



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Polimorfismos de los genes *CYP2C9*, *CYP2D6*, *G6PD* y *GCLC*  
involucrados en el metabolismo de sulfametoxazol y  
ciprofloxacino: identificación basada en la secuenciación**

Tesis que presenta  
**Isaias Eduardo Hernández Verdín**

Para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de la tesis:**  
**Dr. Rubén López Revilla**

San Luis Potosí, S.L.P., Mayo de 2018



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Polimorfismos de los genes CYP2C9, CYP2D6, G6PD y GCLC involucrados en el metabolismo de sulfametoxazol y ciprofloxacino: identificación basada en la secuenciación**" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Isaías Eduardo Hernández Verdín** y aprobada el dieciocho de mayo del dos mil dieciocho por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dr. Rubén Hipólito López Revilla**  
Director de la tesis

**Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga**  
Miembro del Comité Tutoral

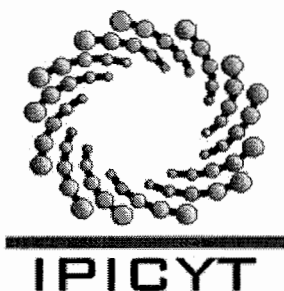
**Dr. Braulio Gutiérrez Medina**  
Miembro del Comité Tutoral



## **Créditos institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 611049) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 180 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 18 días del mes de mayo del año 2018, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Rubén Hipólito López Revilla</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Braulio Gutiérrez Medina</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Isaías Eduardo Hernández Verdín**

sobre la Tesis intitulada:

*Polimorfismos de los genes CYP2C9, CYP2D6, G6PD y GCLC involucrados en el metabolismo de sulfametoxazol y ciprofloxacino: identificación basada en la secuenciación*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Rubén Hipólito López Revilla**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 13:55 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 18 días del mes de mayo de 2018.

  
**Dr. Horacio Flores Zúñiga**  
Secretario Académico

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vález**  
Jefa del Departamento del Posgrado



# Dedicatorias

A mis padres por el esfuerzo, educación y valores inculcados durante mi vida. A Andreina por su apoyo incondicional, junto con mi familia, en la toma de cada una de mis decisiones, por ser mi motivación diaria para ser una mejor persona y por estar ahí conmigo para celebrar los triunfos y animarme en los fracasos.

# Agradecimientos

Al Doctor Rubén López Revilla por haberme escuchado antes de ingresar al IPICYT, por su amistad, consejos, enseñanzas, anécdotas, tiempo y por su forma de ser que hace que el trayecto de enseñanza sea apasionante y ameno.

A la Bióloga Mireya Sánchez Garza por todo su apoyo en el laboratorio, su amabilidad, consejos, amistad y enseñanzas.

Al Maestro en Ciencias Guillermo Pettet Ruiz por la ayuda en todos los protocolos, consejos y amistad.

Al LANBAMA por su atención y eficiente servicio de secuenciación sin el cual no hubiera sido posible el trabajo.

A la Ingeniera Andrea Ganelón Ríos por su colaboración con los experimentos y su análisis.

A mis compañeros: Víctor, Mariana, Clara y Lucía por sus consejos y amistad.

# Contenido

<b>Constancia de aprobación de la tesis</b>	<b>ii</b>
<b>Créditos institucionales</b>	<b>iii</b>
<b>Acta del examen</b>	<b>iv</b>
<b>Dedicatorias</b>	<b>v</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>x</b>
<b>Anexos</b>	<b>xii</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>xiii</b>
<b>Glosario</b>	<b>xviii</b>
<b>Resumen</b>	<b>xxiii</b>
<b>Abstract</b>	<b>xxiv</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
Antecedentes	1
Hipersensibilidad a SMX	4
Anemia hemolítica inducida por SMX	6
Anemia hemolítica inducida por CPMX	7
Síntomas extrapiramidales por coadministración de CPMX-haloperidol	7
Farmacogenética y farmacogenómica de sulfametoxazol y ciprofloxacino	7
Justificación	13
Etapas del estudio	14
Resultados y conclusiones principales	14
<b>Material y métodos</b>	<b>17</b>
Selección de las secuencias génicas blanco	17
Diseño y validación de las parejas de oligonucleótidos iniciadores	17
Condiciones preliminares para generar los amplicones	23
Optimización de las condiciones para generar los amplicones	23
Purificación y cuantificación de los amplicones	26
Secuenciación de los amplicones	26
Alineamiento y análisis de secuencias de los amplicones	26
Identificación de las variantes alélicas relevantes	27
Equilibrio de Hardy-Weinberg, haplotipos y desequilibrio de ligamiento	27
<b>Resultados</b>	<b>29</b>
Montaje de la PCR para obtener el amplicón CYP2C9*2 puro	29
<i>Condiciones de amplificación preliminares</i>	29
<i>Optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub></i>	29
<i>Determinación de la temperatura de annealing óptima</i>	29
<i>Determinación del número de ciclos y temperatura de annealing</i>	29
Montaje de la PCR para obtener el amplicón CYP2C9*3 puro	34
<i>Condiciones de amplificación preliminares</i>	34
<i>Optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub></i>	34
<i>Determinación de la temperatura de annealing óptima</i>	34
<i>Determinación del número de ciclos y temperatura de annealing</i>	34
<i>Concentración óptima de oligonucleótidos</i>	35
Montaje de la PCR para obtener el amplicón CYP2D6 puro	41
<i>Condiciones de amplificación preliminares</i>	41

<i>Optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub></i>	41
<i>Determinación de la temperatura de annealing óptima</i>	41
<i>Determinación del número de ciclos y temperatura de annealing</i>	41
Montaje de la PCR para obtener el amplicón G6PD-Canton puro	46
<i>Condiciones de amplificación preliminares</i>	46
<i>Optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub></i>	46
<i>Optimización de la temperatura de annealing</i>	46
<i>Número de ciclos y temperatura de annealing</i>	46
Montaje de la PCR para obtener el amplicón G6PD-Med puro	48
<i>Condiciones de amplificación preliminares</i>	48
<i>Optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub></i>	48
<i>Número de ciclos y temperatura de annealing</i>	48
Montaje de la PCR para obtener el amplicón GCLC puro	50
<i>Condiciones de amplificación preliminares</i>	50
<i>Optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub></i>	50
<i>Temperatura de annealing</i>	50
Alineamiento y análisis de la secuencia de los amplicones	52
<i>Identificación de las variantes de los genes CYP2C9, CYP2D6, G6PD y GCLC</i>	52
<i>Frecuencia de las variantes de CYP2C9</i>	53
<i>Frecuencia de las variantes de CYP2D6</i>	53
<i>Frecuencia de las variantes de G6PD</i>	53
<i>Frecuencia de las variantes de GCLC</i>	54
<i>Frecuencia de los fenotipos G6PD y GCLC intermedio y pobre concomitantes en hombres y mujeres</i>	54
<i>Frecuencia de los fenotipos G6PD y GCLC intermedio y pobre concomitantes en hombres y mujeres</i>	54
<i>Equilibrio de Hardy-Weinberg, haplotipos y desequilibrio de ligamiento</i>	54
<b>Discusión</b>	<b>67</b>
Diseño de los ensayos de PCR	67
1. <i>Selección de las variantes clínicamente relevantes</i>	67
2. <i>Delimitación de las regiones génicas que contienen las variantes</i>	67
3. <i>Regiones delimitadas con flancos adicionales de ~350 pb</i>	68
4. <i>Diseño de las parejas de oligonucleótidos</i>	68
5. <i>Validación in silico</i>	68
Obtención de los amplicones	69
<i>Condiciones preliminares</i>	69
<i>Ajuste del contenido de DNA</i>	69
<i>Ajuste de la concentración de MgCl<sub>2</sub></i>	69
<i>Ajuste de la temperatura de annealing</i>	69
<i>Ajuste del número de ciclos</i>	70
<i>Ajuste de la concentración de oligonucleótidos</i>	70
Secuenciación, identificación y frecuencia de las variantes alélicas	70
Variantes de CYP2C9	71
Variantes de CYP2D6	76
Variantes de G6PD	80
Variantes de GCLC	83
Equilibrio de Hardy-Weinberg, haplotipos y desequilibrio de ligamiento	85
Implicaciones y perspectivas	85
<b>Referencias</b>	<b>87</b>
<b>Anexos</b>	<b>97</b>



# Lista de tablas

Tabla 1. Secuencias de referencia de los genes CYP2C9, CYP2D6, G6PD y GCLC silvestres	20
Tabla 2. Variantes clínicamente relevantes y SNPs contenidos en los amplicones de los genes CYP2C9, CYP2D6, G6PD y GCLC	21
Tabla 3. Mezclas de PCR (25 µL) optimizadas para los amplicones CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2D6, G6PD-Canton, G6PD-Med y GCLC	24
Tabla 4. Programas de termociclado optimizados para los amplicones CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2D6, G6PD-Canton, G6PD-Med y GCLC	25
Tabla 5. Decanucleótidos adyacentes a los SNPs relevantes de los genes CYP2C9, CYP2D6, G6PD y GCLC	28
Tabla 6. Frecuencia (%) de las variantes alélicas identificadas	57
Tabla 7. Frecuencia de los fenotipos CYP2C9 y CYP2D6	58
Tabla 8. Frecuencia de genotipos G6PD y fenotipos G6PD	59
Tabla 9. Frecuencia de genotipos y fenotipos GCLC rs761142 y los fenotipos correspondientes	60
Tabla 10. Frecuencia de fenotipos G6PD/GCLC concomitantes en hombres y mujeres	61
Tabla 11. Frecuencia de fenotipos CYP2C9/GCLC concomitantes	62
Tabla 12. Distribución de los genotipos	63
Tabla 13. Distribución de haplotipos y desequilibrio de ligamiento <sup>a</sup>	66

