demostró que la parálisis neuromuscular prolongada se debía a una deficiencia en la enzima metabolizadora pseudocolinesterasa. A principios de la década de 1950, se introdujo la isoniazida en el tratamiento de la tuberculosis (Lehmann y Ryan, 1956; Kalow y Genest, 1957) y poco después, se observaron diferencias individuales en el metabolismo del fármaco, permitiendo clasificar a las personas como acetiladores rápidos o lentos. Este último tipo de pacientes presentaron una mayor frecuencia de neuritis periférica relacionada con la toxicidad por isoniazida (Evans y col., 1960). Aunque el polimorfismo de acetilación fue el objetivo de una intensa investigación y uno de los mejores ejemplos de diferencias individuales en la respuesta a los medicamentos, no fue sino hasta 40 años después que se caracterizó el mecanismo molecular real (Blum y col., 1991).

Unos años más tarde, Friedrich Vogel (Vogel, 1959), introdujo el término "farmacogenética" y posteriormente se describieron nuevos ejemplos de variación genética en la respuesta al fármaco, pero fue el descubrimiento del polimorfismo debrisoquina/esparteína de la oxidación del fármaco a fines de la década de 70s lo que detono las investigaciones cuando dos grupos observaron diferentes reacciones adversas inesperadas a medicamentos, y los estudios posteriores mostraron que ambos medicamentos son metabolizados por la misma enzima, una monooxigenasa del citocromo *P450* (CYP), que luego se designó como *CYP2D6*. El gen *CYP2D6* también fue el primer gen polimórfico que afectó la respuesta del fármaco que se clonó y caracterizó (González y col., 1988). *CYP2D6* afecta el metabolismo de numerosos fármacos de uso común y es altamente polimórfico, por lo que se ha convertido en un modelo de la farmacogenética.

El metabolismo de los medicamentos o xenobióticos, en general protege al cuerpo humano contra los posibles efectos nocivos de los compuestos extraños

introducidos al organismo (Evans y Relling, 1999). En las reacciones de fase I, tales como oxidación, reducción e hidrólisis, los grupos funcionales de los compuestos extraños se modifican. Además, en la fase I, las enzimas aumentan la polaridad de los compuestos lipofílicos por medio de oxidaciones, reducciones o hidrólisis. En las reacciones de la fase II, los sistemas enzimáticos actúan sobre el grupo reactivo introducido en la fase I (Rodríguez y cols., 2010). La reacción catalizadora más común es la monooxigenación o la inserción de un átomo de oxígeno en el sustrato orgánico (RH) y la síntesis de agua (Rodríguez y cols., 2010).

La mayoría de las enzimas de fase I pertenecen a la familia de enzimas citocromos *P450*. Las enzimas de fase II, como las: uridina-difosfato glucuroniltransferasa (UGT), las N-acetiltransferasas (NAT), la tiopurina S-metiltransferasa (TPMT), las enzimas glutatión transferasas y las sulfotransferasas, se conjugan con los sustratos endógenos (Evans y Relling, 1999).

Polimorfismos tipo SNV en la Variabilidad genética

En una población dada, no todas las copias de un gen presente pueden tener la misma secuencia de nucleótidos; a esta variación se le denomina polimorfismo, y estos polimorfismos contribuyen a la variabilidad observada en la población (Leeder, 2001). De esta forma, los polimorfismos genéticos surgen como un elemento del potencial papel de la variabilidad en la farmacocinética y la farmacodinámica de los medicamentos (Loscher y cols., 2009).

Los polimorfismos corresponden a variaciones en la secuencia de ADN, y los polimorfismos de nucleótido único (SNV, del inglés *single nucleotide variation*) son la forma más frecuente de variación en el genoma humano (Leeder, 2001). Corresponden a versiones de pares de bases únicas en una posición específica de la secuencia alternativas (alelos) en individuos normales de la población. Para diferenciarlas de las mutaciones, el alelo menos frecuente se presenta en más del 1% de la población general. Se estima que los SNVs ocurren en alrededor de uno cada 1.000 pares de bases y se encuentran dentro de todo el genoma, incluyendo promotores, exones e intrones (Laing y cols., 2011).

Dado que los transportadores ABC impactan en los niveles circulantes o el acceso de los FAE a sitios terapéuticos, su análisis en estudios genéticos tiene una base lógica desde el principio farmacocinético para su uso clínico (Ferrano y cols., 2006).

Los fenotipos asociados al metabolismo que se derivan de estos polimorfismos son conocidos como Metabolizadores Ultrarrápidos (MU), Metabolizadores Rápidos (MR), Metabolizadores Intermedios (MI) y Metabolizadores Lentos (ML), como se muestra en la Figura 5. El fenotipo clínico más importante y distribuido globalmente, es el fenotipo MU. Estos pacientes no responden a las dosis ordinarias, pueden formar metabolitos tóxicos y tener niveles excesivos de droga activa. Cuando el paciente es tratado con precursores de la droga; la explicación a nivel genético es el gran número de copias activas del gen en el mismo alelo o el incremento en la expresión de un gen homocigoto. Por otro lado, los sujetos con el fenotipo ML, incrementan la posibilidad de tener reacciones adversas y corren el riesgo de que la droga no cause el efecto requerido. es decir, En ellos, suelen presentarse la inactivación de la enzima debido a una gran cantidad de alelos con defectos como pérdidas de bases, substituciones o inserciones. Los MR son aquellos que sufren una duplicación o amplificación de los genes y que pueden presentar hasta 13 copias en tándem. Los MI son menos eficientes que los fenotipos normales, rápidos o ultrarrápidos, pero más eficientes que los metabolizadores lentos. La identificación de las variantes alélicas responsables de estos fenotipos asciende aproximadamente a 360 diferentes alelos (Ingelman y Sim, 2010).

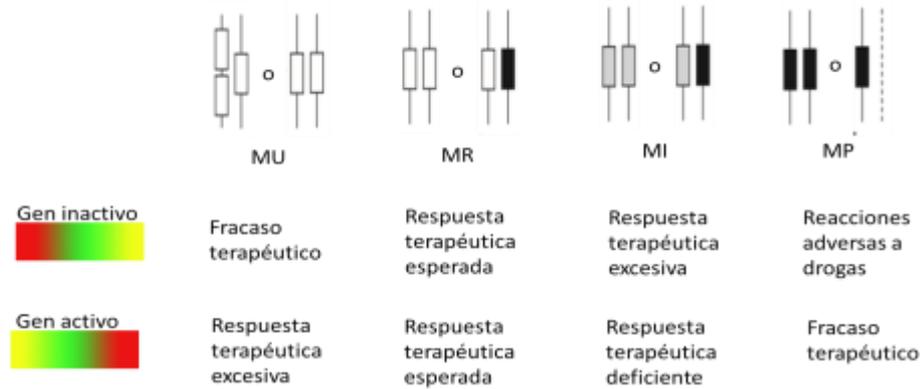


Figura 5. Esquema de la clasificación típica de fenotipos basada en genotipos y sus respuestas clínicas según el tipo de reacción catalizada por la enzima polimórfica. MU: Metabolizador Ultrarrápido; MR: Metabolizador Rápido; MI: Metabolizador Intermedio; MP: Metabolizador Pobre. Tomado de (Zanger y cols., 2004).

ANTECEDENTES

Los CYP constituyen una superfamilia de enzimas hemo-tiolato; actualmente se conocen más de 7000 miembros individuales encontrados en diferentes organismos (Nelson, 2006). El término citocromo *P450* se deriva de un pigmento (P) que tiene un pico espectral de 450 nm cuando se reduce y se une al monóxido de carbono. Las enzimas CYP generalmente son hidrófobas y se asocian con membranas. En la década de los 80s se aislaron y caracterizaron los primeros CYP (Nebert y Russell, 2002). La nomenclatura CYP se basa en las relaciones evolutivas y las proteínas se clasifican en familias indicadas por un número ($\geq 40\%$ de identidad de secuencia de aminoácidos), y en subfamilias indicadas por una letra ($\geq 55\%$ de identidad de secuencia de aminoácidos) (Nelson, 2006). Actualmente, hay 781 familias diferentes de CYP, 110 de las cuales han sido identificadas en animales. Los humanos tienen 57 genes activos CYP funcionales organizados en 18 familias.

La superfamilia del citocromo *P450* se caracteriza por una alta variabilidad genética, sus productos son isoenzimas de hemoproteínas (Zhou y cols., 2009) que se expresan en los microsomas hepáticos (Ingelman y Sim, 2010) y catalizan reacciones de la fase I y fase II de un número importante de compuestos endógenos (esteroles, esteroides, ácidos grasos, entre otros) y exógenos (xenobióticos con estructuras químicas muy diferentes). Más del 80% de los fármacos son metabolizados por las *CYP450*. Estas enzimas se han

caracterizado en diversas poblaciones y sus variaciones genéticas se asocian con cambios en el metabolismo, después de la ingestión oral vía tracto digestivo, los fármacos entran al cuerpo por transporte activo o difusión facilitada, el proceso de absorción de fármacos anfipáticos se lleva a cabo principalmente por difusión pasiva no requiriendo energía. La tasa y el alcance de absorción depende de diversos factores fisicoquímicos y propiedades de las sustancias, la formulación de los fármacos y la concomitancia con el consumo de alimentos u otros fármacos, así como motilidad y vaciado gástrico. Los fármacos también pueden entrar al cuerpo por otras vías alternas de administración y algunas de ellas, como la intravenosa no requiere absorción (Speight y Holford, 1997).

La mayoría de los CYPs metabolizadoras de fármacos (EMFs) de fase I, que se encuentran unidas a las membranas, predominantemente en el retículo endoplásmico, mitocondrias y ocasionalmente en la membrana plasmática y las menos en el citoplasma, se unen a los sustratos químicos hidrófobos e inicia la descomposición de estos compuestos que ingresan al cuerpo, las variaciones genéticas se clasifican en alelos (homocigotos, heterocigotos), mutaciones y polimorfismos (Nebert y Dalton, 2006).

El estudio de los defectos genéticos asociados a la farmacorresistencia de antiepilépticos, fueron inicialmente basados en la farmacodinamia, farmacocinética y metabolismo (Meyer, 2000).

CYP2D6

De los genes más estudiados asociados al metabolismo de los fármacos, está el *CYP2D6*, está clasificado como metabolizador pobre o lento, con una prevalencia alterada de entre 6 y 10% en la población (Cassandra y cols., 2006). El potencial de la sobre expresión de este gen se refleja en la alteración de la absorción, distribución, transporte y vaciado gástrico de los fármacos, incluso puede verse afectada la interacción con otros genes que actúen como reguladores para inducir o inhibir otros genes involucrados en el metabolismo de fármacos como el *PXR* y *CAR* (receptores constitutivos). A su vez, los productos de estos genes inducen a otros miembros de la familia *CYP450*. (Cassandra y cols., 2006), también acetiladores lentos con una frecuencia entre el 40 y 70%, en caucásicos

pero menor en asiáticos, de entre 10y 20% (Blum y cols., 1991). En contraste, la deficiencia en enzimas que actúan como metabolizadores lentos de anticonvulsivantes como la fenitoína son menos frecuentes en caucásicos de 3 a 5% aproximadamente y más común en asiáticos del 15 al 20% aproximadamente (Cramer y cols., 1998).

De manera más específica, el polimorfismo rs1065852 que se localiza en el exón 1 del gen *CYP2D6*, está presente en un 5-10% en pacientes homocigotos recesivos entre de la población caucásica, y que actúan como metabolizador lento para la debrisoquina, usado como antidepresivo. Este tipo de pacientes también metabolizan ineficientemente más de 30 fármacos clínicamente usados como antidepresivos, neuroepilépticos, opioides y fármacos cardiovasculares. En pacientes con la enfermedad de párkinson están directamente asociados a diversos desordenes neurodegenerativos (Massaki y cols., 1990). Se ha reportado que pacientes homocigotos para el polimorfismo rs118203758 tiene un comportamiento lento debido a que sus alelos no son funcionales (Dahl y cols., 1995). En 1967 se reportaron variaciones en metabolismo de carbamazepina, gabapentina, debrisoquina, nortriptelina y desimepramina asociado al gen *CYP2D6*.

Folke Sjoqvist, y Hammer (1967) reportaron una variación de la concentración plasmática de nortriptelina y desimipramina entre la población con la misma dosis y vía de administración. Mas tarde, se identificaron dos tipos de metabolizadores lentos (rs1065852 y rs11820378) y su asociación de origen genético. Este estudio, mostró claramente una causa genética para el fenotipo de un metabolizador lento (Ingelman y Sim, 2010). Posteriormente, Meyer (1990) demostró en población sana europea que presentaba la variante *CYP2D6*2* la incapacidad de metabolizar debrisoquina. Ese mismo año, también se identificó la asociación entre la variante alélica *CYP2D6*4* con una nula capacidad de metabolizar este fármaco (Massaki y cols., 1990). Aunque el metabolismo asociado para *CYP2D6* es lento, en población oriental no se identificaron problemas de ausencia metabólica.

Ante esas contradicciones, fue necesario identificar más variantes alélicas asociadas al metabolismo lento. Se identificó la variante *CYP2D6*10* para el Tomaxifeno en pacientes con cáncer; este fenotipo se reportó de manera más frecuente en población de china (Kiyotani y cols., 2010). Las variantes alélicas más frecuentes que se asocian con una deficiencia en la actividad metabólica de esta isoenzima, están en los alelos *3, *4, *5 y *6, y representan el 97% de las variantes no funcionales en caucásicos. El alelo *CYP2D6*4*, identificado como metabolizador lento, es el más común en población europea con una frecuencia del 17.2% y las poblaciones africanas mostraron una prevalencia ligeramente menor del alelo *4 en comparación con los afroamericanos (del 3,3% al 6,4%, respectivamente), pero una prevalencia similar del alelo *17 (19,9% para los africanos, el 18,1% para los afroamericanos) en los datos del CPIC (Relling 2011).

El alelo *CYP2D6*10* es el más común en población asiática con una frecuencia que oscila entre el 51.6 y 64.6%, con un 45% en población china, 37% en coreana, 42% en japonesa, y 49.5 en población malaya. En poblaciones sudafricana y caucásica se presenta con una frecuencia menor al 3%. El alelo *CYP2D6*17* también está asociado con una baja actividad metabólica y se presenta con una frecuencia del 19.1% en afroamericanos, sin embargo, en poblaciones del norte de África tiene una frecuencia del 28.3% (Zhou y cols., 2009).

La frecuencia de metabolizadores pobres en población mestiza Mexicana es del 10% (López, 2005), similar a la de españoles caucásicos de 6.6 a 10% pero superior a lo reportado en otras poblaciones de América Latina (Mendoza y cols., 2001). También hay reportes del 3.2% de presencia de metabolizadores pobres o lentos en población México-Americana, mientras (Isaza y cols., 2000) reportaron un 6.6% de este mismo metabolizador en población Colombiana y (Jorge y cols., 1999) reportaron frecuencias del 4.4 y 2.2% en indígenas Embera y Ngawbe de Panamá y Colombia, respectivamente.

Otra aportación importante del gen *CYP2D6* fue la identificación de un fenotipo ultrarrápido al presentarse varias copias del gen en el mismo alelo (Ingelman y Sim 2010). La presencia de individuos con fenotipo de metabolizadores ultrarrápidos fue reportado por Bertilsson y colaboradores (1985) en un individuo

tratado con nortriptilina. El paciente era portador de tres copias del gen *CYP2D6* y por tal motivo, dosis normales de antidepresivos eran ineficientes. Investigaciones posteriores confirmaron la relación entre pacientes que portan duplicaciones del gen y la baja o nula respuesta a fármacos antidepresivos. Lo anterior, obligó a estudiar el genotipo de pacientes con problemas de toxicidad e intentos de suicidio, los resultados demostraron una relación directa entre la duplicación del gen *CYP2D6* y pacientes con intentos de suicidio, concluyendo que los UM no tienen una respuesta apropiada a la terapia farmacológica (Ingelman y Sim, 2010).

CYP2C9

El *CYP2C9* es uno de los genes más abundantes en el humano, debido a su variedad de isoformas; representa el 20% de los miembros de la superfamilia de *CYP450* (Xie y cols., 2002). Participan en el metabolismo de esteroides, agentes anti-inflamatorios, antiepilépticos, anticoagulantes, entre otros. Los polimorfismos del gen *CYP2C9* se asocian con la toxicidad de las drogas. En el caso de los antiepilépticos, provoca que no se mantengan las concentraciones adecuadas en sangre, pueden conducir a episodios severos de crisis a lo largo del tratamiento (Miners y Birkett, 1998). Mutaciones en las variantes genéticas del *CYP2C9* (rs1799853 y 1057910) inhiben la catálisis del ácido valproico, fenobarbital y fenitoína. Cuando se comparan los genotipos de pacientes con respuestas normales a estos fármacos con el de pacientes que no lo hacen, resulta claro la relación de los diversos alelos del gen *CYP2C9* con la reducción metabólica en estos fármacos (Cassandra y cols., 2006).

Los polimorfismos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* representan aproximadamente el 85% de todos los polimorfismos con una frecuencia del 2 al 6% en la población caucásica (Xie y cols., 2002). La población caucásica (Europa y Norteamérica) y del Medio Oriente tienen una prevalencia de 12,6% y 13,2% para el alelo *2; respectivamente y de 7,1% para los caucásicos y 9,3% para los de Oriente Medio para el alelo *3 (Relling y cols., 2011). El alelo *CYP2C9*2* tiene una prevalencia inferior al 1% en las poblaciones chinas, pero puede alcanzar una prevalencia de hasta el 19% en ciertas poblaciones europeas (Mizzi y cols., 2016; Goh y cols., 2017). En el caso del alelo *CYP2C9*3* la frecuencia es baja y similar en la

población China, de Mongolia y japonesa, en comparación con la población caucásica y africana (Yang y cols., 2010). Ambos alelos causan una reducción en la eliminación de diversas drogas antiepilépticas con un comportamiento contrario al observado para el genotipo CYP2C9*1/*1. El genotipo CYP2C9*3/*3 presenta una eliminación de los FAE de hasta un 10%. Por otro lado, el genotipo CYP2C9*1/*2 y el CYP2C9*1/*3 requieren de una dosis menor en comparación con individuos de cualquier otro genotipo hasta de un 10 al 20% y del 20 al 50% respectivamente (Xie y cols., 2002).

