

**FRECUENCIAS ALELICAS Y GENOTIPICAS DE POLIMORFISMOS EN LOS GENES *CYP2C9*,
VKORC1 Y *CYP4F2* EN PACIENTES COLOMBIANOS ANTICOAGULADOS CON WARFARINA**

NIDIA PEÑA GONZALEZ

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD MEDICINA

MAESTRIA EN CIENCIAS CON ENFASIS EN GENETICA HUMANA

Bogotá, julio, 2015

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

**FRECUENCIAS ALELICAS Y GENOTIPICAS DE POLIMORFISMOS EN LOS GENES *CYP2C9*,
VKORC1 Y *CYP4F2* EN PACIENTES COLOMBIANOS ANTICOAGULADOS CON WARFARINA**

NIDIA PEÑA GONZALEZ

**Tesis de Grado presentada como requisito parcial para optar al título de MAESTRIA EN
CIENCIAS CON ENFASIS EN GENETICA HUMANA**

Directora: Dra. Nora Constanza Contreras Bravo. MSc

Bogotá, 2015

Dra. Jubby Marcela Gálvez Bermúdez, MD. MSc

JURADO

Dra. Claudia Tamar Silva, Bióloga MSc. PhD (C)

JURADO

NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL

“La Universidad del Rosario no se hace responsable por los conceptos emitido por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Rosario por el apoyo para la ejecución de este proyecto.

A cada uno de los docentes que hicieron parte en mi formación académica

A la Dra. Nora Contreras por su colaboración y enseñanza a lo largo de estos años.

A la Dra. Dora principal artífice de este proyecto.

A mi familia por su acompañamiento.

A los pacientes que aceptaron su participación en el estudio

A todos ellos, muchas gracias.

Tabla de contenido

1	INTRODUCCION	14
2	MARCO TEORICO.....	16
2.1	HISTORIA	16
2.2	ANTICOAGULANTES ORALES	17
2.3	WARFARINA.....	19
2.4	CITOCROMO P450	20
2.4.1	CYP2C9	21
2.4.2	POLIMORFISMOS DE <i>CYP2C9</i>	24
2.5	CYP42F2.....	26
2.6	VKORC1 (Vitamina K óxido reductasa subunidad 1)	27
2.6.1	REACCIONES ADVERSAS	30
3	JUSTIFICACION.....	33
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
5	OBJETIVOS	37
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	37
5.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	37
6	MATERIALES Y METODOS.....	38
6.1	TIPO DE ESTUDIO.....	38
6.2	POBLACION DE ESTUDIO	38
6.3	CRITERIOS DE INCLUSION.....	38
6.4	CRITERIOS DE EXCLUSION	38
7	METODOLOGIA.....	40

7.1	OBTENCION DE LAS MUESTRAS DE ADN	40
7.2	TAMAÑO DE LA MUESTRA.	40
7.3	TOMA DE MUESTRAS Y EXTRACCION DE DNA	40
7.4	REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA	41
7.5	RLFPs	42
7.6	IDENTIFICACION DE LAS REACCIONES ADVERSAS A MEDICAMENTOS (RAM).....	43
8	RESULTADOS	45
8.1	DETERMINACION DE LAS FRECUENCIAS GENOTIPICAS PARA LOS GENES DE INTERES	45
8.2	FRECUENCIAS GENOTIPICAS Y ALELICAS	48
8.3	COMPARACION CON OTROS PAISES	51
8.3.1	DISTRIBUCION DE LOS GENES <i>CYP2C9</i> , <i>CYP4F2</i> Y <i>VKORC1</i> ENTRE LOS DIFERENTES PAISES	52
8.3.1.1	DISTRIBUCION ALELICA DE LOS GENES <i>CYP2C9</i> , <i>CYP4F2</i> Y <i>VKORC1</i> ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS ETNICOS	53
8.3.1.2	DISTRIBUCION GENOTIPICA DE LOS GENES <i>CYP2C9</i> , <i>CYP4F2</i> , Y <i>VKORC1</i> ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS ETNICOS	65
8.4	COMBINACION DE GENOTIPOS.....	83
8.5	IDENTIFICACION DE LAS REACCIONES ADVERSAS.....	84
9	DISCUSION.....	87
10	CONCLUSIONES	91
11	RECOMENDACIONES	92
11	BIBLIOGRAFIA	93
12	ANEXOS	105

INDICE DE FIGURAS

Fig 1. Ciclo de la vitamina K. Modificado de Yin T. 2007 (13).....	18
Fig 2. Estructura química de la warfarina, acenocumarol y fenprocumon. Modificado de Velásquez. Farmacología Básica y Clínica (14)	19
Fig 3. Localización de los genes <i>CYP2C18</i> , <i>CYP2C19</i> , <i>CYP2C9</i> y <i>CYP2C8</i> en la región cromosómica 10q24.....	22
Fig 4. Metabolismo de la warfarina S por <i>CYP2C9</i> y otras CYPs. Modificado de Zhou S, 2009.....	23
Fig 5. Estructura del gen <i>CYP2C9</i> , indicando la posición de 19 SNPs, no sinónimos encontrados en los exones 3, 5, 7, 8 y 9. Modificado de Zhou S. 2009 (20).	24
Fig 6 Hidroxilación de la vitamina K por <i>CYP4F2</i> . Modificada de McDonald MG 2009 (3).....	27
Fig 7 Proteína VKORC1. Los círculos naranjas identifican a los a.a 138-140, que corresponden al sitio de unión a la warfarina TYA; los círculos verdes muestran los a.a 132-135 que identifican el sitio redox CIVC; los círculos azules se refieren a sitios altamente conservados a través de las especies y por último los círculos amarillos se refieren a mutaciones reportadas en pacientes resistentes a la warfarina, identificando el a.a que se ha cambiado. Modificado de Oldenburg J. 2007 (2)	29
Fig 8. Fragmentos de restricción para <i>CYP2C9</i> *2. MP de 100 en 100 pb, los carriles 1 y 2 muestran dos heterocigos *1/*2, los carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 8 muestran los homocigos *1/*1. El carril 9 muestra un homocigoto 2*/2*.	46
Fig 9. Fragmentos de restricción para <i>CYP2C9</i> *3. MP de 50 en 50pb, los carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7 muestran los homocigos *1/*1, el carril uno es un heterocigoto * 1/*3	46
Fig 10 Fragmentos de restricción para <i>CYP4F2</i> , MP de 50 en 50 pb. En los carriles 1, 2, 3, 5, 6 y 7 se observan los heterocigos C/T, en el carril 4 se observa un homocigoto T/T, en el carril 8 se observa el homocigoto C/C.	47
Fig 11. Fragmentos de restricción para <i>VKORC1</i> . MP de 50 en 50 pb, los carriles 1, 2 y 3 muestran los heterocigos G/A, el carril 4 muestra a un homocigoto G/G, el carril 5 corresponde a un homocigoto A/A	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medicamentos metabolizados por CYP2C9.....	22
Tabla 2. Algoritmo de Naranjo, el cual permite determinar si un paciente presentó un evento adverso mediante la ingesta de la warfarina	31
Tabla 3. Primers utilizados para la amplificación de los segmentos de interés, a partir de los genes <i>CYP2C9</i> , <i>CYP4F2</i> y <i>VKORC1</i>	41
Tabla 4. Ciclos de amplificación para los polimorfismos.....	42
Tabla 5. Condiciones de Restricción para verificar la presencia de los SNPs, en los pacientes estudiados	43
Tabla 6. Tamaños de los productos de amplificación y tamaños de los fragmentos de restricción.	43
Tabla 7. Características generales de la población de estudio	45
Tabla 8. Frecuencia genotípica de CYP2C9.....	48
Tabla 9. Frecuencia genotípica de <i>CYP4F2</i>	48
Tabla 10. Frecuencia genotípica de <i>VKORC1</i>	48
Tabla 11. Frecuencia alélica de <i>CYP2C9</i>	49
Tabla 12. Frecuencia alélica de <i>CYP4F2</i>	49
Tabla 13. Frecuencia alélica de <i>VKORC1</i>	49
Tabla 14. Comparación de las frecuencias alélicas (<i>CYP2C9</i>) del presente trabajo vs países latinoamericanos. S: significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo	53
Tabla 15. Comparación de las frecuencias alélicas (<i>CYP2C9</i>) del presente trabajo vs países europeos. S: significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo	54
Tabla 16. Comparación de las frecuencias alélicas (<i>CYP2C9</i>) del presente trabajo vs países europeos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo.....	55

Tabla 17. Comparación de las frecuencias alélicas (<i>CYP2C9</i>) del presente trabajo vs países norteamericanos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo, NE: no encontrado	56
Tabla 18. Comparación de las frecuencias alélicas (<i>CYP2C9</i>) del presente trabajo vs países asiáticos. . S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo, NE: no encontrado	57
Tabla 19. Comparación de las frecuencias alélicas (<i>CYP2C9</i>) del presente trabajo vs países africanos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo	58
Tabla 20. Comparación de las frecuencias alélicas (<i>CYP4F2</i>) del presente trabajo vs países latinoamericanos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo	58
Tabla 21. Comparación de las frecuencias alélicas (<i>CYP4F2</i>) del presente trabajo vs países europeos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo.....	59
Tabla 22. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (<i>CYP4F2</i>) vs países europeos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo.....	59
Tabla 23. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (<i>CYP4F2</i>) vs poblaciones norteamericanas. S.: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo	60
Tabla 24. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (<i>CYP4F2</i>) vs países asiáticos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo	60
Tabla 25. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (<i>CYP4F2</i>) vs países africanos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo	61
Tabla 26. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (<i>VKORC1</i>) vs poblaciones de Latinoamérica. . S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo	61
Tabla 27. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (<i>VKORC1</i>) vs poblaciones de Latinoamérica. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo	62
Tabla 28. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (<i>VKORC1</i>) vs países europeos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo.....	62
Tabla 29. Comparación de las frecuencias alélicas (<i>VKORC1</i>) vs países europeos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo	63
Tabla 30. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (<i>VKORC1</i>) vs poblaciones de Norteamérica. . S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo.....	63
Tabla 31. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (<i>VKORC1</i>) vs poblaciones de Asia. . S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo	64

Tabla 32. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (<i>VKORC1</i>) vs poblaciones de África. S: Significativo, cuando p es menor de 0,005; NS: no significativo.....	64
Tabla 33. Comparación de las frecuencia genotípicas del presente trabajo (<i>CYP2C9</i>) vs poblaciones de Latinoamérica Significativo, cuando p es menor de 0,05; NA: no aplica NS: no significativo	65
Tabla 34. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (<i>CYP2C9</i>) vs países europeos. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NA: no aplica NS: no significativo	66
Tabla 35. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (<i>CYP2C9</i>) vs países europeos. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NA: no aplica NS: no significativo	67
Tabla 36.Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (<i>CYP2C9</i>) vs poblaciones norteamericanas. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NA: no aplica NS: no significativo, NE: no encontrado, NA: no aplica.....	68
Tabla 37.Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (<i>CYP2C9</i>) vs poblaciones de Asia. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NE: no encontrado NS: no significativo.....	69
Tabla 38. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (<i>CYP2C9</i>) vs poblaciones de África. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NA: no aplica NS: no significativo	70
Tabla 39. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (<i>CYP4F2</i>) vs Brasil. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NA: no aplica NS: no significativo.	71
Tabla 40. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo <i>CYP4F2</i>) vs Europa. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo.....	72
Tabla 41 Comparación de las frecuencias genotípicas del presente estudio (<i>CYP4F2</i>) vs países europeos. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo.....	73
Tabla 42. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (<i>CYP4F2</i>) vs Norteamérica. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo	74
Tabla 43. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (<i>CYP4F2</i>) vs Asia. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo.....	75
Tabla 44. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (<i>CYP4F2</i>) vs África. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo.....	76
Tabla 45. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (<i>VKORC1</i>) vs Latinoamérica. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo	77
Tabla 46. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (<i>VKORC1</i>) vs Europa. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo.....	78

Tabla 47. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (<i>VKORC1</i>) vs Europa. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo.....	79
Tabla 48. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (<i>VKORC1</i>) vs Norteamérica. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo	80
Tabla 49. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (<i>VKORC1</i>) vs Asia. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo.....	81
Tabla 50. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (<i>VKORC1</i>) vs países de África. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo, NE: no encontrado	82
Tabla 51. Posibles genotipos al combinarlos entre sí, y el número de pacientes con cada genotipo	84
Tabla 52. Genotipos encontrados en el presente trabajo, y pacientes que presentaron RAM.....	84

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Formato de recolección de datos y test de Cage	105
Anexo 2. Consentimiento Informado	107
Anexo 3.Técnica de extracción de DNA-PROBE con proteinasa	112
Anexo 4. Extracción de ADN por Fenol-Cloroformo	113

1 INTRODUCCION

La farmacogenética es la ciencia que permite identificar las bases genéticas de las diferencias individuales en la respuesta a medicamentos, lo que nos permitirá en el futuro dar el mejor fármaco y la dosis efectiva a cada paciente en particular (1).

La warfarina es un medicamento ampliamente utilizado para los trastornos de hipercoagulabilidad, debido a su estrecho margen terapéutico y a su relación con efectos adversos ha sido objeto de estudio en el campo de la genética, ya que se busca administrar dosis seguras, basadas en la genotipificación de algunos polimorfismos en los genes implicados en el metabolismo de la warfarina, los cuales están relacionados con riesgo de sangrado. Estas variantes se encuentran relacionadas con los genes *CYP2C9*, *CYP4F2* y *VKORC1*(1).

CYP2C9 está implicada en el proceso de eliminación del medicamento, ya que es una enzima hepática perteneciente a la familia del citocromo P450, la cual es la encargada de metabolizar los medicamentos(1); *VKORC1* es el blanco molecular de la warfarina (2), cuya acción es evitar el reciclaje de la vitamina K oxidada a su forma reducida, evitando finalmente la activación de los factores de coagulación; y *CYP4F2* es una oxidasa de la vitamina K, que también se ha visto involucrada en la dosificación de este fármaco (3).

La dosis estable de los cumarínicos también está influenciada por diferentes factores como: la raza, la ingesta de vitamina K en la dieta y la interacción con otros fármacos. Se estima que los factores no genéticos como la edad, el género, la superficie corporal y las interacciones con otros medicamentos contribuyen alrededor de un 30% de la variabilidad de dosis (4).

Actualmente se conocen variantes en los genes implicados en el metabolismo de la warfarina, en poblaciones caucásicas, asiáticas y afroamericanas, principalmente en *CYP2C9* y *VKORC1*. En la actualidad, *CYP4F2* se está incluyendo en los estudios de dosificación de dicho fármaco.

En el presente estudio se incluyeron pacientes colombianos, donde se revisaron frecuencias alélicas y genotípicas de los genes mencionados y se compararon nuestros resultados con lo reportado en la literatura para otras poblaciones.

2 MARCO TEORICO

2.1 HISTORIA

En el año 1922 se produjo el brote de una enfermedad en el ganado, no reconocida anteriormente, en el norte de Estados Unidos y Canadá. El ganado moría de hemorragias incontrolables por lesiones menores o, a veces, de hemorragias internas sin signos externos de lesión (5).

Once años después se logra demostrar que los animales afectados por esta enfermedad tenían disminuida la concentración de protrombina plasmática causante de este desorden (6). Solo hasta 1941 Campbell y col. de la Universidad de Wisconsin (7), aislaron y caracterizaron el agente responsable presente en el trébol dulce, determinando que el anticoagulante presente en esta planta era 3,3'- metilenobis-(4-hidroxycumarina), sustancia que posteriormente se conocería como dicoumarol o bishidroxycumarina. Ellos continuaron desarrollando anticoagulantes sintéticos a partir de la estructura molecular del dicoumarol, con la idea de utilizarlos como veneno contra roedores, hasta que en 1948 obtienen la Warfarina, nombre que proviene del acrónimo WARF, de **Wisconsin Alumni Research Foundation**, más la terminación arina que indica su relación con la cumarina y en el mismo año se registra como raticida en los Estados Unidos (7).

En 1951 se inician estudios sobre la warfarina, para establecer su utilidad como anticoagulante terapéutico (8), debido a que un soldado utiliza este medicamento para suicidarse sin lograr su resultado. En 1954 se autorizó su uso clínico en humanos, y en 1980 se demostró su acción inhibitoria sobre el metabolismo de la vitamina K, en el hígado (9).

2.2 ANTICOAGULANTES ORALES

Existen dos grandes grupos de agentes anticoagulantes orales que se prescriben frecuentemente, el primero y más ampliamente utilizado es el de las cumarinas, cuyo mayor representante es la Warfarina (10); el segundo grupo es el de los agentes antiplaquetarios o antiagregantes plaquetarios, como la aspirina como su mejor representante, seguido por las heparinas de bajo peso molecular entre las que está la enoxaparina (11).

Las cumarinas o antagonistas de la vitamina K (VKAs), han sido por más de 60 años, el pilar de la terapia de anticoagulación oral, utilizados en la prevención primaria y secundaria del tromboembolismo venoso, para la prevención sistémica de embolismo en pacientes con prótesis de la válvula cardíaca o con fibrilación atrial, o como adyuvante profiláctico posterior a infarto del miocardio y para reducir este tipo de infarto (12).

Las razones por las cuales los VKAs son un reto en la práctica clínica son las siguientes: Presenta una ventana terapéutica estrecha, exhiben una considerable variabilidad en la respuesta a dosis entre pacientes debido a factores ambientales y genéticos, están sujetos a interacción con otros fármacos y con alimentos, es difícil estandarizar la dosis y por último, para mantener el nivel terapéutico de anticoagulación requiere de un buen entendimiento de la farmacocinética y farmacodinamia de estos (warfarina) así como de una buena comunicación con el paciente (12).

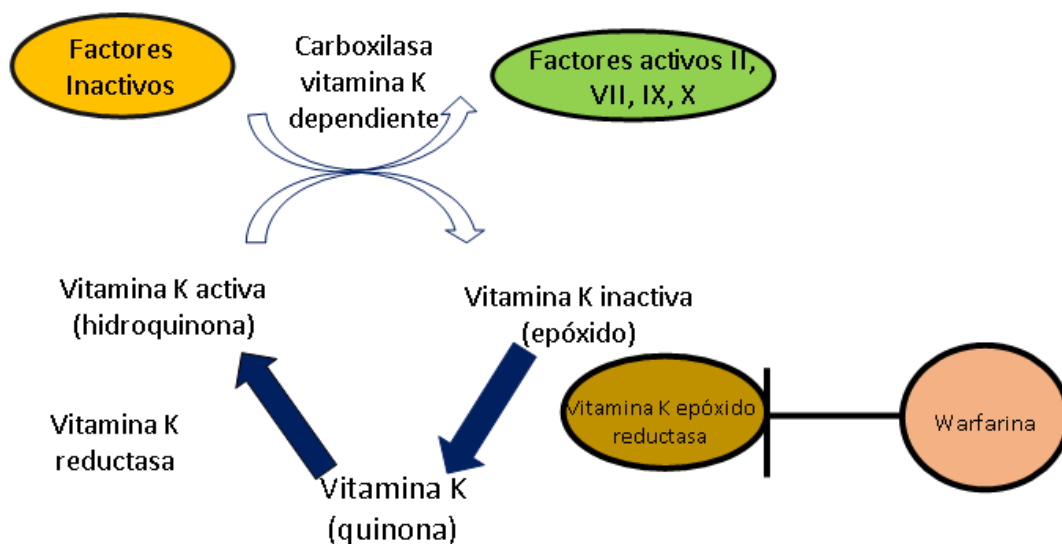


Fig 1. Ciclo de la vitamina K. Modificado de Yin T. 2007 (13).

Los anticoagulantes orales actúan inhibiendo el efecto hepático de la vitamina K. La vitamina K es inactiva como tal, por lo que, tras su administración, pasa por el hígado y se transforma en vitamina K hidroquinona (KH_2) mediante la participación de una vitamina K-reductasa. La KH_2 actúa como cofactor de una γ -glutamyl-carboxilasa que produce la carboxilación de los residuos de ácido glutámico de los factores II, VII, IX y X; estos factores carboxilados ya están preparados para su activación y conversión en IIa, VIIa, IXa y Xa. Por último, la KH_2 se reconvierte en epóxido de vitamina K, el cual vuelve a convertirse en vitamina K activa mediante una epóxido reductasa (VKORC) (14). Fig. 1.

Dentro de las cumarinas más usadas en Europa, están la warfarina, el acenocumarol y el fenprocoumon, Fig. 2, todas estas cumarinas son 4-hidroxycumarinas (15); tienen un centro quiral con un enantiómero S y otro R (los enantiómeros son imágenes especulares que no se pueden superponer), en una proporción 1:1 (mezcla racémica) (16).