# Lista de figuras

Fig. 1. Metabolismo y rutas para el desarrollo de los efectos adversos por SMX	5
Fig. 2. Metabolismo y ruta para el desarrollo de anemia hemolítica de CPMX	8
Fig. 3. Electroferograma de la mezcla de PCR para el amplicón CYP2C9*2 en condiciones preliminares (40 ng de DNA, MgCl <sub>2</sub> 4 mM, annealing a 48 °C, 40 ciclos)	30
Fig. 4. Electroferograma de las mezclas de PCR para el amplicón CYP2C9*2 con MgCl <sub>2</sub> 1.5-4 mM (20 ng de DNA, annealing a 48.0 °C, 40 ciclos)	31
Fig. 5. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas respecto al valor máximo de la banda principal (308 pb) en mezclas de PCR para el amplicón CYP2C9*2 con temperaturas de annealing de 48.2 a 56.2 °C (20 ng de DNA, MgCl <sub>2</sub> 1.5 mM, 40 ciclos)	32
Fig. 6. Electroferograma e intensidades relativas de la banda única de 308 pb en mezclas de PCR para el amplicón CYP2C9*2 con temperaturas de annealing de 54.9 a 61.2 °C (20 ng de DNA, MgCl <sub>2</sub> 1.5 mM, 25 ciclos)	33
Fig. 7. Electroferograma de la mezcla de PCR para el amplicón CYP2C9*3 en condiciones preliminares (40 ng de DNA, MgCl <sub>2</sub> 4 mM, annealing a 48.0 °C, 30 ciclos)	36
Fig. 8. Electroferograma de las mezclas de PCR para el amplicón CYP2C9*3 con MgCl <sub>2</sub> 1.5-4.0 mM (20 ng de DNA, annealing a 48.0 °C, 30 ciclos)	37
Fig. 9. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas respecto al valor máximo de la banda principal (381 pb) en mezclas de PCR para el amplicón CYP2C9*3 con temperaturas de annealing de 48.2 a 56.2 °C (20 ng de DNA, MgCl <sub>2</sub> 1.5 mM, 30 ciclos)	38
Fig. 10. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas respecto al valor máximo de la banda de 381 pb en mezclas de PCR para el amplicón CYP2C9*3 con temperaturas de annealing de 52.6 a 60.8 °C (20 ng de DNA, MgCl <sub>2</sub> 1.5 mM, 25 ciclos)	39
Fig. 11. Electroferograma e intensidades relativas de la banda única de 381 pb en mezclas de PCR para el amplicón CYP2C9*3 con oligonucleótidos 0.1, 0.2 y 0.3 μM (20 ng de DNA, annealing a 57.0 °C, MgCl <sub>2</sub> 1.5 mM, 25 ciclos)	40
Fig. 12. Electroferograma de la mezcla de PCR para el amplicón CYP2D6 en condiciones preliminares (40 ng de DNA, MgCl <sub>2</sub> 4 mM, annealing a 48 °C, 30 ciclos)	42
Fig. 13. Electroferograma de las mezclas de PCR para el amplicón CYP2D6 con MgCl <sub>2</sub> 1.5-4 mM (20 ng de DNA, annealing a 48.0 °C, 30 ciclos)	43
Fig. 14. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas respecto al valor máximo de la banda de 347 pb de mezclas de PCR para el amplicón CYP2D6 con temperaturas de annealing de 48.2 a 56.2°C (20 ng de DNA, MgCl <sub>2</sub> 1.5 mM, 30 ciclos)	44
Fig. 15. Electroferograma e intensidades relativas de la banda única de 347 pb de mezclas de PCR para el amplicón CYP2D6 con temperaturas de annealing de 53.2 a 61.2 °C (20 ng de DNA, MgCl <sub>2</sub> 1.5 mM, 25 ciclos)	45
Fig. 16. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas respecto al valor máximo de la banda de 401 pb de mezclas de PCR para el amplicón G6PD-Canton con temperaturas de annealing de 53.2 a 61.2 °C (20 ng de DNA, MgCl <sub>2</sub> 1.5 mM, 25 ciclos)	47
Fig. 17. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas respecto al valor máximo de la banda de 350 pb de mezclas de PCR para el amplicón G6PD-Med con temperaturas de annealing de 53.2 a 61.2 °C (20 ng de DNA, MgCl <sub>2</sub> 1.5 mM, 25 ciclos)	49
Fig. 18. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas respecto al valor máximo de la banda de 197 pb de mezclas de PCR para el amplicón GCLC con	

temperaturas de annealing de 48.2 a 56.2°C (20 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 30 ciclos)

51

Fig. 19. Cromatogramas de una secuencia con el SNP CYP2C9\*3 en estado heterocigoto y otra del alelo CYP2C9\*1 (silvestre) en estado homocigoto

56

Fig. 20. Monómero de la proteína CYP2D6\*1 modelado en CHIMERA

82

# Anexos

Anexo 1. Electroferograma de la mezcla de PCR para el amplicón G6PD-Canton en condiciones preliminares (40 ng de DNA, MgCl <sub>2</sub> 4 mM, annealing a 48.0 °C, 30 ciclos)	97
Anexo 2. Electroferograma de mezclas de PCR para el amplicón G6PD-Canton con MgCl <sub>2</sub> 1.5-4.0 mM (20 ng de DNA, annealing 48.0 °C, 30 ciclos)	98
Anexo 3. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas respecto al valor máximo de la banda de 401 pb de mezclas de PCR para el amplicón G6PD-Canton con temperaturas de annealing de 48.2 a 56.2°C (20 ng de DNA, MgCl <sub>2</sub> 1.5 mM, 30 ciclos)	99
Anexo 4. Electroferograma de la mezcla de PCR para el amplicón G6PD-Med en condiciones preliminares (40 ng de DNA, MgCl <sub>2</sub> 4 mM, annealing a 48.0 °C, 30 ciclos)	100
Anexo 5. Electroferograma de las mezclas de PCR para el amplicón G6PD-Med con MgCl <sub>2</sub> 1.5-4.0 mM (20 ng de DNA, annealing 48.0 °C, 30 ciclos)	101
Anexo 6. Electroferograma de la mezcla de PCR para el amplicón GCLC en condiciones preliminares (40 ng de DNA, MgCl <sub>2</sub> 4 mM, annealing a 48 °C, 30 ciclos)	102
Anexo 7. Electroferograma de las mezclas de PCR para el amplicón GCLC con MgCl <sub>2</sub> 1.5-4 mM (20 ng de DNA, annealing a 48.0 °C, 30 ciclos)	103
Anexo 8. Genotipos CYP2C9 y fenotipos identificados	104
Anexo 9. Genotipos CYP2D6 y fenotipos identificados	105
Anexo 10. Genotipos G6PD-Canton y fenotipos identificados	107
Anexo 11. Genotipos G6PD-Mediterranean y fenotipos identificados	109
Anexo 12. Genotipos GCLC y fenotipos identificados	110
Anexo 13. Condiciones para generar los amplicones de los genes CYP2C9, CYP2D6, G6PD y GCLC en este y en otros estudios	111
Anexo 14. Amplicones de los exones 3 y 7 del gen CYP2C9	112
Anexo 15. Amplicón CYP2D6	113
Anexo 16. Amplicón G6PD-Canton	114
Anexo 17. Amplicón G6PD-Med	115
Anexo 18. Amplicón GCLC	116
Anexo 19. Código genético	117
Anexo 20. Abreviaturas de los aminoácidos	118
Anexo 21. Equipo	119
Anexo 22. Reactivos	120
Anexo 23. Preparación de soluciones	121
Anexo 24. Productos derivados del trabajo de tesis	124

# Abreviaturas

**CYP2C9\*1.** Alelo silvestre (wild type) del gen *CYP2C9*.

**CYP2C9\*2.** Alelo rs1799853 del gen *CYP2C9*. SNP no sinónimo localizado en el exón 3 (nt 3,608): C430T, R144C.

**CYP2C9\*2.** Amplicón *CYP2C9\*2* de 308 pb generado por PCR a partir del gen *CYP2C9* con la pareja de oligonucleótidos EHCYP2C9\*2F / EHCYP2C9\*2R.

**CYP2C9\*3.** Alelo rs1057910 del gen *CYP2C9*. SNP no sinónimo localizado en el exón 7 (nt 42,614): A1075C, I359L.

**CYP2C9\*3.** Amplicón de 381 pb generado por PCR a partir del gen *CYP2C9* con la pareja de oligonucleótidos EHCYP2C9\*3F / EHCYP2C9\*3R.

**CYP2C9.** Citocromo oxidasa P450 2C9 (EC 1.14.13). Enzima de 55,628 Da (490 aminoácidos) localizada en los microsomas hepáticos. Está implicada en la vía de transporte de electrones dependiente de NADPH y oxida una gran variedad de compuestos que incluyen esteroides, ácidos grasos y xenobióticos.