CYP2C19

El gen *CYP2C19* y sus alelos se caracterizan por metabolizar antiácidos, antiepilépticos (fenitoína, principalmente) y algunas clases de antidepresivos; en general. La mayoría se asocian con un metabolismo lento. Las concentraciones plasmáticas de las drogas en individuos con variantes alélicas de *CYP2C19*, pueden estar por debajo del estándar, no presentar actividad a las dosis prescritas y por consiguiente no se observa respuesta a la terapia. Las variaciones genéticas en *CYP2C19*2* y *CYP2C19*3* presentan proteínas defectuosas sin actividad enzimática en las poblaciones interétnicas de todas las razas (Gardiner y Beg, 2006).

Los alelos más representativos de esta familia de citocromos son el *CYP2C19*2* con una frecuencia del 2 al 5 % en población caucásica y africana, y el *CYP2C19*3* con una frecuencia del 10 al 23% en población asiática (Kostas y cols, 2007). Alexandre (2011), reportó que la frecuencia alélica de *CYP2C19*2* en población asiática, europea y africana oscilaba del 6 al 8%., similar a la reportada para poblaciones de Japón y África (Goldstein, 1997). En la población brasileña, una de las poblaciones más heterogéneas del mundo desde una perspectiva genética, es de 9.8%. La frecuencia que se reportó en la población asiática fue significativamente mayor en comparación con la población caucásica (Alexandre, 2011).

Con respecto a *CYP2C19*3*, se ha obtenido una frecuencia significativamente menor en comparación con otras poblaciones asiáticas de Taiwán, Japón y Corea. Sin embargo, es significativamente mayor que en caucásicos y africanos con un 6.7% (Alexandre, 2011). El cambio de un solo nucleótido en el exón 5

genera un cambio en el marco de lectura de la proteína produciendo una variante *CYP2C19*2* se presenta con una frecuencia del 28.9 al 31.2% en población asiática, de 12.7% población caucásica y de 18.2% en población afroamericana. El fenotipo *CYP2C19*3* es producto de la sustitución G>A en la posición 636 del transcrito del exón 4, crea un codón de terminación prematuro; la frecuencia en población asiática es de 5.7 al 9.6% y en caucásicos de 0.9% (Zhou et al, (2009).

Los genotipos *CYP2C19*2/*2*, *CYP2C19*2/*3* y *CYP2C19*3/*3* se identifican como metabolizadores lentos en la población de Mongolia con una frecuencia del 8%, alta en comparación con caucásicos y africanos que presentan una frecuencia del 2% (Bertilsson, 1995). Por otro lado, estos mismos alelos se presentan de manera similar en población china, y en población taiwanesa (Liu y cols., 2010).

Por otro lado, los polimorfismos del alelo *CYP2C19*17* se identifican como aceleradores del metabolismo gracias al sitio polimórfico localizado en la región 5' río arriba del origen de la transcripción del DNA; el polimorfismo -806 C>T tiene una frecuencia alélica del 22% en población caucásica en general y específicamente 18% en población de Holanda y Etiopia, el polimorfismo -3402 C>T tiene una frecuencia alélica del 22% en población caucásica y 4% en población china (Sim y cols., 2006). En el caso particular de fenitoína, ácido valproico y de fenobarbital, los polimorfismos rs4986893 y rs4244285 del gen *CYP2C19* se asocian con la reducción en el metabolismo, como se mostró en un estudio con 56 pacientes, donde el 57% presentaron estas variantes y se les asoció con la disminución en el metabolismo, por lo que el 68% de esta población requirió terapia concomitante (Zhou y cols., 2009).

CYP3A4

La familia *CYP3A* está asociada con el metabolismo de más del 50% de las drogas antiepilépticas (Lamba y cols., 2002), además de esteroides, antidepressivos, agentes inmunosupresores y antibióticos (Shih y cols., 2002), siendo el *CYP3A4-B* el miembro más sobresaliente. De todas las variantes, esta isoforma tiene la frecuencia más alta en la población greca de 94.35%, seguida de la población inglesa (94%), holandesa (91.7%), francesa (82%), portuguesa (7%) y española con un 5.5% (Kostas, 2007; Rodríguez, 2010). La inducción y

sobre-expresión del gen *CYP3A4* mediante la heterodimerización del receptor X pregnanos (*PXR* o *NR1/2*) con el promotor del *CYP3A4* mostró su relación con el metabolismo de la carbamazepina y la determinación de la dosis con respecto a la concentración inicial (Sahara y cols., 2005). La función primaria de este la detección de sustancias tóxicas o extrañas en la célula y activar la expresión de proteínas encargadas de su desintoxicación y eliminación. El *CYP3A4* inhibe o induce a otros genes que pueden estar implicados en el metabolismo como *PXR*, *CAR* (receptor constitutivo de androstona) (Anderson, 2004) o diferentes miembros de la familia del *CYP450*, lo que incrementa el ritmo metabólico de los antiepilépticos y puede afectar al fenotipo (Cassandra y cols., 2006).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde el año 2001, la OMS indica que la epilepsia significa un problema de salud pública por su magnitud, trascendencia y vulnerabilidad. Los estudios de prevalencia demostraron la repercusión social y la mala calidad de vida, no sólo en los pacientes, sino en su núcleo familiar. En la mayoría de los pacientes, el control de las crisis es con el tratamiento farmacológico. Sin embargo, en una tercera parte de los pacientes la epilepsia persiste a pesar del uso de dos o tres FAE's a concentraciones elevadas, casi tóxicas y un monitoreo adecuado del tratamiento (Sander, 1993; Regesta y Tanganelli, 1999). La epilepsia resistente a fármacos incrementa la morbilidad, mortalidad y la carga económica de las instituciones de salud (Regesta y Tanganelli, 1999). La morbilidad y mortalidad incluyen las lesiones accidentales, el deterioro cognitivo, muerte súbita y el deterioro psicosocial. Las lesiones accidentales típicamente incluyen fracturas, quemaduras, lesiones dentales y TCE.

A pesar del progreso en el entendimiento de la patogénesis de las crisis, hay poca información de sus bases fisiopatológicas para muchos tipos de convulsiones y síndromes epilépticos (Lothman, 1996; Löscher, 2002). Los pacientes epilépticos que no controlan adecuadamente la frecuencia de sus crisis bajo un tratamiento de terapia combinada con nuevos antiepilépticos, se diagnostican como farmacorresistentes. Al respecto, en México se desconoce la asociación entre los polimorfismos de las enzimas encargadas de su metabolismo que constituyen genes candidatos con los niveles terapéuticos plasmáticos de los antiepilépticos y la farmacorresistencia en estos pacientes.

JUSTIFICACIÓN

Las causas de la epilepsia refractaria son variadas e involucra un proceso multifactorial. Por ello se han buscado opciones alternativas que puedan explicar la falta de efecto para controlar las crisis epilépticas con la administración de tratamientos farmacológicos, como el abordaje quirúrgico. La cirugía ha demostrado una menor morbimortalidad que la misma enfermedad, logrando en el paciente una mejor calidad de vida. Sin embargo, no todos los pacientes se ven beneficiados o son candidatos para realizar los procedimientos (Spitz y cols., 1994; Buck y cols., 1997; Malgrem y cols., 1997; Sperling y cols., 1999).

Por otro lado, la farmacogenética ha logrado obtener entre 40 y 50% resultados favorables para el control de las crisis epilépticas al identificar las diferencias genéticas entre pacientes con el mismo síndrome epiléptico y las reacciones adversas al tratamiento farmacológico (Humma, 2002). De forma específica, se ha demostrado la variabilidad metabólica de los fármacos y su asociación con los citocromos *P450*, con las repercusiones tóxicas o la ausencia del efecto terapéutico, que se corrobora por los niveles séricos durante el monitoreo del paciente (Cassandra y cols., 2006; Kostas y cols., 2007).

Los genes *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* y *CYP3A4* son responsables de metabolizar el 75% de las drogas usadas en la clínica participan con el 60% de la eliminación y excreción de ellas o sus productos. Además, sus isoenzimas tienen una fuerte asociación con el metabolismo de los antiepilépticos por lo que algunos autores las consideran como biomarcadores genéticos (Humma, 2010; Ingelman y Sim, 2010). Por lo anterior, en este trabajo se propuso establecer primeramente la correlación entre los niveles plasmáticos y un fluido que utiliza un método no invasivo como es la saliva de los antiepilépticos más usados y posteriormente evaluar la correlación de los polimorfismos de los genes *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* y *CYP3A4* en la respuesta que presentan pacientes farmacorresistentes.

HIPÓTESIS

Las concentraciones de fármacos antiepilépticos evaluadas en sangre y saliva de pacientes pediátricos con epilepsia focal farmacorresistente tendrán una correlación con la presencia de diversas variantes alélicas en los genes asociados al metabolismo de estos fármacos (*CYP450*) con respecto a los pacientes responsivos con la misma farmacoterapia.

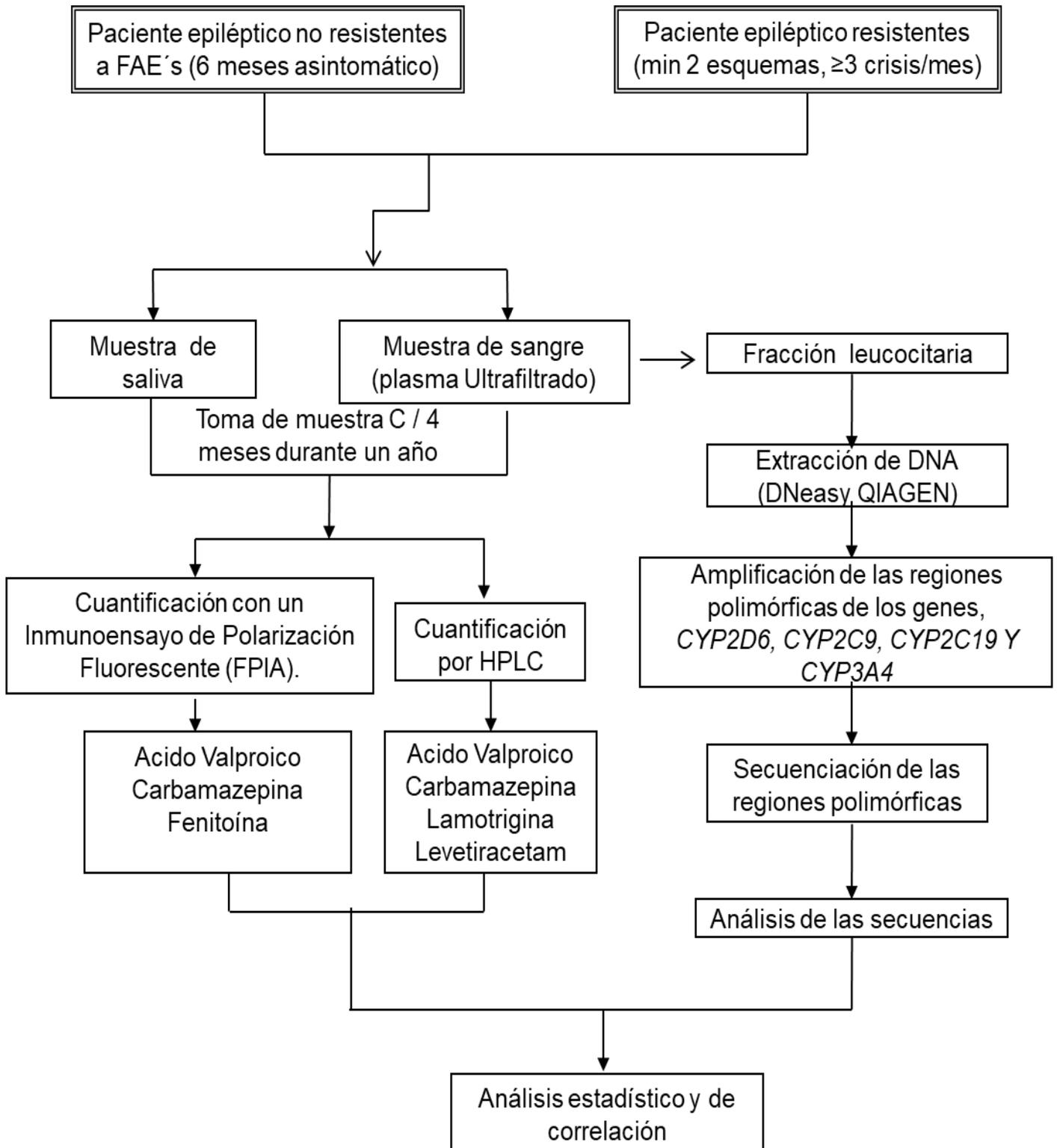
OBJETIVO GENERAL

Identificar en pacientes pediátricos con epilepsia parcial resistentes al tratamiento farmacológico, la asociación de las concentraciones de drogas antiepilépticas en plasma y saliva. y los polimorfismos de los genes (*CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* y *CYP3A4*) que codifican para moléculas metabolizadoras de fármacos antiepilépticos (FAE's).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar las regiones polimórficas de los exones seleccionados de los genes *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* Y *CYP3A4* respectivamente en pacientes epilépticos pediátricos farmacorresistentes y responsivos.
- Realizar el monitoreo de la concentración en plasma y saliva de los FAE's (ácido valproico, fenitoína, fenobarbital carbamazepina, oxcarbazepina, lamotrigina y levetiracetam).
- Analizar la asociación de las concentraciones de los fármacos en plasma y saliva de pacientes resistentes y responsivos a las FAE's con los polimorfismos de los genes *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* Y *CYP3A4*.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIAL Y MÉTODOS.

Población de estudio.

Los pacientes que participaron en el estudio fueron referidos de los departamentos de Neurología y Pediatría de los hospitales participantes del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. El estudio se realizó con 23 pacientes con epilepsia parcial refractaria a tratamiento farmacológico (problema) quienes presentaron crisis parciales con frecuencia superior a 3 veces por mes, con por lo menos seis meses de tratamiento continuo con dos o más fármacos a dosis comúnmente utilizadas, con niveles séricos dentro de límites terapéuticos, con electroencefalograma (EEG) anormal por la presencia de actividad de tipo irritativo y con estudios de imagenología que descartaron la presencia de lesiones estructurales. Como grupo control, participaron 7 pacientes con buena respuesta al tratamiento farmacológico, con un mínimo de 6 meses siendo asintomáticos, con EEG focal y estudio radiológico que descartaron lesiones estructurales. Los pacientes fueron diagnosticados de manera multidisciplinaria por un comité integrado por: neurólogos, neurocirujanos, médicos radiólogos, psicólogos, investigadores, residentes del servicio de neurología y estudiantes de maestría y doctorado. La finalidad radicó en hacer un diagnóstico preciso y asertivo considerando todos los aspectos propuestos por la OMS y la ILAE descritos en las diferentes guías para el buen diagnóstico de los síndromes epilépticos.

Criterios de inclusión.

- 1) De origen mexicano al igual que sus padres y abuelos.
- 2) Con edad de 1 a 16 años.
- 3) Ambos sexos.
- 4) Con diagnóstico de epilepsia parcial compleja refractarios y no refractarios al tratamiento farmacológico (monoterapia o terapia combinada), que cumplan con los criterios establecidos.
- 5) Que ambos padres aceptarán ingresar al proyecto después de una reunión informativa y firma de carta de consentimiento informado, donde se explicó la forma en que participarían, los riesgos, beneficios, la posibilidad de retirarse del proyecto voluntariamente en cualquier

momento mientras durase y la forma en que se utilizarían los datos obtenidos.

- 6) Con exámenes de laboratorio con valores normales (biometría hemática completa, química sanguínea, electrolitos y pruebas de función hepática)

Criterios de no inclusión

- 1) Pacientes con discrasias sanguíneas
- 2) Pacientes con algún tipo de tratamiento con anticoagulantes
- 3) Pacientes con daño hepático
- 4) Con crisis de patrón mixto
- 5) Todos aquellos que no aceptaron ingresar al protocolo o alguno de los padres biológicos.

Criterios de exclusión.

- 1) Cuando el paciente o alguno de los padres del paciente lo solicitara.
- 2) Pacientes diagnosticados con epilepsia parcial compleja asintomáticos durante el proyecto.
- 3) Pacientes que no asistieran a las tomas de muestras por dos ocasiones consecutivas.

Toma de muestras.

Para el monitoreo de fármacos. Se tomaron simultáneamente muestras de saliva y sangre en pre-dosis matutina, con el paciente en ayuno y aseo bucal. La salivación del paciente se estimuló mecánicamente (masticando un trozo de parafilm) o químicamente (pequeños cristales de ácido cítrico), se recolectaron 2 fracciones de 0.5 - 1 ml de saliva en tubos de polipropileno de 10 ml (S1: primera fracción, y S2: segunda fracción). La toma de sangre fue por flebotomía de la vena antecubital en tubos de 13X75 mm. con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), la muestra se centrifugo a 10,000 rpm por 5 min y el plasma fue separado del paquete globular, Los fluidos biológicos fueron etiquetados con una clave que fue asignada a cada paciente y el número progresivo de inclusión en el estudio, tanto para los casos, como para los controles, las muestras de saliva y plasma fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis.

Procesamiento de las muestras.

La cuantificación de fármacos se realizó cada 4 meses. El ácido valproico, carbamazepina, y fenitoína se cuantificaron con 200µl de plasma o saliva por Inmunoensayo de Polarización Fluorescente (FPIA) (DADE BEHRING), es un inmunoensayo de tipo competitivo para la cuantificación de analitos que se encuentran en muy baja proporción en los líquidos biológicos, del orden del microgramo o nanogramo por mililitro, tales como hormonas, drogas terapéuticas, drogas de abuso, vitaminas y algunos aminoácidos, de importancia clínica.

El levetiracetam, lamotrigina, carbamazepina y ácido valproico fueron cuantificados por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) WATERS con detector UV-Vis, sistema de inyección automática y columna C18 (Waters).

Para la preparación de las muestras, se tomaron 0.5 ml de saliva con 50 µl del estándar interno y 3 ml de acetato de etilo. Las muestras se agitaron por 1 min y se centrifugaron 5 min. a 3000rpm. La fase orgánica se recuperó y se llevó a sequedad usando una corriente de N₂ gaseoso. El residuo se resuspendió con 100µl de metanol para inyectarse al cromatógrafo. Las condiciones cromatográficas se describen en la Tabla 3. Las curvas de calibración se hicieron dentro de los rangos de concentración con linealidad significativa. Para fines de comparación fueron considerados los 2 grupos de estudio controles y farmacorresistentes cuando se presenten los mismos fármacos, en casos contrarios la comparación se hizo contra los valores teóricos de los estudios clínicos reportados previamente.