El enantiómero S la forma más activa como anticoagulante, siendo 2.7 a 3.8 veces más potente que el enantiómero R, es principalmente metabolizada por CYP2C9, mientras que el enantiómero R es metabolizado por otras enzimas CYP (CYP1A2 y CYP3A4) (12).

La relación entre la dosis de la warfarina y su respuesta, es modificada por factores genéticos y ambientales que influyen sobre la absorción, la farmacocinética y farmacodinamia de este fármaco (12)

Las cumarinas son absorbidas desde el tracto gastrointestinal con completa biodisponibilidad oral, posteriormente, se alcanzan las concentraciones plasmáticas del medicamento en pocas horas, uniéndose a la albúmina en el 98-99%, luego el metabolismo da lugar a metabolitos inactivos que tienen lugar en el hígado por varias reacciones de hidroxilación, catalizadas por las enzimas CYPs. (15)

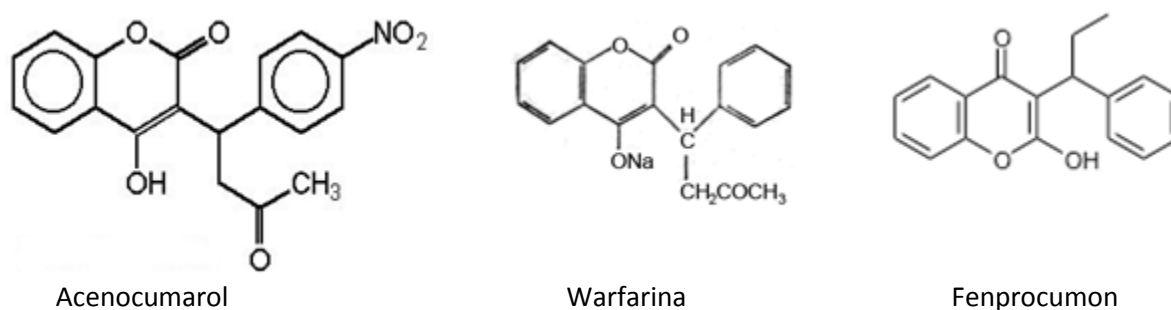


Fig 2. Estructura química de la warfarina, acenocumarol y fenprocumon. Modificado de Velásquez. Farmacología Básica y Clínica (14)

2.3 WARFARINA

Es el anticoagulante oral más usado a nivel mundial, se prescribe al 0.5 - 1.5% de la población anualmente, se formula para el tratamiento y prevención de enfermedades trombóticas (13). Su estrecho margen terapéutico y la amplia variabilidad entre pacientes hacen de este un medicamento que sea de difícil dosificación (14-16), una dosis insuficiente no alcanza a prevenir las enfermedades trombóticas, pero, una sobredosificación incrementa el riesgo de hemorragia, debido a esto, a pesar de ser la warfarina un medicamento altamente eficiente, los efectos adversos son muy frecuentes e informados a la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos y son una de las razones más frecuentes para asistir a servicios de urgencia (17).

La warfarina se dosifica generalmente de forma empírica, iniciando con 5 a 10 mg/día, seguida de una medición del INR (Razón Normalizada Internacional) hasta alcanzar un valor de 2.0 a 3.0, establecer este valor de INR puede tardar semanas, lo que lleva a los pacientes a tener riesgo aumentado de sangrados o tromboembolismo. El INR (International Normalized Ratio), es una prueba de laboratorio que permite monitorear la respuesta a los antagonistas de la vitamina K, por medio de la siguiente formula, $INR = (PT_{\text{paciente}} / PT_{\text{de un control normal}})^{ISI}$, donde el PT es el tiempo de tromboplastina, e ISI, es el Índice de Sensibilidad de la tromboplastina usada en cada laboratorio, dato que es proporcionado por el fabricante del reactivo (12).

Para personas que no toman ningún anticoagulante el INR debe ser 1.0. En la mayoría de países, el INR debe ser de 2.0 a 3.0 para pacientes con fibrilación auricular o tromboembolismo venoso, esto quiere decir que la coagulación in vitro tarda 2 o tres veces más, comparada con individuos que no toman cumarinas. Para otras indicaciones como pacientes con válvulas cardíacas se acepta un INR de 2.5 a 4.0 (17).

2.4 CITOCROMO P450

Las enzimas más importantes en el metabolismo de medicamentos pertenecen a la súper familia del Citocromo P450, (P significa proteínas y 450 se refiere a la absorbancia del grupo hemo de esta familia de hemoproteínas cuando se reducen y se unen al monóxido de carbono) (18), también conocidas desde 1991 como CYPs). Las cuales se han clasificado en familias, sub-familias y enzimas específicas debido a la homología en la secuencia de aminoácidos (19). Las enzimas CYPs son muy importantes en la fase I del metabolismo de fármacos en hígado, estas oxidan un número de sustancias endógenas y xenobióticos, incluyendo más del 90% de todos los medicamentos, convirtiéndolos en compuestos más hidrofílicos, así: el 50% es metabolizado por CYP3A4, el 30% por CYP2D6, el 10% por CYP2C9, el 4% por CYP1A2 y CYP2A6, CYP2C19 y CYP2E1 cada uno metabolizan el 2% de los medicamentos (20).

Utilizando una nueva nomenclatura basada en su homología estructural, se han caracterizado más de 160 formas, deducidas a partir de sus correspondientes cDNAs (12). Aquellas proteínas CYP de cualquier fuente, que presentan 40% o más de identidad en su secuencia, son incluidas en la misma familia, designada por un número arábico, el que va después del término CYP ej.: CYP2A6; las isoformas con más de 55% de identidad, son incluidas en la misma subfamilia, designada por una letra mayúscula (A, B, C, entre otras) y a las enzimas individuales se les asigna un número arbitrario específico. Por ejemplo, CYP2C9; 2 es el número de la familia, C es la subfamilia y 9 la numeración de ésta (12).

Varias enzimas CYPs, están involucradas en la síntesis de moléculas de bajo peso molecular, que actúan como reguladores en diferentes procesos en el organismo humano tales como: esteroides, prostaglandinas, tromboxanos, derivados de los ácidos grasos y derivados del ácido retinoico (21). Un clásico ejemplo es el uso de enzimas CYPs en la biosíntesis de varias hormonas esteroides, por ej. El primer paso en la biotransformación del colesterol es catalizado por una enzima CYP11A1 (22).

2.4.1 CYP2C9

CYP2C9 es uno de los cuatro miembros de la subfamilia CYP2C en humanos, aunque estudios genómicos han demostrado la posible existencia de tres miembros más de esta subfamilia de enzimas. En esta subfamilia en humanos se incluyen, CYP2C8, CYP2C18 y CYP2C19 que junto con CYP2C9, presentan más del 82% de la secuencia de aminoácidos (a.a) idénticos. A pesar del alto nivel de similitud en la secuencia, estas isoformas presentan un bajo nivel de solapamiento en la especificidad del sustrato (23). La enzima CYP2C9 en humanos, ha sido purificada en hígado y se han aislado a partir de cDNA, algunas variantes de esta enzima las cuales difieren en unos pocos aminoácidos. El cDNA de CYP2C9 codifica para una proteína de 490 a.a y pesa 55.6KDa. Gray y col. identificaron a *CYP2C9* como uno de varios genes de *CYP2C* agrupados en una región de 500kb sobre el cromosoma 10q24. (Fig. 3) (24).

La enzima existe en una variedad de formas polimórficas, varias de las cuales alteran la actividad catalítica de esta; CYP2C9 es primariamente expresado en el hígado y es la segunda a nivel de enzimas CYP en expresión (25). Sólo la enzima CYP3A4 es cuantitativamente la más alta en el hígado humano (26).

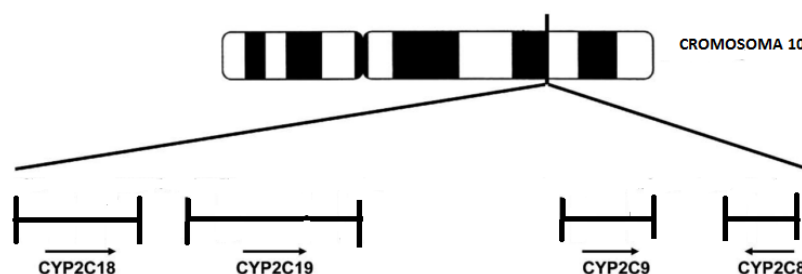


Fig 3. Localización de los genes *CYP2C18*, *CYP2C19*, *CYP2C9* y *CYP2C8* en la región cromosómica 10q24.

Modificado de Zhou S. 2009 (27).

Se estima que CYP2C9 es responsable de la eliminación del 15-20% de todos los medicamentos durante la fase I, algunos relacionados en la tabla 1 (28).

Medicamento	Tipo de medicamento	Referencia
Irbesartan	Bloqueador Angiotensina II	(29,30)
Losartán	Bloqueador angiotensina II	(31)
Fenitoína	Antiepiléptico	(32)
Ciclofosfamida	Agente alquilante	(33)
Tamoxifeno	Antiestrógeno	(34)
Fluvastatina	Estatina	(35)
Celecoxib	AINES	(36,37)
Diclofenaco	AINES	(38,39)
Ibuprofeno	AINES	(40)
Inoxicam	AINES	(41,42)
Meloxicam	AINES	(43)
Naproxeno	AINES	(44)
Glibenclamida	Sulfonilurea	(45)
Glimepirida	Sulfonilurea	(46,47)
Glipizida	Sulfonilurea	(48,49)
Tolbutamida	Sulfonilurea	(50)
Warfarina	Anticoagulante	(51–54)

Tabla 1. Medicamentos metabolizados por CYP2C9

CYP2C9 es la enzima responsable del metabolismo de la fracción S de la warfarina. William y col en el 2003, describieron la estructura cristalina de CYP2C9 humana libre y unida a warfarina (55). La estructura mostró un nuevo sitio de unión, sugiriendo que CYP2C9 puede acomodar simultáneamente múltiples sustratos (otros medicamentos) durante su función biológica, también se sabe que puede estar bajo un cambio alostérico cuando se une a warfarina.

La warfarina tiene un metabolismo estéreo y regio selectivo, estéreo selectivo porque la depuración del isómero activo S, es aproximadamente 1.5 veces mayor que la del isómero inactivo R (56) y regioselectivo porque formas diferentes de P450 catalizan el metabolismo de la warfarina (57). La fracción S, es metabolizada por CYP2C9 introduciendo un grupo hidroxilo en las posiciones 6- 7- dando como productos los metabolitos 6 y 7- hidroxivarfarina; la fracción R es metabolizada por CYP1A1, CYP1A2, y CYP3A4 para formar los metabolitos 6- 8- y 10 hidroxivarfarina (58,59). Ver la fig.4. Estos metabolitos son conjugados y excretados por la bilis y la orina (60).

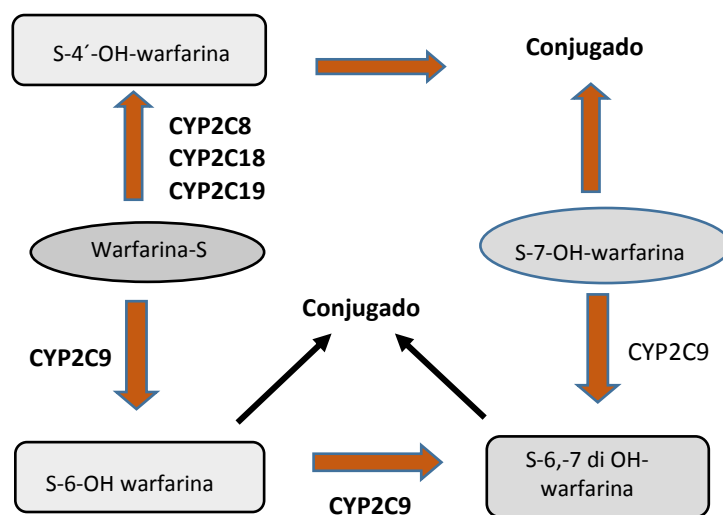


Fig 4. Metabolismo de la warfarina S por CYP2C9 y otras CYPs. Modificado de Zhou S, 2009

En el metabolismo de fase II, los productos hidroxilados por CYP2C9 son sometidos al proceso de glucoronidación, por las enzimas UDP-glucuronosil transferasas (UGTs). Los productos 6- 7- y 8- hidroxiwarfarina son glucorinados por las UGT hepáticas: UGT1A1, UGT1A3, y UGT1A9 junto con las UGTs extrahepáticas UGT1A8 y UGT1A10. Sólo UGT1A10 conjuga 4'-OH-warfarina (61,62).

2.4.2 POLIMORFISMOS DE *CYP2C9*

El gen *CYP2C9* es altamente polimórfico. Las variantes genéticas suscitan cambios en la actividad metabólica de la enzima, disminuyendo la eliminación del medicamento, e incrementando la vida media de éste, provocando reacciones adversas en los pacientes que toman medicamentos, que tienen una ventana terapéutica estrecha, tales como warfarina, fenitoína, glipizida y tolbutamida (63).

De las variantes alélicas en *CYP2C9*, la mayoría de estudios se han centrado en dos variantes no sinónimas, que conllevan a un fenotipo de metabolizador lento, las cuales son *CYP2C9* *2 también conocido como p.R144C o c.430C>T o rs1799853, polimorfismo ubicado en el exón 3; y *CYP2C9**3 también conocido como p.I359L o c.1075A>C o rs1057910 localizado en el exón 7, fig. 5. estos polimorfismos llevan al paciente a tener riesgo de hemorragia, si toman dosis estándar de la población general (64).

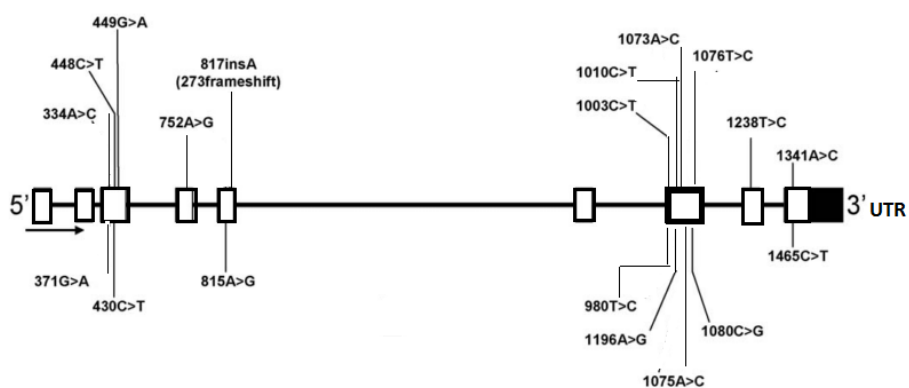


Fig 5. Estructura del gen *CYP2C9*, indicando la posición de 19 SNPs, no sinónimos encontrados en los exones 3, 5, 7, 8 y 9. Modificado de Zhou S. 2009 (20).

De acuerdo a los datos *in vitro*, la afinidad por el sustrato no se ve afectada por el alelo *2, pero la $V_{\max}$ (velocidad máxima: velocidad en la cual la enzima es saturada por el sustrato) es reducida aproximadamente al 50% con respecto al alelo *wild-type* (Wt) o *CYP2C9*1* (28), por otra parte, la variante definida como *CYP2C9*3*, también tiene una reducción en la $V_{\max}$. haciendo que *CYP2C9*3* tenga el 10% de actividad con respecto al alelo Wt (64).

Las personas con estas variables metabolizan más lentamente la warfarina, requieren más tiempo para tener una dosis estable, y tienen mayor riesgo de hemorragia con el tratamiento (65).

Se ha sugerido que los polimorfismos en *CYP2C9* explican 10-20% de la variación en la dosis de warfarina, mientras que factores no genéticos como la edad, peso, comedición y función renal explican el 26-39% de dicha variación (66).

El origen étnico, también relacionado con los factores genéticos, contribuye al mantenimiento de la dosis, por ejemplo, las personas asiáticas requieren 30-40% menos dosis que los caucásicos (67–69) y en los últimos, se ha encontrado que las frecuencias alélicas son 80% para *CYP2C9*1* (alelo Wt), 12% para *CYP2C9*2* y 8% para *CYP2C9*3*. La variante *CYP2C9*2* no está presente en los asiáticos y solo el 2-4% de los afroamericanos son portadores de este alelo. La variante *CYP2C9*3* está presente el 1-4% de la población china, coreana y japonesa, y en el 1-2% de los afroamericanos (13).

Los alelos *2 y *3, causan reducción en el aclaramiento de S-warfarina y en los requerimientos terapéuticos. Pacientes con el genotipo *3/*3 requieren una reducción en la dosis cercana al 90%, mientras que los portadores de los genotipos *1/*2 y *1/*3 requieren dosis de mantenimiento 10-20% y 20-50% menores respectivamente, en relación con el genotipo *1/*1 silvestre (65).

Otros análisis han demostrado que el 81% de los pacientes con requerimientos bajos de warfarina, tienen por lo menos un alelo *2 o *3, datos que en conjunto sugieren una fuerte relación entre la respuesta al tratamiento y los polimorfismos genéticos (70).

2.5 CYP4F2

CYP4F2 es una enzima miembro de la familia del citocromo P450, está involucrado en la ω -hidroxilación del ácido araquidónico y de la vitamina E; CYP4F2 también está involucrado en el metabolismo de la Vitamina K1 para convertirla en hidroxivitamina K1 Fig 6, y así, lograr eliminarla del organismo, este proceso conlleva a una menor concentración de vitamina K, la cual es necesaria para la activación de los factores de coagulación. El polimorfismo c.1347C>T también denominado rs2108622 o p.V433M, disminuye la hidroxilación de la VK, por lo que los portadores de p.V433M tienen una capacidad reducida de metabolizar la VK1, teniendo niveles elevados esta, por lo que requerirán una dosis de warfarina más alta para alcanzar la dosis terapéutica (72).

Mc Donald y col en 2009 (3), compararon la actividad de hidroxilación de CYP4F2 con el genotipo de microsomas hepáticos humanos (MHH) (membranas del retículo endoplásmico de células hepáticas), encontrándose, que cuando el genotipo era CC (genotipo silvestre) la actividad oxidasa de CYP4F2 era alta, cuando los MHH eran TT (genotipo polimórfico) se observó una reducción hasta del 75% de la actividad oxidasa de CYP4F2 y cuando el genotipo de los MHH era TC (heterocigotos), se generaba una actividad intermedia de la enzima.

Un estudio realizado por Caldwell y col (70), comprobaron que pacientes homocigotos para el alelo T requerían aproximadamente 1mg/día más de warfarina que los pacientes homocigotos para el alelo C y que el polimorfismo explica el 2-7% de la variación en la dosis de warfarina. Un estudio de asociación realizado en 1053 pacientes suecos, consideró a *CYP4F2* como un predictor menor de dosificación para la warfarina, pasando este gen a ser el tercer predictor para la dosificación de esta (71). Liang R, y col. (72) realizaron un Meta-análisis donde sugiere que los portadores del alelo T, ya sea el genotipo TC o TT requieren dosis de warfarina más altas entre el 10% y el 21% respectivamente que el alelo C.

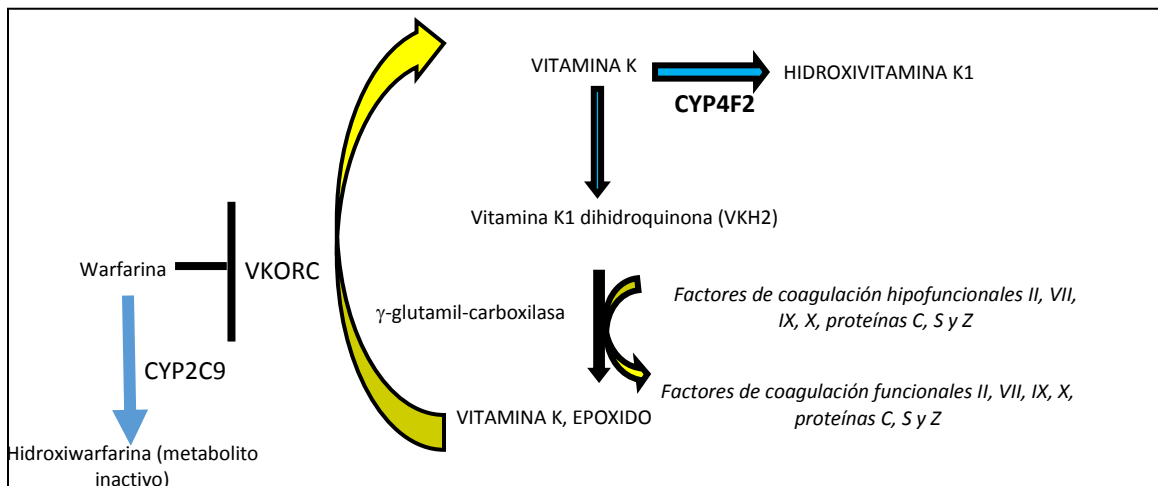


Fig 6 Hidroxilación de la vitamina K por CYP4F2. Modificada de McDonald MG 2009 (3).