**CYP2C9.** Gen *CYP2C9* humano que codifican la citocromo oxidasa P450 2C9. Localizado en el cromosoma 10 (10q.23.33), tiene una longitud de 50,734 nucleótidos que incluyen nueve exones y ocho intrones.

**CYP2D6\*1A.** Alelo silvestre (wild type) del gen *CYP2D6*.

**CYP2D6\*6.** Alelo rs5030655 del gen *CYP2D6*. SNP localizado en el exón 3 (nt 1,707): T538ΔT, frameshift.

**CYP2D6.** Amplicón *CYP2D6* de 347 pb generado por PCR a partir del gen *CYP2D6* con la pareja de oligonucleótidos EHCYP2D6F / EHCYP2D6R.

**CYP2D6.** Citocromo oxidasa P450 2D6 (EC 1.14.14.1). Enzima de 55,769 Da (497 aminoácidos) localizada en el retículo endoplásmico y mitocondria. Está implicada en el metabolismo del 25% de los fármacos comúnmente prescritos incluyendo neurolépticos, antidepresivos tricíclicos, inhibidores selectivos de serotonina y bloqueadores  $\beta$ .

**CYP2D6.** Gen *CYP2D6* humano que codifica la Citocromo oxidasa P450 2D6. Localizado en el cromosoma 22 (22q13.2) tiene una longitud de 4,383 nucleótidos que incluyen nueve exones y ocho intrones.

**EHCYP2C9\*2F.** Oligonucleótido iniciador forward usado para generar el amplicón CYP2C9\*2-308.

**EHCYP2C9\*2R.** Oligonucleótido iniciador reverse usado para generar el amplicón CYP2C9\*2-308.

**EHCYP2C9\*3F.** Oligonucleótido iniciador forward para generar el amplicón CYP2C9\*3-381.

**EHCYP2C9\*3R.** Oligonucleótido iniciador reverse para generar el amplicón CYP2C9\*3-381.

**EHCYP2D6F.** Oligonucleótido iniciador forward para generar el amplicón CYP2D6-347.

**EHCYP2D6R.** Oligonucleótido iniciador reverse para generar el amplicón CYP2D6-347.

**EHG6PDMF.** Oligonucleótido iniciador forward para generar el amplicón G6PD-Med-350.

**EHG6PDMR.** Oligonucleótido iniciador reverse para generar el amplicón G6PD-Med-350.

**EHG6PDSF.** Oligonucleótido iniciador forward para generar el amplicón G6PD-Canton-401.

**EHG6PDSR.** Oligonucleótido iniciador reverse para generar el amplicón G6PD-Canton-401.

**EHGCLCF.** Oligonucleótido iniciador forward para generar el amplicón GCLC-197.

**EHGCLCR.** Oligonucleótido iniciador reverse para generar el amplicón GCLC-197.

**EtBr.** Bromuro de etidio.

**Exón 12 (de *G6PD*).** Segmento codificante de 93 pb del gen *G6PD* que contiene el SNP *Canton*.

**Exón 3 (de *CYP2C9*).** Segmento codificante de 150 pb del gen *CYP2C9* que contiene los SNP's *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*8*, *CYP2C9\*14*, *CYP2C9\*26*, *CYP2C9\*24*, *CYP2C9\*33*, *CYP2C9\*41*, *CYP2C9\*42*, *CYP2C9\*43*, *CYP2C9\*44*, *CYP2C9\*45* y *CYP2C9\*46*.

**Exón 3 (de CYP2D6).** Segmento codificante de 153 pb el gen *CYP2D6* que contiene los SNP's *CYP2D6\*6A*, *CYP2D6\*6B*, *CYP2D6\*5*, *CYP2D6\*50*, *CYP2D6\*90* y *CYP2D6 rs1135824*.

**Exón 6 (de G6PD).** Segmento codificante de 159 pb del gen *G6PD* que contiene el SNP *Mediterranean*.

**Exón 7 (de CYP2C9).** Segmento codificante de 186 pb del gen *CYP2C9* que contiene los SNPs *CYP2C9\*3*, *CYP2C9\*4*, *CYP2C9\*5*, *CYP2C9\*17* y *CYP2C9\*55*.

**G6PD B.** Alelo silvestre (wild type) del gen *G6PD*.

**G6PD.** Gen *G6PD* humano que codifica la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Localizado en el cromosoma X (Xq28) tiene una longitud de 16,197 nucleótidos que incluyen 13 exones y 12 intrones.

**G6PD.** Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49). Enzima de 59,257 Da (515 aminoácidos) localizada principalmente en la membrana plasmática, citosol y en menor medida en núcleo y citoesqueleto. Involucrada en la primera reacción de la ruta de las pentosas fosfato de donde se produce NADPH, un donador de electrones clave para la defensa contra agentes oxidantes y en reacciones reductivas biosintéticas.

**G6PD-Canton.** Alelo rs72554665 del gen *G6PD*. SNP localizado en el exón 12 (nt 15,318): G1376A/C/T, R459H/P/L.

**G6PD-Canton.** Amplicón G6PD-Canton de 401 pb generado por PCR a partir del gen *G6PD* con la pareja de oligonucleótidos EHG6PDSF / EHG6PDSR.

**G6PD-Med.** Amplicón G6PD-Med de 350 pb generado por PCR a partir del gen *G6PD* con la pareja de oligonucleótidos EHG6PDMF / EHG6PDMR.

**G6PD-Mediterranean.** Alelo rs5030868 del *G6PD*. SNP localizado en el exón 6 (nt 13,168): C563T, S188F.

**GCLC rs761142.** Alelo rs761142 del gen *GCLC*. SNP localizado en el intrón 1 (nt 17,724): disminución del RNA mensajero.

**GCLC.** Alelo silvestre (wild type) del gen *GCLC*.

**GCLC.** Amplicón GCLC de 197 pb generado por PCR a partir del gen *GCLC* con la pareja de oligonucleótidos EHGCLCF / EHGCLCR.

**GCLC.** Gen *GCLC* humano que codifica la subunidad catalítica de la ligasa de glutamato-cisteína. Localizado en el cromosoma 6 (6p12.1) tiene una longitud de 47,789 nucleótidos que incluyen 16 exones y 15 intrones.

**GCLC.** Subunidad catalítica de la ligasa de glutamato-cisteína (EC 6.3.2.2). Proteína de 72,766 Da (637 aminoácidos) localizada principalmente en el citosol y en menor cantidad en mitocondria y núcleo. Componente de la ligasa de glutamato-cisteína implicada en la síntesis de glutatión.