Obtención de DNA

Del paquete globular que se separó del plasma fue utilizada la fase leucocitaria para la obtención del DNA, utilizando un kit comercial (DNeasy QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADN se cuantificó espectrofotométricamente en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 usando 1 µL de la muestra. La relación A260/A280 fue usada para evaluar la pureza del ADN, un valor entre 1.7 y 1.9 se consideró aceptable.

Amplificación de los genes seleccionados.

Los SNVs fueron seleccionados con base a la frecuencia con la que se presentan en diversas poblaciones, así como los más asociados al metabolismo de fármacos. Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron amplificados los exones 1, 3, 5, y 6 del gen *CYP2D6*, 4 y 5 del gen *CYP2C19*, 3 y 7 del gen *CYP2C9* y 6 y UTR (región no traducida) del *CYP3A4*. La mezcla de reacción para cada amplificación contenía 1µl de amortiguador de reacción (10x), 0.6µl de MgCl₂ (50mM), 0.2µl de desoxinucleótidos (10mM), 0.2µl de cada oligonucleótido iniciador específico (10mM) (Tabla 3) 0.5µl de Taq DNA polimerasa (5U/µl) y 5ng de DNA, con un volumen final de 10µl. El perfil térmico utilizado consistió en 1 ciclo a 94°C por 5 min; 37 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 35 seg, y una extensión final de 10 min a 72°C en un Termociclador DNAEngine (Bio-Rad, Hercules, Ca, USA). Cuando fue necesario, se ajustaron las condiciones de la temperatura de hibridación y las concentraciones del MgCl₂. Posterior a la amplificación, se verificó el producto amplificado en geles de agarosa al 2.0%. Los fragmentos fueron purificados con el kit QIAquick PCR purification (Qiagen, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante y cuantificados a 260nm. Finalmente, los productos fueron secuenciados utilizando el Sistema Big Dye Reaction (Promega, USA) a partir de 50 ng de producto en un secuenciador ABI 3700 (Applied Biosystems; USA). Las secuencias fueron analizadas y comparadas con las reportadas en el banco de genes (Genbank) y se rastrearon los polimorfismos de interés (Tabla 4).

Tabla 3. *Condiciones cromatográficas*

METABOLITO	FASE MÓVIL	FLUJO (ml/min)	ESTÁNDAR INTERNO	LONGITUD DE ONDA (nm)	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	PRESIÓN (Kg/cm²)	TEMPERATURA (°C)
LAMOTRIGINA	H ₂ O: CH ₃ CN: PO ₄ ⁻³ (0.5M) 72:20:8	1.5	Trimetropin	277	TRIM = 5.9 LTG = 8.7	190	37
CARBAMAZEPINA	H ₂ O: MeOH:CH ₃ CN 64:33:3	2.4	MHD: 10,11-Dihidro- 10-monohidroxi- oxcarbazepina	240	OXC = 6.8 CBZ = 14	174	36
LEVETIRACETAM	H ₂ O: CH ₃ CN: PO ₄ ⁻³ (0.5M) 72:95:5	0.7	Ácido Dietil- Barbiturico	210	ABD = 8.3 LEVE = 4.3	125	36
ÁCIDO VALPROICO	H ₂ O: CH ₃ CN: PO ₄ ⁻³ (0.5M) 72:80:20	3.4	Cloranfenicol	220	CLOANF =6.6 AC. VAL = 8.9	310	37

Tabla 4. *Oligonucleótidos específicos para las regiones exploradas*

Gen	Exon	Iniciadores		MgCl ₂ (mM)	(T°C)	(pb)
		Fw	Rv			
CYP2D6	1	5'-TTTATAAGGGAAGG GT CACGC-3'	5'-TTTC ACC CAC CATCC ATGTT-3'	1.5	56	375
	3	5'-AAGGT GGATG CAC AAAGAGTG-3'	5'-AAGAG AC CGTT GGG GCGAA-3'	1.5	57	264
	5	5'-ACT TGTC CAG GTGAAC GCAGA-3'	5'-ATTC CT CCT GGG ACGCT CAA-3'	1.25	59	294
	6	5'-AAAAGTT GGACCAGT GCATC-3'	5'-TGTTGG AGGAGGTCAGGCTTA-3'	1.25	60	416
CYP2C9	3	5'-TAGGT GTG CATGT GCCTGTTT-3'	5'-C CCCT GAAATGTTTCC AAGA-3'	1.5	57	490
	7	5'-TGGC AGTTACACATTTGTGC A-3'	5'-TAGC CCCAAACTGGAAAC AA-3'	1.5	58	500
CYP2C19	4	5'-TGTGTTG ATTTT ATGCATGCC-3'	5'-CTTTT CCAGAT ATTC ACC CCA-3'	1.5	57	460
	5	5'-TTACAAC CAGAGCTTGGCAT-3'	5'-C CTT GACCTGTAAACATCCG-3'	1.5	58	350
CYP3A4	5' UTR	5'-AAGGGATGACATGCAGAGGC-3'	5'-T CAC AAACC CTGTC ATCAT-3'	1.5	63	804
	6	5'-TAGGGCCAGCTGCAT CACT-3'	5'-T CAC AAACC CTGTC ATCAT-3'	1.5	61	570

Análisis estadístico.

Para la selección de los SNVs se realizó una revisión bibliográfica de las variantes reportadas en los genes asociados al metabolismo de FAE's, (CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4) mediante el uso de las principales bases de datos, tales como NCBI, EMBASE, FullfreePDF, Medline. Los datos clínicos de los pacientes se analizaron con una prueba no paramétrica y no pareada ($p < 0.05$), y las frecuencias relativas alélicas y genotípicas se analizaron con la prueba exacta de Fisher en el software Graph Pad Prism versión 4.00 (Graph Pad Software Inc®, USA). Los valores de equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se derivaron de las pruebas de chi-cuadrada basada en la heterocigocidad total del locus, para el análisis se empleó un grado de libertad y una $p < 0,05$ se consideró significativo, la asociación entre odds ratios (OR) e intervalos de confianza se determinó utilizando el software disponible en <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.

Consideraciones Éticas.

El proyecto fue avalado y autorizado por la comisión de ética en Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social, se ajustó a los preceptos enunciados en la declaración de Helsinki, adoptada en la 18ª Asamblea General de la Asociación Médica Mundial (Helsinki, Finlandia, junio de 1964), revisada por la 29ª Asamblea Médica Mundial (Tokio, Japón, octubre de 1975) y por la 35ª Asamblea Médica Mundial (Venecia, Italia, octubre de 1983) (World Medical Association), así como a lo estipulado en la Ley General de Salud en cuanto a la investigación médica en humanos. Se anexa un instructivo en donde se especifica en lenguaje claro y sencillo los objetivos del proyecto, los beneficios esperados en los datos obtenidos para el diagnóstico oportuno, la manera en que participarán los pacientes, la utilización del material obtenido para cumplir con los objetivos planteados, así como hacer hincapié que, en caso de solicitar su separación del estudio, no influirá en la atención médica que sea necesaria. Al final del instructivo se anexa la hoja de consentimiento informado que incluye un resumen de lo anotado en el instructivo, también en lenguaje claro y sencillo, y un espacio en donde el paciente acepta participar en el proyecto, anotándose

nombre y firma (huella digital) del paciente, de un testigo y del investigador responsable.

RESULTADOS

Población de estudio.

Con respecto a los datos clínicos del presente estudio, los resultados muestran que no hay diferencias significativas en ambos grupos con relación a la frecuencia, entre ambos sexos. Tanto en el grupo control como en el farmacorresistente, la edad promedio fue de 10 años con una D.E. de ± 4.1 en los pacientes CTR y 3.6 en los pacientes RF, $p= 0.42$), la edad promedio de inicio de las crisis fue de 3.0 (2.0 – 9.0 [mediana (p25-p75)]) para CTR y (1.0 – 8.0 [mediana (p25-p75)]) para RF. Por otra parte, el número de crisis promedio por mes fue de 9.0 (4.0 – 90.0 [mediana (p25-p75)]) en el grupo RF. (Tabla 5)

Tabla 5. Datos demográficos y clínicos de pacientes refractarios y no refractarios a FAE'S

Datos Clínicos	CTR		FR	
	n	Media (SD)	n	Media (SD)
Edad (Años \pm SD)	7	10.6 (4.1)	23	10.2 (3.6)
Género (n, % masculino)	7	4.0, 57.1	23	8.0, 34.8
Inicio de las convulsiones [media (p25 - p75)]	7	3.0 (2.0 – 9.0)	23	3.0 (1.0 – 8.0)
Número de convulsiones/mes [media (p25 - p75)]	7	-	23	9.0 (4.0 – 90.0)

Amplificación de las regiones seleccionadas.

Los experimentos realizados permitieron establecer las condiciones óptimas de amplificación, siendo la cantidad y calidad del ADN (en un rango 1 a 5 ng/ μ ; concentraciones menores no producen amplificación y mayores generan inespecificidad), la concentración de MgCl₂ así como la temperatura de hibridación en la reacción, son los factores importantes para la obtención de los fragmentos requeridos y evitar productos inespecíficos o bien un menor rendimiento de amplificación (Figura 6).

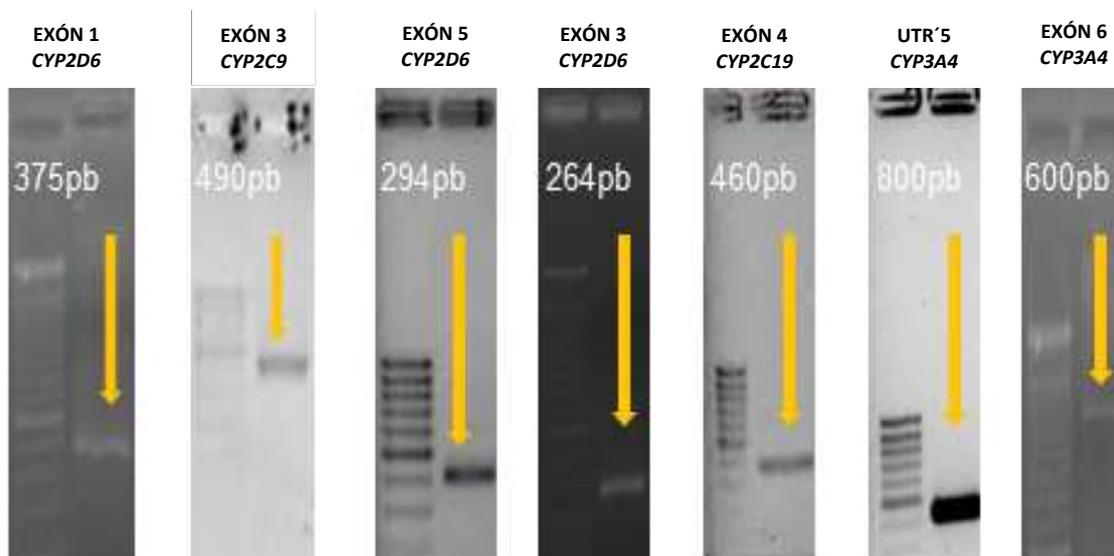


Figura 6. Amplicones de las regiones seleccionadas de los genes CYP450 en geles de agarosa al 2%.

Con respecto a los SNVs, fueron seleccionados con base a la frecuencia con la que se presentan en diversas poblaciones, así como los más asociados al metabolismo de fármacos. Cabe señalar que las secuencias obtenidas fue el producto de los iniciadores específicos que se diseñaron para amplificar los exones 1, 3, 5 y 6 para el gen *CYP2D6*; los exones 3 y 7 para el gen *CYP2C9*; los exones 4 y 5 para el gen *CYP2C19* y el exón 6 del gen *CYP3A4* para nuestra población de estudio. En estos exones se identificaron los SNVs: rs1065852 (exón 1), rs1058164 (exón 3), rs3892097 (intrón 3), rs16947 (exón 6) y rs28371725 (intrón 6) del gen *CYP2D6* sin embargo no se presentó el SNVs rs35742686 (exón 5) de este gen (Figura 7).

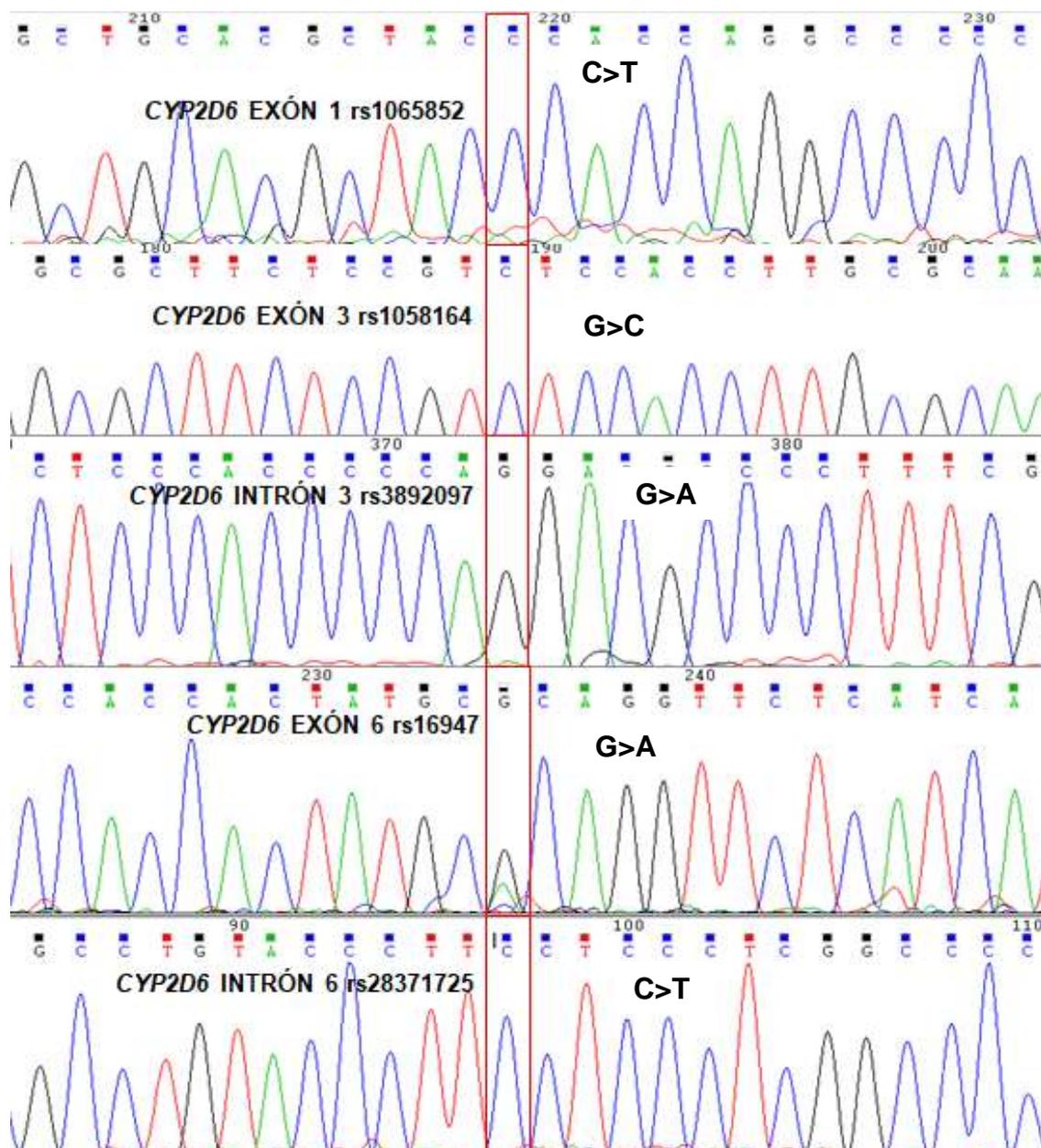


Figura 7. Cromatogramas que muestran la ubicación de las variantes alélicas del gen CYP2D6

Con respecto al gen *CYP2C9* se encontró el SNV rs9332120 con el cambio esperado T>C (exón 3) pero el rs1057910 (exón 7) estuvo ausente en la población de estudio (Figura 8).

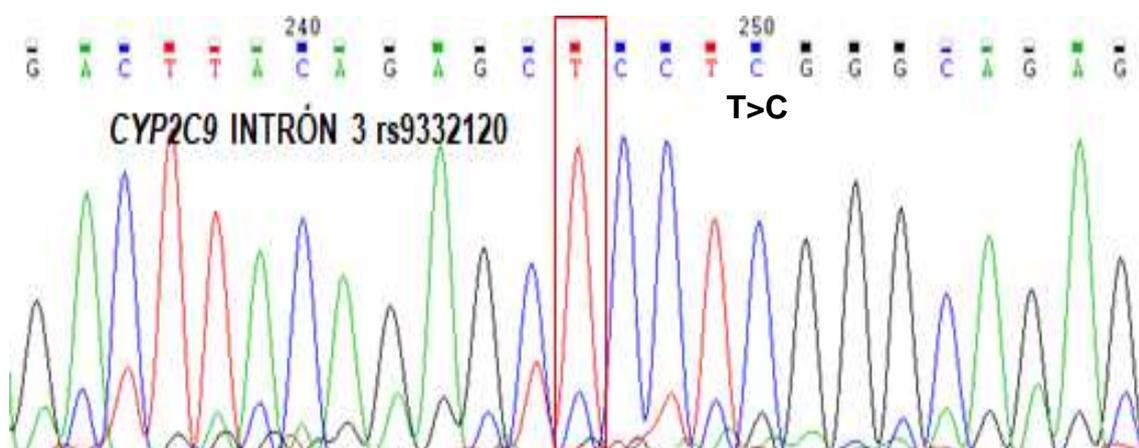


Figura 8. Cromatogramas que muestran la ubicación de las variantes alélicas del gen *CYP2C9*

Con respecto al gen *CYP2C19* se encontró el SNV rs4244285 (exón 5) pero estuvo ausente el rs4986893 (exón 4) (Figura 9)

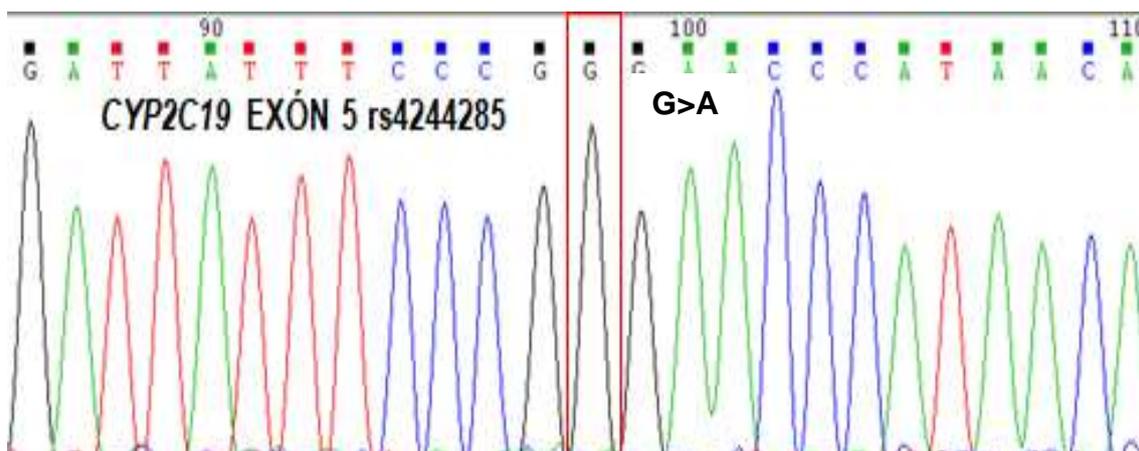


Figura 9. Cromatogramas que muestran la ubicación de las variantes alélicas del gen *CYP2C19*

Finalmente, para el gen CYP3A4 se encontró el SNV rs2687116 con el cambio esperado A>G y el rs2740574 en la región UTR 5' con el cambio esperado T>G (Figura 10). Es importante precisar que de los SNVs encontrados, el rs3892097 (intrón 3) y el rs28371725 (intrón 6) del gen CYP2D6 no se esperaba ser identificados (Tabla 6).