2.6 VKORC1 (Vitamina K óxido reductasa subunidad 1)

La función principal de la vitamina K es actuar como cofactor para la γ -glutamyl carboxilasa, enzima que cataliza la carboxilación postraducciona, específica del ácido glutámico a ácido γ -carboxiglutámico, una variedad de proteínas dependientes de vitamina K (73).

Dentro de esta familia de proteínas, se incluyen factores de coagulación (II, VII, IX y X), así como otras proteínas que participan en el metabolismo óseo y traducción de señales (73). Concomitantemente con la carboxilación de la γ -glutamyl, la forma reducida de la vitamina K (Vitamina K hidroquinona VKH₂) es convertida a vitamina K 2,3-epóxido, la cual debe ser convertida nuevamente a vitamina K hidroquinona, reacción necesaria para que la VK esté disponible ya que *in vivo* su cantidad es limitada, esto es conocido como Ciclo REDOX o ciclo de la vitamina K, fig. 1 (73).

VKORC1, es responsable de la conversión de la VK 2,3-epóxido en VKH₂ y es muy sensible a la inhibición por medicamentos cumarínicos como R y S warfarina (73). La inhibición de

VKORC1 por la warfarina reduce la biodisponibilidad de VK, y a su vez se reduce la tasa de carboxilación y por ende conduce a la inactivación de proteínas dependientes de VK (73).

VKORC1 es blanco de los anticoagulantes cumarínicos, y sus variantes genéticas comunes alteran la sensibilidad de la warfarina. Esta enzima fue descrita en 1974, su gen, identificado en 2004 por Li T. y col (74), está localizado en 16p11.2, posee 3 exones y 2 intrones y codifica para las diferentes isoformas de la proteína, comúnmente denominadas complejo VKORC1. VKORC1 es una proteína integral de membrana de 163 a.a y un peso de 18.2 kDa. Fig 7. (78).

La deficiencia congénita de VKORC1 produce un fenotipo de hemorragia llamado deficiencia combinada de vitamina K dependiente de factores de coagulación tipo 2, y una mutación missense, p.R98W, ha sido identificada (75); otras mutaciones missense en *VKORC1* se han identificado en pacientes con resistencia a la warfarina: p.VI45A, p.R58G, y p.L128R (75).

Yuan H y col, secuenciaron el promotor de *VKORC1* y hallaron un polimorfismo en este, denominado g.-1639G>A. Este SNP (Polimorfismo de nucleótido simple) mostró una asociación con la dosis de warfarina, debido a que individuos con el alelo A requieren menor dosis del medicamento.

El polimorfismo g.-1639G>A se localiza en el segundo nucleótido de la caja E, el cual altera la secuencia consenso (CANNTG), siguiendo a una disminución en la transcripción del gen, dato confirmado por medio de un reportero de luciferasa, donde la actividad del promotor con el alelo G fue un 44% más alto que con el alelo A. Rieder y col. (76) establecieron que polimorfismos en *VKORC1* explican el 21% de la variación de la dosis.

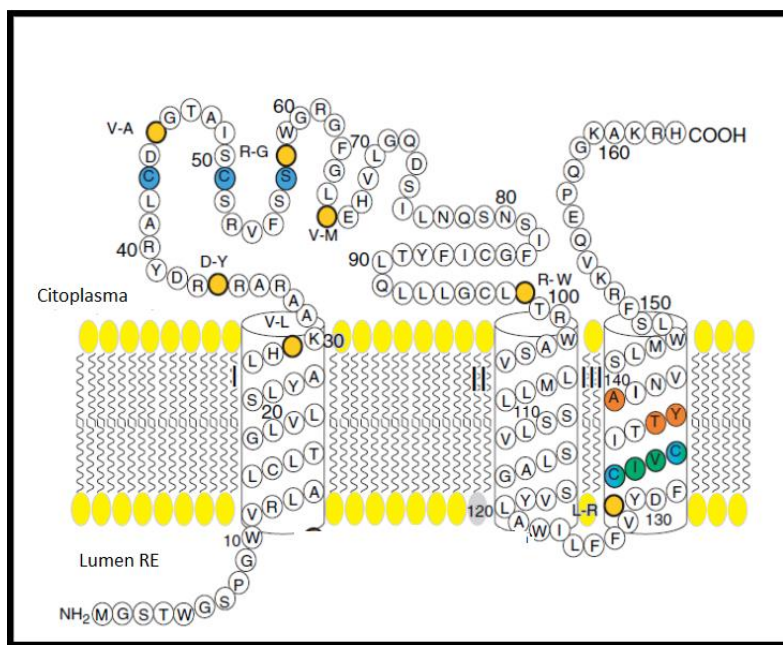


Fig 7 Proteína VKORC1. Los círculos naranjas identifican a los a.a 138-140, que corresponden al sitio de unión a la warfarina TYA; los círculos verdes muestran los a.a 132-135 que identifican el sitio redox CIVC; los círculos azules se refieren a sitios altamente conservados a través de las especies y por último los círculos amarillos se refieren a mutaciones reportadas en pacientes resistentes a la warfarina, identificando el a.a que se ha cambiado. Modificado de Oldenburg J. 2007 (2)

VKORC1 es una proteína de membrana tipo III, contiene tres dominios transmembranales, el N-terminal localizado en el lumen del retículo endoplásmico (RE) y C-terminal en el citoplasma. El dominio N-terminal de VKOR, como muchas proteínas de membrana de tipo III, es corto facilitando su traslado hacia la luz, 12 de los 163 aminoácidos están en el lumen, 85 residuos se encuentran en el citoplasma, y los 66 restantes están dentro de la membrana del RE (77). Tiene un *loop* citoplasmático largo, en el cual se encuentran cuatro cisteínas de las cuales dos son absolutamente conservadas: Cys 43 y 51, Goodstadt y Ponting (78), propusieron que estas dos cisteínas son parte del sitio activo de VKORC1.

También se ha propuesto que las Cisteína 132 y 135 probablemente sirven como centro redox, catalizando la reducción de la vitamina K-epóxido a la forma quinona (79); Tyr139(Y) es flanqueada por treonina (T) y alanina (A), este motivo (TYA) ha sido identificado como el sitio de unión a la warfarina en las oxido reductasas quinonas sensibles a las cumarinas (NQOR), cuando se reemplaza la tirosina por fenilalanina se presenta resistencia completa a la warfarina (2).

2.6.1 REACCIONES ADVERSAS

La OMS define una reacción adversa al medicamento (RAM) como “cualquier respuesta a un fármaco que es nociva y no intencionada que ocurre con la dosis utilizada en el hombre para el diagnóstico, profilaxis o tratamiento de una enfermedad o para la modificación de la función fisiológica”. Informe técnico No 425 de la OMS.

Se define el Problema Relacionado con la Medicación (PRM) como “cualquier evento indeseable que presenta el paciente, y en el que está involucrado o se sospecha que la causa es el tratamiento farmacológico y que interfiere de manera real o puede interferir en una evolución deseada del paciente”(80). Las reacciones adversas en ocasiones pueden ser graves, aproximadamente 1% de los pacientes que los padecen fallecen como consecuencia de las mismas (80).

Para identificar eventos adversos por medicamentos se establece un procedimiento de análisis (algoritmo), que permite la valoración y toma de decisiones. En este procedimiento, es fundamental el seguimiento del algoritmo o herramienta compuesta por una secuencia lógica de preguntas con valores numéricos (cuantitativos) o con pasos (cualitativos), que permite determinar como definitiva, probable o dudosa la RAM (80). El más conocido y recomendado es el propuesto por Naranjo y colaboradores, tabla 4.

ALGORITMO DE NARANJO Y COLABORADORES¹⁴

CRITERIO	SI	NO	NO SABE / NO RESPONDE
1. Existe evidencia previa concluyente sobre la RAM?	+1	0	0
2. La RAM apareció después de la administración del medicamento sospechoso?	+2	-1	0
3. Ocurrió mejoría de la RAM al suspender el medicamento o al administrar un antagonista específico?	+1	0	0
4. La RAM reapareció al reiniciar la administración del medicamento?	+2	-1	0
5. Existen otras causas probables de la RAM?	-1	+2	0
6. La RAM aparece después de administrar un placebo?	-1	+1	0
7. Se evidenció la presencia del fármaco en fluidos corporales en concentraciones definidas como tóxicas?	+1	0	0
8. Varió la gravedad de la RAM al variar la dosis del medicamento?	+1	0	0
9. El paciente ha presentado una RAM semejante por exposiciones previas al mismo medicamento o similares?	+1	0	0
10. La RAM se determinó mediante alguna evidencia objetiva?	1+	0	0

Tabla 2. Algoritmo de Naranjo, el cual permite determinar si un paciente presentó un evento adverso mediante la ingesta de la warfarina

En un estudio hecho en un hospital universitario de tercer nivel en la ciudad de Bogotá en el período de cinco meses del año 2003-2004, en el servicio de medicina interna, se detectaron 268 reacciones adversas en 208 de los 836 pacientes que ingresaron en el servicio. El sistema frecuentemente afectado fue el hematológico (33,9%); los medicamentos que actúan en sangre fueron los más frecuentemente relacionados (37,6%). El costo generado por la atención de las reacciones adversas fluctuó entre \$93'633.422 y \$ 122'155.406, pasando el costo a dólares estadounidenses el costo anual se ubicaría entre US\$96.4321 y US\$125.793 (año 2004) (81). En este estudio la warfarina ocupó el cuarto lugar en los medicamentos causantes de reacciones adversas con un porcentaje de 6,3%. (81).

En 2006 Machado JE, publicó un estudio realizado en dos clínicas de la ciudad de Pereira, tomando todos los pacientes sin tener en cuenta edad y género que llegaban al servicio de urgencia por problemas relacionados con la toma de medicamentos (entre julio y septiembre del 2005) (82), 91 casos fueron compatibles con una RAM, la prevalencia en el servicio de urgencias por RAM fue de 0.46%. Los grupos de medicamentos más

representativos según clasificación ATC (Anatómica, Terapéutica y Química) fueron los anti infecciosos de uso sistémico (24,2%), los antiinflamatorios y antirreumáticos no esteroides (17,6%), los analgésicos (9,9%), los medicamentos usados en diabetes (8,8%), antieméticos y antinaúseos (4,4%), agentes antitrombóticos (4,4%), antihipertensivos (4,4%), antipsicóticos (4,4%) y antidepresivos (4,4%) (82).

3 JUSTIFICACION

La Warfarina es utilizada en la anticoagulación oral crónica en una gran variedad de cuadros clínicos, entre los cuales podemos mencionar: prevención y tratamiento de trombosis venosa profunda, tromboembolismo pulmonar, fibrilación auricular, pacientes con prótesis valvulares de tipo mecánico y tisular, prevención de recurrencia de infarto agudo de miocardio y útil en la profilaxis de trombosis venosa, después de cirugía.

El manejo de la terapia es generalmente hecho por el seguimiento del tiempo de tromboplastina (PT), junto con el INR (International Normalized Ratio), el cuál debe estar de 2 a 3, rango en el cual se encuentra la dosis terapéutica que evitará que un paciente se encuentre subanticoagulado o sobreanticoagulado. Sin embargo, llegar a tener la dosis adecuada requiere de tiempo, el cual varía en cada individuo; actualmente la única prueba con la que cuenta el médico para que pueda determinar la dosis es el INR, examen de laboratorio el cual indicará si debe subir o bajar los mg del medicamento, por otra parte, algunos pacientes presentan reacciones adversas la mayoría asociadas a hemorragia.

En pacientes con sangrado severo o que comprometan la vida (Ej.: hemorragia intracraneana), se recomienda suspender la warfarina e iniciar tratamiento con vitamina K (antagonista de la warfarina).

Existen tres genes muy importantes en la dosificación de la warfarina, *CYP2C9*, *VKORC1* y *CYP4F2*, variaciones en la secuencia de estos se encuentran asociados con riesgo de hemorragia por deficiencia enzimática.

La warfarina es ampliamente utilizada en Colombia y en el mundo para prevención y tratamiento de varias patologías hematológicas y debido a los efectos adversos que

generan, los costos por tratamiento de estos pacientes pueden llegar a ser insostenibles para el país, aproximadamente 53 a 160 miles de millones de pesos, por lo que la genotipificación de los individuos que toman este medicamento beneficiaría a los estamentos prestadores de salud, ahorrando costos y evitarían que el paciente recurra a las salas de urgencias por presentar algún tipo de sangrado.

Debido a que en cada población las frecuencias alélicas de estos genes son diferentes, el presente estudio realiza la genotipificación de una muestra de 204 individuos, de la ciudad de Bogotá y los datos obtenidos se comparan con los de otras poblaciones y de esta manera conocer mejor nuestro acervo genético.

Es probable que en el futuro cercano se realice la genotipificación recomendada por la FDA (Food and Drug Administration) para quienes toman warfarina para administrar una dosis individual según las características propias de cada paciente a través de un algoritmo.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El futuro de la farmacogenética en la medicina actual, radica en el estudio de la diversidad individual a la administración de medicamentos, con el objetivo de identificar el fármaco y la dosis adecuada para cada paciente. Se han identificado polimorfismos genéticos que confieren diferencias interindividuales en la respuesta a medicamentos, conocimiento necesario para modificar la efectividad de los fármacos terapéuticos y de esta manera reducir los efectos adversos que estos pueden generar.

En Colombia, como en todo el mundo, los cumarínicos como la warfarina son ampliamente utilizados para el tratamiento de pacientes con diversos padecimientos cardiovasculares. La FDA estima que dos millones de personas inician tratamiento con estos medicamentos, cada año. La Warfarina es un medicamento de difícil manejo debido a que su dosis óptima depende no solo de lo genético sino también de lo ambiental. Este medicamento es el segundo fármaco, después de la insulina en causar el mayor número de reacciones adversas, muchas de estas debido a polimorfismos en los genes relacionados con la vía de inactivación de factores de coagulación, como *CYP2C9*, *CYP4F2* y *VKORC1*, teniendo en cuenta que la variabilidad en la dosificación del medicamento debido a causas genéticas es cercano al 60%, por esto la importancia de genotipificar a los individuos para los genes farmacogenéticamente importantes ya que permitirá iniciar un tratamiento eficaz, seguro que genere menos fallas terapéuticas y eventos adversos.

En el gen *CYP2C9*, los dos polimorfismos más importantes son *CYP2C9**2 y *CYP2C9**3, que corresponden a mutaciones no sinónimas que generan cambio en la proteína: p.R144C para *2 y p.I359L para *3. Estas mutaciones en el paciente causan hemorragias si toman la dosis estándar de la población debido a que ellos son metabolizadores lentos.

Para el gen *VKORC1*, se han descrito un polimorfismo, asociados a la respuesta al tratamiento con warfarina: g.-16396 G>A, el cual disminuye la transcripción del gen, por lo tanto que pacientes con esta variación deben ser tratados con dosis menores a la estándar para evitar sobre anticoagulación y por ende hemorragias.

En el 2008, se propone un tercer gen farmacogenéticamente importante en la dosificación de la warfarina, *CYP4F2* con un polimorfismo específico, p. V433M.

Para verificar la efectividad del tratamiento se hace la evaluación del INR; así valores iguales a 1 indican para el paciente riesgo de trombosis y valores mayores a 3 riesgos de hemorragia.

A pesar del uso de estos protocolos, los accidentes hemorrágicos pueden ser prevenidos, mediante la genotipificación de los pacientes a través de su ADN. La FDA introdujo en la etiqueta de la warfarina lo siguiente: es necesario monitorear la dosis del medicamento mediante la variante genética de los genes *CYP2C9* y *VKORC1* del paciente.

En Colombia no se conocen frecuencias alélicas y genotípicas de los genes farmacológicamente importantes en la medicación con warfarina, como *CYP2C9*, *VKORC1* y *CYP4F2*, cuyas variantes motiva a que se modifiquen las dosis en el 60% de los casos. Otro motivo como el peso y la edad, son responsables de un 10 al 15% de las variaciones en la dosificación del fármaco.

Este trabajo pretende establecer el comportamiento de los alelos *CYP2C9**2 y *3, *VKORC1* g.-16396 G-A y en *CYP4F2* c.1347C>T, en una muestra de la población colombiana, y compararlos con lo reportado en la literatura para otros países. Estos datos a futuro pueden ser usados para establecer un algoritmo que permita dar la dosis segura y eficaz a los pacientes que estén genotipificados para estos tres genes.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar las frecuencias alélicas de los polimorfismos farmacogenéticamente importantes en los genes: *VKORC1*, *CYP2C9* y *CYP4F2* en una muestra de la ciudad de Bogotá y su comparación con otros países.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar el genotipo de estos pacientes y determinar la frecuencia en la población de estudio, en relación a los polimorfismos de *CYP2C9*1*, *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3*, el polimorfismo V433M de *CYP4F2* y el polimorfismo -16396 G-A en *VKORC1*, los cuales son responsables de la variación en la dosificación y ocurrencia de efectos adversos de la warfarina.
- Establecer las frecuencias alélicas para cada uno de los polimorfismos de interés en los genes de estudio.
- Identificar las sobreanticoagulaciones en pacientes tratados con warfarina y su distribución en la población estudiada.

6 MATERIALES Y METODOS

6.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio observacional analítico

6.2 POBLACION DE ESTUDIO

Se incluyeron 204 muestras de ADN de pacientes que toman warfarina, 25 de la Clínica Cardio Infantil y 179 del Hospital Universitario Mayor Méderi, de la ciudad de Bogotá.

6.3 CRITERIOS DE INCLUSION

- Pacientes anticoagulados con warfarina.
- Pacientes que deseen participar voluntariamente en el estudio.

6.4 CRITERIOS DE EXCLUSION

- Evidencia clínica de Insuficiencia hepática e insuficiencia renal moderada a severa.
- Enfermedad maligna diagnosticada
- IMC (Indice de Masa Corporal) <de 18.
- Enfermedad del colágeno diagnosticada.

- Fármaco de evidencia mayor establecida: Aspirina, Cabezitapina, Fluconazol, Florouracilo, Maxifloxaxina, Simbastatina, Sulfametoxazol (medicamentos inductores o inhibidores de *CYP2C9*).
- Alcoholismo: evaluado bajo el test de Cage, que consiste de cuatro preguntas sobre el consumo de bebidas alcohólicas (anexo 1).
- Pacientes vegetarianos (Consumen más vitamina K, la cual se encuentra en los vegetales de hojas verdes).

7 METODOLOGIA

7.1 OBTENCION DE LAS MUESTRAS DE ADN

Se tomaron muestras de sangre venosa por venopunción y/o raspado de mucosa oral con escobillón, previo consentimiento informado. (Anexo 2.)

7.2 TAMAÑO DE LA MUESTRA.

El tamaño de la muestra fue determinado teniendo en cuenta la relación $1/FAM^2$ (Frecuencia alélica mínima), donde FAM corresponde a la frecuencia mínima reportada de los alelos a estudiar que para el caso corresponde a 9,5% (alelo 3* de *CYP2C9*)(83). Mediante la ecuación de Hardy-Weinberg se determina la frecuencia del alelo mediante la relación q^2 . La frecuencia de este alelo en este estudio corresponde a (0,095%) elevado al cuadrado da un valor de 0,0090 y 1 dividido en este valor, corresponde a 111 individuos, sin embargo dado que las frecuencias alélicas de una población a otra pueden variar se decidió ingresar 200 pacientes..

7.3 TOMA DE MUESTRAS Y EXTRACCION DE DNA

Las muestras empleadas en este estudio corresponden a personas que toman warfarina, procedentes de la Clínica Cardio Infantil y del Hospital Universitario Mayor Méderi, de la ciudad de Bogotá, quienes mediante el conocimiento y diligenciamiento de un consentimiento informado decidieron participar voluntariamente en el presente estudio

(anexo 2). De cada persona participante del estudio se tomaron 5cc de sangre periférica anticoagulada en EDTA para posterior extracción de ADN. En algunos casos se utilizaron muestras de raspado bucal, tomado con escobillón, para luego hacer las respectivas extracciones de ADN.