**Intrón 1 (de *GCLC*).** Segmento no codificante de 21,969 pb del gen *GCLC* que contiene el SNP *GCLC rs761142*.

**Intrón 3 (de *CYP2D6*).** Segmento no codificante de 90 pb del gen *CYP2D6* que contiene el SNP *CYP2D6\*4*.

**nt.** Nucleótido.

**pb.** Par de bases.

**PCR.** Reacción de polimerización en cadena de punto final.

**PCR-TR.** PCR en tiempo real.

**rpm.** Revoluciones por minuto.

**SB.** Amortiguador de borato de sodio.

**SNP *Canton*.** *G6PD-Canton*. (rs72554665, G1376A/C/T, R459H/P/L).

**SNP *Mediterranean*.** *G6PD Mediterranean*. (rs5030868, C563T, S188F).

**SNP *CYP2C9\*14*.** *CYP2C9\*14* (rs72558189, G374A, R125H).

**SNP *CYP2C9\*17*.** *CYP2C9\*17* (C1144T, P382S).

**SNP *CYP2C9\*2*.** *CYP2C9\*2* (rs1799853, C430T, R144C).

**SNP *CYP2C9\*24*.** *CYP2C9\*24* (rs749060448, G1060A; C430T, E354K; R144C).

**SNP *CYP2C9\*26*.** *CYP2C9\*26* (rs200965026, C389G, T130R).

**SNP *CYP2C9\*3*.** *CYP2C9\*3* (rs1057910, A1075C, I359L).

**SNP *CYP2C9\*33*.** *CYP2C9\*33* (rs200183364, G395A, R132Q).

**SNP *CYP2C9\*35*.** *CYP2C9\*35* (G374T; C430T, R125L; R144C).

**SNP *CYP2C9\*4*.** *CYP2C9\*4* (rs56165452, T1076C/A, I359T).

**SNP *CYP2C9\*41*.** *CYP2C9\*41* (A356G, K119R).

**SNP *CYP2C9\*42*.** *CYP2C9\*42* (rs12414460, G371A, R124Q).

**SNP *CYP2C9\*43*.** *CYP2C9\*43* (rs767576260, C370T, R124W).



**SNP CYP2C9\*44.** CYP2C9\*44 (rs200965026, C389T, T130M).

**SNP CYP2C9\*45.** CYP2C9\*45 (rs199523631, C394T, R132W).

**SNP CYP2C9\*46.** CYP2C9\*46 (rs754487195, G445A, A149T).

**SNP CYP2C9\*5.** CYP2C9\*5 (rs28371686, C1080G, D360E).

**SNP CYP2C9\*55.** CYP2C9\*55 (C1081A, L361I).

**SNP CYP2C9\*8.** CYP2C9\*8 (rs7900194, G449A, R150H).

**SNP CYP2D6 rs1135824.** CYP2D6 rs1135824 (rs1135824, A580G, N166D).

**SNP CYP2D6\*4.** CYP2D6\*4 (rs3892097, G1846A, slicing alternativo).

**SNP CYP2D6\*5.** CYP2D6\*5 (Delección del gen).

**SNP CYP2D6\*50.** CYP2D6\*50 (rs267608302, A551C, E156A).

**SNP CYP2D6\*6A.** CYP2D6\*6A (rs5030655, T538ΔT, frameshift).

**SNP CYP2D6\*90.** CYP2D6\*90 (rs569229126, A524G, K147R).

**Sondas TaqMan.** Oligonucleótidos marcados con un fluorocromo; utilizados para PCR en tiempo real.

**TA.** Temperatura de annealing.

**Taq pol.** DNA polimerasa termoestable de *Thermus aquaticus*.

**U.** Unidad de actividad enzimática.

**UV.** Luz ultravioleta.

# Glosario

**Ácido desoxirribonucleico (DNA).** Macromolécula lineal formada por cuatro desoxinucleótidos polimerizados con las bases adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Consta de dos cadenas helicoidales antiparalelas con secuencias nucleotídicas complementarias (cada base de una cadena está unida por puentes de hidrógeno con la base de la cadena complementaria formando los pares de bases A-T y G-C). La secuencia nucleotídica es la información genética.

**Agarosa.** Polímero lineal alternante de D-galactosa y 3,6 anhidro L-galactosa extraído de algas marinas. Se emplea como soporte en medios electroforéticos y cromatográficos.

**Agua MilliQ.** Agua de calidad ultrapura a partir del agua del grifo, obtenida mediante el sistema de purificación MilliQ. Se utiliza en cromatografía, análisis elemental, cultivo de células, biología molecular y bioquímica.

**Alelo.** Forma alternativa de un locus genético.

**Alineación.** Comparación de dos o más secuencias de macromoléculas biológicas (DNA, RNA o proteínas) para tratar de encontrar la máxima correspondencia entre los residuos. Puede haber alineaciones locales, globales, en parejas o múltiples.

**Aminoácido.** Unidad estructural de las proteínas. Existen 20 aminoácidos diferentes con dos grupos funcionales característicos, el grupo amino (NH<sub>2</sub>) y el carboxilo (COOH). La secuencia de aminoácidos y la función de la proteína está determinada por el código genético.

**Amortiguador.** Soluciones formadas por un ácido débil y una sal del ácido con una base fuerte, cuya concentración de hidrogeniones (pH) apenas varía por adición de ácidos o bases fuertes. Su función es mantener el pH.

**Amplicón.** Producto de la amplificación por PCR de un segmento de DNA).

**Amplificación.** Aumento del número de copias de un segmento específico de DNA, in vivo o in vitro.

**Bromuro de etidio (ETBr).** Agente intercalante del DNA que emite fluorescencia cuando se expone a radiación UV. Se utiliza para revelar la posición de bandas de DNA después de la electroforesis.

**Buffer SB.** Solución amortiguadora de borato de sodio utilizada para la preparación y corrida electroforética de geles de agarosa.

**Citocromo oxidasa P450.** Hemoproteína con actividad enzimática característica de las monooxigenasas, con afinidad por sustratos endógenos o exógenos diferenciados, incluyendo fármacos.

**Control negativo.** Reacción adicional fundamental en la realización de pruebas moleculares. Se agregan todos los reactivos necesarios para la reacción menos DNA. Sirve para determinar si hay contaminación durante la PCR.

**Cromosoma.** Estructura genética auto-replicante de las células que contienen el DNA celular que en su secuencia nucleotídica tiene la matriz lineal de genes. En procariotas el DNA cromosómico es circular y un cromosoma incluye todo el

genoma. Los genomas eucariotas consisten en una serie de cromosomas cuyo DNA está asociado con diferentes tipos de proteínas. Están compuestos por un brazo largo (región q) y un brazo corto (región p).

**CYP.** Familia de las citocromo oxidasas que utilizan citocromo P450 como cofactor.

**CYP2C19.** Citocromo oxidasa P450 2C19 (EC 1.14.14.1), polimórfica, de la subfamilia CYP2C expresada en hígado humano, involucrada en el metabolismo de cerca del 8% de los fármacos clínicamente relevantes. Se conocen al menos 20 variantes de la enzima.

**CYP2C9\*2.** Variante alélica de CYP2C9 caracterizada por un SNP en el exón 3 del gen *CYP2C9*. El cambio de bases C430T lleva a la sustitución Arg144Cys en la secuencia de aminoácidos.

**CYP2C9\*3.** Variante alélica de CYP2C9 caracterizada por un SNP en el exón 7 del gen *CYP2C9*. El cambio de bases A1075C lleva a la sustitución Ile359Leu en la secuencia de aminoácidos.

**CYP2C9\*4.** Variante alélica de CYP2C9 caracterizada por un SNP en el exón 7 del gen *CYP2C9*. El cambio de bases T1076C que lleva a la sustitución Ile359Thr en la secuencia de aminoácidos.

**CYP2C9.** Enzima citocromo P450 2C9 polimórfica de la subfamilia CYP2C expresada en hígado humano: Constituye cerca del 20% del contenido total de las enzimas P450 en los microsomas de hígado humano y metaboliza cerca del 10% de los fármacos terapéuticamente relevantes.

**CYP2D6\*6.** Variante alélica caracterizada por un SNP localizado en el exón 3 del gen *CYP2D6*. El cambio de bases T538ΔT cambia el marco de lectura que produce un codón de paro cercano al sitio de delección del nucleótido T genera una proteína trunca de 153 aminoácidos.

**CYP2D6.** Citocromo oxidasa P450 2D6 (EC 1.14.14.1) expresada en el retículo endoplásmico y las mitocondrias: Implicada en el metabolismo del 25% de los fármacos comúnmente prescritos. Existen más de 100 variantes de la enzima.

**Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs).** Los cuatro precursores del DNA (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), sustratos de las DNA polimerasas.

**DNA polimerasa.** Enzima que cataliza la síntesis de DNA a partir de un molde de DNA preexistente.

**Electroferograma.** Registro fotográfico de una corrida electroforética.

**Electroforesis.** Técnica de separación de moléculas en una mezcla por aplicación de un campo eléctrico. Las moléculas disueltas migran a través del campo eléctrico a una velocidad determinada por su relación carga/masa. Para la electroforesis de ácidos nucleicos se utilizan usualmente geles de agarosa y para las proteínas geles de poliacrilamida.

**Enzima de restricción.** Enzima que reconoce e hidroliza secuencias cortas específicas en el DNA.

**Enzima.** Proteína catalítica que acelera la velocidad de una reacción bioquímica pero no altera la dirección ni la naturaleza de la reacción.

**EtBr** (véase bromuro de etidio).

**Exón.** Secuencia de DNA que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína.

**Farmacogenómica.** El estudio de la interacción del genoma y la respuesta individual a los fármacos.

**Fotodocumentador.** Equipo para adquisición, documentación y análisis de imágenes experimentales.

**G6PD.** Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49), expresada principalmente en la membrana plasmática, el citosol y en menor medida en el núcleo y el citoesqueleto. Involucrada en la primera reacción de la ruta de las pentosas-fosfato, donde se produce NADPH, donador de electrones clave para reacciones biosintéticas reductoras y defensa contra agentes oxidantes.

**G6PD-Canton.** Variante alélica caracterizada por un SNP en el exón 12 del gen *G6PD*. El cambio de bases G1376A/C/T lleva a la sustitución R459H/P/L en la secuencia de aminoácidos.

**G6PD-Mediterranean.** Variante alélica caracterizada por un SNP en el exón 6 del gen *G6PD*. El cambio de bases C563T lleva a la sustitución S188F en la secuencia de aminoácidos.

**GCLC rs761142.** Variante alélica caracterizada por un SNP en el intrón 1 del gen *GCLC*. El cambio de bases T17724G genera una disminución en el RNA mensajero.

**GCLC.** Subunidad catalítica de la ligasa de glutamato-cisteína (EC 6.3.2.2), implicada en la síntesis de glutatión; expresada principalmente en el citosol y en menor medida en la mitocondria y el núcleo.

**Gen.** Unidad física y funcional de la herencia. Secuencia ordenada de nucleótidos, localizada en una posición particular de un cromosoma que codifica un producto con una función específica.

**Genética.** Estudio de la variación y herencia de los organismos vivos.

**Heterocigoto.** Organismo diploide que porta dos alelos diferentes de un gen.

**Homocigoto.** Organismo diploide que porta dos alelos idénticos de un gen.

**Intrón.** Secuencia de DNA que interrumpe la secuencia codificante de la proteína de un gen y se transcribe como parte del precursor del RNA mensajero del cual es eliminado para que pueda traducirse la proteína.

**Microsomas hepáticos.** Fracción subcelular que contiene retículo endoplásmico liso de las células hepáticas donde se encuentran enzimas clave en reacciones de metabolización y eliminación de fármacos.

**Mismatch.** Las bases no idénticas de dos o más secuencias nucleotídicas, colocadas en la misma columna de una alineación.