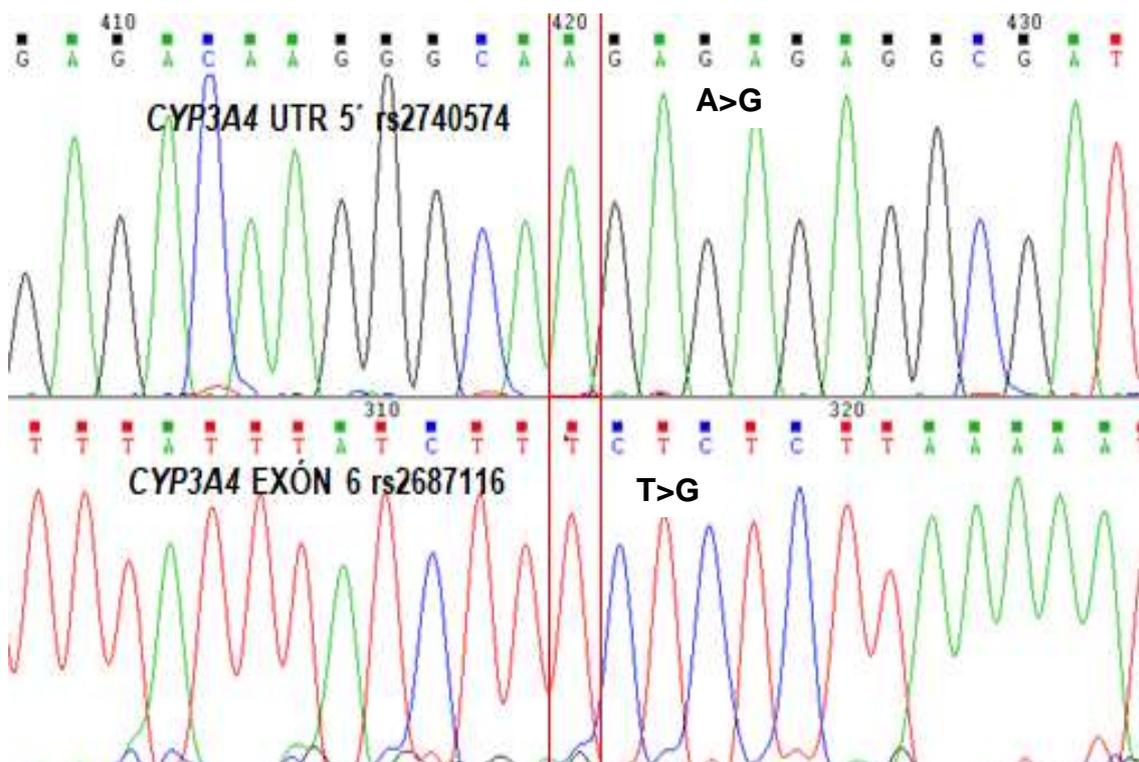


Figura 10. Cromatogramas que muestran la ubicación de las variantes alélicas del gen CYP3A4

Fueron analizados los cromatogramas de los amplicones para ubicar los polimorfismos esperados y determinar las frecuencias relativas alélicas y genotípicas (Tabla 6), las frecuencias genotípicas no mostraron una desviación del EHW ($P>0.05$),

El SNV rs1065852 del exón 1 del gen CYP2D6 se presentó con una frecuencia genotípica relativa del alelo silvestre C/C=0.428, del alelo heterocigoto C/T=0.286 y la mutación T/T=0.286, para el grupo CTR y C/C=0.740 del alelo silvestre, C/T=0.130 del alelo heterocigoto, T/T=0.130 de la mutacion, para los

pacientes RF, con una tendencia a presentarse el alelo homocigoto silvestre en ambos grupos de nuestra población, sin embargo en los pacientes que presentaron la mutación (CCA=>TCA [C>T]) presentaron cambio de aminoácido en la posición 34 de la secuencia aminoacídica de la proteína (Pro=>Ser) sin dominio reportado (sitio de reconocimiento al substrato) (uniprot.org) pero con asociación a patogenicidad (PubMed GenBank) y un MinorAlleleCount (MAF) de T=0.238/1192. Para el SNV rs1058164 del exón 3 del gen *CYP2D6* se presentó con una frecuencia genotípica relativa del alelo silvestre G/G=0.00, del alelo heterocigoto G/C=0.858 y la mutación C/C=0.142 para el grupo CTR y G/G=0.217 del alelo silvestre, G/C=0.566 del alelo heterocigoto, C/C=0.217 para la mutación del grupo RF, se observó en la mayoría de nuestra población de estudio para ambos grupos. Los pacientes que presentaron la variante homocigota para el alelo mutado (GTG=>GTC [G>C]) resultan en un cambio silencioso en la secuencia aminoacídica de la proteína en la posición 136 (val>val) en la secuencia aminoacídica de la proteína ubicado en una región alfa hélice sin dominio reportado (uniprot.org) y un MAF de C=0.401/2008. El SNVs rs3892097 tuvo una frecuencia genotípica relativa del alelo silvestre G/G=0.286, del alelo heterocigoto G/A=0.571 y para la mutación A/A=0.870 para el grupo RF y G/G=0.545 del alelo silvestre, G/A= 0.714 del heterocigoto , A/A=0.286 de la mutación para los pacientes CTR, en este SNV se observa una tendencia a presentar el heterocigoto (G/A) en el grupo CTR al presentarse en cinco pacientes, a diferencia del grupo RF que presenta una marcada tendencia a presentar la variante homocigoto mutado (A/A) en 20 pacientes, sin embargo este SNVs fue encontrado en una región no codificante (intrón 3), con un cambio silencioso (G>A) pero en una región de empalme con el exón 4 (uniprot.org) pero con asociación a patogenicidad (Banco de genes), y con un MAF reportado de A=0.093/466. Para el SNV rs16947 presentó frecuencias genotípicas de G/G=0.286, G/A=0.571, A/A=0.142 para el grupo CTR y G/G=0.261, G/A=0.609, A/A=0.130 para el grupo RF para el alelo silvestre, heterocigoto y homocigoto mutado respectivamente, para este SNV se muestra una tendencia a presentarse en la mayoría de los pacientes la variante heterocigoto siguiendo la variante homocigoto silvestre para los pacientes de ambos grupos, tanto CTR

como RF, este SNV fue localizado en la posición 296 (Cys=>Arg) de la secuencia aminoacídica en una región de giro alfa hélice pero sin dominio reportado (uniprot.org) sin embargo la variante mutada (CGC=>TGC [G>A]) está asociada con patogenicidad y presenta un MAF de $A=0.359/1799$. Para el SNV rs28371725 se presentaron frecuencias genotípicas de $G/G=1.000$, $G/A=0.000$, $A/A=0.000$ para el grupo CTR, debido a que en los siete pacientes del grupo control únicamente se presentó la variante homocigoto G/G, para el grupo RF las frecuencias genotípicas fueron $G/G=0.870$, $G/A=0.130$, $A/A=0.000$, ya que en este grupo, sólo 3 pacientes presentaron el alelo heterocigoto, sin embargo, la tendencia es presentar el alelo silvestre, éste SNV fue encontrado en el intrón 6 del gen *CYP2D6*, por lo que está en una región no codificante para la proteína (uniprot.org) y con un cambio silencioso en la secuencia aminoacídica (G>A) y con un MAF de $A=0.064/318$. Cabe mencionar que la secuencia de referencia utilizada (Ref. Seq. Gene [Banco de genes]) para los alineamientos de todos los SNVs del gen *CYP2D6* fue 008376.3.

El SNV rs9332120 del gen *CYP2C9* presentó frecuencias genotípicas de $T/T=0.572$, $T/C=0.428$, $C/C=0.000$ para el grupo CTR y $T/T=0.783$, $T/C=0.217$, $C/C=0.000$ para el grupo RF, para el alelo homocigoto silvestre, heterocigoto y homocigoto mutado respectivamente, se puede observar una tendencia a presentar mayoritariamente el alelo homocigoto silvestre (T/T) para ambos grupos de pacientes, este SNV se presentó en el exón 3, con un cambio silencioso (T>C) sin verse afectada la secuencia aminoacídica sin embargo no hay reporte alguno (uniprot.org) de la ubicación en la estructura de la proteína y presentó un MAF de $C=0.144/722$. La secuencia de referencia utilizada (Ref. Seq. Gene [Banco de genes]) para los alineamientos de este SNVs del gen *CYP2C9* fue 008385.1.

Con respecto al SNV rs4244285 del gen *CYP2C19* presentó frecuencias relativas genotípicas de $G/G=1.000$, $G/A=0.000$, $A/A=0.000$ para el grupo CTR y $G/G=0.783$, $G/A=0.217$, $A/A=0.000$ para los pacientes RF, alelo silvestre homocigoto, heterocigoto y homocigoto mutado respectivamente, en este SNV se presentó únicamente la variante homocigota G/G en el grupo CTR, mientras que para el grupo RF además se presentó la variante heterocigota G/A, este SNV

fue localizado en el exón 3 y en la posición 227 de la secuencia aminoácídica con un cambio silencioso (CCG/CCA) para (Pro=>Pro [G>A]) en un giro alfa hélice sin dominio reportado (uniprot.org) y con un MAF de A=0.221/1109. La secuencia de referencia utilizada (Ref. Seq. Gene [Banco de genes]) para los alineamientos de este SNVs del gen *CYP2C19* fue 008384.2.

Finalmente el SNV rs2687116 pertenece al gen *CYP3A4*, se presenta en el exón 6 con una frecuencia genotípica de G/G=0.000, G/T=0.571, T/T=0.429 para el grupo CTR y G/G=0.000, G/T=0.087, T/T=0.913 para el grupo RF, el alelo silvestre homocigoto, heterocigoto y homocigoto mutado respectivamente, este SNV presentó para ambos grupos la variante alélica homocigoto T/T, siguiendo la variante heterocigoto G/T, este SNV presenta un cambio silencioso (G>C) en la secuencia aminoácídica pero sin reporte en la ubicación proteínica (uniprot.org) y con un MAF de G=0.220/1103. Para el SNV rs2740574 se ubica en la UTR 5', su frecuencia genotípica para A/A=0.429, A/G=0.571, G/G=0.00 para el grupo control y A/A=0.913, A/G=0.087, G/G=0.00 para el grupo RF, el alelo silvestre homocigoto y heterocigoto respectivamente para ambos grupos, este SNV presentó el heterocigoto un sesgo para la variante alélica heterocigoto G/A=8.000 y MAF de G=0.231/1156. La secuencia de referencia utilizada (Ref. Seq. Gene [Banco de genes]) para los alineamientos de este SNVs del gen *CYP3A4* fue 008421.1 (Tabla 6).

Tabla 6. Genotipo y frecuencias alélicas relacionadas con los SNVs valor de MAF, cambios de aminoácidos y odds ratio encontrados en los genes CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 y CYP3A4

Gen	SNV	Muestra	Frecuencias Alélicas	Frecuencias Genotípica	MAF	Cambios en la proteína		Alelo Silvestre	Odds Ratio	
						Aminoácido	Localización		Aa	Genotipo AA
CYP2D6	rs1065852	CTR	C=0.571 T=0.429	C/C=0.428 C/T=0.286 T/T=0.286	T=0.238/ 1192	34; C>T; Ser>Pro	PPGP región, NH2-terminal	[C]<->[T] 0.324	[CC]<->[CT] 0.265	[CC]<->[TT] 0.265
		RF	C=0.804 T=0.196	C/C=0.740 C/T=0.130 T/T=0.130						
	rs1058164	CTR	G=0.429 C=0.571	G/C=0.858 C/C=0.142	C=0.401/ 2008	136; G>C; Val>Val	Cadena alfa-hélice	[G]<->[C] 0.750	[GG]<->[GC] 0.189	[GG]<->[C/C] 0.333
		RF	G=0.500 C=0.500	G/G=0.217 G/C=0.566 C/C=0.217						
	rs3892097	CTR	G=0.357 A=0.643	G/A=0.714 A/A=0.286	A=0.093/ 466	Intron entre el exón 3 y 4		[G]<->[A] 7.963	[GG]<->[GA] 0.636	[GG]<->[AA] 8.200
		RF	G=0.065 A=0.934	G/A=0.130 A/A=0.870						
	rs16947	CTR	G=0.571 A=0.429	G/G=0.286 G/A=0.572 A/A=0.142	A=0.359/ 1799	296; G>A; Cys>Arg	Cadena alfa-hélice	[G]<->[A] 1.026	[GG]<->[GA] 1.167	[GG]<->[AA] 1.000
		RF	G=0.565 A=0.435	G/G=0.261 G/A=0.609 A/A=0.130						
	rs28371725	CTR	G=1.000	G/G=1.000	A=0.064/ 318	Intrón entre el exón 6 y 7		[G]<->[A] 2.333	[GG]<->[GA] 2.561	[GG]<->[AA] 0.366
		RF	G=0.935 A=0.065	G/G=0.870 G/A=0.130						

“Estudio de los polimorfismos en las regiones codificantes de los genes CYP450 asociados al metabolismo de fármacos antiepilépticos en pacientes pediátricos con epilepsia focal farmacorresistente”

Continuacion de **Tabla 6...**

CYP2C9	rs9332120	CTR	T=0.786 C=0.214	T/T=0.572 T/C=0.428	C=0.144/ 722	Intrón entre el exón 2 y 3	[T]<->[C] 0.447	[TT]<->[TC] 0.243	[TT]<->[CC] 0.370	
		RF	T=0.891 C=0.109	T/T=0.783 T/C=0.217						
CYP2C19	rs4244285	CTR	G=1.000	G/G=1.000	A=0.221/ 1109	227; G>A; Pro>Pro	Cadena alfa-hélice	[G]<->[A] 3.843	[GG]<->[GA] 4.459	[GG]<->[AA] 0.405
		RF	G=0.891 A=0.109	G/G=0.783 G/A=0.217						
CYP3A4	rs2740574	CTR	A=0.714 G=0.286	A/A=0.429 A/G=0.571	G=0.231/ 1156	Región 5' UTR	[G]<->[A] 8.000	[GG]<->[GA] 0.556	[GG]<->[AA] 6.200	
		RF	A=0.957 G=0.043	A/A=0.913 A/G=0.087						
	rs2687116	CTR	T=0.714 G=0.286	T/T=0.429 T/G=0.571	G=0.220/ 1103	Intrón entre el exón 6 y 7	[G]<->[T] 8.000	[GG]<->[GT] 0.556	[GG]<->[TT] 6.200	
		RF	T=0.957 G=0.043	T/T=0.913 T/G=0.087						

Se realizó un análisis comparativo entre las frecuencias alélicas relativas de los SNVs de nuestros pacientes (rs1065852, rs1058164, rs3892097, rs16947 y rs28371725, rs9332120, rs4244285, rs2687116 y rs2740574) y las frecuencias reportadas en poblaciones Hispánicas/mexicanas y caucásicas relevantes en la base de datos del PubMed GenBank (Tabla 7).

Los SNVs encontrados en nuestra población de estudio fueron asociados en la base de datos de nomenclatura de alelos del citocromo P450 (*CYP*) en humanos (Tabla 8 y 9). Las familias de alelos * 2, * 4 y * 14 se identificaron en el gen *CYP2D6*. En pacientes CTR, el genotipo * 1 / * 1 o el tipo silvestre, así como * 1 / * 4 y * 2 / * 14, tienen la misma frecuencia (0.142), mientras que los genotipos * 4 / * 14 y * 1 / * 2 presentan una frecuencia de 0.285. En los pacientes RF, los genotipos * 1 / * 1, * 1 / * 4 y * 4 / * 14 mostraron la misma frecuencia (0.086), los genotipos * 2 / * 2, * 2 / * 14 y * 14 / * 14 presentaron la misma frecuencia (0.043) y el genotipo * 1 / * 2 tuvieron la frecuencia más alta en 0.521. Se muestra evidencia que los alelos de tipo silvestre o *CYP2D6* * 1 presentaron actividad enzimática normal, mientras que * 2, * 4 y * 14 redujeron la actividad enzimática. La Tabla 8 describe la actividad de la enzima (Fenotipo basada en los alelos (Genotipo). El SNV rs4244285 en el gen *CYP2C19* correspondió a la familia del alelo * 2. Los pacientes CTR mostraron solo el genotipo * 1 / * 1 o el tipo silvestre. Los pacientes con RF presentaron el genotipo silvestre con una frecuencia de 0.739 y el genotipo * 1 / * 2 con una frecuencia de 0.217. El alelo * 2 no presentó actividad enzimática, mientras que la actividad enzimática se vio reducida en pacientes que presentaron el genotipo * 1 / * 2. Finalmente, el SNV rs2740574 localizado en el gen *CYP3A4* correspondió al alelo *CYP3A4* * 1B. En pacientes con CTR, el genotipo * 1A / * 1B tenía una frecuencia de 0.428 y * 1B / * 1B tenía una frecuencia de 0.571. En pacientes con RF, el genotipo * 1A / * 1B se presentó con una frecuencia de 0.086 y * 1B / * 1B con una frecuencia de 0.913.