Las muestras de sangre periférica fueron sometidas a extracción de ADN mediante el método de *salting out* (84) (anexo 3), y el de las muestras obtenidas de escobillón por el método Fenol-Cloroformo (85) (anexo 4). El ADN extraído de sangre fresca y de raspado bucal se cuantificó en un espectrofotómetro NANODROP 2000c (ThermoSCIENTIFIC), (la concentración del ADN debe corresponder a 100ng/μl). Los ADN de calidad (pureza del ADN entre 1.8 y 2), y concentración fueron utilizados en el montaje de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

7.4 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron los fragmento de interés de cada uno de los genes, mediante el uso de primers forward y reverse (tabla 3), así: *CYP2C9* exones 3 y 7, con primers diseñados mediante el programa bioinformático Gene Runner, los segmentos esperados tienen una longitud de 691 y 166pb, respectivamente; para *CYP4F2*, los primers se diseñaron mediante Gene Runner y se observa un fragmento esperado de 358 pb, tabla 6.

Gen	Primers
<i>CYP2C9*2</i>	Primer Forward 5' TACAAATACAATGAAAATATCATG 3'
	Primer Reverse 5' TAACAACCAGGACTCATAATG 3'
<i>CYP2C9*3</i>	Primer Forward 5' AATAATAATATGCACGAGGTCCAGAG 3'
	Primer Reverse 5'GATACTATGAATTTGGGGACTT 3'
<i>CYP4F2</i>	Primer Forward 5' AGTCCCGGTCATCTCCG 3'
	Primer Reverse 5' CGCCAGCCTTGGAGAGACAGACAG 3'
<i>VKORC1</i>	Primer Forward 5' ATCCCTCTGGGAAGTTCAAGC 3'
	Primer Reverse 5' CACCTTCAACCTCTCCATCC 3'

Tabla 3. Primers utilizados para la amplificación de los segmentos de interés, a partir de los genes *CYP2C9*, *CYP4F2* y *VKORC1*

En cuanto a *VKORC1* se amplificó un fragmento del promotor del gen, se utilizaron los primers diseñados por Obayashi y col. 2006 (86), que generan un fragmento de 636pb.

La PCR fue realizada en mezclas de reacción a volumen final 14,5 µl, con los siguientes reactivos: primer 1: 0,5µl, Primer 2: 0,5 µl, master mix: 6.25 µl, agua MQ 5,25 µl y ADN 2µl. las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 4. Todas las amplificaciones fueron montadas sobre un termociclador MJ Research PTC-100, con capacidad para 96 tubos.

Tabla: Ciclos de amplificación (PCR) para los SNPs				
	<i>CYP2C9*2</i>	<i>CYP2C9*3</i>	<i>CYP4F2</i>	<i>VKORC1</i>
Paso 1	94°C x10 min	95°C x 10 min	94°C x 10min	94°C x 10 min
Paso 2	94°C x 45 seg	95°C x 45 seg	94°C x 45 seg	94°C x 45 seg
Paso 3	55°C x 45 seg	57°C x45 seg	61°C x 45 seg	61°C x 45 seg
Paso 4	72°C x 45 seg	72°C x45 seg	72°C x 45 seg	72°C x 45 seg
Paso 5	Repetir 34 veces desde el paso 2	Repetir 34 veces desde el paso 2	Repetir 34 veces desde el paso 2	Repetir 34 veces desde el paso 2
Paso 6	72°Cx 10 min	72°C x 10 min	72°C x 10 min	72°C x 10 min

Tabla 4. Ciclos de amplificación para los polimorfismos

Luego de la amplificación todos los productos fueron verificados en geles de agarosa al 1.2%, teñidos con bromuro de etidio así: 5 µl de producto amplificado y 1 µl de marcador de peso molecular (PM), los geles se corrieron por 60 minutos a 110 voltios.

La verificación del tamaño obtenido para cada paciente se hizo mediante el uso de un patrón de peso molecular (MP) que va de 50 en 50pb para *VKORC1* y *CYP4F2* y de 100 en 100 pb para *CYP2C9*.

7.5 RLFPs

Los productos amplificados fueron sometidos a restricción con enzimas específicas para cada uno de los genes de interés, así, para los polimorfismos en *CYP2C9*2* se empleó la enzima de restricción *Avall* cuyo sitio de restricción es G[^]GWCC (W es A o T) y para el

alelo *3 *KpnI* con el sitio de restricción GGTAC[^]C, para *CYP4F2*, la enzima *PvuII* con el sitio de restricción CAG[^]CTG y para *VKORC1* *NciI* con la secuencia de reconocimiento CCSGG (S es G o C. Las condiciones de restricción, se observan en la tabla 5 y los tamaños de los fragmentos en la tabla 6.

T				
	<i>CYP2C9*2</i> Enzima <i>AvaII</i>	<i>CYP2C9*3</i> Enzima <i>KpnI</i>	<i>CYP4F2</i> Enzima <i>PvuII</i>	<i>VKORC1</i> Enzima <i>NciI</i>
Enzima de Restricción	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Producto de amplificación	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Buffer	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Agua	9 µl	9 µl	9 µl	9 µl
Incubación	Las reacciones se incubaron a 37°C toda la noche			

Tabla 5. Condiciones de Restricción para verificar la presencia de los SNPs, en los pacientes estudiados

La verificación de los segmentos de restricción, se hizo sobre geles de agarosa al 1,5% y se verificaron los pesos de los fragmentos, mediante el uso de un patrón de PM, que va de 100 en 100 para *CYP2C9*2*, de 50 en 50 para *CYP2C9*3*, *CYP4F2*, y *VKORC1*.

Tamaños del producto de amplificación y tamaños de los fragmentos de restricción				
	<i>CYP2C9*2</i>	<i>CYP2C9*3</i>	<i>CYP4F2</i>	<i>VKORC1</i>
Tamaño del producto amplificado	691 pb	161 pb	358 pb	636 pb
Tamaño del fragmento de restricción	527 pb	110 pb	208pb	472 pb
	164 pb	51 pb	150 pb	114 pb
				50 pb

Tabla 6. Tamaños de los productos de amplificación y tamaños de los fragmentos de restricción

7.6 IDENTIFICACION DE LAS REACCIONES ADVERSAS A MEDICAMENTOS (RAM)

Las RAM (Reacciones Adversas a Medicamentos): Se realizaron por medio del algoritmo de Naranjo, que permite evaluar si un evento adverso fue causado por la exposición a un medicamento. Tabla 2.

Para verificar esta respuesta a medicamento se les hizo seguimiento, durante 6 meses, a los individuos participantes en el estudio, el cual se realizó por medio de una llamada telefónica y se indagó sobre el valor del último INR, dosis, y la presencia de algún tipo de

evento adverso. (Anexo 5) (Los resultados de los pacientes se encuentran en una base de datos de Excel)

Luego al aplicar el algoritmo de Naranjo se definió un evento adverso como: Probado ≥ 9 , probable entre 5-8, posible de 1-4 y dudoso ≤ 0 .

8 RESULTADOS

Se analizaron 204 personas provenientes de la Clínica Cardio Infantil, y el Hospital Universitario Méderi, con indicación médica de warfarina, quienes presentaron las características de la tabla 7.

Promedio	Hombres	Mujeres
Total	91(44,60%)	113 (53,39%)
Edad (años)	63,87	63,60
Peso (Kg)	72,46	66,16
IMC	26,18	26,20

Tabla 7. Características generales de la población de estudio

8.1 DETERMINACION DE LAS FRECUENCIAS GENOTIPICAS PARA LOS GENES DE INTERES

La frecuencia de los genotipos de *CYP2C9*, *CYP4F2* c.1347C>T y *VKORC1* g.-1639 G>A fueron determinados para la población de estudio por conteo directo a partir de los pacientes que los presentaban, luego de hacer las respectivas restricciones y verificando en cada caso la presencia de homocigotos silvestres, heterocigotos y homocigotos mutados con base en los tamaños de los segmentos de restricción así:

Para *CYP2C9**2 cuando el genotipo es *1/*1 se obtienen dos bandas de restricción una de 527pb y otra de 164pb; para el genotipo *1/*2 se observan tres, de 691pb, 527pb y 164pb, y cuando es *2/*2 solo se observa una banda de 691pb (fig. 8).

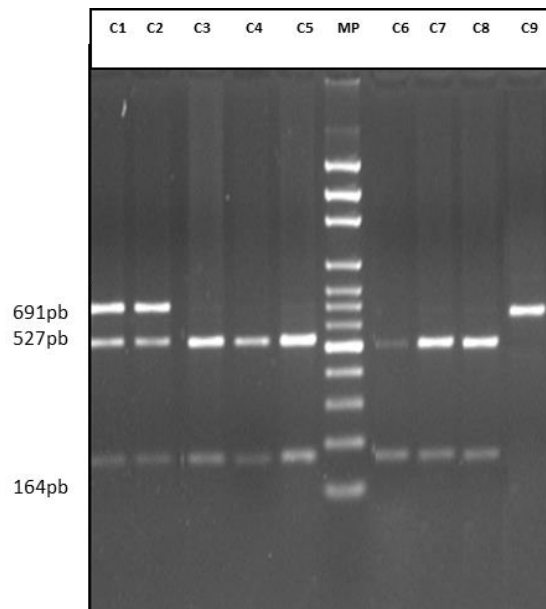


Fig 8. Fragmentos de restricción para *CYP2C9*2*. MP de 100 en 100 pb, los carriles 1 y 2 muestran dos heterocigos **1/*2*, los carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 8 muestran los homocigotos **1/*1*. El carril 9 muestra un homocigoto *2*/2**.

Para *CYP2C9*3*, cuando el genotipo es **1/*1*, se observa solo una banda de 161pb, para el genotipo **1/*3*, se observan tres bandas de 161, 110 y de 51pb, y por último el genotipo **3/*3* presenta dos bandas de 110pb y otra de 51pb. Como se observa en la fig. 9.

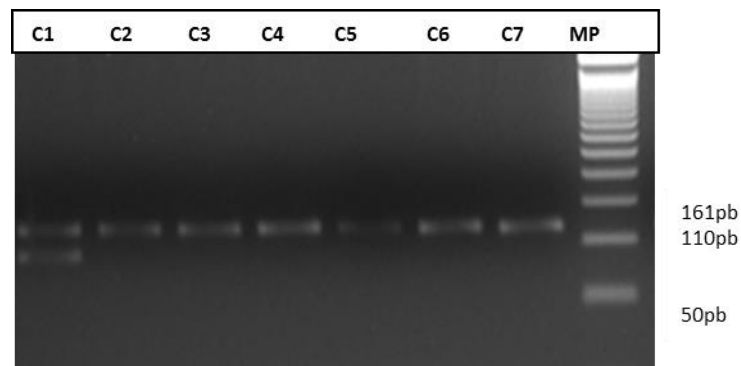


Fig 9. Fragmentos de restricción para *CYP2C9*3*. MP de 50 en 50pb, los carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7 muestran los homocigotos **1/*1*, el carril uno es un heterocigoto **1/*3*

Para *CYP4F2* cuando el genotipo es CC se obtienen dos fragmentos de 208 y 150pb, cuando el genotipo es CT se obtienen 3 bandas de 358, 208 y 150pb, y cuando el genotipo es TT se obtiene una banda de 358pb, como se observa en la figura 10.

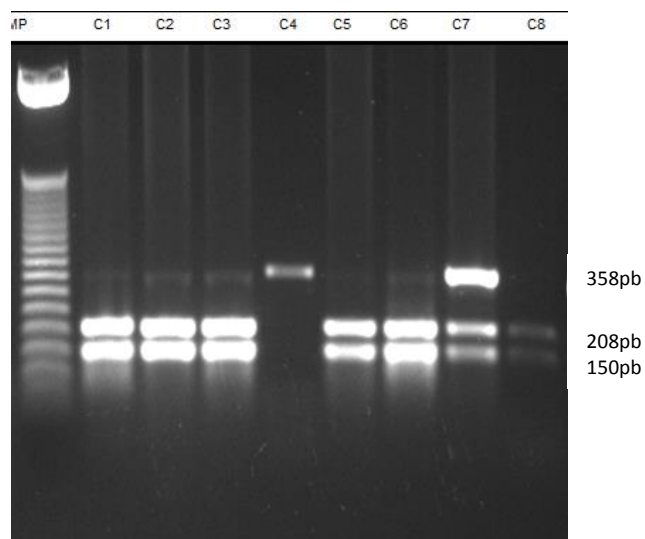


Fig 10 Fragmentos de restricción para *CYP4F2*, MP de 50 en 50 pb. En los carriles 1, 2, 3, 5, 6 y 7 se observan los heterocigotos C/T, en el carril 4 se observa un homocigoto T/T, en el carril 8 se observa el homocigoto C/C.

Para *VKORC1* cuando el genotipo es GG se obtienen tres bandas de 472, 114 y 50 pb, cuando el genotipo es GA se observan 4 bandas de 522, 472, 114 y 50 pb y cuando el genotipo es AA se observan dos bandas de 522 y 114pb. Como se observa en la figura 11.

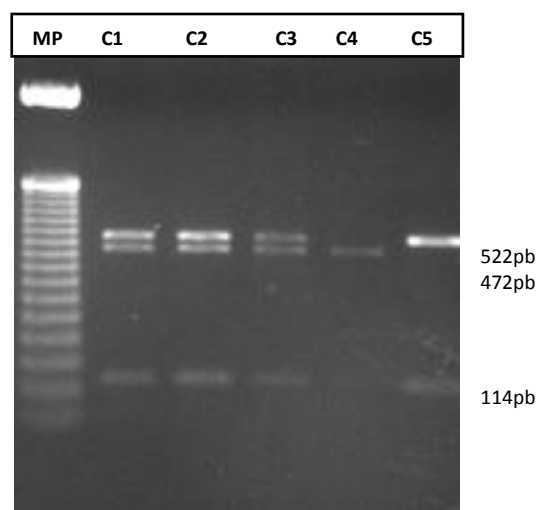


Fig 11. Fragmentos de restricción para *VKORC1*. MP de 50 en 50 pb, los carriles 1, 2 y 3 muestran los heterocigotos G/A, el carril 4 muestra a un homocigoto G/G, el carril 5 corresponde a un homocigoto A/A

8.2 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALELICAS

Para el cálculo de las frecuencias genotípicas y alélicas en cada caso se excluyeron los pacientes en los cuales no hubo amplificación así para el gen *CYP2C9* y *VKORC1* el número total de pacientes tenidos en cuenta fue 203 y para *CYP4F2*, 204. Para calcular la frecuencia genotípica se suma la cantidad de individuos que poseen el genotipo y se divide por el número total de individuos en la muestra (87)

Ejemplo: *CYP2C9* *1/*1: $157/203=0,77$, los demás resultados se muestran en la tabla 8

Genotipo <i>CYP2C9</i>	Individuos n=203	Frecuencia Genotípica
<i>CYP2C9</i> *1/*1	157	0.77
<i>CYP2C9</i> *1/*2	27	0.13
<i>CYP2C9</i> *1/*3	16	0.08
<i>CYP2C9</i> *2/*2	2	0.01
<i>CYP2C9</i> *2/*3	1	0.01
<i>CYP2C9</i> *3/*3	No encontrado	0.00

Tabla 8. Frecuencia genotípica de *CYP2C9*

Genotipos *CYP4F2*: n=204 tabla 9

Genotipo <i>CYP4F2</i>	Individuos n=204	Frecuencia Genotípica
C/C	107	0.52
C/T	71	0.35
T/T	26	0.13

Tabla 9. Frecuencia genotípica de *CYP4F2*

Genotipos *VKORC1*: n=203 tabla 10

Genotipo <i>VKORC1</i>	Individuos n=203	Frecuencia Genotípica %
G/G	65	0.32
G/A	95	0.47
A/A	43	0.21

Tabla 10. Frecuencia genotípica de *VKORC1*

Para calcular las frecuencias alélicas se cuentan el número de copias de un alelo particular presente en una muestra y se divide por el número total de todos los alelos en la muestra
Frecuencia de un alelo= número de copias del alelo / número de copias de todos los alelos en el locus (87) así:

Ejemplo:

Alelo *1: Total de alelos de los individuos homocigotos con el alelo *1= $157 \times 2 = 314$; total de alelos de los individuos heterocigotos con el alelo *1= $27 + 16 = 43$; así el total de alelos *1= $314 + 43 = 357$; Número de copias de todos los alelos= $203 \text{ individuos} \times 2 = 406$ alelos
Frecuencia del alelo *1= $357/406 = 0.87$. Los demás resultados se pueden observar en la tabla 11.

<i>CYP2C9</i> n=203	Frecuencia alélica
*1	0.87
*2	0.08
*3	0.05

Tabla 11. Frecuencia alélica de *CYP2C9*

Alelos de *CYP4F2* n=204 tabla 12.

<i>CYP4F2</i> n=204	Frecuencia alélica
C	0.7
T	0.3

Tabla 12. Frecuencia alélica de *CYP4F2*

Alelos de *VKORC1* n=203 tabla 13.

<i>VKORC1</i> n=203	Frecuencia alélica
G	0.55
A	0.44

Tabla 13. Frecuencia alélica de *VKORC1*

Finalmente, para el presente estudio se verificó que la población de estudio se encontrara en equilibrio de Hardy-Weinberg, cuya fórmula es: $p^2+2pq+q^2=1$, la cual se aplicó para *CYP4F2* y *VKORC1*. Donde p^2 corresponde al genotipo homocigoto *wild type* y q^2 corresponde al genotipo homocigoto polimórfico, y los heterocigotos corresponden al doble de $p \times q$.

Debido a que se analizan 3 alelos en *CYP2C9* se aplicó la fórmula para el equilibrio de Hardy-Weinberg de la siguiente manera: $p^2+2pq+2pz+q^2+2qz+z^2=1$, p corresponde al alelo *1, q al alelo *2 y z al alelo *3. La frecuencia del genotipo *1/*1 corresponde a la frecuencia del alelo p (*1) al cuadrado, la frecuencia del genotipo *2/*2 corresponde a la frecuencia del alelo q (*2) al cuadrado y la frecuencia del genotipo *3/*3 corresponde a la frecuencia del alelo z (*3) al cuadrado. La frecuencia de los heterocigotos es entonces el doble de la frecuencia p y q, más el doble de la frecuencia de q y z.

Para confirmar si existe una diferencia significativa de los alelos observados y los esperados se realizó una prueba de *chi*-cuadrado mediante la fórmula $X^2 = (O-E)^2/E$ donde O corresponde al número de individuos observados, E corresponde al número de individuos esperados. Para esta prueba se acepta el equilibrio de Hardy-Weinberg cuando $p < 0,05$.

Para *CYP2C9* y *VKORC1* se encontraron valores de p: 0.99 y 0.38 respectivamente, indicando que la población de estudio se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg; mientras que el valor de p para *CYP4F2* fue p: 0.02, indicando que la población no se encuentra en equilibrio, debido a que la mayoría de pacientes nació en diferentes lugares de Colombia, sin embargo, migraron a la capital, fenómeno que afecta la frecuencia alélica.

También se usó la base de datos GenePop para confirmar los resultados anteriores observándose los siguientes datos:

Para *CYP2C9* valor de p: 0.44, para *CYP4F2* valor de p: 0.00 y *VKORC1* con valor de p: 0,28.

8.3 COMPARACION CON OTROS PAISES

Posteriormente se compararon estas frecuencias con las realizadas en el presente trabajo con otros países de diferentes continentes, por medio de la prueba chi-cuadrado y se determinó si existe diferencia significativa cuando el valor de p es menor o igual a 0.05.

Para las frecuencias alélicas y genotípicas de *CYP2C9*, se revisó bibliografía para los siguientes países latinoamericanos: Colombia, Uruguay, Brasil, Argentina, México y Puerto Rico; Europeos: España, Noruega, Suecia, Reino Unido, Italia, y Alemania; Norteamericanos: Canadá (población indígena y población esquimal), Estados Unidos (población blanco-americana y afroamericana); Asiáticos: China, Corea, Japón y Taiwán y africanos: Egipto y Etiopía.

Para las frecuencias alélicas y genotípicas de *CYP4F2*: Latinoamericanos: Colombia y Brasil; Europeos: Holanda, Italia, Noruega, Francia, Holanda y Alemania; Norteamérica: Canadá y Estados Unidos (población blanco-americana y afroamericano); Asiáticos: China, Corea y Japón, africanos: Egipto, y Etiopía.