**N-hidroxilación.** Reacción de oxidación del sistema microsomal hepático que introduce en un compuesto un grupo hidroxilo (OH) en lugar de un átomo de hidrógeno.

**Nicotinamida-adenín-dinucleótido fosfato reducido (NADPH).** Coenzima en su forma reducida que actúa como agente transportador de hidrógeno en numerosas rutas enzimáticas.

**Nucleótido.** Subunidad de DNA o RNA que contiene una base nitrogenada (adenina, guanina, timina/uracilo, citosina), una molécula de fosfato y una molécula de azúcar (desoxirribosa/ribosa).

**Oligonucleótido iniciador forward.** Molécula compuesta por 20-25 desoxinucleótidos, utilizada como cebador de la síntesis de DNA que forma el extremo 5' de los productos de PCR.

**Oligonucleótido iniciador reverse.** Molécula compuesta por 20-25 desoxinucleótidos, utilizados como cebador de la síntesis de DNA que forma el extremo 3' de los productos de PCR.

**PCR** (véase reacción de polimerización en cadena).

**PCR de punto final.** PCR en la que los productos de amplificación son analizados por electroforesis en geles de agarosa.

**PCR en tiempo real.** PCR en la que los productos de amplificación son detectados por su fluorescencia en cada ciclo del proceso de amplificación.

**Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*).** Método de análisis de la variación en el tamaño de los fragmentos de DNA generados por el corte con enzimas de restricción específicas. Los fragmentos de restricción de las secuencias polimórficas se utilizan como marcadores en los mapas físicos y mapas de ligamiento genético.

**Polimorfismo de nucleótido único (SNP, *single nucleotide polymorphism*).** Variación puntual en la secuencia del DNA genómico por el cambio de un solo nucleótido.

**Polimorfismo genético.** Diferencia en la secuencia de DNA entre individuos, grupos o poblaciones.

**Proteína.** Macromolécula biológica lineal compuesta por una o más cadenas de aminoácidos alineados en un orden determinado por la secuencia de los tripletes del código genético de la región codificante del gen.

**Reacción de polimerización en cadena (PCR).** Método para amplificar un segmento de DNA con una polimerasa termoestable y una pareja de oligonucleótidos iniciadores (forward y reverse) de 20-25 bases. El iniciador forward es complementario al extremo 5' de una cadena y el reverse al extremo 5' de la cadena complementaria del segmento. Las nuevas cadenas de DNA sirven como plantillas adicionales para los mismos iniciadores. Los ciclos sucesivos de unión de los cebadores, polimerización y disociación generan los productos de amplificación deseados.

**RFLP** (véase polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción).

**Secuenciación de Sanger.** Método ampliamente utilizado para determinar la secuencia de los productos de PCR obtenidos a partir de iniciadores forward y reverse específicos. Se basa en la inserción de cuatro didesoxinucleótidos análogos a precursores normales que generan cadenas de DNA de longitud diferente terminadas aleatoriamente.

**SNP** (véase polimorfismo de nucleótido único).

**Sondas TaqMan.** Sondas de oligodesoxinucleótidos marcadas con un fluorocromo en el extremo 5', utilizadas en PCR de tiempo real. Hibridan en un punto intermedio de la secuencia entre los iniciadores forward y reverse. El fluorocromo se encuentra *silenciado* por otro fluorocromo o *quencher*. La sonda hibrida con la secuencia del DNA de cadena doble de interés y elimina la secuencia del quencher cuando la sonda se degrada por la actividad de la exonucleasa 5'→3' de la DNA polimerasa.

**Sulfametoxazol.** Antimicrobiano sintético de amplio espectro que bloquea la síntesis del ácido fólico.

**Temperatura de annealing (TA).** Temperatura óptima a la que los iniciadores hibridan específicamente con la cadena sencilla complementaria del DNA blanco desnaturalizado. Es ~5 °C mayor que la T<sub>m</sub>.

**Temperatura de fusión (T<sub>m</sub>).** Temperatura a la que se desnaturaliza el 50% un segmento de DNA de cadena doble. Depende del contenido de GC y de la secuencia nucleotídica. La T<sub>m</sub> de un iniciador se calcula con la fórmula  $T_m = 2(AT) + 4(GC)$ .

**Termociclador.** Instrumento automático que varía y controla la temperatura de manera programada a lo largo de los ciclos del proceso de la PCR.

**T<sub>m</sub>** (véanse temperatura fusión y temperatura de annealing).

**Unidad de actividad enzimática (U).** Micromolas de sustrato transformados por minuto por una enzima.

**Validación in silico.** Método no experimental basado en herramientas computacionales y modelos matemáticos para la búsqueda de funciones y estructuras de genes, proteínas y otras biomoléculas en bases de datos.

**Xenobiótico.** Sustancia que interactúa con un organismo y no es uno de sus componentes naturales. Los xenobióticos —entre los que se encuentran fármacos, productos químicos, subproductos industriales y aditivos de alimentos— son sustratos de diversas isoformas de enzimas de la familia de citocromo P450 (CYP).

# Resumen

## Polimorfismos de los genes *CYP2C9*, *CYP2D6*, *G6PD* y *GCLC* involucrados en el metabolismo de sulfametoxazol y ciprofloxacino: identificación basada en la secuenciación

**CONTEXTO.** Sulfametoxazol (SMX) y ciprofloxacino (CPFX), dos de los antimicrobianos más prescritos, tienen efectos adversos en personas con idiosincrasias genéticas. Algunos polimorfismos de nucleótido único (SNPs) de los genes que codifican la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6PD*) y la subunidad catalítica de la ligasa de glutatión-cisteína (*GCLC*) aumentan el riesgo de anemia hemolítica. Ciertos SNPs de *GCLC* y del gen que codifica la citocromo oxidasa 2C9 (*CYP2C9*) aumentan el riesgo de hipersensibilidad a SMX y ciertos SNPs de *CYP2D6* están asociados a reacciones adversas cuando CPFX es coadministrado con otros medicamentos. En México hay algunos estudios sobre la frecuencia de algunas variantes alélicas de *CYP2C9*, *CYP2D6* y *G6PD* pero no del gen *GCLC*. **OBJETIVOS.** Nos propusimos desarrollar un método de bajo costo basado en el análisis de la secuencia nucleotídica para identificar polimorfismos clínicamente relevantes de los genes *CYP2C9*, *CYP2D6*, *G6PD* y *GCLC* involucrados en el metabolismo de SMX y CPFX y en las reacciones adversas a estos antimicrobianos. **MÉTODOS.** Diseñamos y validamos in silico las parejas de oligonucleótidos iniciadores para generar seis productos de amplificación ('amplicones') que contengan SNPs clínicamente relevantes de los genes de interés. Optimizamos las condiciones de PCR para generar amplicones puros. Produjimos amplicones puros en mezclas de PCR optimizadas a partir del DNA de los 100 sujetos que fueron incluidos en el estudio y los aislamos por precipitación. Secuenciamos los amplicones, identificamos los SNPs y determinamos la frecuencia de las variantes alélicas, los fenotipos respectivos, el equilibrio de Hardy-Weinberg, así como identificar los haplotipos y su desequilibrio de ligamiento. **RESULTADOS.** Las secuencias de los amplicones coincidieron con las de los genes de referencia. Frecuencias de las variantes alélicas identificadas, de *CYP2C9*: \*2, 18%; \*3, 6%; \*26, 1%; \*44, 1%; \*45, 1%; \*55, 2%; de *CYP2D6*: rs1135824, 89%; \*4, 3%; \*6B, 1%; \*50, 3%; \*90, 2%; de *GCLC*: rs761142, 87%; de *G6PD-Canton*: 19% en mujeres en estado heterocigótico, 14% en hombres en estado hemocigótico; de *G6PD-Mediterranean*: 0%. Frecuencias de los fenotipos predichos: *CYP2C9*: normal 75%, intermedio 22%, pobre 3%; *CYP2D6*: rápido 11%, intermedio 2%, pobre 6%, indeterminado 81%. Fenotipo *CYP2C9* normal concomitante con *GCLC* intermedio y pobre: 40% y 23%, respectivamente. Fenotipo *G6PD* normal/*GCLC* intermedio en 8% de los hombres; fenotipo *G6PD* normal/*GCLC* pobre en 2% de los hombres; fenotipo *G6PD* intermedio/*GCLC* intermedio en 16% de las mujeres; fenotipo *G6PD* intermedio/*GCLC* pobre en 3% de las mujeres. De los cuatro haplotipos identificados solamente *CYP2D6* T1707ΔT/G1976A estuvo en completo desequilibrio de ligamiento. **CONCLUSIONES.** Identificamos por primera vez nueve variantes alélicas en una población mexicana: *CYP2C9* \*26, \*44, \*45, \*55; *CYP2D6* rs1135824, \*6B, \*50, \*90 y *GCLC* rs761142. Entre los sujetos incluidos en el estudio el riesgo de anemia hemolítica por SMX es alto en el 29% (19% de las mujeres, 10% de los hombres) que porta las variantes *G6PD-Canton* y *GCLC* rs761142; en contraste, el riesgo de anemia hemolítica por CPFX parece ser nulo por ausencia de la variante *G6PD-Mediterranean*. El 63% de los sujetos con fenotipo concomitante *CYP2C9* normal/ *GCLC* pobre o intermedio, tendría riesgo máximo de hipersensibilidad a SMX. El riesgo de efectos adversos por CPFX es desconocido porque, aunque la mayoría (81%) porta la variante *CYP2D6* rs1135824, la funcionalidad de la enzima no ha sido determinada.