Las presencias de variantes alélicas de la familia *CYP* están asociadas con un fenotipo metabolizador. Los pacientes se consideran metabolizadores homocigotos pobres o ultrarrápidos, dependiendo de la variante presente, mientras que los pacientes con heterocigotos se consideran metabolizadores intermedios. En la población estudiada, los metabolizadores ultrarrápidos tienen

el genotipo TT rs16947, que ocurrió con una frecuencia similar en los grupos CTR (0.130) y RF (0.142). Los cambios de nucleótidos que se asociaron con los cambios de aminoácidos fueron los SNV rs1065852 y rs16947 de *CYP2D6*, que también aparecieron en frecuencias similares en los grupos CTR y RF (Tabla 10).

Tabla 7. Frecuencias genotípicas y de población alélica de SNV encontradas en los genes CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 y CYP3A4

Gen	SNV	Ensayo NCBI ID	Población	# Muestras (2n)	Frecuencias Alélicas	Frecuencias Genotípicas
CYP2D6	rs1065852		Mestizo Mexicano (Noreste)	224	T=0.023	
			Mestizo Mexicano (Centro)	486	T= 0.124	
	rs3892097	ss105439771	Hispano	46	G=0.935 A=0.065	G/G=0.913 G/A=0.043 A/A=0.043
			Hispano	96	G=0.938 A=0.062	G/G=0.875 G/A=0.125
			Mestizo Mexicano (Noreste)	224	A=0.131	
			Mestizo Mexicano (Centro)	486	A= 0.112	
	rs16947	ss105439394	Hispano	46	G=0.674 A=0.326	G/G=0.435 G/A=0.478 A/A=0.087
			Hispano	98	G=0.724 A=0.276	G/G=0.510 G/A=0.429 A/A=0.061
	rs28371725	ss105439396	Hispano	46	G=0.958 A=0.042	G/G=0.917 G/A=0.083
			Hispano	98	G=1.000	GG=1.000
CYP2C9	rs9332120	ss66862435	Hispano	52	T=0.904 C=0.096	TT=0.808 TC=0.192

Continuación **Tabla 7** ...

CYP2C19	rs4244285	ss5586417	Hispano	46	G=0.848 A=0.152	G/G=0.740 G/A=0.217 A/A=0.043
		ss66862485	Hispano	54	G=0.889 A=0.111	G/G=0.778 G/A=0.222
CYP3A4	rs2740574	ss37043510	Hispano	44	A=0.977 G=0.023	A/A=0.955 A/G=0.045
		ss5586454	Hispano	46	A=0.891 G=0.109	A/A=0.783 A/G=0.217
	ss4390533	Español	79	A=0.960 G=0.040		
		Maya	96	A=0.953 G=0.047		
	rs2687116	ss37043537	Hispano	38	T=0.947 G=0.053	T/T=0.895 T/G=0.105 G/G=0.136
		ss6903779	Hispano	46	T=0.891 G=0.109	T/T=0.783 T/G=0.217

Tabla 8. Muestra la Relación Genotipo (SNV) / Fenotipo (comportamiento de la proteína)

GEN	GENOTIPO	SNP	MUESTRA	FRECUENCIA GENOTIPICA	ACTIVIDAD
CYP2D6	*1/*1	TIPO SILVESTRE	CTR	0.142	NORMAL
			FR	0.086	
	*1/*2	TIPO SILVESTRE rs16947	CTR	0.285	DISMINUIDA
			FR	0.521	
	*1/*4	TIPO SILVESTRE rs1065852	CTR	0.142	DISMINUIDA
			FR	0.086	
	*2/*2	rs16947	CTR	0.285	DISMINUIDA
			FR	0.043	
	*2/*14	rs16947 rs1065852	CTR	0.142	DISMINUIDA
			FR	0.043	
	*4/*14	rs16947 rs1065852	CTR	0.285	DISMINUIDA
			FR	0.086	
	*14/*14	rs16947 rs1065852	CTR	0.000	DISMINUIDA
			FR	0.043	
CYP2C19	*1/*1	TIPO SILVESTRE	CTR	0.739	NORMAL
	*1/*2	TIPO SILVESTRE rs4244285	FR	0.217	DISMINUIDA
CYP3A4	*1A/*1B	TIPO SILVESTRE	CTR	0.428	DISMINUIDA
		rs2740574	FR	0.086	
	*1B/*1B	rs2740574	CTR	0.571	DISMINUIDA
			FR	0.913	

Tabla 9. Muestra datos clínicos de pacientes RF (P) y CTR (C), nomenclatura alélica, foco epiléptico, tipos de crisis: *ELT*: epilepsia de lóbulo temporal (izquierda o derecha), *FRT*: frontal, (izquierdo o derecha) *GEN*: generalizadas, *CTC*: crisis tónico clónicas, *CA*: crisis de ausencia, *A* y *farmacoterapia*.

PACIENTE	EDAD	SEXO	CENTRO DE LA CRISIS	TIPO DE EPILEPSIA	FARMACO	ALELO		
						CYP3A4	CYP2D6	CYP2C19
P001	15	M	ELT	CPC	VPA, CZP, LEV	*1B	*1/*2	*1B
P002	8	F	ELT- D	CPC CON GEN	TPM	*1B	*1	*1B
P003	10	F	ELT	CPC	CBP, TPM	*1B	*4/*14	*1B
P004	14	M	ELT	CTC CON GEN	CBP	*1A/*1B	*1/*2	*1A/*1B
P005	6	M	ELT	GEN	VPA, TPM	*1B	*1/*2	*1B
P006	11	F	ELT	CTC CON GEN	CBP, TPM	*1B	*14/*14	*1B
P007	13	M	ELT	CPC	LEV	*1B	*1/*4	*1B
P008	11	M	FRON-TEM	CPC	LEV, PHT	*1B	*1	*1B
P009	14	F	FRON-TEM	CPC	CBP, TPM	*1B	*1/*2	*1A/*1B
P010	11	M	ELT	CPC	VPA, CLB	*1B	*1/*2	*1B
P011	8	M	ELT	CPC, GEN	VPA, LEV, PRM	*1A/*1B	*2/*14	*1B
P012	15	F	ELT	CTC CON GEN	LEV	*1B	*1/*2	*1A/*1B
P013	3	F	FRONTAL-D	CPC, CA	VPA, PHT, CLB	*1B	*1/*4	*1B
P014	12	F	ELT- D	CPC	LEV, VPA, CZP	*1B	*1/*2	*1B
P015	13	F	ELT- D	CTC, CA	OXC, LEV	*1B	*1	*1B
P016	9	F	ELT- I	CA, GEN	OXC, TPM	*1B	*1	*1B
P017	11	M	TEMPORAL-B	CPC CON GEN	LEV	*1B	*4/*14	*1A/*1B
P018	11	F	FRONTAL-I	CTC	TPM	*1B	*1/*2	*1B
P019	13	F	FRONTAL-D	T-GEN	VPA, TPM	*1B	*1/*2	*1B
P020	1	F	FRONTAL-I	CPC CON GEN	VPA, TPM, OXC	*1B	*1/*2	*1A/*1B
P021	3	M	ELT- D	CPC	VPA, CBZ	*1B	*1/*2	*1B
P022	14	M	FRONTAL -B	CPC	VPA, TPM	*1B	*2	*1B
P023	10	F	FRONTAL -I	CTC	VPA, OXC	*1B	*1/*2	*1B
C001	1	M	FRONTAL -D	CPC	PHT	*1A/*1B	*4/*14	*1A/*1B
C002	9	F	ELT- D	CPC	VPA, LTG	*1A/*1B	*1/*4	*1B
C003	7	F	ELT- D	CPC	VPA	*1B	*4/*14	*1B
C004	12	M	ELT- D	CA	TPM, OXC	*1B	*1/*2	*1B
C005	15	F	FRONTAL -D	CPC	TPM, LEV	*1A/*1B	*2/*14	*1B
C006	12	M	ELT	CPC	VPA, CBZ	*1B	*1/*2	*1B
C007	15	M	ELT	CPC	LEV	*1B	*1	*1B

Tabla 10. Muestra las variantes alélicas de la familia CYP450 asociadas con su fenotipo metabolizador.

	CYP2D6 EXON 1			CYP2D6 EXON 3			CYP2D6 INTRON 3			CYP2D6 EXON 6			CYP2D6 INTRON 6			CYP2C9 EXON 3			CYP2C19 EXON 5			CYP3A4 EXON 6			CYP3A4 UTR 5'		
	rs1065852			rs1058164			rs3892097			rs16947			rs28371725			rs9332120			rs4244285			rs2687116			rs2740574		
	WT (CC)	H (CT)	M (TT)	WT (GG)	H (GC)	M (CC)	WT (GG)	H (AG)	M (AA)	WT (CC)	H (CT)	M (TT)	WT (GG)	H (GA)	M (AA)	WT (TT)	H (TC)	M (CC)	WT (GG)	H (GA)	M (AA)	WT (GG)	H (GT)	M (TT)	WT (GG)	H (GA)	M (AA)
C001																											
C002																											
C003																											
C004																											
C005																											
C006																											
C007																											
P001																											
P002																											
P003																											
P004																											
P005																											
P006																											
P007																											
P008																											
P009																											
P010																											
P011																											
P012																											
P013																											
P014																											
P015																											
P016																											
P017																											
P018																											
P019																											
P020																											
P021																											
P022																											
P023																											

■ Metabolizador Rápido
 ■ Metabolizador Intermedio
 ■ Metabolizador Pobre
 ■ Ultra Metabolizador

Con respecto al consumo de los fármacos, el más usado fue el ácido valproico, con una dosis promedio ingerida de 1140 mg/24h y una frecuencia relativa de 0.14 para el grupo CTR, así como, una ingesta de 1025.4 mg/24h y una frecuencia relativa de 0.09 para los RF., subsecuentemente siguió el uso de la carbamazepina, lamotrigina, fenitoína y levetiracetam con una frecuencia relativa de 0.71, 0.14, 0.29, 0.0 y 0.14, respectivamente, en los pacientes CTR, y 0.59, 0.09, 0.0, 0.18 y 0.23 en los pacientes RF. El ácido valproico y la carbamazepina (Tabla 9) se le prescribió a la mayoría de pacientes de los dos grupos. No hubo diferencia significativa en la concentración de fármaco en plasma entre los grupos (35.17 ± 18.04 mg en pacientes CTR y 31.62 ± 8.03 mg en pacientes RF, p=0.42); sin embargo, la concentración media del fármaco en saliva fue menor en pacientes RF (1.68 ± 0.59 mg en los pacientes CTR y 0.57 ± 0.12 mg en pacientes RF, p=0.01) (tabla 11).

Tabla 11. Muestra las Concentraciones en plasma y saliva de los FAE's en pacientes controlados y farmacorresistentes.

Antiepiléptico	CTR		FR	
	n	Media (SD)	n	Media (SD)
Ácido Valproico				
Dosis (SD), mg/24h	5	1140.0 (89.4)	14	1025.4 (426.2)
Concentración/saliva (SD), mg/l	5	2.3 (1.3)	13	1.0 (0.1)
Concentración/plasma (SD), mg/l	3	82.1 (32.5)	11	63.2 (28.0)
Carbamazepina				
Dosis (SD), mg/24h	1	600.0	2	900.0(141.4)
Concentración/saliva (SD), mg/l	1	1.0	2	0.7(0.5)
Concentración/plasma (SD), mg/l	0	-	1	5.9
Lamotrigina				
Dosis (SD), mg/24h	2	100.0(0.0)		-
Concentración/saliva (SD), mg/l	1	0.9		-
Concentración/plasma (SD), mg/l	0	-		-
Fenitoína				
Dosis (SD), mg/24h		-	4	124(94.2)
Concentración/saliva (SD), mg/l		-	2	0.9(0.1)
Concentración/plasma (SD), mg/l		-	3	24.8(37.5)
Levetiracetam				
Dosis (SD), mg/24h	1	1000.0	5	1300.0(570.1)
Concentración/saliva (SD), mg/l		-	4	1.7(1.8)
Concentración/plasma (SD), mg/l		-		-

DISCUSIÓN

En el presente estudio, los pacientes pediátricos con epilepsia recibieron un régimen de farmacoterapia a largo plazo. El tratamiento farmacológico es la alternativa más empleada para recuperar al individuo, y reinsertarlo en su ambiente habitual, dado que el tratamiento se prolonga por mucho tiempo, la administración oral de medicamentos es la vía más usual de llevar a cabo la terapia antiepiléptica. Un factor relacionado con la falta de control de las convulsiones, es el monitoreo inadecuado de las concentraciones de FAE's en plasma (Fagiolino y cols., 2010). Esto es debido a que normalmente se estudia las respuestas farmacológicas del medicamento en dos grandes aspectos; aquellos relacionados con las concentraciones del fármaco y aquellos relacionados con los efectos producidos, sin comprender que sólo las concentraciones en los sitios de acción son responsables de los efectos, por lo anterior, se propuso la cuantificación de los niveles de FAE's en saliva mediante el monitoreo de medicamentos en tándem (Fagiolino y cols., 2010). El monitoreo de las concentraciones de fármaco en la saliva proporciona ventajas sobre el monitoreo de las concentraciones de fármaco en plasma, si bien la sangre presenta condiciones propicias para realizar el monitoreo farmacocinético, por su abundancia y accesibilidad, así como por estar en contacto en todos los tejidos corporales las concentraciones plasmáticas han mostrado desajustes en la correlación farmacocinética / farmacodinamia, debido a que no se consideran factores como la distancia media entre la medición del plasma y la concentración presente en la biofase o subestimar la fracción libre de la unida a proteínas (Kwan y Brodie, 2005). Los resultados obtenidos demostraron que las concentraciones de fármacos salivales en la mayoría de los pacientes estaban en niveles sub-terapéuticos (Tabla 9). En contraste, la mayoría de los niveles de fármacos en el plasma de los pacientes con epilepsia controlada estaban en niveles terapéuticos. Sin embargo, la glándula salival, produce un fluido que tiene varias ventajas respecto al plasma sanguíneo (Fagiolino, 1999). Porque, por un lado, las drogas vertidas a la saliva se encuentran casi totalmente libres, por la muy baja concentración de macromoléculas ligantes, en segundo lugar, dicha concentración salival de

fármacos se alcanza a consecuencia de un equilibrio con los espacios acuosos que conforman la glándula y capilares que irrigan el tejido glandular, por tales motivos existe una relación significativa entre los niveles de fármaco en saliva/plasma y los niveles esperados de fármaco capilar/venoso, finalmente el muestreo es indoloro y no invasivo (Maldonado, 2008). Por otro lado, las variaciones genéticas individuales se relacionaron directamente con las concentraciones de FAE's, porque no todos los pacientes tenían la misma capacidad de absorción, distribución y metabolismo, diferentes polimorfismos afectan el metabolismo del fármaco en diferentes etapas, lo que a su vez afecta la biodisponibilidad. Por lo tanto, dosis iguales de un medicamento producen diferentes concentraciones en plasma y saliva, que proporcionan acceso al sistema nervioso central (Fagiolino y cols., 2010).

Polimorfismos en los genes *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* y *CYP3A4*.

El gen *CYP2D6* del citocromo P450, es uno de los genes más ampliamente estudiados con relevancia farmacogenética debido a su participación en el metabolismo de los fármacos de uso común, la mayoría de los cuales tienen índices terapéuticos estrechos (Ingelman y cols., 1999; Ma y cols., 2002; Lazarowski y Czornyj, 2010). El SNV rs1058164, que se identificó en nuestra población de estudio, no se ha reportado previamente en la población mestiza mexicana (López y cols., 2005; Sosa y Llerena, 2013). Pero si, en otras poblaciones étnicas (Marez y cols., 1997), Baclig y cols, en 2011 reportaron tres alelos mutantes comunes relacionados con la actividad catalítica reducida, entre ellos el *CYP2D6* *2 reportado principalmente en poblaciones de diferente origen continental (asiática), con un 15.6 % encontraron que la frecuencia del alelo *CYP2D6**2 no era significativamente diferente entre las poblaciones Han, mongol o Hui; aunque la población Uigur mostró frecuencias significativamente más bajas de ese alelo en comparación con las otras tres poblaciones (Baclig y cols., 2011) en nuestra población se encontró en una proporción mayor en su forma heterocigótica (GC) en el grupo RF en comparación con el grupo CTR. La referencia más cercana fue la población caucásica, que tenía una frecuencia de 1.000 (PubMed GenBank). El SNV rs3892097 se detectó con mayor

frecuencia en el grupo con epilepsia resistente a los fármacos en comparación con los controles o responsivos y a las poblaciones de referencia. El SNV rs1065852 también fue reportado previamente como MP o ML en la forma homocigótica. El fenotipo que se comportó como MR en nuestros pacientes se presentó con una frecuencia coincidentemente igual a la frecuencia reportada en la población mestiza mexicana (Sosa y Llerena, 2013). Las variantes de *CYP2D6* se han asociado principalmente como MP y la alteración de las concentraciones de metabolitos en el torrente sanguíneo. Sin embargo, el SNV rs16947 se comportó como MP debido a una mutación que disminuyó su actividad enzimática (Lothman, 1996; Meyer y Zanger, 1997; Schmidt y Löscher, 2005; Rodríguez y cols., 2010; Wang y cols., 2003). Esta variante no se ha reportado anteriormente en la población mestiza mexicana, pero si en muchas otras poblaciones, incluidas las hispanas (Marez y cols., 1997). Los pacientes del grupo de RF en nuestro estudio mostraron una mayor frecuencia de la variante heterocigótica (GA); sin embargo, las variantes homocigóticas de (GG) fueron más del doble que las de las poblaciones hispanas y caucásicas (Sosa y Llerena, 2013).