Para las frecuencias alélicas y genotípicas de *VKORC1*, se revisaron los países latinoamericanos: Colombia, Uruguay, Brasil, Argentina y Puerto Rico; europeos: España, Portugal, Reino Unido, Francia, Holanda, Italia, Alemania, Noruega y Suecia; norteamericanos: Canadá, estados Unidos; asiáticos: China, Corea y Japón y africanos: Mozambique y Egipto

8.3.1 DISTRIBUCION DE LOS GENES *CYP2C9*, *CYP4F2* Y *VKORC1* ENTRE LOS DIFERENTES PAISES

A continuación se presentan la distribución alélica y genotípica de los genes *CYP2C9*, *CYP4F2* y *VKORC1*, por continentes: Latinoamérica, Europa, Asia y África, y sus respectivos valores de p respecto a nuestro estudio.

8.3.1.1 DISTRIBUCION ALELICA DE LOS GENES *CYP2C9*, *CYP4F2* Y *VKORC1* ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS ETNICOS

Se comparan las frecuencias obtenidos en el presente estudio, con las frecuencias reportadas para países latinoamericanos y se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

CYP2C9																			
Latinoamérica	Estudio actual n=202	Colombia n=145 (88)			Uruguay n=71 (89)			Brasil n=390 (90)			Argentina n=101 (91)			México n=98 (92)			Puerto Rico n=103 (93)		
Alelos			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS	NS	p	S/NS		p	S/NS
CYP2C9*1	0.87	0.90	0.97	NS	0.73	0.87	NS	0.82	0.96	NS	0.70	0.84	NS	0.86	0.99	NS	0.75	0.89	NS
CYP2C9*2	0.08	0.09	0.97	NS	0.12	0.91	NS	0.12	0.89	NS	0.27	0.71	NS	0.09	0.97	NS	0.19	0.79	NS
CYP2C9*3	0.05	0.05	1.00	NS	0.15	0.80	NS	0.05	1.00	NS	0.03	0.91	NS	0.05	1.00	NS	0.05	1.00	NS

Tabla 14. Comparación de las frecuencias alélicas (*CYP2C9*) del presente trabajo vs países latinoamericanos. S: significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se comparan las frecuencias obtenidas en el presente estudio con lo reportado para países europeos y se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

<i>CYP2C9</i>										
Europa	Estudio Actual	España n=116 (94)			Noruega n=212 (95)			Suecia n=1490 (96)		
Alelos			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
<i>CYP2C9*1</i>	0.87	0.76	0.90	NS	0.83	0.96	NS	0.81	0.95	NS
<i>CYP2C9*2</i>	0.08	0.16	0.84	NS	0.11	0.93	NS	0.11	0.93	NS
<i>CYP2C9*3</i>	0.05	0.08	0.92	NS	0.06	0.97	NS	0.08	0.92	NS

Tabla 15. Comparación de las frecuencias alélicas (*CYP2C9*) del presente trabajo vs países europeos. S: significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se comparan las frecuencias obtenidos en el presente estudio con lo reportado para países europeos y se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

CYP2C9										
Europa	Estudio Actual	Reino unido n=297(83)			Italia n=437 (97)			Alemania n=75 (98)		
Alelos			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
CYP2C9*1	87,0	0.73	0.87	NS	0.78	0.92	NS	0.81	0.95	NS
CYP2C9*2	7,9	0.17	0.83	NS	0.15	0.87	NS	0.13	0.89	NS
CYP2C9*3	4,1	0.09	0.89	NS	0.07	0.97	NS	0.06	0.97	NS

Tabla 16. Comparación de las frecuencias alélicas (CYP2C9) del presente trabajo vs países europeos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se comparan las frecuencias obtenidos en el presente estudio con lo reportado para países norteamericanos y se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

CY2PC9																
Norteamérica	Estudio Actual	Canadá n=246 (99)			Indígenas Canadá n=114 (100)			Esquimal n=151 (100)			Blanco americano n=213 (101)			Afroamericano n=116 (102)		
Alelos			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
CYP2C9*1	0.87	0.80	0.94	NS	0.91	0.97	NS	0.01	0.00	S	0.86	0.99	NS	0.96	0.93	NS
CYP2C9*2	0.08	0.13	0.89	NS	0.03	0.77	NS	NE	/	/	0.09	0.97	NS	0.03	0.77	NS
CYP2C9*3	0.05	0.05	0.97	NS	0.07	0.94	NS	NE	/	/	0.05	1.00	NS	0.01	0.69	NS

Tabla 17. Comparación de las frecuencias alélicas (CYP2C9) del presente trabajo vs países norteamericanos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo, NE: no encontrado

Se comparan las frecuencias obtenidas en el presente estudio con lo reportado para países asiáticos se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

CYP2C9													
Asia	Estudio actual	China n=22 (103)			Corea n=574 (104)			Japón n=218 (105)			Taiwán n=98 (106)		
Alelos			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
CYP2C9*1	0.87	0.96	0.93	NS	0.96	NS	0.93	0.98	0.91	NS	0.97	0.92	NS
CYP2C9*2	0.08	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
CYP2C9*3	0.05	0.04	0,92	NS	0.04	NS	0.96	0.02	0.83	NS	0.03	0.91	NS

Tabla 18. Comparación de las frecuencias alélicas (CYP2C9) del presente trabajo vs países asiáticos. . S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo, NE: no encontrado

Se comparan las frecuencias obtenidas en el presente estudio con lo reportado para países africanos y se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

África	Estudio actual	Egipto n=247 (107)			Etiopía n=150 (108)		
Alelos			p	S/NS		p	S/NS
<i>CYP2C9*1</i>	0.87	0.82	0.96	NS	0.94	0.94	NS
<i>CYP2C9*2</i>	0.08	0.12	0.91	NS	0.04	0.84	NS
<i>CYP2C9*3</i>	0.05	0.06	0.97	NS	0.02	0.83	NS

Tabla 19. Comparación de las frecuencias alélicas (*CYP2C9*) del presente trabajo vs países africanos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se comparan las frecuencias obtenidas en el presente estudio con lo reportado para países latinoamericanos se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p

<i>CYP4F2</i>							
Latinoamérica	Actual estudio	Colombia n=145 (88)			Brasil n=370 (109)		
Alelos			p	S/NS		p	S/NS
C	0,70	0.79	0.92	NS	0.75	0.95	NS
T	0.30	0.21	0.84	NS	0.25	0.90	NS

Tabla 20. Comparación de las frecuencias alélicas (*CYP4F2*) del presente trabajo vs países latinoamericanos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se comparan las frecuencias obtenidas en el presente estudio con lo reportado para países europeos y se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

CYP4F2										
Europa	Actual estudio	España n=114 (94)			Reino Unido n=200 (110)			Francia n=465 (111)		
Alelo			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
C	0.70	0.64	0.94	NS	0.68	0.98	NS	0.71	0.99	NS
T	0.30	0.36	0.92	NS	0.32	0.97	NS	0.30	0.99	NS

Tabla 21. Comparación de las frecuencias alélicas (CYP4F2) del presente trabajo vs países europeos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se comparan las frecuencias obtenidas en el presente estudio con lo reportado para países europeos y se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

CYP4F2													
Europa	Actual estudio	Holanda n=244 (112)			Italia n=437 (97)			Alemania n=75 (98)			Noruega n=105 (113)		
Alelo			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
C	0.70	0.70	0.99	NS	0.68	0.98	NS	0.73	0.97	NS	0.74	0.96	NS
T	0.30	0.30	0.99	NS	0.32	0.83	NS	0.27	0.95	NS	0.26	0.92	NS

Tabla 22. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (CYP4F2) vs países europeos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se comparan las frecuencias obtenidas en el presente estudio, con lo reportado para países norteamericanos y se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

CYP4F2										
Norteamérica	Actual estudio	Blanco-americano n=181 (3)			Canadá n=246 (99)			Afroamericano n=258 (114)		
Alelos			p	S/NS	%	p	S/NS	%	p	S/NS
C	0.70	0.72	0.98	NS	0.70	0.98	NS	0.94	0.80	NS
T	0.30	0.28	0.97	NS	0.30	0.97	NS	0.05	0.26	NS

Tabla 23. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (CYP4F2) vs poblaciones norteamericanas. S.: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se comparan las frecuencias obtenidas en el presente estudio con lo reportado para países asiáticos y se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

CYP4F2										
Asia	Actual estudio	China n=222 (103)			Corea n=403 (104)			Japón n=97 (115) p S/NS		
Alelo	%	%	p	S/NS	%	p	S/NS	%	p	S/NS
C	0.70	0.76	0.95	NS	0.65	0.95	NS	0.71	0.99	NS
T	0.30	0.27	0.95	NS	0.35	0.93	NS	0.29	0.99	NS

Tabla 24. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (CYP4F2) vs países asiáticos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se comparan las frecuencias obtenidas en el presente estudio con lo reportado para países africanos y se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

CYP4F2							
África	Actual estudio	Egipto n=192 (116)			Marruecos n=114 (117)		
Alelos			p	S/NS		p	S/NS
C	0.70	0.69	0.99	NS	0.69	0.99	NS
T	0.30	0.31	0.99	NS	0.41	0.86	NS

Tabla 25. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (CYP4F2) vs países africanos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se comparan las frecuencias obtenidas en el presente estudio, con lo reportado para países latinoamericanos y se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

VKOC1													
Alelo VKORC1-1639G/A Latinoamérica	Actual estudio	Colombia n=145 (88)			Colombia n=120 (118)			Uruguay n=71 (89)			Brasil n=390 (90)		
Alelos			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
G	0.55	0.58	0.98	NS	0.55	0.99	NS	0.55	1.00	NS	0.67	0.89	NS
A	0.44	0.41	0.98	NS	0.45	0.99	NS	0.44	1.00	NS	0.33	0.85	NS

Tabla 26. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (VKORC1) vs poblaciones de Latinoamérica. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se comparan las frecuencias obtenidas en el presente estudio, con lo reportado para países latinoamericanos y se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

VKORC1							
Latinoamérica	Actual estudio		Argentina n=101 (91)		Puerto Rico n=103 (93)		
Alelos			p	S/NS		p	S/NS
G	0.55	0.50	0.93	NS	0.59	0.97	NS
A	0.44	0.50	0.93	NS	0.41	0.96	NS

Tabla 27. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (VKORC1) vs poblaciones de Latinoamérica. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se comparan las frecuencias obtenidas en el presente estudio, con lo reportado para países europeos y se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

VKORC1										
Europa	Actual Estudio	España n=117 (94)			Reino Unido n=297 (83) p			Holanda 1173C/T n=231 (119) p S/NS		
Alelos			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
G	0.55	0.63	0.93	NS	0.53	0.97	NS	0.55	0.99	NS
A	0.44	0.37	0.91	NS	0.47	0.97	NS	0.44	1.00	NS

Tabla 28. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (VKORC1) vs países europeos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se comparan las frecuencias obtenidas en el presente estudio, con lo reportado para países europeos y se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

VKORC1												
Europa	Italia n=147 (97)	p	S/NS	Alemania n=75 (98)	p		Noruega 1173C/T n=58 (95)	p	S/NS	Suecia n=1461 (96)	p	S/NS
Alelos		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
G	0.56	0.99	NS	0.62	0.94	NS	0.59	0.97	NS	0.60	0.96	NS
A	0.44	1.00	NS	0.38	0.92	NS	0.41	0.96	NS	0.40	0.96	NS

Tabla 29. Comparación de las frecuencias alélicas (VKORC1) vs países europeos. S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se comparan las frecuencias obtenidas en el presente estudio, con lo reportado para países norteamericanos y se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

VKORC1										
Norteamérica	Actual estudio	Blanco-Americano n=213 (101)			Canadá n=246 (99)			Afro-americanos n=111 (102)		
Alelos			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
G	0.55	0.62	0.96	NS	0.60	0.96	NS	0.90	0.72	NS
A	0.44	0.38	0.92	NS	0.40	0.92	NS	0.10	0.28	NS

Tabla 30. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (VKORC1) vs poblaciones de Norteamérica. . S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se comparan las frecuencias obtenidas en el presente estudio, con lo reportado para países asiáticos y se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

VKORC1										
-Asia	Actual estudio	China n=222 (103)			Corea n=564 (104)			Japón n=259 (105)		
Alelos			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
G	0.55	0.14	0.26	NS	0,70	0.87	NS	10,0	0.15	NS
A	0.44	0.86	0.65	NS	0.93	0.61	NS	90,0	0.63	NS

Tabla 31. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (VKORC1) vs poblaciones de Asia. . S: Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se comparan las frecuencias obtenidas en el presente estudio, con lo reportado para países africanos y se determinan las diferencias significativas (DS) por medio de la prueba chi-cuadrado p.

África	Actual estudio	Mozambique-Angola n=216 (120)			Egipto n=196 (116)		
Alelos			p	S/NS		p	S/NS
G	0.55	0.97	0.68	NS	0.54	0.98	NS
A	0.44	0.03	0.02	S	0.46	0.98	NS

Tabla 32. Comparación de las frecuencias alélicas del presente trabajo (VKORC1) vs poblaciones de África. S: Significativo, cuando p es menor de 0,005; NS: no significativo

8.3.1.2 DISTRIBUCION GENOTIPICA DE LOS GENES *CYP2C9*, *CYP4F2*, Y *VKORC1* ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS ETNICOS

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con países latinoamericanos buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura.

<i>CYP2C9</i>																
<i>CYP2C9</i>	Actual estudio	Uruguay n=71 (89)			Brasil n=370 (109)			Argentina n=101 (91)			México n=98 (92)			Puerto Rico n=103 (93)		
Genotipo			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
*1/*1	0.77	0.51	0.71	NS	0.69	0.91	NS	0.56	0,77	NS	0.74	0.96	NS	0.59	0.80	NS
*1/*2	0.13	0.24	0.82	NS	0.18	0.91	NS	0.23	0.83	NS	0.15	0.96	NS	0.25	0.81	NS
*1/*3	0.07	0.23	0.74	NS	0.09	0.95	NS	0.05	0.93	NS	0.10	0,92	NS	0.05	0.93	NS
1*/5*	NA	NA	NA	NA	0.005	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA	NA
1*/6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2*/2*	0.001	0	NA	NA	0.01	0.93	NS	0.14	0.71	NS	0	NE	NA	0.03	0.87	NS
2*/3*	0.01	0	NA	NA	0.01	1.00	NS	0.01	1.00	NS	0.01	1.00	NS	0.06	0.84	NS
2*/5*	NA	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA	NA
2*/11*	NA	NA	NA	NA	0.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3*/3*	NE	0.03	0,91	NS	NE	NE	NS	0	NA	NA	NE	NA	NA	NE	NA	NA

Tabla 33. Comparación de las frecuencia genotípicas del presente trabajo (*CYP2C9*) vs poblaciones de Latinoamérica Significativo, cuando p es menor de 0,05; NA: no aplica NS: no significativo

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con países europeos buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura.

<i>CYP2C9</i>										
Europa <i>CYP2C9</i>	Estudio Actual	Reino Unido n=297 (83)			Italia n=437 (97)			Alemania n=75 (98)		
			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
*1/*1	0.78	0.56	0.77	NS	0.61	0.83	S	0.64	0.86	NS
*1/*2	0.13	0.22	0.85	NS	0.23	0.83	S	0.24	0.82	NS
*1/*3	0.07	0.14	0.85	NS	0.12	0.89	NS	0.11	0.90	NS
2*/2*	0.001	0.03	0.90	NS	0.02	0.94	NS	NE	NE	NA
2*/3*	0.01	0.04	0.88	NS	0.01	1.00	NS	0.01	1.00	NS
3*/3*	NE	0.01	0.92	NS	0.01	0.94	NS	NE	NE	NA

Tabla 34. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (*CYP2C9*) vs países europeos. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NA: no aplica NS: no significativo

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con países europeos buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura.

CYP2C9										
España	Estudio Actual	España n=116 (94)			Noruega n=212 (95)			Suecia n=1490 (96)		
Genotipo			p	S/NS		P	S/NS		p	S/NS
*1/*1	0.77	0.54	0.74	NS	0.69	0.91	NS	0.66	0.88	NS
*1/*2	0.13	0.29	0.77	NS	0.18	0.91	NS	0.19	0.89	NS
*1/*3	0.08	0.14	0.85	NS	0.09	0.95	NS	0.12	0.89	NS
2*/2*	0.001	0.01	0.93	NS	0.02	0.89	NS	0.01	0.93	NS
2*/3*	0.01	0.01	1.00	NS	0.01	0.99	NS	0.01	1.00	NS
3*/3*	NE	0.01	1.00	NS	0.01	0.94	NS	NE	0.94	NS

Tabla 35. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (CYP2C9) vs países europeos. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NA: no aplica NS: no significativo

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con Canadá y poblaciones de Estados Unidos, buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura.

CYP2C9																
	Actual estudio	Canadá n=246 (99)			Indígenas Canadá n=114			Esquimal n=151 (121)l			Blanco-americano n=325 (101)			Afro-americano n=116 (102)		
Genotipo			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
*1/*1	0.78	0.64	0.86	NS	0.83	0.96	NS	1.00	0.83	NS	0.60	0.82	NS	0.89	0.91	NS
*1/*2	0.13	0.21	0.86	NS	0.06	0.78	NS	NE	NA	NA	0.23	0.83	NS	0.05	0.72	NS
*1/*3	0.07	0,12	0,89	NS	0,11	0.90	NS	NE	NA	NA	0.13	0.87	NS	0.03	0.82	NS
2*/2*	0.01	0,03	0.91	NS	NE	NA	NA	NE	NA	NA	0.03	0.91	NS	NE	NA	NA
2*/3*	0.01	NE	NE	NA	NE	NA	NA	NE	NA	NA	0.01	1.00	NS	NE	NA	NA
3*/3*	NE	NE	NE	NA	NE	NA	NA	NE	NA	NA	NE	NA	NA	NE	NA	NA

Tabla 36.Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (CYP2C9) vs poblaciones norteamericanas. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NA: no aplica NS: no significativo, NE: no encontrado, NA: no aplica

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con países asiáticos buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura.

CYP2C9													
Asia CYP2C9	Actual estudio	China n=222 (103)			Japón n=218 (105)			Corea n=574 (104)			Taiwán n=98 (106)		
Genotipo			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		P	S/NS
*1/*1	0.78	0.91	0.91	NS	0.96	3,83	NS	0.98	0.84	S	0.92	0.88	NS
*1/*2	0.13	NE	NA	NA	NE	NA	NA	NE	NA	NA	NE	NE	NA
*1/*3	0.07	0,04	0.88	S	0.04	3,56	NS	0.02	0.72	S	0,08	0.88	NS
2*/2*	0.01	NE	NA	NA	NE	NA	NA	NE	NA	NA	NE	NE	NA
2*/3*	0.01	NE	NA	NA	NE	NA	NA	NE	NA	NA	NE	NE	NA
3*/3*	0.01	NE	NA	NA	NE	NA	NA	NE	NA	NA	NE	NE	NA

Tabla 37.Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (CYP2C9) vs poblaciones de Asia. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NE: no encontrado NS: no significativo

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con países africanos buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura.

Genotipo	Actual estudio	Egipto n=247 (107)			Etiopía n=150 (108)		
			p	S/NS		p	S/NS
*1/*1	0.78	0.66	0.88	NS	0.87	0.92	NS
*1/*2	0.13	0.19	0.89	NS	0.09	0.89	NS
*1/*3	0.07	0.12	1.00	NS	0.04	0.88	NS
2*/2*	0.01	0.02	0.94	NS	0,00	NA	NA
2*/3*	0.01	NE	NA	NA	0,00	NA	NA
3*/3*	0,00	0.01	0.92	NS	0,00	NA	NA

Tabla 38. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (*CYP2C9*) vs poblaciones de África. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NA: no aplica NS: no significativo

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con países latinoamericanos buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura, sólo Brasil tiene estudios reportados con CYP4F2.

CYP4F2							
CYP4F2	Actual estudio	Colombia n=145 (88)			Brasil n=370 (109)		
Genotipos			p	S/NS		p	S/NS
C/C	0.52	0.59	0.93	NS	0.59	0.93	NS
C/T	0.35	0.40	0.94	NS	0.33	0.97	NS
T/T	0.13	0.01	0.01	NS	0.09	0.89	NS

Tabla 39. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (CYP4F2) vs Brasil. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NA: no aplica NS: no significativo.

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con países europeos buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura.