**Palabras clave:** Farmacogenética, farmacogenómica, ciprofloxacino, sulfametoxazol, anemia hemolítica, hipersensibilidad, variantes alélicas, *CYP2C9*, *CYP2D6*, *GCLC*, *G6PD*.

# Abstract

## ***CYP2C9*, *CYP2D6*, *G6PD* and *GCLC* gene polymorphisms involved in sulfamethoxazole and ciprofloxacin metabolism: sequencing-based identification**

**BACKGROUND.** Sulfamethoxazole (SMX) and ciprofloxacin (CPFX), two of the most prescribed antimicrobials, cause adverse effects in people with genetic idiosyncrasies. Certain single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the genes encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase (*G6PD*) and the glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (*GCLC*) increase the risk of hemolytic anemia. Several SNPs of the *GCLC* and the cytochrome oxidase 2C9 (*CYP2C9*) genes increase the risk of hypersensitivity to SMX. Some *CYP2D6* SNPs are associated with adverse reactions when CPFX is co-administered with other drugs. In Mexico there are scarce population studies of *CYP2C9*, *CYP2D6* and *G6PD* allelic variants and none on *GCLC*. **AIMS.** In this work we developed a low cost reliable method based on nucleotide sequence analysis to identify clinically relevant SNPs from the *CYP2C9*, *CYP2D6*, *G6PD* and *GCLC* genes involved in SMX and CPFX metabolism and adverse reactions. **METHODS.** Primer oligonucleotide pairs were designed and validated in silico to generate six amplification products ('amplicons') containing known clinically relevant SNPs of the genes of interest, and PCR conditions were optimized to generate pure amplicons from template DNA of 100 San Luis Potosí city residents. Amplicons were sequenced, SNPs were identified and used to determine allelic variant frequencies and the corresponding genotypes, phenotypes, Hardy-Weinberg equilibrium as well as to identify the haplotypes and their linkage disequilibrium. **RESULTS.** Identity of all amplicon sequences matched those of the reference genes. Frequencies of the allelic variants identified: *CYP2C9* \*2, 18%; \*3, 6%; \*26, 1%; \*44, 1%; \*45, 1%; \*55, 2%; *CYP2D6* rs1135824, 89%; \*4, 3%; \*6B, 1%; \*50, 3%; \*90, 2%; *GCLC* rs761142, 87%; *G6PD-Canton*, 19% heterozygous women; 14% hemizygous men; *G6PD-Mediterranean*, 0%; *G6PD-Canton/GCLC* rs761142, 19% in women, 10% in men. Phenotype frequencies: *CYP2C9* normal 75%, intermediate 22% and poor 3%; *CYP2D6* rapid 11%, intermediate 2% poor 6% and undetermined 81%. Normal *CYP2C9* phenotype concomitant with intermediate or poor *GCLC* phenotype: 40% and 23%, respectively. Normal *G6PD* phenotype concomitant with intermediate *GCLC* phenotype, 8% in men; intermediate *G6PD* phenotype concomitant with *GCLC* poor phenotype, 2% in men; intermediate *G6PD* phenotype concomitant with intermediate *GCLC* phenotype, 16% in women; intermediate *G6PD* phenotype concomitant with poor *GCLC* phenotype, 3% in women. Among the four haplotypes identified only *CYP2D6* T1707ΔT/G1976A was in complete linkage disequilibrium. **CONCLUSIONS.** We identified for the first time the following nine allelic variants in a Mexican population: *CYP2C9* \*26, \*44, \*45, \*55; *CYP2D6* rs1135824, \*6B, \*50, \*90 and *GCLC* rs761142. Risk of hemolytic anemia by SMX is high in the subjects included since 29% of them (19% of the women, 10% of the men) carry the *G6PD-Canton* and *GCLC* rs761142 variants; in contrast, risk of hemolytic anemia by CPFX appears to be null since the *G6PD-Mediterranean* variant is absent. Nearly two thirds (63%) of the subjects included have normal *CYP2C9* phenotype concomitant with poor or intermediate *GCLC* phenotype and would be at maximum risk of SMX hypersensitivity. Although the majority (81%) carry the *CYP2D6* rs1135824 variant the risk of adverse effects by CPFX is unknown since activity of the corresponding enzyme has not been determined.

**Keywords:** Pharmacogenetics, pharmacogenomics, ciprofloxacin, sulfamethoxazole, hemolytic anemia, hypersensitivity, allelic variants, *CYP2C9*, *CYP2D6*, *GCLC*, *G6PD*.



# Introducción

## Antecedentes

La respuesta individual a los fármacos es determinada por factores clínicos como edad, peso, altura, sexo, raza, dieta, interacciones con fármacos concomitantes, etc. Estos factores pueden provocar efectos adversos o que la dosis terapéutica no sea alcanzada. Se estima que 17% de los pacientes en hospitales desarrollan efectos adversos que son letales en el 0.5%; evitarlos es por tanto obligatorio desde el punto de vista ético y económico (Bohm and Cascorbi 2016). La causa principal de las diferencias interétnicas en la respuesta a los fármacos son los polimorfismos funcionales en los genes involucrados en su absorción, modificación, distribución y excreción (Castelan-Martinez et al. 2013).

La familia de enzimas CYP450 cataliza la biotransformación oxidativa de la mayoría (~80%) de los fármacos actuales (Sanchez-Pozos et al. 2016). La subfamilia CYP2C es parte de una familia de hemoproteínas y CYP2C9 juega un papel clave en el metabolismo de alrededor del 15% de los más de 100 fármacos prescritos comúnmente que son depurados por rutas de oxidación (Hiratsuka 2016). CYP2D6 es una de las enzimas más importantes en la bioactivación o eliminación de compuestos químicos endógenos y exógenos y participa en el metabolismo hepático del 25% de los fármacos de uso clínico (Hersberger et al. 2000).

Los genes *CYP2C9* y *CYP2D6* son altamente polimórficos por lo cual las enzimas que codifican son muy variables en su expresión y actividad catalítica (Hiratsuka 2016; Twist et al. 2016; Zhou et al. 2010). CYP2C9 representa alrededor del 20% de las proteínas CYP450 del hígado y es responsable del metabolismo oxidativo de muchos fármacos relevantes de uso clínico —algunos con índices terapéuticos estrechos— que incluyen antihipertensivos, antidiabéticos, antiinflamatorios no esteroideos, anticoagulantes y antiepilépticos (Dorado et al. 2011). La enzima CYP2D6 está localizada principalmente en el retículo endoplásmico y las mitocondrias y es responsable del metabolismo de muchos

neurolépticos, antidepresivos tricíclicos, inhibidores selectivos de serotonina y bloqueadores  $\beta$  (Hersberger et al. 2000).

La enzima G6PD se localiza principalmente en la membrana plasmática y en el citosol y en menor medida en el núcleo y el citoesqueleto. Está involucrada en la primera reacción de la ruta de las pentosas fosfato que produce NADPH, donador de electrones clave para la defensa contra los agentes oxidantes y para reacciones biosintéticas reductoras. La deficiencia de G6PD, causada por variantes polimórficas del gen *G6PD*, fue descubierta en la década de 1950 en relación con exposición a fármacos antipalúdicos y consumo de habas (Mason et al. 2007).

La subunidad catalítica de la ligasa de glutatión-cisteína (GCLC), proteína localizada principalmente en el citosol y en menor proporción en la mitocondria y el núcleo, es un componente de la ligasa de glutamato-cisteína (GCL) implicada en la síntesis de glutatión (Gysin et al. 2007). Las glutatión S-transferasas (GST) son enzimas de detoxificación que tienen un papel protector relevante porque catalizan la conjugación de diversos metabolitos reactivos causantes de daño celular al glutatión (Li et al. 2013).

GSTM1 es una enzima metabolizadora de fase II que detoxifica compuestos electrofílicos tales como carcinógenos, fármacos terapéuticos, toxinas ambientales y productos del estrés oxidativo (Li et al. 2013).

Las N-acetiltransferasas de arilaminas (NAT) metabolizan xenobióticos por tres mecanismos: N-acetilación de arilaminas o arilhidrazinas dependiente de acetil coenzima A (CoA), O-acetilación de N-hidroxiarilaminas dependiente de CoA y, por último, transferencia de grupos N,O-acetilos sobre ácidos N-aril hidroxámicos. NAT2 es una enzima metabolizadora de fase II de compuestos que contienen aminas o hidracinas aromáticas mediante N- u O-acetilación. El gen *NAT2* tiene alta variación funcional con elevados niveles de diversidad de haplotipos. NAT2 está localizada principalmente en hígado, intestino delgado y colon y metaboliza fármacos como isoniacida, dapsona, hidralazina, procainamida y sulfametoxazol (McDonagh et al. 2014) (Taja-Chayeb et al. 2012).

Los polimorfismos de los genes que codifican las enzimas CYP450, NAT2, GSTM1 y GCLC generan variantes alélicas (Cappellini and Fiorelli 2008; Lynch and Price 2007; McDonagh et al. 2014; Sachse et al. 1997; Wang et al. 2012).