El gen *CYP2C9* se expresa ampliamente en el hígado, representa el 20% de las enzimas metabolizadoras. Se han reportado 60 alelos en *CYP2C9* que intervienen de manera directa o indirecta en el metabolismo de una gran variedad de anticonvulsivos (Rettie y Jones, 2005). Los pacientes del proyecto que presentaron el SNV rs9332120 se comportaron como el fenotipo MP. La forma heterocigótica de este SNV apareció a una frecuencia más baja que la variante de tipo silvestre TT con diferentes frecuencias para los grupos CTR y RF. Las diferencias en las frecuencias de la variante TC fueron mayores en el grupo RF en comparación con el grupo CTR. Es importante destacar que no hay reportes para este SNV en la población mestiza mexicana (Sosa y Llerena, 2013).

Los SNVs del gen *CYP2C19* se han estudiado ampliamente y se han relacionado fenotípicamente como MP (Amirimani y cols., 2003). Estos SNVs están involucrados en el metabolismo de benzodiazepinas y fenitoína de

manera específica, el SNV rs424285 es uno de los dos alelos con función de pérdida más importantes (*CYP2C19*2*) (De Morais et al., 1994). Este SNV, por su localización forma un defecto en la región de origen de la replicación que resulta con una interrupción en dicha región (Schmidt y Löscher, 2005). El SNV rs424285 se presenta con mayor frecuencia en nuestra población de estudio como el ancestral en forma GG homocigota; esta frecuencia fue mayor en el grupo CTR, mientras que en el grupo RF se presenta con mayor frecuencia más cerca de coincidir con la población caucásica y presenta la forma de GA heterocigótica (Fagiolino, 2010).

La enzima *CYP3A4* muestra una alta variabilidad interindividual, influenciada por factores ambientales (alcohol, tabaquismo y consumo de drogas). Estos factores contribuyeron al 20% de su variabilidad. Las variantes rs2740574 y rs2687116 de los genotipos homocigotos o heterocigotos se presentaron en ambos grupos de pacientes en nuestra población de estudio. Sin embargo, el SNV rs2740574 en la región 5-UTR se reporta clínicamente como patógeno; el genotipo AA en particular, presenta una frecuencia más alta en el grupo de RF en comparación con el grupo de epilépticos controlados. Entre los marcadores farmacogenéticos de la enzima *CYP3A4*, el polimorfismo SNV rs2740574 se incrementó la expresión génica debido a la modificación en la afinidad de unión al factor de transcripción (Amirimani y cols., 2003). El SNV rs2740574 juega un papel importante en la actividad enzimática. (Hesselink y cols., 2004; Tran, 2006) en particular, (Sosa y Llerena, 2013), reportó que la variante * 1B (SNV rs2740574) presenta bajas frecuencias en mestizos mexicanos (Sosa y Llerena, 2013). Esta variante se presenta con mayor frecuencia en las poblaciones europeas, los griegos presentan una frecuencia de 0,940, seguida de los ingleses 0,940, holandeses 0,901, franceses 0,820, portugueses 0,707 y españoles 0,05 (De Morais, 1994; Ingelman, 2004; Perucca, 2006).

Las observaciones clínicas sugieren que ciertas combinaciones de FAE's pueden presentar efectos benéficos en las interacciones farmacodinámicas (Tran, 2006). En la terapia antiepiléptica de la práctica médica es importante considerar el tipo de epilepsia y algunas veces se requiere la prescripción de

medicamentos relativamente contraindicados (por ejemplo, ácido valproico y carbamazepina o ácido valproico y fenitoína). La concentración concomitante de CBZ y fenitoína en nuestra población de estudio demostró niveles sub-terapéuticos en comparación con AVP. En particular, esta observación coincidió con la presencia concomitante del genotipo homocigoto de SNV rs16947, que es un polimorfismo que se comporta fenotípicamente como MU. Además, también se identificó la presencia del genotipo heterocigoto de *CYP2C19* SNV rs4244285, que afecta directamente el metabolismo del VPA (Kimura y cols., 1990). El análisis de este polimorfismo reveló que el 87% de los pacientes resistente a los medicamentos presentaban el genotipo homocigoto, en comparación con pacientes controlados que se presentó sólo en el 4%. La presencia de este polimorfismo y las concentraciones sub-terapéuticas de VPA en saliva se utilizaron para identificar a los pacientes resistentes a los fármacos. Nuestra población de estudio presentó los SNV rs1058164, rs16947 y rs28371725 de *CYP2D6*, rs9332120 de *CYP2C9*, rs4244285 de *CYP2C19* y rs2687116 de *CYP3A4*. Estos SNVs no se han reportado anteriormente en la población general, lo que sugiere la herencia hispana de nuestra población mestizos-mexicano. Para el SNV rs1058164, todos los polimorfismos se encontraron en la población hispana de referencia como se esperaba. Sólo los SNV rs28371725 y rs4244285 se presentaron en pacientes con RF. El estudio de haplotipos revela que el haplotipo *CYP2D6* * 2 (A), *CYP3A4* * 1B (T) y *CYP2C19* * 2 (A) se relaciona con la resistencia a las FAE's. Se ha demostrado que los pacientes con variantes alélicas de los genotipos *CYP3A4* y *CYP2C19* tienen un mayor riesgo de resistencia a los fármacos, aunque la contribución general de *CYP2C19* hacia el metabolismo de algunos FAE's fue menos relevantes que otros *CYPs* (Kimura, 1990; Hung, 2004). La resistencia a los medicamentos es un fenotipo complejo que resulta de la contribución de numerosos genes, además de las alteraciones en enzimas metabolizadoras de fármacos, la expresión o sobre expresión de los transportadores de múltiples drogas, también influye en la disposición de fármacos como la fenitoína y la carbamazepina y puede explicar la variabilidad farmacocinética interindividual (Mamiya y cols., 1998; Escalante y cols., 2014).

Las variantes alélicas *CYP2C19** 2 y *CYP2C19** 3 son los alelos más caracterizados del gen *CYP2C19* (Coe y cols., 2002; Simón y cols., 2007). *CYP2C19** 2 es el alelo más común entre los caucásicos; la frecuencia es del 20.83% encontrada en nuestro grupo de RF y fue cercana a los valores reportados en estudios de diferentes poblaciones caucásicas (Gaikovitch y cols., 2003; Scordo y cols., 2004). Además, (Aynacioglu y cols., 1997) reportaron frecuencias alélicas similares a las variantes *CYP2C19** 2 y * 3 en una población turca (12 y 0.4%, respectivamente).

Las variantes polimórficas más comunes de *CYP2D6* en otras poblaciones son las variantes * 3 y * 4, que producen una actividad enzimática disminuida y conducen a fenotipos de metabolizador deficiente (Sachse y cols., 1997). En el presente estudio, se encontró en *CYP2D6** 4 una baja frecuencia del 21% en el grupo CTR y del 9% en el grupo RF. Estos resultados fueron similares a los resultados de Aynacioglu y cols., 1999. Quienes evaluaron 404 individuos donde la frecuencia del alelo *CYP2D6** 4 fue del 11%, (Aydin y cols., 2006), evaluaron a 140 individuos el alelo * 4 y reporto una frecuencia del 14%. Además, la frecuencia de alelos *CYP2D6** 14 fue del 21% en el grupo CTR y del 11% en el grupo RF.

Estos resultados confirman la importancia de realizar un análisis desde dos perspectivas; tanto SNVs como alelos porque las variantes genéticas heterocigotas están presentes en un gran número de pacientes. Además, en este estudio se empleó una estrategia para seleccionar rigurosamente a pacientes pediátricos con epilepsia resistente a los FAE's y pacientes con buen control de las CE para disminuir la influencia potencial de las variables de confusión asociadas con la enfermedad y desarrollar una búsqueda exploratoria no inferencial basada en polimorfismos conocidos y nuevas características no reportadas de la población mexicana. Nuestra población epiléptica no había sido estudiada, lo que nos permitió realizar estudios de asociación de los nuevos SNV y FAE's utilizados para tratar diferentes formas de epilepsia. Se seleccionaron los exones que contenían polimorfismos previamente reportados en poblaciones mexicanas e hispanas para evitar la secuenciación de genes completos y limitar el enfoque al tamaño de la muestra

y la variabilidad en los tratamientos. Sin embargo, es difícil realizar estos análisis en pacientes con epilepsia farmacorresistente que hayan recibido el mismo tratamiento farmacológico. Por lo tanto, el objetivo principal era estandarizar las variables clínicas.

El trabajo se enfocó en encontrar una asociación entre los polimorfismos *CYP450* y la epilepsia resistente a los medicamentos en niños mexicanos con epilepsia. Los resultados confirman la importancia de la variante *CYP3A4 * 1B* para conferir un fenotipo múltiple resistente a los fármacos contra los FAE. Se necesitan grandes esfuerzos para desentrañar los determinantes genéticos de la respuesta de FAE's. Estos resultados pueden ayudar a los médicos para elegir el tratamiento adecuado ya que la variabilidad en el patrón genético entre poblaciones se traduce en diferentes respuestas a los medicamentos, comprender la variabilidad de los genes del *CYP-450* podría mejorar el uso racional de los medicamentos, sin embargo, estos polimorfismos deben investigarse en poblaciones de pacientes adultos con epilepsia farmacorresistente.

CONCLUSIONES

El monitoreo de las concentraciones de fármaco en saliva brindó ventajas sobre el monitoreo de las concentraciones de fármaco en plasma ya que los niveles terapéuticos son similares estadísticamente por la relación capilar / venoso y esto se manifiesta en el paciente, además de ser una técnica no invasiva.

El monitoreo de anticonvulsivantes resultó ser efectivo para el seguimiento farmacoterapéutico en pacientes con epilepsia que recibieron politerapia, porque nos permite identificar junto con los polimorfismos identificados a aquellos pacientes que son malos metabolizadores, esto evitó la sobremedicación, por consiguiente, el daño hepático y el gasto excesivo en medicamentos.

No se detectaron SNVs de interés en el exón 5 como el rs35742686 reportado del gen *CYP2D6* o el rs113667357 del exón 6 del gen *CYP3A4* que en otras poblaciones se han reportados por estar asociados al metabolismo de fármacos antiepilépticos.

El estudio de otros polimorfismos asociados al metabolismo de FAE's puede contribuir a una terapia individualizada en el tratamiento antiepiléptico.

Un mejor conocimiento acerca de los polimorfismos de las enzimas *P450*, tiene gran importancia por la relación que hay entre la efectividad del tratamiento de elección y la respuesta que presentan los diferentes polimorfismos que codifican para estas enzimas.

Se demostró que hay un incremento de 2.4 veces la concentración del ácido valproico, (hasta en un 0.99 mg/L) cuando está presente el polimorfismo rs16947 y rs28371725 en estado heterocigoto del gen *CYP2D6*, así como cuando está presente la mutación del polimorfismo rs3892097 del gen *CYP2D6* y rs2687116 del gen *CYP3A4*, a diferencia que cuando no está presente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amirimani B, Ning B, Deitz A, Weber B, Kadlubar F, Rebbeck TR. Increased transcriptional activity of the CYP3A4* 1B promoter variant. *Environ Mol Mutagen*, 2003; 42:299-305.
2. Anderson G. Pharmacogenetics and enzyme induction/inhibition properties of antiepileptic drugs. *Neurology*, 2004; 63 (suppl 4): S3-8.
3. Annegers J. Epidemiology and genetics of epilepsy. *Neuro Clin North Am*. 1994; 12:15.
4. Aydin M, Hatirnaz O, Erensoy N, Ozbek U. Role of CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1, GSTT1, and GSTM1 genes in the susceptibility to acute leukemias. *Am J Hematol*, 2006; 81:162–70.
5. Aynacioglu A, Sachse C, Bozkurt A, Kortunay S, Nacak M, Schröder T. Low frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population. *J Clin. Pharmacol Ther*, 1999; 66:185–192.
6. Baclig M, Predicala R, Mapua C, Lozano-Kühne J, Daroy M, Natividad F, Javier F. Allelic and genotype frequencies of catechol-O-methyltransferase (Val158Met) and CYP2D6* 10 (Pro34Ser) single nucleotide polymorphisms in the Philippines. *IntJ Mol Epidemiol Genet*. 2011;3(2):115–21.
7. Bassin S, Smith TL, Bleck TP. Clinical review: status epilepticus. *Crit Care*, 2002; 6 (2): 137-142.
8. Berg A, Berkovic S, Brodie M, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsy*, 2010;51:676–685.
9. Bertilsson L, Åberg-Wistedt A, Gustafsson L, Nordin C. Extremely rapid hydroxylation of debrisoquine: a case report with nortriptyline and other tricyclic antidepressants. *Therapeutic Drug Monitoring*: (1985) 7: 478-480.
10. Bertilsson L. Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C9. *Clin Pharmacokinet*, 1995. 29:192-209.
11. Biller J. *Neurología Práctica*. Cuarta Edición. Capítulo 6: Enfoque del paciente con convulsiones. Wolters Kluvers. 2011; 51-60.
12. Blum M, Demierre A, Grant D, Heim M, Meyer U. Molecular mechanism of

- slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991; 88:5237-5241.
13. Brodie MJ, Barry SJ, Bamagous GA, Norrie JD, Kwan P. Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy. Neurology, 2012;78:1548–54.
 14. Brumholz K, Wiebe S, Gronseth G et al. Evidence-Based Guideline: Management of an Unprovoked First seizure in adults. Epilepsy Currents, 2015; 15(3): 144–152.
 15. Buck D, Baker G, Jacoby A. Patient’s experiences of injury as a result of epilepsy. Epilepsy, 1997; 38:439-444.
 16. Cassandra S, Newton M, Wood M, Goldstein D, Bercovic F, O'Brien J, Sheffield J. Update on pharmacogenetics in epilepsy: a brief review. Lancet Neurol, 2006; 5:189-196.
 17. Chen J, Wasterlain C. Status epilepticus: pathophysiology and management in adults. Lancet Neurol. 2006; 5 (3): 246- 256
 18. Coe B, Girirajan S, Eichler E. The genetic variability and commonality of neurodevelopmental disease. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2002; 160C:118–29.
 19. Cramer S, Ebert U, Losher W. Characterization of phenytoin-resistant kindled rats a new model of drug-resistant partial epilepsy: comparison of inbred strains. Epilepsia, 1998; 39:1046-1053.
 20. Cruz C, Gallardo E, Paredes S, Legorreta S, Flores M. Andersson N. Factores asociados a epilepsia en niños en México: un estudio caso-control. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. 2017; 74: 334-340.
 21. Dahl M, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman M, Sjoqvist F. Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analisis of the molecular genetics’ basis. J. Pharmacol Exp Ther, 1995; 274:516-520.
 22. De Morais, S.M., Wilkinson, G.R., Blaisdell, J., Nakamura, K., Meyer, U.A., Goldstein, J.A. (1994). The Major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. J. Biol. Chem, 1994; 269:15419-15422.
 23. Engel J Jr. Report of the ILAE classification core group. Epilepsy,

- 2006;47:1558– 1568.
24. Escalante D, Feria I, Ribas M, Rayo D, Fangiolino P, Vázquez M, Grijalva I, López M, Orozco S. Genetic variability in MDR-1 and MRP2 in Mexican pediatric patients with pharmacorresistant epilepsy. *Fron Neurol*, 2014; 5.
25. Evans D, Manley K, McKusick V. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br Med J*, 1960; 2:485-491.
26. Evans W, Relling M. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*, 1999; 286:487-491.
27. Fagiolino P, Monitorización de fármacos en saliva: aplicaciones biofarmacéuticas, farmacocinéticas y terapéuticas. Editor: Comisión Sectorial de investigación científica (CSIC)- Universidad de la República. Montevideo, 1999; 1-121.
28. Fagiolino P, Vázquez M, Maldonado C. Aspectos farmacocinéticos del tratamiento antiepiléptico y su monitoreo mediante el uso de saliva. In: Beas C, Ureña M, Rivera M, Pallas M, Camins A, editors. *Tópicos de Actualización en Neurobiología*: Universidad de Guadalajara, 2010; 381-400.
29. Ferraro TN, Dlugos DJ, Buono RJ. Challenges and opportunities in the application of pharmacogenetics to antiepileptic drug therapy. *Pharmacogenomics* 2006; 7: 89-103.
30. Fisher S, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross H, Elger C, Engel Jr J, Forsgren L, French J, MikeGlynn, Hesdorffer C, Lee B, Mathern W, Moshé L, Perucca E, Scheffer I, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsy*, 2014; 1-8.
31. Fisher R, Boas W, Blume W, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsy*, 2005;46:470–472.
32. Fisher RS, Leppik I. Debate: When does a seizure imply epilepsy? *Epilepsy*. 2008;49 Suppl 9:7–12.
33. Gaikovitch E, Cascorbi I, Mrozikiewicz P, Brockmöller J, Frötschl R, Köpke K. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol*, 2003; 59:303–312.

34. Gaillard W, Chiron C, Cross J, et al. Guidelines for imaging infants and children with recent-onset epilepsy. *Epilepsy*, 2009;50:2147– 2153.
35. Gardiner S, Begg E, Farmacogenetics, drug-metabolizing enzymes, and clinical practice. *Pharmacol Rev*, 2006; 58: 521-590.
36. Glauser T, Ben-Menachem E, Bourgeois B, Cnaan A, Guerreiro C, Kiviainen R. Updated ILAE evidence review of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. *Epilepsy*, 2013; 54:551-63.
37. Gonzalez F, Skoda R, Kimura S, Umeno M, Zanger U, Nebert D, et al. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature*, 1988; 331:442-446.
38. Grinton B, Heron S, Pelekanos J, et al. Familial neonatal seizures in 36 families: clinical and genetic features correlate with outcome. *Epilepsy*, 2015;56:1071–1080.
39. Hammer W, Sjoqvist F, Plasma levels of monomethylated tricyclic antidepressants during treatment with imipramine-like compounds. *Life Sci*, 1967; 1895-1903.
40. Hauser W, Beghi E. First seizure definitions and worldwide incidence and mortality. *Epilepsia*, 2008; 49:8-12
41. Hesselink D, Van Gelder T, Van Schaik R, Balk A, Van der Heiden I, Van Dam T, et al. Population pharmacokinetics of cyclosporine in kidney and heart transplant recipients and the influence of ethnicity and genetic polymorphisms in the MDR-1, CYP3A4, and CYP3A5 genes. *Clin Pharmacol Ther*, 2004; 76:545-556.
42. Hockwald R, Arnold J, Clayman C, Alving A. Toxicity of primaquine in Negroes. *J Am Med Assoc*, 1952; 149:1568-1570.
43. Humma L, Terra S, Pharmacogenetics and cardiovascular disease: impact on drug response and applications to disease management. *Am J Health Syst Pharm*, 2002; 59:1241-1252.
44. Hung C, Lin C, Chen C, Chang C, Liou H, Ninomiya H, et al. Dosage recommendation of phenytoin for patients with epilepsy with different CYP2C9/CYP2C19 polymorphisms. *The Drug Monit*, 2004; 26:534-540.