CYP4F2													
Genotipos	Actual estudio	España n=114 (109)			Reino Unido n=204 (110)			Francia n=101 (111)			Holanda n=244 (112)		
			p	S/NS		p	S/NS		P	S/NS		p	S/NS
C/C	0.52	0.41	0.86	NS	0.48	0.95	NS	0.50	0.98	NS	0.49	0.97	NS
C/T	0.35	0.47	0.86	NS	0.41	0.93	NS	0.41	0.93	NS	0.43	0.90	NS
T/T	0.13	0.12	0.98	NS	0.12	0.98	NS	0.09	0.89	NS	0.09	0.89	NS

Tabla 40. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo CYP4F2) vs Europa. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con países norteamericanos buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura.

CYP4F2										
Genotipos	Actual estudio	Italia n=437 (122)			Alemania n=75 (98)			Noruega n=105 (113)		
			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
C/C	0.52	0.44	0.90	NS	0.49	0.97	NS	0.55	0.97	NS
C/T	0.35	0.46	0.87	NS	0.48	0.85	NS	0.38	0.96	NS
T/T	0.13	0.09	0.89	NS	0.03	0.56	NS	0.07	0.82	NS

Tabla 41 Comparación de las frecuencias genotípicas del presente estudio (CYP4F2) vs países europeos. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con países norteamericanos buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura.

<i>CYP4F2</i>										
<i>CYP4F2</i> Norteamérica	Estudio Actual	Canadá n=246 (99)			Blanco-americano n=181 (3)			Afroamericano n=258		
			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
C/C	0.52	0.50	0.98	NS	0.50	0.98	NS	0.89	0.69	NS
C/T	0.35	0.40	0.94	NS	0.44	0.89	NS	0.11	0.47	NS
T/T	0.12	0.10	0.92	NS	0.06	0.78	NS	0.04	0.65	NS

Tabla 42. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (*CYP4F2*) vs Norteamérica. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con países asiáticos buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura.

	Estudio actual	China n=222 (103)			Corea n=403 (104)			Japón n=97 (115)		
Genotipos			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
C/C	0.52	0.52	1.00	NS	0.42	0.95	NS	0.52	1.00	NS
C/T	0.35	0.41	0.93	NS	0.47	0.86	NS	0.41	0.93	NS
T/T	0.12	0,07	0.98	S	0.12	0.98	NS	0,07	0.82	NS

Tabla 43. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (*CYP4F2*) vs Asia. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con países africanos buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura.

CYP4F2							
Genotipos	Estudio Actual	Marruecos n=114 (117)			Egipto n=192 (116)		
			p	S/NS		p	S/NS
C/C	0.52	0.36	0.79	NS	0.35	0.77	NS
C/T	0.35	0.47	0.86	NS	0.45	0.88	NS
T/T	0.12	0.18	0.91	NS	0.19	0.89	NS

Tabla 44. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (CYP4F2) vs África. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con países latinoamericanos buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura.

<i>VKORC1</i> Latinoamérica	Actual studio n=202	Colombia n=145 (88)			Colombia n=120 (118)			Uruguay n=68 (89)			Brasil n=390 (90)			Argentina n=101 (91)			Puerto Rico n=103 (93)		
<i>Genotipo</i>			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
GG	0.32	0.37	0.93	NS	0.32	1.00	NS	0.34	0.97	NS	0.44	0.86	NS	0.20	0.79	S	0.33	0.99	NS
G/A	0.47	0.43	0.95	NS	0.47	1.00	NS	0.44	0.96	NS	0.46	0.99	NS	0.60	0.87	NS	0.52	0.94	NS
A/A	0.21	0.20	0.98	NS	0.21	1.00	NS	0.22	0.98	NS	0.10	0.73	NS	0.19	0.96	NS	0.15	0.88	NS

Tabla 45. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (*VKORC1*) vs Latinoamérica. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con países latinoamericanos buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura.

VKORC1																
VKORC1 Europa	Actual estudio	España n=117 (94)			Portugal			Reino Unido n=297 (83)			Francia			Holanda n=231 (119)		
Genotipo			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
G/G	0.32	0.42	0.97	NS	0.34	0.89	NS	0.25	0,15	NS	0.36	0.95	NS	0.35	0.96	NS
G/A	0.47	0.42	0.99	NS	0.48	0.90	NS	0.56	0,21	NS	0.48	0.99	NS	0.48	0.99	NS
A/A	0.21	0.16	0.94	NS	0.18	0.96	NS	0.19	0,60	NS	0.16	0.90	NS	0.17	0.92	NS

Tabla 46. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (VKORC1) vs Europa. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con países europeos buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura.

VKORC1													
VKORC1	Actual estudio	Italia			Alemania			Noruega			Suecia		
		1173C/T			1173C/T			1173C/T			1173C/T		
		n=147			n=75			n=58			n=1461		
		(97)			(98)			(95)			(96)		
Genotipo			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
G/G	0.32	0.37	0.93	NS	0.40	0.90	NS	0.35	0.96	NS	0.36	0.95	NS
G/A	0.47	0.47	1.00	NS	0.44	0.96	NS	0.50	0.97	NS	0.50	0.97	NS
A/A	0.21	0.16	0.90	NS	0.16	0.90	NS	0.16	0.90	NS	0.15	0.88	NS

Tabla 47. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (*VKORC1*) vs Europa. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con países norteamericanos buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura.

VKORC1										
VKORC1	Actual Estudio	Canadá n=256 (99)			Blanco-americano n=213 (101)			Afroamericano n=111 (123)		
			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
G/G	0.32	0.35	0.96	NS	0.37	0.93	NS	0.80	0.59	NS
G/A	0.47	0.49	0.98	NS	0.51	0.96	NS	0.20	0.55	NS
A/A	0.21	0.15	0.88	NS	0.13	0.82	NS	0	/	/

Tabla 48. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (VKORC1) vs Norteamérica. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con países asiáticos buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura.

VKORC1										
genotipos	Estudio actual	China n=222 (103)			Corea n=564 (104)			Japón n=269 (105)		
			p	S/NS		p	S/NS		p	S/NS
G/G	0.32	0.02	0.00	S	0.09	0.44	S	0.01	0.00	S
G/A	0.46	0.24	0.64	NS	0.12	0.31	S	0.17	0.47	NS
A/A	0.21	0.74	0.54	NS	0.87	0.48	S	0.82	0.50	NS

Tabla 49. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (*VKORC1*) vs Asia. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo

Se calcularon las frecuencias genotípicas de nuestro estudio y se compararon con países africanos buscando si presenta diferencia significativa (DS) con alguno de lo reportado en la literatura.

<i>Genotipos</i>	Estudio Actual	Mozambique-Angola n=216 (120)			Egipto n=196 (116)		
			p	S/NS		p	S/NS
G/G	0.32	0.94	0.52	NS	0.26	0.91	NS
G/A	0.47	0.06	0.13	NS	0.57	0.89	NS
A/A	0.21	NE	NE	/	0.18	0.94	NS

Tabla 50. Comparación de las frecuencias genotípicas del presente trabajo (VKORC1) vs países de África. Significativo, cuando p es menor de 0,05; NS: no significativo, NE: no encontrado

8.4 COMBINACION DE GENOTIPOS

De acuerdo al siguiente árbol se relacionaron los pacientes que poseen genotipificación de los tres genes estudiados

Genotipos	Genotipo CYP2C9	Genotipo VKORC1	Genotipo CYP4F2	Pacientes con el genotipo n=202
1	*1/*1	G/G	C/C	29
2	*1/*1	G/G	C/T	12
3	*1/*1	G/G	T/T	6
4	*1/*1	G/A	C/C	33
5	*1/*1	G/A	C/T	31
6	*1/*1	G/A	T/T	10
7	*1/*1	A/A	C/C	15
8	*1/*1	A/A	C/T	17
9	*1/*1	A/A	T/T	3
10	*1/*2	G/G	C/C	7
11	*1/*2	G/G	C/T	1
12	*1/*2	G/G	T/T	2
13	*1/*2	G/A	C/C	7
14	*1/*2	G/A	C/T	4
15	*1/*2	G/A	T/T	2
16	*1/*2	A/A	C/C	4
17	*1/*2	A/A	C/T	0
18	*1/*2	A/A	T/T	0
19	*1/*3	G/G	C/C	5
20	*1/*3	G/G	C/T	3
21	*1/*3	G/G	T/T	0
22	*1/*3	G/A	C/C	2
23	*1/*3	G/A	C/T	2
24	*1/*3	G/A	T/T	0
25	*1/*3	A/A	C/C	1
26	*1/*3	A/A	C/T	1
27	*1/*3	A/A	T/T	2
28	*2/*2	G/G	C/C	0
29	*2/*2	G/G	C/T	0
30	*2/*2	G/G	T/T	0
31	*2/*2	G/A	C/C	2
32	*2/*2	G/A	C/T	0
33	*2/*2	G/A	T/T	0
34	*2/*2	A/A	C/C	0
35	*2/*2	A/A	C/T	0
36	*2/*2	A/A	T/T	0
37	*2/*3	G/G	C/C	0
38	*2/*3	G/G	C/T	0
39	*2/*3	G/G	T/T	0
40	*2/*3	G/A	C/C	0

41	*2/*3	G/A	C/T	0
42	*2/*3	G/A	T/T	1
43	*2/*3	A/A	C/C	0
44	*2/*3	A/A	C/T	0
45	*2/*3	A/A	T/T	0
46	*3/*3	G/G	C/C	0
47	*3/*3	G/G	C/T	0
48	*3/*3	G/G	T/T	0
49	*3/*3	G/A	C/C	0
50	*3/*3	G/A	C/T	0
51	*3/*3	G/A	T/T	0
52	*3/*3	A/A	C/C	0
53	*3/*3	A/A	C/T	0
54	*3/*3	A/A	T/T	0

Tabla 51. Posibles genotipos al combinarlos entre sí, y el número de pacientes con cada genotipo

8.5 IDENTIFICACION DE LAS REACCIONES ADVERSAS

Combinación de los tres genotipos	Número de pacientes con RAM Probada ≥9	Número de pacientes con RAM probable 5-8	Número de pacientes con RAM posible 1-4	Número de pacientes con RAM dudosa 0≤	Número total de pacientes que presentaron RAM
*1/*1, GG, CC	0	4	1	0	5
*1/*1, GG, CT	0	3	1	0	4
*1/*1, GG, TT	0	2	3	0	5
*1/*1, AA, CC	0	1	1	0	2
*1/*1, GA, TT	2	6	3	1	10
*1/*1, AA, CC	0	1	0	2	3
*1/*1, AA, CT	1	7	4	1	12
*1/*1, AA, TT	0	1	0	0	1
*1/*2, GG, CC	0	3	0	2	5
*1/*2, GG, CT	0	1	0	0	1
*1/*2, GG, TT	0	0	1	1	2
*1/*2, GA, CC	0	2	0	1	3
*1/*2, GA, CT	0	2	0	0	2
*1/*2, GA, TT	0	0	0	0	0
*1/*2, AA, CC	0	1	1	0	2
*1/*3, GG, CC	0	0	2	0	2
*1/*3, GG, CT	0	0	1	0	1
*1/*3, GA, CC	0	1	0	1	2
*1/*3, GA, CT	0	1	0	0	1
*1/*3, AA, CC	0	0	0	0	0
*1/*3, AA, CT	0	0	0	0	0
*1/*3, AA, TT	0	1	0	0	1
*2/*2, GA, CC	0	0	4	0	4
*1/*1, GA, CT	1	4	2	4	10
*1/*1, AA, CC	0	1	0	2	3
TOTAL	4	42	20	15	81
	4.93%	51.86%	24.70%	18.6%	100%

Tabla 52. Genotipos encontrados en el presente trabajo, y pacientes que presentaron RAM

Reacciones adversas: se analizaron las reacciones adversas para cada genotipo completo y se obtuvieron los siguientes datos, según el algoritmo de Naranjo:

Genotipo 1: El 82.8% de los pacientes no presentó ningún evento adverso, el 10.32% presentó equimosis, el 3.44% presentó epistaxis y el 3.44% hemorragia uterina anormal (HUA).

Genotipo 2: El 50% no presentó ningún tipo de evento adverso, el 25% presento epistaxis y el 8.33% presentó hematomas, 8.33% hemorragia de vías digestivas altas y el 8.33, presento un INR mayor a 3.

Genotipo 3: el 50% no presentó ningún tipo de evento adverso, el 33,33% presentó epistaxis y el 16,66% gingivorragia.

Genotipo 4: El 63.6% no presentó reacción adversa, el 15.3% presentó equimosis, el 6.1% No pudo ser estabilizado su INR, 3% presentó epistaxis, el 3%Hematomas, el 3% hematurias, 3% hipermenorrea, 3% hemorragias de vías digestivas altas.

Genotipo 5: El 64.5% no presentó reacción adversa, 9.7% presentaron gingivorragias, el 6.5% epistaxis, el 6.5% equimosis, el 6.5% INR mayor a 3, el 3.2% hemorragias de vías digestivas altas y el 3.2% alergias en piel.

Genotipo 6: El 90% no presento reacción adversa y el 10% presento equimosis.

Genotipo 7: El 46.7% no presento reacción adversa, el 13.3% presentó el INR por encima de 3, el 6.66% epistaxis, 6.66% gingivorragia, 6.66% hematomas, 6.66%hematurias, el 6.66% hemorragia uterina anormal y el 6.66% hemorragia de vías digestivas altas.

Genotipo 8: El 23.5%no presentó reacción adversa, 23.4% presentó equimosis, el 11.8% epistaxis, el 5.9% presentó hematomas, el 5.9% hematurias, el 5.9% hematuria y hematomas, el 5.9% hemorragia de vías digestivas altas, 5.9% hemorragia uterina anormal, 5.9% gingivorragias y el 5.9% INR mayor de 3.

Genotipo 9: El 66.7% de los pacientes no presentó reacción adversa y el 33.3% presentó gingivorragia.

Genotipo 10: El 28.6% no presentó reacción adversa, el 28.6 presentó epistaxis, 14.3 gingivorragia, el 14.3 hematuria y el 14.3 INR mayor a 3.

Genotipo 11: El 100% presentó equimosis (un único paciente).

Genotipo 12: El 50% presentó equimosis y el 50% restante subanticoagulación.

Genotipo 13: el 57,14% no presentó ninguna reacción, el 14,28% presentó epistaxis, el 14,28% presentó hematomas y el restante 14,28% presentó equimosis.

Genotipo 14: el 50% no presentó ninguna reacción, el otro 50% presentaron equimosis

Genotipo 15: 100% no tuvo reacciones adversas.

Genotipo 16: 50% no presentó reacciones adversas, el restante 50% presentó hematomas.

Genotipo 19: 80% no presentó reacciones adversas, de éste el 40% suspendió el tratamiento en el segundo mes, 20% presentó hemorragia uterina normal.

Genotipo 20: 66,66% no presentó reacciones adversas, 33,33% presentó gingivorragia.

Genotipo 22: 50% presentó hematuria, 50% presentó gingivorragia.

Genotipo 23: 50% presentó petequias, 50% presentó gingivorragia.

Genotipo 25: 100% no presentó reacciones adversas.

Genotipo 26: 100% no presentó reacciones adversas.

Genotipo 27: 50% no presentó reacciones adversas, 50% presentó hematoquecia.

Genotipo 31: 50% no presentó ninguna reacción, 50% presentó equimosis.

Genotipo 42: 100% presentó hematomas.

9 DISCUSION

La warfarina es un medicamento ampliamente utilizado para el tratamiento de varias patologías como la trombosis venosa profunda, válvulas cardíacas artificiales, prevención del infarto o embolia pulmonar (12).

La warfarina tiene un margen terapéutico estrecho, lo que permite que se presente una falla terapéutica, ya sea por subanticoagulación lo que puede conducir a infarto o sobreanticoagulación que conlleva a hemorragias (124). El INR (International Normalized Ratio) permite vigilar la terapia de anticoagulación y en la práctica clínica debe tener un índice de 2-3, este estándar es manejado universalmente (124).

CYP2C9 es el gen que codifica una enzima, que permite eliminar del organismo muchos medicamentos, entre ellos la warfarina, y los alelos *2 y *3 afectan el proceso metabólico y la dosis requerida para cada paciente, así como presentan diferentes frecuencias alélicas en diferentes grupos étnicos (125).

En el presente estudio el alelo *1 de *CYP2C9* referido como wild type (WT), se encontró con una frecuencia de 0.87 en la población de estudio, siendo el más común y también el más frecuente en estudios realizados por Isaza y Palacio en otras poblaciones colombianas, así como también es el más frecuente en el resto de los continentes, según lo reportan diferentes autores, en cuanto al análisis con el presente estudio, se encontró diferencia significativa (DS) (p.0.00) con la población esquimal, quienes habitan las regiones árticas de América y parte de Siberia debido a que en esta población el 100% de los individuos tiene el alelo silvestre.

El alelo *2 es el segundo alelo más común en el presente estudio con una frecuencia de 0.08 y en los estudios previos realizados por Isaza y Palacio en Colombia (88,118), también ocupa el segundo lugar en todos los países, excepto en la población asiática donde no existe (126). Este alelo tampoco se encontró en la población esquimal, debido a que ellos son descendientes de asiáticos (100).

En cuanto al alelo *3 se presenta en nuestra población con una frecuencia de 0.05 siendo el tercero más común, al igual que en los estudios previos realizados en el país y en el mundo, excepto en la población esquimal de Norteamérica, donde no se encontró y tiene una muy baja frecuencia (0.01) en la población afroamericana de los Estados Unidos.

El cuanto a los genotipos en *CYP2C9*, no se encontraron DS, sin embargo, el genotipo *3/*3 no se encontró en el presente estudio, ni tampoco en los previos realizados por Isaza y Palacio, así como tampoco es reportado para poblaciones de Etiopía, Asia, Norteamérica, Argentina, México y Puerto Rico, mientras que si es posible encontrarlo en Egipto, España, Noruega, Suecia, Reino Unido, Italia y Alemania.

El genotipo *3/*3 no se encontró, porque el alelo *3 está en una frecuencia muy baja, no sólo en el presente estudio sino a nivel mundial, y para poder encontrarlo sería necesario aumentar el tamaño de la muestra. En general, es indudable que todos los países tienen frecuencias alélicas y genotípicas diferentes, sin embargo, para *CYP2C9*, las personas caucásicas presentan mayor variabilidad, mientras que las afrodescendientes y asiáticas poseen principalmente el genotipo *1/*1 (126).

En relación a los polimorfismos de *VKORC1*, el alelo G (silvestre), fue el predominante con una frecuencia de 0.55, como también lo es para otras poblaciones colombianas (88,118), también ocurre lo mismo para Latinoamérica, Europa, Norteamérica y África, excepto en la población asiática donde es el menos frecuente que el alelo A. No se observó DS con ningún país.

La frecuencia del alelo A de *VKORC1* en nuestra población es de 0.45, y sólo se observó DS con Mozambique-Angola (p. 0.02) porque este país tiene una frecuencia de 0.03 para este alelo y en esta población es más común el alelo silvestre con una frecuencia de 0.97. Por otra parte el alelo A es más frecuente en la población asiática, aunque no se presentaron DS con los países analizados China, Corea y Japón. El genotipo GA es el más común en el presente estudio con una frecuencia de 0.47, al igual que en Latinoamérica, Europa, y Norteamérica; mientras que, el genotipo más frecuente en Asia es AA y GG en los países Mozambique-Angola y en la población afroamericana de los Estados Unidos, en estos no se encuentra el genotipo AA.

Al analizar el comportamiento de los polimorfismos en *CYP4F2*, para nuestra población encontramos que la frecuencia del alelo C o *Wt* es de 0.70 siendo el más común, al igual que el estudio de Isaza y col. realizado en Colombia (88), a nivel mundial también ocurre lo mismo. Al verificar si este gen se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, encontramos que está en desequilibrio, posiblemente, porque la población de Bogotá es en su gran mayoría de otros departamentos y solo el 31.86% son oriundos de esta ciudad, observándose la influencia ejercida por la migración (127), afectando las frecuencias alélicas de este gen. Al comparar nuestras frecuencias con Europa, Asia y África no encontramos DS, como lo confirma Liang y col. (72); quienes realizaron un metaanálisis de *CYP4F2* y tampoco encontraron diferencias significativas entre asiáticos y caucásicos.

Debido a que las variables en los genes *CYP2C9*, *VKORC1* y *CYP4F2* tienen frecuencias importantes en algunas poblaciones étnicas, y qué estas afectan la dosificación de warfarina es importante conocer en nuestra población que polimorfismos están presentes, el presente estudio permitió afirmar que efectivamente se encuentran las variables relacionadas con la dosificación de warfarina y este conocimiento puede ayudar al personal médico para dar una dosis acorde con un polimorfismo, en un individuo determinado y evitar los efectos adversos, posteriormente, estas frecuencias serán útiles

en la realización de una dosificación guiada por un algoritmo que permita dar dosis óptimas.