El alelo silvestre del gen *CYP2C9* se denomina *CYP2C9\*1*; el alelo silvestre del gen *GCLC* lleva el mismo nombre. El individuo que porta dos copias de ambos alelos silvestres se define como metabolizador “normal”; el que porta dos copias de una variante alélica polimórfica se clasifica como metabolizador “pobre”; y el que porta una copia del alelo silvestre y otra del alelo variante se considera metabolizador “intermedio” (Lynch and Price 2007; Wang et al. 2012).

Los alelos silvestres de los genes *NAT2* y *CYP2D6* se denominan *NAT2\*4* y *CYP2D6\*1A*, respectivamente. El individuo que porta dos copias del alelo silvestre de cada gen es un metabolizador “rápido”; el que porta dos copias de una variante alélica polimórfica es metabolizador “pobre”; el que porta una copia del alelo silvestre y otra del alelo variante es metabolizador “intermedio” (McDonagh et al. 2014; Sachse et al. 1997).

El gen *G6PD* está localizado en el cromosoma X y su alelo silvestre se denomina *G6PD B*. Las variantes alélicas se agrupan en cinco clases de acuerdo a la actividad de las enzimas que codifican: clase I, menor al 1%; clase II, 1-10%; clase III, 10-60%; clase IV, normal (100%); clase V, 150% (Cappellini and Fiorelli 2008).

Sulfametoxazol (SMX) y ciprofloxacino (CPFX) son dos de los antimicrobianos más prescritos en el mundo (Ott et al. 2014; Shimatsu et al. 2014).

La combinación de trimetoprima (TMP) con SMX (TMP-SMX) es usada para el tratamiento de bronquitis, neumonía, infecciones urinarias e infecciones por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. TMP-SMX se utiliza además en infecciones por protozoarios como *Toxoplasma gondii* y *Pneumocystis jiroveci* en pacientes inmunocomprometidos, especialmente con SIDA (Reinhart et al. 2016). *P. jiroveci* causa la infección oportunista más común en pacientes infectados con VIH, en quienes la mortalidad es del 10% al 20% (Ewald et al. 2015). *T. gondii* puede causar daño ocular o incluso daños congénitos (Bottari et al. 2015). El tratamiento con TMP-SMX puede tener efectos adversos como hipersensibilidad o anemia

hemolítica inducida por SMX (Chan and McFadzean 1974; Ott et al. 2014). Las reacciones de hipersensibilidad a TMP-SMX ocurren en el 3% de la población general y en el 30% de pacientes con VIH; incluyen fiebre, erupciones cutáneas simples o síndrome de Stevens-Johnson hasta necrosis epidérmica tóxica o disfunción de diversos órganos (Naisbitt et al. 2002). Serpa et al. (2010) encontraron que cinco de 75 pacientes G6PD-deficientes (no por genotipificación) desarrollaron anemia hemolítica al ser tratados con TMP-SMX (Serpa et al. 2010).

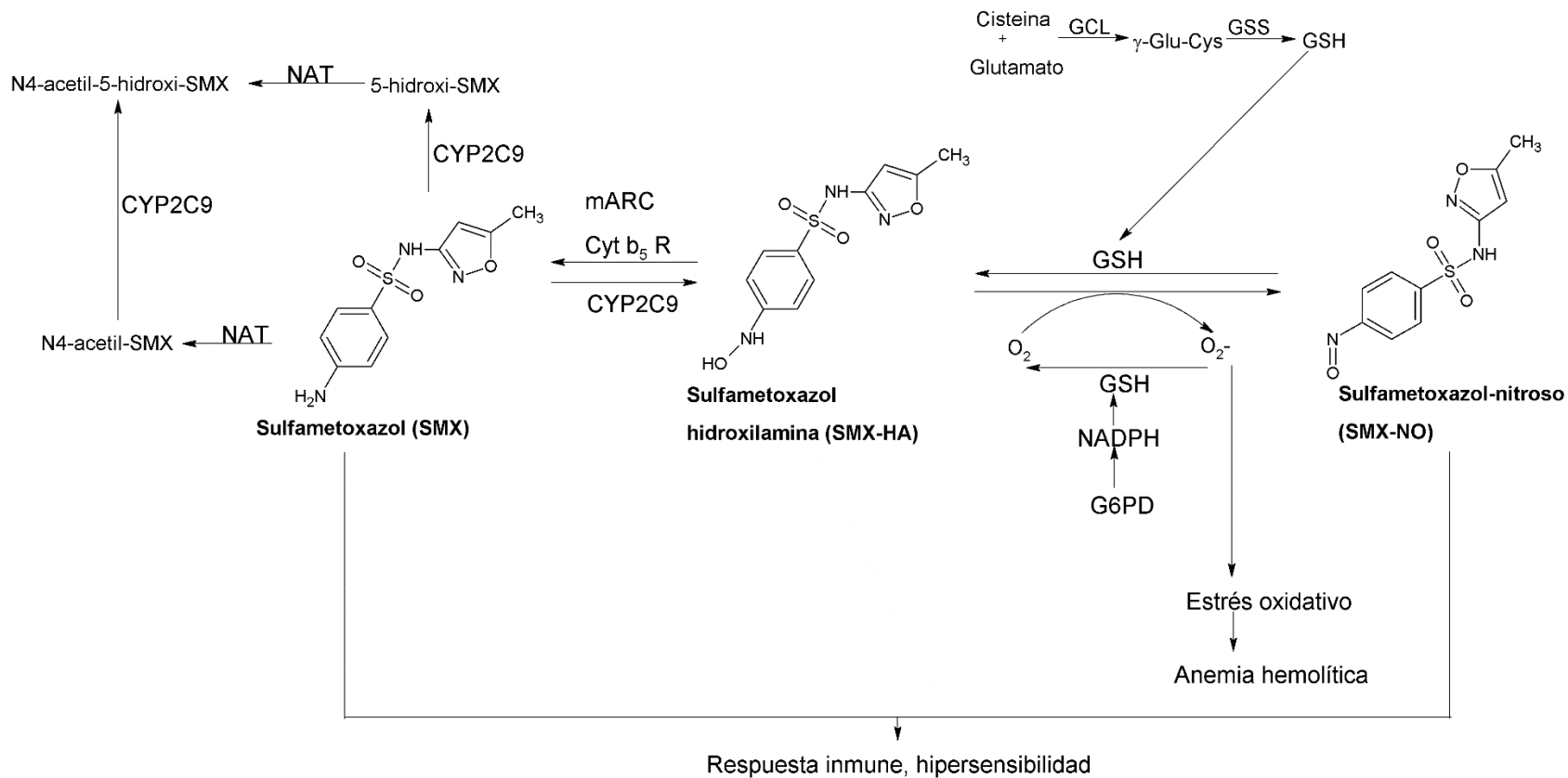
Las fluoroquinolonas como ciprofloxacino (CPFX) son usadas comúnmente para tratar infecciones genitourinarias, respiratorias, intraabdominales, de piel y tejidos blandos porque son de amplio espectro y tienen excelente penetración en los tejidos. La prescripción de fluoroquinolonas es frecuente; en 2010 representó el 12% de todas las prescripciones de antimicrobianos (Shimatsu et al. 2014). CPFX es cuatro veces más potente que norfloxacino, ofloxacino, pefloxacino y enoxacino (Anadon et al. 2001). La administración de CPFX puede provocar anemia hemolítica, en tanto que su coadministración con haloperidol puede provocar síntomas extrapiramidales (Sansone et al. 2010; Simic et al. 2016).

### **Hipersensibilidad a SMX**

El SMX puede ser oxidado por la citocromo oxidasa P450 2C9 (CYP2C9) para formar SMX-N4-hidroxilamina (SMX-HA). A su vez, la SMX-HA puede autooxidarse y formar el metabolito tóxico SMX-nitroso (SMX-NO).

Por otra parte, como mecanismo de defensa, el glutatión reducido (GSH) reduce la SMX-NO a SMX-HA que posteriormente puede ser reducido a SMX por acción de otras enzimas. A su vez, la actividad de desintoxicación de GSH es afectada por la subunidad catalítica de la ligasa de glutatión-cisteína (GCLC) y por la glutatión transferasa Mu 1 (GSTM1).

Otro mecanismo de defensa es la acetilación de SMX a N-acetil-SMX por las enzimas N-acetil-transferasa 1 y 2 (NAT1/2) (Ott et al. 2014; Wang et al. 2012) (Fig. 1).



**Fig. 1. Metabolismo y rutas para el desarrollo de los efectos adversos por SMX**

CYP, citocromo P-450. Cyt b<sub>5</sub> R, NADH de la reductasa del citocromo b<sub>5</sub>. mARC, componente reductor de la amidoxima mitocondrial. GCL, ligasa glutamato-cisteína (incluye las subunidad catalítica GCLC y la regulatoria GCLM). GSS, sintetasa de glutatión. Modificado de Wang et al. (2012) y Ott et al. (2014).