45. Ingelman M, Oscarson M, McLellan R. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: An opportunity for individualized drug treatment. *Science*, 1999; 20:342-349.
46. Ingelman M. Human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2004;369:89-104.
47. Ingelman M, Sim S. Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system. *Biochemical and biophysical research communications*, 2010; 396: 90-94.
48. Isaza C, Henao J, Lopez A, Cacabelos R. Isolation, sequence and genotyping of the drug metabolizer CYP2D6 gene in the Colombian population. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2000; 22:695–705.
49. Jorge L, Eichelbaum M, Griese E, Inaba T, Arias T. Comparative evolutionary pharmacogenetics of CYP2D6 In Ngawbe and Enbera Amerindians of Panama and Colombia: role of selection versus drift in world populations. *Pharmacogenetics*, 1999; 9:217–228.
50. Kalow W, Genest K. *Can J. Biochem. Physiol*, 1957; 35:339-346.
51. Kimura S, Meyer U, González J. The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: AG1934A base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3' splice recognition site. *Am J Hum Gene*, 1990; 47:994-1001.
52. Kiyotani K, Mushiroda T, Imamura C, Hosono N, Tsunoda T, Kubo M. Significant effect of polymorphisms in CYP2D6 and ABCC2 on clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients. *Journal Clin Oncol*, 2010; 28:1287-1293.
53. Korff CM, Scheffer IE. Epilepsy classification: a cycle of evolution and revolution. *Curr Opin Neurol*, 2013;26:163–167.
54. Kostas A, Ragia G, Iordanidou M, Kyriaki S, Xanthi A, Tavridou A, Manolopoulos V. Genetics polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, and CYP3A5 in the Greek population. *Fund Clin Pharmacol*, 2007; 21:419-426.

55. Kotsopoulos A, Van Merode T, Kessels G, De Krom C, Knottnerus J. Systematic review and meta-analysis of incidence studies of epilepsy and unprovoked seizures. *Epilepsy*, 2002; 43:1402-1409.
56. Krumholz A, Wiebe S, Gronseth G. Et al. Practice Parameter: Evaluating an apparent unprovoked first seizure in adults (an evidencebased review). *Neurology*, 2007; 69(21): 1996- 2007
57. Kwan P, Brodie M. Definition of refractory epilepsy: Defining the indefinable? *Lancet Neurol*, 2010; 9(1): 27-29.
58. Kwan P, Brodie M. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med*, 2000; 342 (5): 314-319.
59. Kwan P, Brodie M. Potential role of drug transporter in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsy*. 2005, 46 (2): 224-235.
60. Laing RE, Hess P, Shen Y, Wang J, Hu SX. The role and impact of SNVs in pharmacogenomics and personalized medicine. *Curr Drug Metab* 2011; 12: 460-86
61. Lamba J, Lin Y, Schuetz E, Thummel K, Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Delivered Rev.*, 2002; 54: 1271-1294.
62. Lazarowski A, Czornyj L. Mecanismos de resistencia múltiple a fármacos en epilepsias refractarias. In Beas C, Ureña M, Rivera M, Pallas M, Camins A, editors. *Tópicos de Actualización en Neurobiología: Universidad de Guadalajara*, 2010; 401-421
63. Leeder JS. Pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Pediatr Clin North Am* 2001; 48: 765-81.
64. Lehmann H, Ryan E. The familial incidence of low pseudocholinesterase level. *Lancet*, 1956; 271:124.
65. Liu X, Wang Z, Yang Q, Gao F, Yu Y, Shi D, Zhao Y, Zhou Y. Impac of CYP2C19 polimorphism and smoking on response, to clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *Chin Med J*, 2010; 123 (22): 3178-3183.
66. López M, Guerrero J, Jung-Cook H, Alonso M. CYP2D6 genotype and phenotype determination in a Mexican mestizo population. *Eur. J. Clin. Pharmacol*, 2005; 61:749- 54.

67. Louis E, Cascino G. Diagnosis of Epilepsy and Related Episodic Disorders. Continuum (Minneapolis Minn), 2016;22(1):15–37.
68. Löscher W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. Trends Pharmacol Sci, 2002; 23:113-118.
69. Löscher W, Klotz U, Zimprich F, Schmidt D. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. Epilepsy. 2009; 50: 1-23.
70. Lothman E. Basic mechanisms of seizure spread. Epilepsy Res suppl, 1996; 11:9-16.
71. Ma K, Woo H, McLeod L. Genetic basis of drug metabolism. Am J Health Syst Pharm, 2002; 59: 2061-2069.
72. Majersik J. Inherited and Uncommon Causes of Stroke. Continuum (Minneapolis Minn), 2017;23(1):211–237
73. Maldonado C, Fagiolino P, Vázquez M, Rey A, Olano I, Eiraldi R, Scavone C. Therapeutic carbamazepine (CBZ) and valproic acid (VPA) monitoring in children using saliva as biologic fluid. J Epilepsy Clin Neurophysiol 2008; 14: 55-58.
74. Malgrem K, Sullivan M, Ekstedt G. Health-related quality of life after epilepsy surgery: a multicentric study. Epilepsy, 1997; 38:830-838.
75. Mamiya K, Leiri I, Shimamoto J, Yukawa E, Imai J, Ninomiya H, The effects of genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 on phenytoin metabolism in Japanese adult patients with epilepsy: studies stereoselective hydroxylation and population pharmacokinetics. Epilepsy, 1998; 39: 1317–1323.
76. Manji H, Connolly S, Kitchen N Et al. Manual Oxford de Neurología. Segunda edición. Capítulo 3: Urgencias Neurológicas. Aula Médica. 2016; 78-79.
77. Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Lo Guidice J, Spire C, Lafitte J, et al. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: Characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. Pharmacogenetics, 1997; 7: 193-202.
78. Marson A, Jacoby A, Johnson A, Kim L, Gamble C, Chadwick D, Medical Research Council MESS Study Group. Immediate versus deferred

- antiepileptic drug treatment for early epilepsy and single seizures: A randomised controlled trial. *Lancet*. 2005; 365:2007–13
79. Massaki K, Markus H, Keiko K, Tanja Z, and Urs A Meyer. Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. *J. Biol Chem*, 1990; 265 (28): 17209-17214.
80. McTague A, Howell K, Cross J, et al. The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol*, 2016;15:304–316.
81. Mendoza R, Wan Y, Poland R, Smith M, Zheng Y, Berman N, Lin K. CYP2D6 polymorphism in a Mexican American population. *Clin Pharmacol Ther*, 2001; 70:552–560.
82. Meyer U, Skoda R, and Zanger U. *Pharmacol Ther*. 1990. 46, 297-308.
83. Meyer U, Zanger U. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 1997; 37:269-96.
84. Meyer U. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet*, 2000. 356:1667-1671.
85. Meyer, U. Pharmacogenetics – five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nature Reviews*, 2004; 5: 669-676
86. Miners J, Birkett D. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol*, 1998; 45:525-538.
87. Mizzi C, Dalabira E, Dzimiri N, et al. A European spectrum of pharmacogenomic biomarkers: implications for clinical pharmacogenomics. *PLoS One*. 2016;11(9)
88. Nair P, Kalita J, Misra U. Status epilepticus: why, what, and how. *J Postgrad Med*, 2011; 57 (3): 242-252
89. Nelson D. Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Methods Mol Biol*, 2006; 320:1-10.
90. Nebert D, Russell D. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, 2002; 360:1155-1162.

91. Nebert D, Dalton T. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 2006; 6:947-960.
92. Perucca, E. Clinically relevant drug interactions with antiepileptic drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol*, 2006; 61: 246-255.
93. Perucca E, Tomson T. The pharmacological treatment of epilepsy in adults. *Lancet Neurol*. 2011; 10:446–56
94. Regesta G, Tanganelli P. Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. *Epilepsy Res*, 1999; 34(2-3):109-22.
95. Relling M, Klein T. CPIC: clinical pharmacogenetics implementations consortium of the pharmacogenomics research network. *Clin Pharmacol Ther*. 2011; 89(3):464–467.
96. Rettie A, Jones J. Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug- drug interactions and pharmacogenetics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 2005; 45: 477-494.
97. Riviello J, Ashwal S, Hirtz D, Glauser T, Ballaban-Gil K, Kelley K et al. Practice parameter: diagnostic assessment of the child with status epilepticus (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*, 2006; 67 (9): 1542-
98. Rodríguez M, García E, Martínez F, Conesa P. Role of CYP450 in pharmacokinetics and pharmacogenetics of antihypertensive drugs. *Farm Hosp*, 2010; 35: 84-92.
99. Rosner F. Neurology in the Bible and Talmud *Israel J. Med. Sol*, 1975; 11: 385-397.
100. Ryan R, Kempfer K, Kemplem A. The stigma of epilepsy as a self-concept. *Epilepsia*, 1980; 21: 433-444.
101. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet*, 1997; 60:284-295.

102. Sahara K, Chantal D, Sanjay M, Sisodiya, Gianpiero L, Cavalleri, Stephanie S, Soranzo N, Thom M, Sen A, Shorvon S, Sander J, Wood N, Goldstein D. Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoine. PNAS, 2005, 102 (5): 5507-5512.
103. Sander J, Shorvon S. Incidence and prevalence studies in epilepsy and their methodological problems: A review. J neurol Neurosurg Psychiatry, 1987; 50:829.
104. Sander J. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. Epilepsia, 1993; 34:1007-1016.
105. Shibasaki H, Hallett M. The Neurologic Examination Scientific Basis for Clinical Diagnosis. Chapter 24: Paroxysmal and Functional Disorders. Oxford University Press. 2016; 237
106. Schmidt D, Löscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. Epilepsy, 2005; 46: 858-877.
107. Scordo M, Caputi A, D'Arrigo C, Fava G, Spina E. Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population. Pharmacol Res, 2004; 50: 195–20.
108. Scheffer I. Epilepsy: a classification for all seasons? Epilepsia, 2012;53(Suppl. 2):6–9.
109. Scheffer I, Berkovic S, Capovilla G. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Comission for the Classification and Terminology. Epilepsy, 2017; 58(4):512–521
110. Shih P, Huang J, Pharmacokinetics of midazolam and 1-hydroxymidazolam in Chinese with diferent CYP3A5 genotypes. Drug Metab dispos, 2002; 30: 1491-1496.
111. Sim S, Risinger C, Dahl M, Aklilu E, Christencen M, Ingelman M. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. Clin Pharmacol there, 2006; 79(1): 103-113.
112. Simon C, Stieger B, Kullak-Ublick G, Fried M, Mueller S, Fritschy J. Intestinal expression of cytochrome P450 enzymes and ABC transporters

- and carbamazepine and phenytoin disposition. *Acta Neurol Scand*, 2007; 115:232–242.
113. Sosa M, Llerena A. Cytochrome P450 genetic polymorphisms of Mexican indigenous populations. *Drug. Metabol. Drug. Interact*, 2013; 28:193-208.
114. Speight T, Holford N. *Avery’s drug treatment: A guide to the properties, choice, therapeutic use and economic value of drugs in disease management*, 4^a ed. Auckland: ADIS International, 1997.
115. Sperling M, Feldman H, Kinman J. Seizure control and mortality in epilepsy. *Ann Neurol*, 1999; 46:45-50.
116. Spitz M, Twbin J, Shantz D. Risk factors for burns as a consequence of seizures in patients with epilepsy. *Epilepsy*, 1994; 35:764-767.
117. Temkin, O. *The falling sickness: a history of epilepsy from the Greeks to the beginning of modern neurology*. 2nd. Ed Baltimore. 1971. The John Hopkins Press.
118. Tran A, Jullien V, Alexandre J, Rey E, Rabillon F, Guirre V, et al. Pharmacokinetics and toxicity of docetaxel: role of CYP3A MDR1, and G5T polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther*, 2006; 79:570-580.
119. Vezzani A, Fujinami R, White H, et al. Infections, inflammation and epilepsy. *Acta Neuropathol*, 2016;131:211–234.
120. Vogel F. *Moderne probleme der humangenetik*. *Ergebn Inn Med Kinderheilkd*, 1959; 12:52-125.
121. Wang H, Faucette S, Sueyoshi T, Moore R, Ferguson S, Negishi M, LeCluyse E. A Novel Distal Enhancer Module Regulated by Pregnane X Receptor/Constitutive Androstane Receptor Is Essential for the Maximal Induction of CYP2B6 Gene Expression. *J Biol Chem*, 2003; 278:14146-14152.
122. Wolf P, Yacubian E, Avanzini G, et al. Juvenile myoclonic epilepsy: a system disorder of the brain. *Epilepsy Res*, 2015;114:2–12.
123. Xie H, Prasad H, Kim R, Stein C. CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Adv Drug Deliv*, 2002; 54: 1257-1270.

124. Yang Z, Cui H, Hasi T, Jia S, Gong M, Su X. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 Enzymes 2C9 and 2C19 in a healthy Mongolian population in china. *Genet. Mol. Res*, 2010; 9 (3):1844-1851.
125. Zanger U, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2004; 369:23-37.
126. Zhou Q, Yu X, Lin H, Wang L, Yun Q, Hu S, et al. Genetic polymorphism, linkage disequilibrium, haplotype structure and novel allele analysis of CYP2C19 y CYP2D6 in Han Chinese. *Pharmacogenomics J*, 2009; 380-394.

ANEXOS

ANEXO 1. Carta de consentimiento informado



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES
NEUROLÓGICAS, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES EN COLABORACIÓN
CON EL SERVICIO DE NEUROLOGÍA PEDIÁTRICA DEL HOSPITAL DE
PEDIATRÍA DEL CMN SIGLO XXI.**

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO: 12 MESES

Título. Estudio multicéntrico de los polimorfismos en las regiones codificantes de los genes asociados con la farmacorresistencia en pacientes pediátricos con epilepsia parcial compleja.

Objetivo. El estudio en el cual se les está invitando a participar, es para conocer si la epilepsia que padece su hijo se debe a mutaciones en su material genético que tiene que ver con ciertas proteínas que transportan los medicamentos de la sangre al cerebro o en las proteínas que reconocen a los medicamentos en el cerebro y que hace que muchos pacientes con epilepsia no respondan al tratamiento farmacológico.

Como participar: Si Ustedes aceptan a participar junto con su hijo(a) en este estudio, personal especializado les tomará una muestra de sangre y de saliva cada 4 meses durante 1 año y una muestra de raspado de los conductos bucales en una sola ocasión al inicio del proyecto.

Procedimientos. Si aceptaron participar se le entregará esta Forma de **Consentimiento para que la firme.** Si deciden no participar no afectará la norma de cuidados que recibe su hijo (a). El personal pondrá las muestras en medio adecuado para ser preservado y transportado al laboratorio de investigación. Se va extraer el material genético el cual será almacenado y preservado adecuadamente para ser utilizado solamente en este estudio y durante el tiempo que dure el estudio (aproximadamente 3 años).

Si desearan que se quede en el banco de DNA se dejará bien etiquetado y en condiciones óptimas de almacenamiento, en medio estéril y condiciones de congelación a -70°C en un ultracongelador propiedad de la Unidad de Investigación en Enfermedades Neurológicas bajo el cuidado de la Dra. Sandra Orozco Suárez e Iris Feria Romero.

Riesgos del estudio. El estudio farmacológico y genético que se le hará, no producirá malestares secundarios, ni dolor o riesgo para ustedes o su hijo (a).

Beneficios por participar. El estudio no conlleva ningún beneficio personal o remuneración económica. El principal beneficio de participar en este estudio es la posibilidad de saber si el problema del inadecuado control de las crisis se debe a modificaciones genéticas. Los resultados de este estudio pueden, en el futuro ayudarnos a mejorar los esquemas de tratamiento de otras personas con epilepsia farmacorresistente.

Confidencialidad. Si Ustedes aceptan participar en este estudio, el expediente médico de su hijo (a) será inspeccionado directamente por los investigadores para saber la evolución de su enfermedad y/o también puede ser inspeccionado por el Comité Independiente de Ética para verificar que el estudio se está llevando de manera correcta. La información recolectada durante el estudio será almacenada sin incluir su nombre, solo el número de paciente correspondiente al estudio, solo los investigadores y el médico en el estudio, sabrá que la información se relaciona a ustedes. El conocimiento que obtendremos de este estudio se compartirá con usted antes de que se haga ampliamente disponible al público. Los resultados del estudio pueden ser publicados en la literatura médica, pero su identidad no será revelada.

Participación voluntaria/retiro del estudio. La participación en este proyecto es completamente voluntaria. Si aceptan participar, pero si en el transcurso del protocolo desean retirarse, y la muestra ha sido procesada para extraer DNA esta no será utilizada en el presente proyecto. Esto no modificará su esquema de tratamiento ni la atención por parte del médico tratante.

La finalidad de solicitar la carta de consentimiento es la de utilizar el material solo en el presente proyecto autorizado por el comité de ética y de los padres

del paciente con el compromiso que el resultado obtenido será en beneficio de los pacientes. Gracias por leer esta información. Por favor pregunte al doctor en el estudio todas las dudas que tenga, para asegurar que entiende completamente los procedimientos que se harán si acepta participar.

Personal de referencia. En caso de que tenga dudas sobre el estudio favor de contactar a la Dra. Sandra Orozco Suárez y Dra. Iris Feria Romero, responsables del proyecto en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, en Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI, Tel. 55780240, de 8.00 a 17 hrs. Dr. Darío Rayo Mares, Servicio de Neurología del Hospital de Pediatría, CMN, Siglo XXI, de 8.00 a las 14.30 hrs.

Sus firmas indican su aceptación para participar voluntariamente en el presente estudio.

Nombre y firma de los participantes.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de nuestra participación en el estudio.

_____ Fecha _____

_____ Fecha _____

Nombre del doctor _____

Fecha _____

Nombre del Investigador: Dra. Sandra Orozco Suárez

Fecha _____

ANEXO 2. Carta de Asentimiento informado



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES
NEUROLÓGICAS, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES EN COLABORACIÓN
CON EL SERVICIO DE NEUROLOGÍA PEDIÁTRICA DEL HOSPITAL DE
PEDIATRÍA DEL CMN SIGLO XXI**

CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO. 12 meses.