La warfarina es un medicamento frecuentemente relacionado con reacciones adversas, en Estados Unidos en el año 2006 se presentaron 36.000 pacientes con reacciones adversas a dicho medicamento (124). El riesgo de presentar sangrado durante los primeros meses de terapia con warfarina es 10 veces mayor que durante el primer año, las hemorragias gastrointestinal, de tejidos blandos, y del tracto urinario son las más comunes, siendo la intracraneana la más rara (124).

En el presente estudio, de los 64 posibles genotipos combinados, se encontraron 25 (tabla 52), en los cuales, 81 pacientes presentaron algún síntoma relacionado con sangrado como epistaxis, equimosis, hemorragia uterina anormal, hemorragia de vías digestivas altas, entre otros.

En nuestro estudio 4 pacientes presentaron una RAM probada que corresponde al 4.93%, 42 pacientes presentaron una RAM probable que equivale al 51.86%, 20 pacientes mostraron una RAM posible equivalente al 24.70% y 15 pacientes presentaron una RAM dudosa correspondiendo al 18.6%, de acuerdo al algoritmo de Naranjo.

10 CONCLUSIONES

1. En relación a *CYP2C9* los alelos *2 y *3 son más frecuentes en la población caucásica, mientras que en la población afrodescendiente el alelo silvestre es el más frecuente, y en el presente estudio, se observa que también se encuentran los alelos polimórficos, asemejándose a la población caucásica.
2. En relación a *VKORC1* el genotipo GA es el más frecuente en nuestro estudio, al igual que Latinoamérica, Europa, y Norteamérica, pero difiere de Asia donde el genotipo más común es AA y de los afrodescendientes donde el genotipo más frecuente es GG.
3. En el gen *CYP4F2* cuando se compara con otros países, se observó que el genotipo silvestre CC es más común en los afrodescendientes, mientras que el genotipo polimórfico TT está en una frecuencia baja.
4. En la población afrodescendiente, son más comunes los alelos silvestres, y los polimórficos se encuentran en una baja frecuencia.

11. RECOMENDACIONES

1. Se sugiere el estudio de frecuencias alélicas a otra población, con individuos de ascendencia bogotana, para verificar el desequilibrio de Hardy-Weinberg que se encontró en el gen *CYP4F2*.
2. Probablemente se relacionen otros genes que estén implicados en la dosis de warfarina, como el gen *GGCX* gamma-glutamyl carboxilasa, que mejoraran los algoritmos ya utilizados y que serán necesarios conocer su distribución en la población colombiana.
3. Establecer un algoritmo para la dosificación de la warfarina a nuestra población.

11 BIBLIOGRAFIA

1. Li J, Wang S, Barone J, Malone B. Warfarin pharmacogenomics. *P T*. 2009;34(8):422–7.
2. Oldenburg J, Watzka M, Rost S, Müller CR. VKORC1: molecular target of coumarins. *J Thromb Haemost*. 2007 Jul;5 Suppl 1(February):1–6.
3. McDonald MG, Rieder MJ, Nakano M, Hsia CK, Rettie AE. CYP4F2 Is a Vitamin K 1 Oxidase : An Explanation for Altered Warfarin Dose in Carriers of the V433M Variant. 2009;75(6):1337–46.
4. Gage BF, Lesko LJ. Pharmacogenetics of warfarin: regulatory, scientific, and clinical issues. *J Thromb Thrombolysis*. 2008;25:45–51.
5. Schofield FW. A brief account of a disease in cattle simulating hemorrhagics Septicaemia due to feeding sweet clover. *Can Vet J*. 1984 Dec;25(12):453–5.
6. ML R. A problem in the coagulation of the blood: “sweet clover disease of cattle.” *Am J Physiol*. 1931;96:413–25.
7. Campbell HA, Link KP. Studies on the hemorrhagic sweet clover disease IV the isolation and crystallization of the hemorrhagic agent. *Nutr Rev*. 2009 Apr 27;32(8):244–6.
8. Link KP. The discovery of dicumarol and its sequels. *Circulation*. 1959;19:97–107.
9. Helgeland L. The action of vitamin K and coumarin anticoagulants. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 1980. p. 66–9.
10. Militaru F, Vesa S, Pop T, Buzoianu A. Pharmacogenetics aspects of oral anticoagulants therapy. *J Med Life*. 2015;8(2):171–5.
11. Xingyang Y, Wanzhang C, Chun W, Biao Z, Lin J. Low-molecular-weight heparin or dual antiplatelet therapy is more effective than aspirin alone in preventing early neurological deterioration and improving the 6-month outcome in ischemic stroke patients. *J Clin Neurol*. 2015;11(1):57–65.

12. Ansell J, Hirsh J, Hylek E, Jacobson A, Crowther M, Palareti G. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008;133(6 SUPPL. 6).
13. Tong Y, Miyata T. Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1 - rationale and perspectives. *Thromb Res*. 2007 Jan;120(1):1–10.
14. Lorenzo Fernández P, Alfaro Ramos MJ, Lizasoain Hernández I, Leza Cerro JC, Moro Sánchez MÁ, Portolés Pérez A. Velazquez; *Farmacología Básica y Clínica*. 18 ed. Buenos Aires: Panamericana; 2008. 621 p.
15. Verhoef TI, Redekop WK, Daly AK, van Schie RMF, de Boer A, Maitland-van der Zee A-H. Pharmacogenetic-guided dosing of coumarin anticoagulants: algorithms for warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon. *Br J Clin Pharmacol*. 2014 Apr;77(4):626–41.
16. Bailey P, Bailey C. Química Orgánica: Conceptos y Aplicaciones. In: Education P, editor. 1998. p. 197.
17. Cannegieter SC, Rosendaal FR, Wintzen AR, van der Meer FJ, Vandenbroucke JP, Briët E. Optimal oral anticoagulant therapy in patients with mechanical heart valves. *N Engl J Med*. 1995;333:11–7.
18. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*. 2002;360(9340):1155–62.
19. Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cellular and Molecular Life Sciences Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. 2001;58:737–47.
20. Zhou S-F, Zhou Z-W, Huang M. Polymorphisms of human cytochrome P450 2C9 and the functional relevance. *Toxicology*. Elsevier Ireland Ltd; 2010;278(2):165–88.
21. Ortiz de Montellano PR. Cytochrome P450. Structure, Mechanism and Biochemistry. *Cytochrome P450. Structure, Mechanism and Biochemistry*. New York; 1995.
22. Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I BR. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*. 1999;390(401):493–7.
23. Miners JO, Birkett DJ. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol*. 1998 Jun;45(6):525–38.

24. Gray IC, Nobile C, Muresu R, Ford S, Spurr NK. A 2.4-megabase physical map spanning the CYP2C gene cluster on chromosome 10q24. *Genomics*. 1995;28:328–32.
25. Soars MG, Gelboin H V, Krausz KW, Riley RJ. A comparison of relative abundance, activity factor and inhibitory monoclonal antibody approaches in the characterization of human CYP enzymology. *Br J Clin Pharmacol*. 2003;55:175–81.
26. Rettie AE, Jones JP. Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:477–94.
27. Zhou S-F, Zhou Z-W, Yang L-P, Cai J-P. Substrates, inducers, inhibitors and structure-activity relationships of human Cytochrome P450 2C9 and implications in drug development. *Curr Med Chem*. 2009 Jan;16(27):3480–675.
28. Derek Van Booven, Sharon Marsh HM, , Michelle Whirl Carrillo K, Sangkuhl, Teri E. Klein and RBA. Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. *Pharmacogenet Genomics*. 2010;20(4):277–81.
29. Werner D, Werner U, Meybaum A, Schmidt B, Umbreen S, Grosch A, et al. Determinants of steady-state torasemide pharmacokinetics: impact of pharmacogenetic factors, gender and angiotensin II receptor blockers. *Clin Pharmacokinet*. 2008;47(5):323–32.
30. Chen, G, Jiang, S, Mao, G, Zhang, S, Hong, X, Tang, G et al. CYP2C9 Ile359Leu polymorphism, plasma irbesartan concentration and acute blood pressure reductions in response to irbesartan treatment in Chinese hypertensive patients. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2006;28(1):19–24.
31. McCrea JB, Cribb A, Rushmore T, Osborne B, Gillen L, Lo MW et al. Phenotypic and genotypic investigations of a healthy volunteer deficient in the conversion of losartan to its active metabolite E-3174*. *Clin Pharmacol Ther*. 1999;65(3):348–52.
32. Veronese ME, Mackenzie PI, Doecke CJ, McManus ME, Miners JO, Birkett DJ. Tolbutamide and phenytoin hydroxylations by cDNA-expressed human liver cytochrome P4502C9. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;175:1112–8.
33. Ekhardt C, Doodeman VD, Rodenhuis S, Smits PHM, Beijnen JH, Huitema ADR. Influence of polymorphisms of drug metabolizing enzymes (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, GSTA1, GSTP1, ALDH1A1 and ALDH3A1) on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18:515–23.

34. Collier JK, Krebsfaenger N, Klein K, Endrizzi K, Wolbold R, Lang T, et al. The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the potent antioestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;54:157–67.
35. Fischer V, Johanson L, Heitz F, Tullman R, Graham E, Baldeck J-P, et al. The 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitor Fluvastatin: Effect on Human Cytochrome P-450 and Implications for Metabolic Drug Interactions. *Drug Metab Dispos*. 1999 Mar 1;27(3):410–6.
36. Chan AT, Zauber AG, Hsu M, Breazna A, Hunter DJ, Rosenstein RB, et al. Cytochrome P450 2C9 variants influence response to celecoxib for prevention of colorectal adenoma. *Gastroenterology*. 2009;136(7):2127–36.e1.
37. Pilotto A, Seripa D, Franceschi M, Scarcelli C, Colaizzo D, Grandone E, et al. Genetic Susceptibility to Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Related Gastrointestinal Bleeding: Role of Cytochrome P450 2C9 Polymorphisms. *Gastroenterology*. 2007;133(2):465–71.
38. Transon C, Leemann T, Vogt N DP. In vivo inhibition profile of cytochrome P450TB (CYP2C9) by (+/-)-fluvastatin. *Clin Pharmacol Ther*. 1995;58(4):412–7.
39. Leemann T, Transon C, Dayer P. Cytochrome P450TB (CYP2C): a major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver. *Life Sci*. 1993;52(1):29–34.
40. Leemann T, Kondo M, Zhao J, Transon C, Bonnabry P, Dayer P. The biotransformation of NSAIDs: a common elimination site and drug interactions. *Schweiz Med Wochenschr*. 1992;122(49):1897–9.
41. Guo Y, Zhang Y, Wang Y, Chen X, Si D, Zhong D, et al. Role of CYP2C9 and its variants (CYP2C9*3 and CYP2C9*13) in the metabolism of lornoxicam in humans. *Drug Metab Dispos*. 2005;33:749–53.
42. Bonnabry P, Leemann T, Dayer P. Role of human liver microsomal CYP2C9 in the biotransformation of lornoxicam. *Eur J Clin Pharmacol*. 1996;49(4):305–8.
43. Chesné C, Guyomard C, Guillouzo A, Schmid J, Ludwig E, Sauter T. Metabolism of Meloxicam in human liver involves cytochromes P4502C9 and 3A4. *Xenobiotica*. 1998;28(1):1–13.
44. Miners JO, Coulter S, Tukey RH, Veronese ME, Birkett DJ. Cytochromes P450, 1A2, and 2C9 are responsible for the human hepatic O-demethylation of R- and S-naproxen. *Biochem Pharmacol*. 1996;51(8):1003–8.

45. Zhang Y-F, Chen X-Y, Guo Y-J, Si D-Y, Zhou H, Zhong D-F. Impact of cytochrome P450 CYP2C9 variant allele CYP2C9 * 3 on the pharmacokinetics of glibenclamide and lornoxicam in Chinese subjects. *Yao Xue Xue Bao*. 2005;40(9):796–9.
46. Niemi M, Cascorbi I, Timm R, Kroemer HK, Neuvonen PJ, Kivist?? KT. Glyburide and glimepiride pharmacokinetics in subjects with different C2CP2C9 genotypes. *Clin Pharmacol Ther*. 2002;72(3):326–32.
47. Suzuki K, Yanagawa T, Shibasaki T, Kaniwa N, Hasegawa R, Tohkin M. Effect of CYP2C9 genetic polymorphisms on the efficacy and pharmacokinetics of glimepiride in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2006;72(2):148–54.
48. Kirchheiner J, Brockm??ller J, Meineke I, Bauer S, Rohde W, Meisel C, et al. Impact of CYP2C9 amino acid polymorphisms on glyburide kinetics and on the insulin and glucose response in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*. 2002;71(4):286–96.
49. Kidd RS, Straughn AB, Meyer MC, Blaisdell J, Goldstein JA, Dalton JT. Pharmacokinetics of chlorpheniramine, phenytoin, glipizide and nifedipine in an individual homozygous for the CYP2C9*3 allele. *Pharmacogenetics*. 1999;9(1):71–80.
50. Jones BC, Hawksworth G, Horne VA, Newlands A, Morsman J, Tute MS, et al. Putative active site template model for cytochrome P450C9 (tolbutamide hydroxylase). *Drug Metab Dispos*. 1996;24(2):260–6.
51. Rettie AE, Korzekwa KR. Kunze KL, Lawrence RF, Eddy AC, Aoyama T et al. Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-450C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions. *Chem Res Toxicol*. 1992;5(1):54–9.
52. Black DJ, Kunze KL, Wienkers LC, Gidal BE, Seaton TL, McDonnell ND, Evans JS, Bauwens JE TW. Warfarin-fluconazole. II. A metabolically based drug interaction: in vivo studies. *Drug Metab Dispos*. 24(4):422–8.
53. Rettie AE, Wienkers LC, Gonzalez FJ, Trager WF KK. Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9. *Pharmacogenetics*. 1994;4(1):39–42.
54. Furuya H, Fernandez-Salguero P, Gregory W, Taber H, Steward A, Gonzalez FJ IJ. Genetic polymorphism of CYP2C9 and its effect on warfarin maintenance dose requirement in patients undergoing anticoagulation therapy. *Pharmacogenet Genomics*. 1995;5(6):389–92.

55. Williams PA, Cosme J, Ward A, Angove HC, Jhoti H. Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature*. 2003;424(6947):464–8.
56. Kelley WN. *Medicina Interna*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 1993. 359 p.
57. Kaminsky LS, Zhang ZY. Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacology and Therapeutics*. 1997. p. 67–74.
58. Hermans JJ, Thijssen HH. Human liver microsomal metabolism of the enantiomers of warfarin and acenocoumarol: P450 isozyme diversity determines the differences in their pharmacokinetics. *Br J Pharmacol*. 1993;110(1):482–90.
59. Kaminsky LS, Zhang ZY. Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacol Ther* [Internet]. 1997 Jan;73(1):67–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9014207>
60. Jansing RL, Chao ES, Kaminsky LS. Phase II metabolism of warfarin in primary culture of adult rat hepatocytes. *Mol Pharmacol*. 1992;41(1):209–15.
61. Zielinska A, Lichti CF, Bratton S, Mitchell NC, Gallus-Zawada A, Le V-H, et al. Glucuronidation of monohydroxylated warfarin metabolites by human liver microsomes and human recombinant UDP-glucuronosyltransferases. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;324(1):139–48.
62. Miller GP, Lichti CF, Zielinska AK, Mazur A, Bratton SM, Gallus-Zawada A, et al. Identification of hydroxywarfarin binding site in human UDP glucuronosyltransferase 1a10: phenylalanine90 is crucial for the glucuronidation of 6- and 7-hydroxywarfarin but not 8-hydroxywarfarin. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(1):2211–8.
63. Pirmohamed M, Park BK. Cytochrome P450 enzyme polymorphisms and adverse drug reactions. *Toxicology*. 2003;192(1):23–32.
64. Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics*. 2002;12(3):251–63.
65. Gardiner SJ, Begg EJ. Pharmacogenetics, drug-metabolizing enzymes, and clinical practice. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):521–90.
66. Gage BF, Eby C, Milligan PE, Banet GA, Duncan JR, McLeod HL. Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. *Thromb Haemost*. 2004;91(1):87–94.

67. Zhao F, Loke C, Rankin SC, Guo JY, Lee HS, Wu TS, et al. Novel CYP2C9 genetic variants in Asian subjects and their influence on maintenance warfarin dose. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;76(3):210–9.
68. Kimura R, Miyashita K, Kokubo Y, Akaiwa Y, Otsubo R, Nagatsuka K, et al. Genotypes of vitamin K epoxide reductase, gamma-glutamyl carboxylase, and cytochrome P450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in Japanese patients. *Thromb Res.* 2007;120(2):181–6.
69. Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu E a, Morita T, Ritchie MD, Scordo MG, et al. Different contributions of polymorphisms in VKORC1 and CYP2C9 to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans. *Pharmacogenet Genomics.* 2006 Feb;16(2):101–10.
70. Caldwell MD, Awad T, Johnson J a, Gage BF, Falkowski M, Gardina P, et al. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose. *Blood.* 2008;111(8):4106–12.
71. Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S, Barnes C, Eriksson N, Soranzo N, et al. A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose. *PLoS Genet.* 2009;5(3):e1000433.
72. Liang R, Wang C, Zhao H, Huang J, Hu D, Sun Y. Influence of CYP4F2 genotype on warfarin dose requirement-a systematic review and meta-analysis. *Thromb Res.* 2012;130(1):38–44.
73. Tie J-K, Nicchitta C, von Heijne G, Stafford DW. Membrane topology mapping of vitamin K epoxide reductase by in vitro translation/cotranslocation. *J Biol Chem* [Internet]. 2005;280(16):16410–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15716279>
74. Li T, Chang C-Y, Jin D-Y, Lin P-J, Khvorova A, Stafford DW. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature.* 2004;427(6974):541–4.
75. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz H-J, et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature.* 2004;427(6974):537–41.
76. Rieder Mark, Reiner Alexander G, Al B et. Effect of VKORC1 Haplotypes on Transcriptional Regulation and Warfarin Dose. *N Engl J Med.* 2005;352(22):2285–93.

77. Tie JK, Nicchitta C, Von Heijne G, Stafford DW. Membrane topology mapping of vitamin K epoxide reductase by in vitro translation/cotranslocation. *J Biol Chem.* 2005;280(16):16410–6.
78. Goodstadt L, Ponting CP. Vitamin K epoxide reductase: Homology, active site and catalytic mechanism. *Trends Biochem Sci.* 2004;29(6):289–92.
79. Rost S, Fregin A, Hünnerberg M, Bevans CG, Müller CR, Oldenburg J. Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin. *Thromb Haemost.* 2005;94(4):780–6.
80. Arango C, Beatriz S, Intensiva V, Adversas DER, Al A, En W, et al. Vigilancia intensiva de reacciones adversas asociadas al uso de warfarina en pacientes hospitalizados. *Vitae, Rev la Fac química Farm Univ Antioquía.* 2001;8(1 y 2):21–35.
81. Tribiño G, Maldonado C, Segura O, Díaz J. Costos directos y aspectos clínicos de las reacciones adversas a medicamentos en pacientes hospitalizados en el servicio de medicina interna de una institución de tercer nivel de Bogotá. *Biomedica.* 2006;26(1):31–41.
82. Machado-Alba JE, Moncada-Escobar JC. Reacciones adversas medicamentosas en pacientes que consultaron a instituciones prestadoras de servicios en Pereira, Colombia. *Rev Salud Pública.* 2006;8(2):200–8.
83. Sconce E a, Khan TI, Wynne H a, Avery P, Monkhouse L, King BP, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood.* 2005;106(7):2329–33.
84. Riera M, Rojas M, Zapata P. Protocolo de extracción de DNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre. *Revi Cienc y Tecnol.* 2010;14:4–7.
85. Barrio-Caballero PA. Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. *Rev Esp Med Leg.* 2013;39(2):54–62.
86. Obayashi K, Nakamura K, Kawana J, Ogata H, Hanada K, Kurabayashi M, Hasegawa A, Yamamoto K HR. VKORC1 gene variations are the major contributors of variation in warfarin dose in Japanese patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;80(2):169–78.
87. Pierce B. *Genética, un enfoque conceptual.* tercera ed. Panamericana, editor. 2009. 832 p.