***NOMBRE DEL PROYECTO:* Estudio metacéntrico de los polimorfismos en las regiones codificantes de los genes asociados con la farmacorresistencia en pacientes pediátricos con epilepsia parcial compleja.**

Te voy a dar información e invitarte a formar parte de este estudio de investigación. Puedes elegir si participar o no. Hemos discutido esta investigación con tus padres y ellos saben que te estamos preguntando a ti también para tu aceptación. Si vas a participar en la investigación, tus padres también tienen que aceptarlo. Pero si no deseas tomar parte en la investigación no tiene por qué hacerlo, aun cuando tus padres lo hayan aceptado.

Puedes discutir cualquier aspecto de este documento con tus padres o amigos o cualquier otro con el que te sientas cómodo. Puedes decidir participar o no después de haberlo discutido. No tienes que decidirlo inmediatamente.

Puede que haya algunas palabras que no entiendas o cosas que quieras que te las explique mejor porque estás interesado o preocupado por ellas. Por favor, puedes pedirme que pare en cualquier momento y me tomaré tiempo para explicártelo.

¿Por qué se está haciendo esta investigación? Se te está pidiendo que participes en un estudio de Investigación con la finalidad de conocer porque te dio esta enfermedad y porque los medicamentos que te están dando para controlar tus crisis ya no te hacen efecto. Creemos que este estudio nos ayudará a conocer eso.

Elección de participantes, ¿Por qué me lo pide a mí? Estamos pidiéndole a niños de tu edad que tienen la misma enfermedad e igual que tu no le hacen efecto los medicamentos, vamos a investigar porque les está sucediendo esto.

Si decido participar ¿Qué me va a suceder? Si aceptas a participar en este estudio, personal especializado te tomara una muestra de sangre y de saliva cada 4 meses durante 1 año y una muestra de raspado de las mejillas en una sola ocasión al inicio del proyecto.

Que molestias tendré ¿Dolerá? La toma de sangre puede doler, pero solo un segundo cuando entra la aguja en la superficie de tu piel, la toma de saliva y raspado de boca por las mejillas se hará con un cepillito que no produce molestia.

He preguntado al niño/a y entiende las molestias _____ (inicial)

La participación es voluntaria: ¿Tengo que hacer esto? No tienes por qué participar en esta investigación si no lo deseas. Es tu decisión si decides participar o no en la investigación, está bien y no cambiara nada. Este es todavía tu hospital, todo sigue igual que antes. Incluso si dices que “si” ahora, puedes cambiar de idea más tarde y estará bien todavía. He preguntado al niño/a y entiende que la participación es voluntaria _____ (inicial)

Beneficios. ¿Obtengo algo por participar en la investigación? No hay beneficios económicos pero esta investigación ayudara a otros niños que tienen esta misma enfermedad.

He preguntado al niño/a y entiende los beneficios _____ (inicial)

Confidencialidad: ¿Van a saber todos acerca de esto? No diremos a otras personas que estas en ésta investigación y no compartiremos información sobre ti a nadie que no trabaje en el estudio de investigación. Cuando la investigación finalice, se te dirá a ti y a tus padres los resultados. La información sobre ti por la investigación será retirada y nadie sino los investigadores podrán verla. Cualquier información sobre ti tendrá un número en vez de su nombre. Solo los investigadores sabrán cuál es su número y se guardará la información con llave. No será compartida, ni dada a nadie, excepto a tus padres si lo solicitan.

He preguntado al niño/a y entiende la confidencialidad _____ (inicial)

Personal de referencia. En caso de que tenga dudas sobre el estudio favor de contactar a Dra. Sandra Orozco Suárez y Dra. Iris Feria Romero, responsables del proyecto en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, en Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI, Tel. 55780240, de 8.00 a 17 hrs. Dr. Darío Rayo Mares, Servicio de Neurología 56276900 ext 21504, Hospital de Pediatría, CMN, Siglo XXI, de 8.00 a las 14.30 hrs.

Sé que puedo elegir participar en la investigación o no hacerlo. Sé que puedo retirarme cuando quiera. He leído esta información (o se me ha leído la información) y la entiendo. Me han respondido las preguntas y sé que puedo hacer preguntas más tarde si las tengo. Entiendo que cualquier cambio se discutirá conmigo.

Acepto _____ participar _____ en _____ la investigación” _____

O

“Yo no deseo participar en la investigación y no he firmado el asentimiento que sigue”.

_____ (iniciales del niño/menor)

Solo si el niño/a asiente:

Nombre del niño/a _____

Firma del niño/a: _____

Fecha: _____

Día/mes/año

Si es analfabeto:

Nombre del doctor _____

Fecha _____

Nombre del Investigador: Dra. Sandra Orozco Suárez

Fecha _____

ANEXO 3. Publicaciones

29

LA FARMACOGENÓMICA EN LA EPILEPSIA REFRACTARIA AL TRATAMIENTO

Feria-Romero IA, Escalante-Santiago D, López-García MA,
Orozco-Suárez S.

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de
Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS, México, D.F., México.

RESUMEN

La farmacogenómica es un área de la genética que pretende personalizar el tipo y cantidad del medicamento que se debe administrar a cada individuo dependiendo de su perfil genético y su padecimiento. El interés por esta rama surgió principalmente por los efectos adversos y la resistencia a fármacos que presentan los individuos. En la epilepsia, los estudios genéticos se han enfocado en genes que tienen una relación lógica con este padecimiento, como son los sistemas inhibidores y excitadores, su relación con diferentes síndromes de difícil control farmacológico, y el tipo o tipos de antiepilépticos (DAEs) que se administran. De manera complementaria, el estudio genético de la farmacoresistencia se ha enfocado en genes que históricamente tienen trascendencia en la resistencia a fármacos como es la familia de los citocromos 450 (CYP) y las proteínas transportadoras de multi-fármacos (MDR y MRP). A pesar de todos los estudios realizados, hasta el momento no se ha determinado el gen o grupos de genes que demuestren una asociación directa entre la variabilidad genética y la epilepsia farmacorresistente. Lo anterior sugiere que para una mejor selección en el fenotipo del individuo y el tipo de epilepsia que padece, es necesario incrementar significativamente, el número de pacientes y extender el grupo de genes que se van a estudiar, si es que se desea continuar en esta búsqueda. En el presente capítulo los autores revisan las bases moleculares que originan las teorías farmacogenética y farmacodinámica, así como su relación con la resistencia a los medicamentos, enfocándose principalmente a la epilepsia.

Chapter 10

Gene Therapy in Epilepsy

Miguel A. López-García, Iris A. Feria-Romero, Julia J. Segura-Uribe,
David Escalante-Santiago, and Sandra Orozco-Suárez

Abstract

The genetic modification of cell cultures and their transplantation into the brain is an effective *ex vivo* gene therapy. This transfer of genes via the genetic engineering of viruses or plasmids and subsequent transfection into cells that will express transgenes in the central nervous system (CNS) may allow specific treatment in epileptogenic foci while sparing healthy brain tissue, and minimize the side effects of antiepileptic drug treatment. Prime modification candidates are neuropeptide Y (NPY) and galanin, which are important modulators of neuronal excitability. These neurotransmitters exhibit an inhibitory effect on neuronal activity and provide anticonvulsant effects in animal models. Galanin also exhibits neuroprotective properties. Other modification candidates are adenosine, which acts as an endogenous anticonvulsant, and the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), which exerts neuroprotective and anticonvulsive actions. Recombinant adeno-associated viral vectors can release any of these agents because of their neuronal tropism, lack of toxicity, and stable persistence in neurons. This chapter provides an overview of gene therapy methods, and reviews several studies that used neural and non-neuronal cell transplants as a basis for expanding our understanding of diseases that affect the CNS and possible therapeutic alternatives.

Key words Transfection, Viral vectors, Gene therapy, Neuropeptide Y, Galanin, Neural transplant

1 Introduction

Gene therapy is a therapeutic strategy to replace a defective gene with its functional counterpart and restore the operation of a specific cell population. Gene therapy uses nucleic acids tactically, instead of drugs, to correct the pathological state of cells via modification of their genome [1]. Therefore, molecular knowledge of the disease is essential to hit specific targets [2]. Depending on the target cell, two types of gene therapy exist: the first genetically modifies germ cells (i.e., those that are involved in the formation of eggs and sperm), so that this information will be transmitted to offspring. Another type is the somatic gene therapy where the genetic endowment is introduced in non-germ or somatic cells, so genetic modification is not transmitted to offspring [3]. Gene therapy can be performed *in vivo* or *ex vivo*. *In vivo* gene therapy

[Frontiers in Bioscience E6, 377-386, June 1, 2014]

Genetic polymorphisms associated with antiepileptic metabolism

Miguel A Lopez-García^{1,2}, Iris A Feria-Romero², Hector Fernando- Serrano³, David Escalante -Santiago³, Israel Grijalva³, Sandra Orozco- Suarez²

¹Doctoral Biological and Health Sciences, Metropolitan Autonomous University, Mexico City, Mexico. ²Unit of Medical Research in Neurological Diseases, National Medical Center Century XXI, IMSS, Mexico City, Mexico. ³Department of Health Science, Metropolitan Autonomous University, Mexico City, Mexico

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Introduction
3. Genetics of drug response
 - 3.1. Genetics of drug metabolism
 - 3.2. CYP450 overview
4. CYP450 pharmacogenetics
 - 4.1. Genetic biomarkers for efficient therapy
 - 4.2. Genetic variability of CYP450 in different populations
 - 4.2.1. CYP2D6
 - 4.2.2. CYP2C9
 - 4.2.3. CYP2C19
 - 4.2.4. CYP3A4
 - 4.3. Metabolism of antiepileptic drugs by CYP
 - 4.4. Interaction of CYP with new antiepileptic drugs
5. Summary and perspective
6. Acknowledgments
7. References

Pharmacological Reports 19 (2017) 94–101

Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacological Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharep

Original article

Influence of genetic variants of CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 on antiepileptic drug metabolism in pediatric patients with refractory epilepsy

Miguel A. López-García^{a,b}, Iris A. Feria-Romero^d, Héctor Serrano^e, Darío Rayo-Mares^f, Pietro Fagnolino^g, Marta Vázquez^h, Consuelo Escamilla-Núñezⁱ, Israel Grijalva^j, David Escalante-Santiago^k, Sandra Orozco-Suarez^h

^aPrograma de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad-Iztapalapa, Ciudad de México, México
^bInstituto de Investigación Médica en Epilepsias y Neurología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Secretaría de Salud, Ciudad de México, México
^cServicio de Neurología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México
^dDepartamento de Ciencias Farmacológicas de la Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
^eFuerzas Armadas de México, Cuernavaca, México

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 July 2016
Received in revised form 10 January 2017
Accepted 18 January 2017
Available online 18 January 2017

Keywords:
Refractory epilepsy
CYP
SNPs
Antiepileptic drug

ABSTRACT

Background: Identified the polymorphisms of CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4, within a rigorously selected population of pediatric patients with drug-resistant epilepsy.

Method: The genomic DNA of 23 drug-resistant epilepsy patients and 7 patients with good responses were analyzed. Ten genes in these four genes were genotyped, and the drug concentrations in saliva and plasma were determined.

Results: The relevant SNPs with pharmacogenetics relations were CYP2D6*2 (rs16847) decreased your activity and CYP2D6*4 (rs1065852), CYP2C9*2 (rs4944385) and CYP3A4*7B (rs2740374) by association with poor metabolism. The strongest risk factors were found in the AA genotype and allele of SNP rs3892087 from the CYP2D6 gene, followed by the alleles A and T of SNPs rs2740374 and rs2687116, respectively from CYP3A4.

The most important concentration was between heterozygous genotype AA of rs3892087 and genotype AA of rs2740374 with 16.3% in drug-resistant epilepsy patients as compared to 14.3% in control patients.

Conclusions: The results demonstrated the important role of the CYP3A4*7B allele is not as risk factor for developing drug resistance and CYP2D6, CYP2C9 SNPs and haplotypes may affect the response to antiepileptic drugs.

© 2017 Published by Elsevier Sp. z o.o. on behalf of Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences.

Introduction

About 35% of patients with epilepsy are refractory to treatment despite several polytherapy regimens [1–3]. Clinically, drug resistance is associated with the time of onset (before the first year), type (usually focal seizures), the high frequency of seizures

prior to drug administration and the presence of structural lesions. Pharmacokinetic theory proposes that the overexpression of transporter proteins in the blood brain barrier and the expression of certain allelic variants of metabolizing enzymes (CYP450) modify the concentrations of AEDs that enter the brain [4].

The CYP450 enzymes (CYPs) are accountable for the metabolism of approximately 80% of all clinically prescribed drugs; the first three CYP families are part of oxidative enzymes (traditionally called metabolic enzymes phase I), CYP3A4 is the most important hepatic CYP, and represents more than a third of hepatic CYPs. Others, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6, are conclusively important for the metabolism of drugs; these first

^{*} Corresponding author: Instituto de Investigación Médica en Epilepsias y Neurología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México.
E-mail addresses: mlopez@ibn.mx, msa@ibn.mx (M. López-García).



MDR-1 and MRP2 gene polymorphisms in Mexican epileptic pediatric patients with complex partial seizures

David Escalante-Santiago^{1,2}, Iris Angélica Faria-Romero², Rosa María Ribas-Aparicio¹, Darío Rayo-Mares², Pietro Fagiolino⁴, Marta Vázquez⁴, Consuelo Escamilla-Móñez⁴, Israel Grijalva-Otero², Miguel Ángel López-García² and Sandra Orozco-Suárez^{2*}

¹ Programa de Biomedicina y Fisiología Molecular, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, México City, México

² Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México City, México

³ Neurología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México City, México

⁴ Departamento de Ciencias Farmacológicas de la Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

* Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México

Edited by:

Fernando Cendes, University of Campinas, Brazil

Reviewed by:

Marília M. Guarnieri, University of Campinas, Brazil
Rodrigo Seccin, University of Campinas, Brazil

*Correspondence:

Sandra Orozco-Suárez, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuernavaca No. 2334, Col. Doctores, 06702-26 México City, México
E-mail: sorozco@inmss.com.mx

Although the P-glycoprotein transport protein is overexpressed in resected tissue of patients with epilepsy, the presence of polymorphisms in MDR1/ABCB1 and MRP2/ABCC2 in patients with anti-epileptic-drugs resistant epilepsy (ADR) is controversial. The aim of this study was to perform an exploratory study to identify nucleotide changes and search new and reported mutations in patients with ADR and patients with good response (CTR) to anti-epileptic drugs (AEDs) in a rigorously selected population. We analyzed 22 samples in Material and Methods, from drug-resistant patients with epilepsy and 7 samples from patients with good response to AEDs. Genomic DNA was obtained from leukocytes. Eleven exons in both genes were genotyped. The concentration of drugs in saliva and plasma was determined. The concentration of valproic acid in saliva was lower in ADR than in CTR. In ABCB1, five reported SNPs and five unreported nucleotide changes were identified; rs2229109 (G/A) and rs2032582 (A/T and A/G) were found only in the ADR. Of six SNPs associated with the ABCC2 that were found in the study population, rs3740066 (T/T) and 66744T > A (T/G) were found only in the ADR. The strongest risk factor in the ABCB1 gene was identified as the TA genotype of rs2032582, whereas for the ABCC2 gene the strongest risk factor was the T allele of rs3740066. The screening of SNPs in ABCB1 and ABCC2 indicates that the Mexican patients with epilepsy in this study display frequently reported ABCB1 polymorphisms; however, in the study subjects with a higher risk factor for drug resistance, new nucleotide changes were found in the ABCC2 gene. Thus, the population of Mexican patients with AED-resistant epilepsy (ADR) used in this study exhibits genetic variability with respect to those reported in other study populations; however, it is necessary to explore this polymorphism in a larger population of patients with ADR.

Keywords: drug-resistant, epilepsy, ABCB1, ABCC2, Mexican patients, single-nucleotide polymorphisms, anti-epileptic drugs

INTRODUCTION

Epilepsy is a chronic non-communicable disorder of the brain that affects approximately 70 million people worldwide (1, 2). The administration of anti-epileptic drugs (AEDs) is the treatment of choice. In 30% of patients with epilepsy, seizures persist despite polytherapy with more than one AED, adequate monitoring of serum drug levels and the watchful care of a neurologist (3). Hence, the timely identification of patients who do not respond favorably to AEDs is crucial because these patients are affected both by the treatment and by continuing seizures. Although the pathophysiological basis of drug resistance in epilepsy is not clear, some mechanisms for this resistance have been proposed. Following seizures, the overexpression of drug-transporter proteins in the blood brain barrier (BBB) could be mediated by the nuclear receptor FXR (4); alternatively, polymorphisms in these proteins could

abrogate their function. The main function of carrier proteins is to allow the passage of compounds through biological barriers such as the BBB. Using ATP, the ABC transporter family of proteins actively transports a wide variety of compounds, including toxins and xenobiotics, across cell membranes. ABC transporter proteins have two functional domains. The first domain is anchored to the cell membrane by its alpha-helical structure; the second, which is a nucleotide-binding domain (NBD), binds ATP, which provides the energy necessary for the conformational change that results in transport of the compound across the membrane. All ABC transporters have at least two transmembrane domains and two NBDs that are highly conserved between species (5).

MDR-1 (P-glycoprotein or P-gp) is an ATP-dependent efflux pump protein that controls the flow of toxins and drugs such as felbamate (FBM), gabapentin (GBP), lamotrigine (LTG),



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00007

Matrícula: 210380925

ESTUDIO DE LOS
POLIMORFISMOS EN LAS
REGIONES CODIFICANTES DE
LOS GENES CYP450 ASOCIADOS
AL METABOLISMO DE
FÁRMACOS ANTIÉPÉLPTICOS
EN PACIENTES PEDIÁTRICOS
CON EPILEPSIA FOCAL
FARMACORRESISTENTE.



MIGUEL ÁNGEL LÓPEZ GARCÍA
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 30 del mes de marzo del año 2020 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. HECTOR FERNANDO SERRANO
DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO
DRA. PETRA YESCAS GOMEZ
DRA. IRIS ANGELICA FERIA ROMERO
DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: MIGUEL ÁNGEL LÓPEZ GARCÍA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

PRESIDENTE

DR. HECTOR FERNANDO SERRANO

VOCAL

DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO

VOCAL

DRA. PETRA YESCAS GOMEZ

VOCAL

DRA. IRIS ANGELICA FERIA ROMERO

SECRETARIA

DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