88. Isaza C, Beltrán L, Henao J, Porras G, Pinzón A, Vallejos Á, et al. Factores genéticos y ambientales asociados con la respuesta a warfarina en pacientes colombianos. *Biomedica*. 2010;30(3):420–20.
89. Esperón P, Lorenzo DM, Taub I, Stoll M. Genotipo de los genes VKORC1 y CYP2C9 en la respuesta individual a la warfarina. *Rev Med Urug*. 2008;
90. Perini JA, Struchiner CJ, Santana ISC, Rangel F, Ojopi EB. Pharmacogenetics of Warfarin : Development of a Dosing Algorithm for Brazilian Patients. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;84(6):722–8.
91. Scibona P, Redal M a, Garfi LG, Arbelbide J, Argibay PF, Belloso WH. Prevalence of CYP2C9 and VKORC1 alleles in the Argentine population and implications for prescribing dosages of anticoagulants. *Genet Mol Res*. 2012;11(1):70–6.
92. Llerena a, Dorado P, O’Kirwan F, Jepson R, Licinio J, Wong M-L. Lower frequency of CYP2C9*2 in Mexican-Americans compared to Spaniards. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2004 Jan [cited 2014 Mar 21];4(6):403–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15452553>
93. Valentin II, Vazquez J, Rivera-Miranda G, Seip RL, Velez M, Kocherla M, et al. Prediction of Warfarin Dose Reductions in Puerto Rican Patients, Based on Combinatorial CYP2C9 and VKORC1 Genotypes. *Ann Pharmacother*. 2012;46(2):208–18.
94. Borobia AM, Lubomirov R, Ramírez E, Lorenzo A, Campos A, Muñoz-Romo R, et al. An acenocoumarol dosing algorithm using clinical and pharmacogenetic data in Spanish patients with thromboembolic disease. *PLoS One*. 2012;7(7):e41360.
95. Haug KBF, Sharikabad MN, Kringen MK, Narum S, Sjaatil ST, Johansen PW, et al. Warfarin dose and INR related to genotypes of CYP2C9 and VKORC1 in patients with myocardial infarction. *Thromb J*. 2008;6(7):1–7.
96. Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, Eriksson N, Ghori MJR, Bumpstead S, et al. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood*. 2009;113(4):784–92.
97. Zambon C-F, Pengo V, Padrini R, Basso D, Schiavon S, Fogar P, et al. VKORC1, CYP2C9 and CYP4F2 genetic-based algorithm for warfarin dosing: an Italian retrospective study. *Pharmacogenomics*. 2011;12(1):15–25.
98. Geisen C, Luxembourg B, Watzka M, Toennes SW, Sittlinger K, Marinova M, et al. Prediction of phenprocoumon maintenance dose and phenprocoumon plasma

concentration by genetic and non-genetic parameters. *Eur J Clin Pharmacol*. 2011 Apr;67(4):371–81.

99. Wells PS, Majeed H, Kassem S, Langlois N, Gin B, Clermont J, et al. A regression model to predict warfarin dose from clinical variables and polymorphisms in CYP2C9, CYP4F2, and VKORC1: Derivation in a sample with predominantly a history of venous thromboembolism. *Thromb Res. Elsevier Ltd*; 2010;125(6):e259–64.
100. Gaedigk A, Casley WL, Tyndale RF, Sellers EM, Jurima-Romet M, Leeder JS. Cytochrome P4502C9 (CYP2C9) allele frequencies in Canadian Native Indian and Inuit populations. *Can J Physiol Pharmacol*. 2001;79(10):841–7.
101. Carlquist JF, Horne BD, Muhlestein JB, Lappé DL, Whiting BM, Kolek MJ, et al. Genotypes of the cytochrome p450 isoform, CYP2C9, and the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 conjointly determine stable warfarin dose: a prospective study. *J Thromb Thrombolysis*. 2006;22(3):191–7.
102. Dickmann LJ, Rettie a E, Kneller MB, Kim RB, Wood a J, Stein CM, et al. Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9*5) expressed among African Americans. *Mol Pharmacol*. 2001;60(2):382–7.
103. Cen H-J, Zeng W-T, Leng X-Y, Huang M, Chen X, Li J-L, et al. CYP4F2 rs2108622: a minor significant genetic factor of warfarin dose in Han Chinese patients with mechanical heart valve replacement. *Br J Clin Pharmacol*. 2010;70(2):234–40.
104. Choi JR, Kim J-O, Kang DR, Yoon S-A, Shin J-Y, Zhang X, et al. Proposal of pharmacogenetics-based warfarin dosing algorithm in Korean patients. *J Hum Genet*. 2011;56(4):290–5.
105. Yoshizawa M, Hayashi H, Tashiro Y, Sakawa S, Moriwaki H, Akimoto T, et al. Effect of VKORC1-1639 G>A polymorphism, body weight, age, and serum albumin alterations on warfarin response in Japanese patients. *Thromb Res. Elsevier Ltd*; 2009;124(2):161–6.
106. Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM, et al. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics*. 1996;6(4):341–9.
107. Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, El-Enany M, Moursi N, Ahmed MS-E, et al. Allele and genotype frequencies of polymorphic cytochromes P450 (CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;53(6):596–603.

108. Scordo MG, Aklillu E, Yasar U, Dahl ML, Spina E, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in a Caucasian and a black African population. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;52(4):447–50.
109. Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assunção E, Suarez-Kurtz G. Impact of CYP4F2 rs2108622 on the stable warfarin dose in an admixed patient cohort. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;87(4):417–20.
110. Zhang JE, Jorgensen AL, Alfirevic A, Williamson PR, Toh CH, Park BK, et al. Effects of CYP4F2 genetic polymorphisms and haplotypes on clinical outcomes in patients initiated on warfarin therapy. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19(10):781–9.
111. Lacut K, Ayme-Dietrich E, Gourhant L, Poulhazan E, Andro M, Becquemont L, et al. Impact of genetic factors (VKORC1, CYP2C9, CYP4F2 and EPHX1) on the anticoagulation response to fluindione. *Br J Clin Pharmacol*. 2012;73(3):428–36.
112. Teichert M, Eijgelsheim M, Uitterlinden AG, Buhre PN, Hofman A, De Smet P a GM, et al. Dependency of phenprocoumon dosage on polymorphisms in the VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 genes. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21(1):26–34.
113. Kringen MK, Haug KBF, Grimholt RM, Stormo C, Narum S, Opdal MS, et al. Genetic variation of VKORC1 and CYP4F2 genes related to warfarin maintenance dose in patients with myocardial infarction. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:739751.
114. Bress A, Patel SR, Perera MA, Campbell RT, Kittles RA CL. Effect of NQO1 and CYP4F2 genotypes on warfarin dose requirements in Hispanic–Americans and African–Americans. *Pharmacogenomics*. 2012;13(16):1925–35.
115. Harada T, Ariyoshi N, Shimura H, Sato Y, Yokoyama I, Takahashi K, et al. Application of Akaike information criterion to evaluate warfarin dosing algorithm. *Thromb Res*. 2010;126(3):183–90.
116. Shahin MHA, Khalifa SI, Gong Y, Hammad LN, Sallam MTH, El Shafey M, et al. Genetic and nongenetic factors associated with warfarin dose requirements in Egyptian patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21(3):130–5.
117. Smires FZ, Moreau C, Habbal R, Siguret V, Fadili S, Golmard JL, et al. Influence of genetics and non-genetic factors on acenocoumarol maintenance dose requirement in Moroccan patients. *J Clin Pharm Ther*. 2012;37(5):594–8.
118. Palacio L, Falla D, Tobon I, Mejia F, Lewis JE, Martinez AF, et al. Pharmacogenetic impact of VKORC1 and CYP2C9 allelic variants on warfarin dose requirements in a hispanic population isolate. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2010;16(1):83–90.

119. Schalekamp T, Brass?? BP, Roijers JFM, Chahid Y, van Geest-Daalderop JHH, de Vries-Goldschmeding H, et al. VKORC1 and CYP2C9 genotypes and acenocoumarol anticoagulation status: Interaction between both genotypes affects overanticoagulation. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;80(1):13–22.
120. Suarez-Kurtz G, Amorim A, Damasceno A, Hutz MH, de Moraes MO, Ojopi EB, et al. VKORC1 polymorphisms in Brazilians: comparison with the Portuguese and Portuguese-speaking Africans and pharmacogenetic implications. *Pharmacogenomics.* 2010;11(9):1257–67.
121. Gaedigk A, Casley WL, Tyndale RF, Sellers EM, Jurima-Romet M, Leeder JS. Cytochrome P4502C9 (CYP2C9) allele frequencies in Canadian Native Indian and Inuit populations. *Can J Physiol Pharmacol.* 2001;79(10):841–7.
122. Zambon C, Pengo V, Padriani R, Basso D, Schiavon S, Fogar P, et al. algorithm for warfarin dosing : an Italian retrospective study. *Pharmacogenomics.* 2011;12(1):15–26.
123. Schelleman H, Chen Z, Kealey C, Whitehead a S, Christie J, Price M, et al. Warfarin response and vitamin K epoxide reductase complex 1 in African Americans and Caucasians. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81(5):742–7.
124. Moyer TP, O’Kane DJ, Baudhuin LM, Wiley CL, Fortini A, Fisher PK, et al. Warfarin sensitivity genotyping: a review of the literature and summary of patient experience. *Mayo Clin Proc.* 2009;84(12):1079–94.
125. Azarpira N, Namazi S, Hendijani F, Banan M, Darai M. Investigation of allele and genotype frequenciesl of CYP2C9, CYP2C19 and VKORC1 in Iran. *Pharmacol Rep.* 2010;62(4):740–6.
126. Kamali F, Pirmohamed M. The future prospects of pharmacogenetics in oral anticoagulation therapy. *Br J Clin Pharmacol.* 2006;61(6):746–51.
127. Purves SD. *Vida La Ciencia de la Biología.* 8 edición. Panamericana E, editor. Buenos Aires; 2008. 494 p.

12 ANEXOS

Anexo 1 Formato de recolección de datos y test de Cage

Anexo 2. Formato de recolección de datos al ingresar al estudio

Formato de recolección de datos

Datos del paciente	
Nombre	
Identificación	
Teléfono fijo	
Teléfono celular	
Acudiente	
Edad	
Sexo	
Natural de	
Procedente de	
Ocupación	
Observaciones	
Información de la anticoagulación	
Indicación de la anticoagulación (CIE 10)	
Tiempo de anticoagulación	
Dosis de warfarina semanal	
Marca	
Presencia de eventos adversos previos	
Antecedentes	
Patológicos	
Diabetes mellitus	☐
Hipertensión arterial	☐
Enfermedad valvular	☐
Cardiopatía	☐
Enfermedad coronaria	☐

Evento cerebrovascular ☐	
Otro (especifique):	
Alérgicos	
Tóxicos	
• Fuma actualmente?	☐ Si ☐ No
Si la respuesta es afirmativa, cuántos cigarrillos fuma al día?	
• Bebe?	
Si la respuesta es afirmativa	
¿Ha sentido alguna vez que debe beber menos?	Si ☐ No ☐
¿Le ha molestado que la gente lo critique por su forma de beber?	Si ☐ No ☐
¿Alguna vez se ha sentido mal o culpable por su forma de beber?	Si ☐ No ☐
¿Alguna vez ha necesitado beber por la mañana para calmar los nervios o eliminar molestias por haber bebido la noche anterior?	
Antecedentes farmacológicos	
Examen físico	
Tensión arterial	Frecuencia respiratoria
Frecuencia cardíaca	Temperatura
Talla	Peso
IMC	
Datos relevantes al examen físico	

Anexo 2. Consentimiento Informado

ANEXO

COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS CON EL OBJETO DE REALIZAR UN TRABAJO DE INVESTIGACIÓN: NUEVO ALGORITMO PARA LA DOSIFICACIÓN DE WARFARINA: REACCIONES ADVERSAS, FACTORES GENÉTICOS Y NO GENÉTICOS

Usted (o su paciente) está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por el Instituto de Ciencias Básicas- Unidad de Genética y Unidad de Farmacología de la Universidad del Rosario con la participación de:

CARLOS RESTREPO, DORA FONSECA, CLAUDIA SILVA, CARLOS CALDERON, ANGELICA TELLEZ, GERMAN MENDEZ.

Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio:

- (a) La participación en este estudio es totalmente voluntaria.
- (b) La naturaleza de esta investigación, su propósito, sus limitaciones, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información pertinente al resultado de éste, le será explicada por el equipo de atención clínica.
- (c) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas.
- (d) **CONFIDENCIALIDAD:** Los registros médicos de cada individuo permanecerán archivados en la Universidad del Rosario. Los datos, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de atención clínica tendrá acceso a esta información. Por ningún motivo se divulgará esta

información sin su aprobación.

- (e) De acuerdo con lo establecido en la resolución 008430 de 1993 ("Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud"), este estudio puede ser clasificado como una "Investigación con riesgo mínimo". Se cumplirá con lo establecido por el Ministerio de Protección Social colombiano (antiguo Ministerio de Salud), la ley 84 de 1989 y la ley 2381 de 1993.

Cualquier información adicional usted puede obtenerla directamente con:

DORA FONSECA, CLAUDIA SILVA, CARLOS CALDERON ó

DR. ALBERTO VÉLEZ VAN MEERBEKE. Dirección: Carrera 24 No. 63C – 69 "Quinta de Mutis". Oficina de Investigaciones. Teléfono: 3474570 ext. 249.

Departamento de Ciencias Básicas.

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud.

Universidad del Rosario. Tel (57-1)347 4570 (Ext266)

A. EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO

OBJETIVO:

1. Generar una herramienta para cálculo de dosis basado en factores genéticos y otros factores, y la ocurrencia de efectos secundarios, de utilidad para la implementación de esquemas de dosificación en pacientes que toman warfarina.

PROCEDIMIENTO:

Se revisará su historia clínica y se tomarán datos de ella y se recogerá una muestra de aproximadamente 10 ml de sangre mediante punción en vena periférica. En caso de que sea necesario repetir los exámenes, usted será notificado para tomar las muestras nuevamente. Estas muestras serán manejadas y analizadas únicamente por personas involucradas directamente en este proyecto y almacenadas en nuestro laboratorio de Genética

RIESGOS E INCOMODIDADES La participación en este estudio representa riesgo mínimo para su salud e integridad, y las molestias y efectos secundarios estarán representadas exclusivamente por la toma de

muestra referida en el procedimiento, algunas molestias pueden ser: hematomas (morados), enrojecimiento y/o sensibilidad al tacto en el lugar de donde se extrae la muestra, sin embargo, estas se presentarán de manera transitoria.

BENEFICIOS ADICIONALES:

Este estudio nos ayudará a hacer más seguro el tratamiento con warfarina en el futuro para Ud. y otros pacientes. Mientras dure el estudio, Ud. seguirá recibiendo el manejo habitual por parte de su médico tratante.

RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES

Al tomar parte de este estudio es importante que usted contemple las siguientes responsabilidades y precauciones:

El riesgo existente en una toma de muestra de sangre en vena periférica es muy bajo y por lo tanto no reviste riesgo en su salud.

MANEJO DE RESULTADOS

Los resultados que se obtengan de la investigación serán entregados de manera personal en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad del Rosario.

AUTORIZACION

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender mejor los resultados del tratamiento con warfarina. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio.

Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla junto con el resultado del estudio , en las situaciones señaladas a continuación:

- | | | |
|---|----|----|
| ☐ En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, enviando la muestra al exterior a el(los) laboratorio(s) de el(los) instituto(s) antes mencionado(s). | Si | No |
| ☐ En estudios complementarios de diagnóstico para mi o algún miembro de mi familia | Si | No |

- | | | |
|---|----|----|
| o En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación: | Si | No |
| o En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación | Si | No |
| o En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación | Si | No |

**AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO:
NUEVO ALGORITMO PARA LA DOSIFICACIÓN DE WARFARINA: REACCIONES ADVERSAS,
FACTORES GENÉTICOS Y NO GENÉTICOS**

Habiendo sido enterada(o) del contenido del presente estudio, se que los resultados me indicaran acerca de mis factores genéticos y como este determina como reacciono ante el tratamiento con warfarina, lo cual ayudará a optimizar mi tratamiento en el futuro. Yo,

_____ con documento de identificación número: _____ de _____, acepto voluntariamente que se me tome una muestra de sangre, con el fin de realizar el análisis mencionado. Así mismo, declaro que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra.

Fecha: _____

Dirección _____

Teléfono _____

Firma _____

CC.

Firma _____

CC.

Testigo 1

Firma _____

CC.

Testigo 2

Anexo 3. Técnica de extracción de DNA-PROBE con proteinasa

Día Uno

1. En un tubo Falcon de 15 ml medir 6 ml de buffer de lisis de glóbulos rojos y sobre este adicionar 5ml de sangre total (lo que contenga el tubo lila). Mezclar muy bien y con mucha suavidad hasta completa homogenización
2. Agitar fuertemente en una plataforma (shaker) durante 15 minutos a temperatura ambiente
3. Centrifugar 10 minutos a 4500 rpm
4. Descartar el sobrenadante y conservar el pellet
5. Agregar 3ml de lisis de glóbulo rojos y luego dejar 10 minutos en congelación
6. Adicionar 2,5 ml de buffer de lisis celular y mezclar cuidadosamente con chupa plástica varias veces, hasta completar homogenización. Adicionar 3 μ l de proteinasa K 20mg/ml y dejar 2 a 4 horas a 55°C, que es la temperatura óptima de acción de la proteinasa K
7. Centrifugar 10 minutos a 4500 rpm

Día Dos

8. Adicionar 800 μ l de solución precipitante de proteínas agitando suavemente por inversión, luego se incuba en hielo durante 5 minutos.
9. Centrifugar a 4000rpm durante 20 minutos
10. Verter el sobrenadante sobre un tubo Falcon de 15 ml que contenga, 2,4 ml de isopropanol frio (alcohol isopropílico), dejar en reposo al menos unos 5 minutos.
11. Mezclar cuidadosamente por inversión hasta precipitar el DNA
12. Envolver el DNA en una pipeta pasteur de vidrio y pasarlo a 400 μ l de agua
13. Colocar en plataforma(shaker) a velocidad lenta, toda la noche a temperatura ambiente para resuspender por completo el DNA
14. Chequear al día siguiente en agarosa y almacenarlo a 20 °C.

Anexo 4. Extracción de ADN por Fenol-Cloroformo

1. Adicionar 500 µl de buffer de lisis (Tris-HCL 50mM, pH 7,5-8,0, EDTA 50mM, pH 8,0, SDS 0,5%) y dar vórtex fuertemente durante 10 segundos)
2. Agregar 20 µl de proteinasa K (10mg/ml), mezclar muy bien por inversión e incubar dos horas en baño de agua
3. Luego agregar 500 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) agitar muy fuerte
4. Centrifugar diez minutos a 10.000-14000 rpm en el ependorf
5. Con la ayuda de una micropipeta de 100 µl, retirar cuidadosamente la fase superior acuosa y transferirla a un tubo de microcentrífuga de 1,5 µl (se debe tener especial cuidado de no disturbar la interfase con el fin de evitar tomar material de ésta o de la fase interior)
6. Agregar 500 µl: alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo. Agitar fuertemente
7. Centrifugar diez minutos a 10.000-14.000 rpm
8. Con la ayuda de una micropipeta de 100 µl, retirar cuidadosamente, la fase superior y transferirla a un ependorf de 1,5 µl (no se debe tomar material de la interfase)
9. Precipitar el ADN, agregando 1ml de mezcla de etanol absoluto y acetato de amonio (agregar a cada tubo una mezcla de 900 µl de etanol y 200 µl de acetato de amonio 10M). Mezclar suavemente por inversión
10. Llevar los tubos a una temperatura de -20°C durante mínimo 30 minutos (puede dejarse toda la noche)
11. Centrifugar los tubos durante 10 minutos a 10.000-14.000 rpm
12. Descartar el sobrenadante suavemente evitando eliminar el pellet y agregar 1ml de etanol 70% a cada tubo
13. Centrifugar los tubos durante 10.000-14.000 rpm
14. Descartar el sobrenadante suavemente por inversión evitando descartar el pellet y colocar los tubos brevemente boca abajo sobre una servilleta, colocar los tubos en

una gradilla y dejar secar completamente. Es recomendable hacer otro lavado más con etanol 70%

15. Resuspender el pellet en 7-15 μ l de buffer de TE (10mM TrisHCL pH, 7,5, 1mM EDTA) o en agua MQ, la cantidad del buffer de resuspensión o agua que se empleen depende del tamaño del pellet de ADN obtenido en cada muestra
16. Conservar las muestras de ADN extraído, preferiblemente a una temperatura de -20°C