Las mutaciones en los genes que modifican la actividad de estas enzimas afectan la acumulación de SMX-NO, responsable de la hipersensibilidad. Este metabolito forma neoantígenos al unirse a proteínas celulares y extracelulares mediante enlaces covalentes a los grupos sulfhidrilo de sus residuos de cisteína en linfocitos y queratinocitos. El SMX-NO haptena preferentemente células presentadoras de antígenos y células T CD8+; si la haptención supera el umbral por 10% (> 5-10  $\mu$ M) las células presentadoras de antígeno mueren por apoptosis y generan la señal de peligro. La señal antigénica que genera la respuesta proliferativa es dada tanto por células presentadoras de antígeno (viables y muertas) y células T hapténadas con SMX-NO. El umbral antigénico de SMX-NO para células T es de 0.5-1  $\mu$ M, menor que la concentración plasmática de metabolitos de SMX encontrados después de una aplicación terapéutica de SMX.

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es necesario para la proliferación, pero su modificación directa por SMX-NO no es el mecanismo de presentación de antígenos por las células T por lo cual se supone que se lleva a cabo un procesamiento del SMX-NO previo a la presentación antigénica, cuyo mecanismo no ha sido elucidado (Naisbitt et al. 2002; Yun et al. 2016).

Un estudio combinado in silico e in vitro demostró que otro mecanismo de interacción de las sulfonamidas, SMX incluido, es la interacción directa SMX-receptor de células T (TCR, también llamado p-i-TCR). El SMX forma seis puentes de hidrógeno y un puente salino con el bucle del dominio CDR2 $\beta$  del TCR de las células H13 TCC (clona de células T) y los aminoácidos S54, A56, T57, Y58, K64, D65, L68 y N70 son los responsables de la interacción con SMX. Por otra parte, las sulfonilamidas actúan como antagonistas de la SMX (Watkins and Pichler 2013).

### **Anemia hemolítica inducida por SMX**

La oxidación de SMX-HA a SMX-NO libera radicales libres de oxígeno responsables del estrés oxidativo que se manifiesta como anemia hemolítica. Además de las enzimas involucradas en la formación de SMX-HA (NAT2, CYP2C9 y GCLC), G6PD es la principal enzima responsable de la predisposición a la anemia hemolítica inducida por SMX porque protege del estrés oxidativo indirectamente a través de la reducción de glutatión (Cappellini and Fiorelli 2008) (Fig. 1).

### **Anemia hemolítica inducida por CPMX**

Norfloxacin, fluoroquinolona derivada de CPMX, contiene una etiqueta de la FDA que advierte que se han reportado casos de anemia hemolítica por. El CPMX es metabolizado en mamíferos de manera no completamente elucidada (Anadon et al. 2001), aunque se sabe que en la bilis se acumulan los metabolitos sulfo-CPMX (83%), oxo-CPMX (13%), desetileno-CPMX (2%) y formil-CPMX (0.1%) (Lee 2014; Parry et al. 1988). El oxo-CPMX probablemente se forma por oxidación del anillo piperazinil (grupo 7) que genera radicales de oxígeno libres que son responsables del estrés oxidativo. Los radicales libres son eliminados por GSH reducido, producido indirectamente por acción de la G6PD (Fig. 2).

### **Síntomas extrapiramidales por coadministración de CPMX-haloperidol**

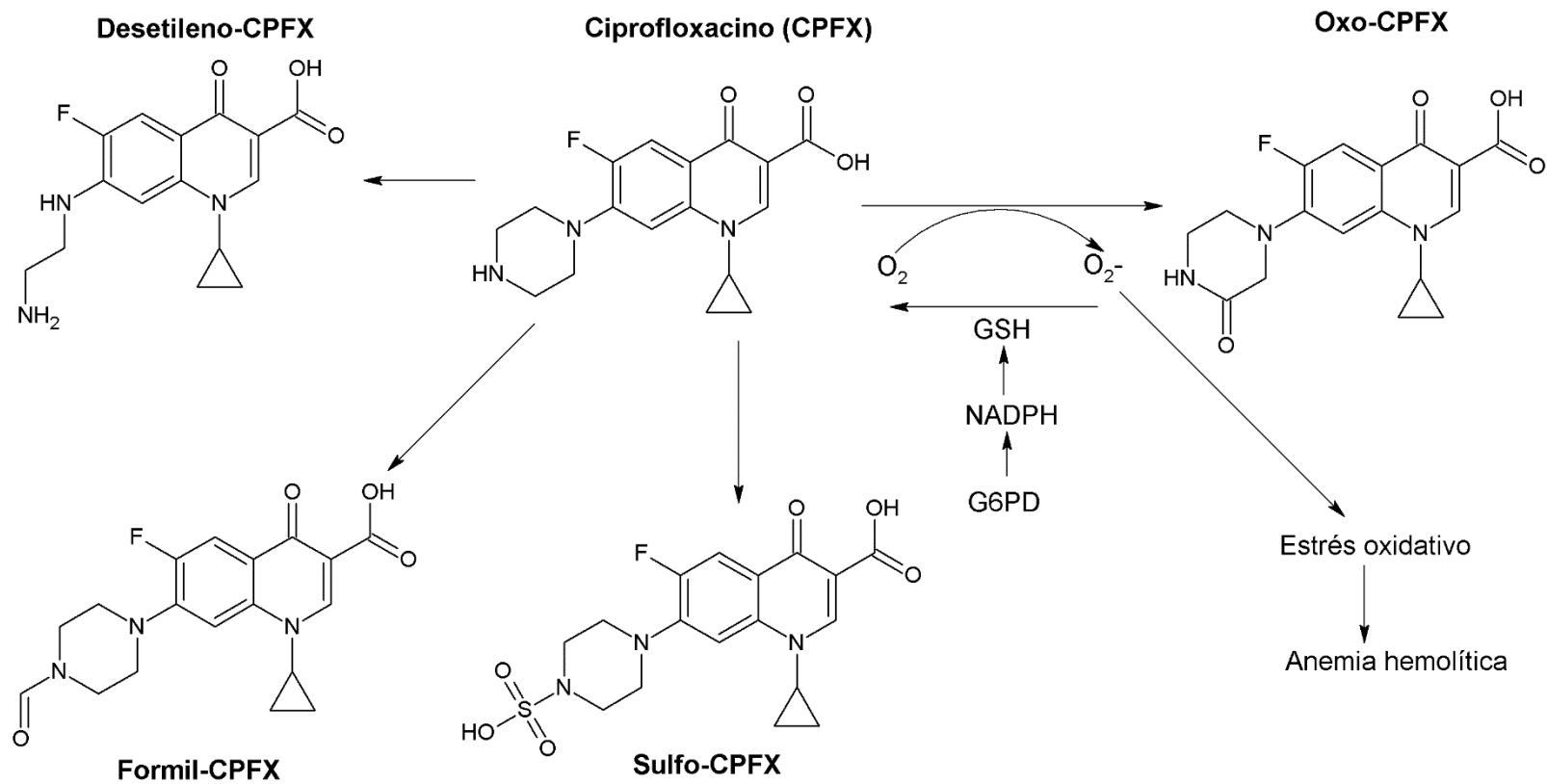
CPMX es un potente inhibidor de las enzimas CYP1A2 y CYP3A4 por lo cual debe tenerse especial cuidado cuando es coadministrado con algún fármaco metabolizado por dichas enzimas y cuya ruta secundaria involucra a la citocromo oxidasa P450 2D6 (CYP2D6). El riesgo de efectos secundarios aumenta si el paciente porta una variante de CYP2D6 que determina un fenotipo pobre.

Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en los genes que codifican las enzimas involucradas en el metabolismo de SMX y CPMX están asociados a los efectos adversos de estos fármacos (Sansone et al. 2010; Simic et al. 2016; Wang et al. 2012).

### **Farmacogenética y farmacogenómica de sulfametoxazol y ciprofloxacino**

La farmacogenética trata de las respuestas de los individuos a los fármacos, tanto en términos de efectos terapéuticos como adversos, basadas en la variación de genes individuales (Luzzatto and Seneca 2014). De forma más amplia, la farmacogenómica abarca la asociación de variaciones de diversos genes involucrados en el metabolismo de los fármacos.

Para identificar los genes asociados a enfermedades particulares o la respuesta a fármacos se buscan marcadores en el genoma de personas afectadas y se comparan con los de personas no afectadas (Wang et al. 2011).



**Fig. 2. Metabolismo y ruta para el desarrollo de anemia hemolítica de CPFX**

Modificado de Lee (2014).



Los SNPs son cambios de un solo nucleótido en la secuencia de ADN que representan el 90% de los polimorfismos conocidos en la población. Identificar estos polimorfismos es crucial porque se asocian a la susceptibilidad a varias enfermedades y en la respuesta al tratamiento con fármacos (Novelli 2010). Para lograr un tratamiento individualizado con fármacos que tenga resultados predecibles deben hacerse estudios farmacogenéticos y farmacogenómicos en poblaciones geográfica y étnicamente distintas (Vogenberg et al. 2010).

Algunos SNPs de los genes que codifican la G6PD y la subunidad catalítica de la ligasa de glutatión-cisteína (GCLC) aumentan el riesgo de anemia hemolítica por SMX y CPMX (Chan and McFadzean 1974; Sansone et al. 2010). Ciertos SNPs de *GCLC* y de los genes que codifican la citocromo oxidasa 2C9 (*CYP2C9*), la glutatión transferasa Mu 1 (*GSTM1*) y las N-acetil-transferasas 1 y 2 (*NAT1/2*) aumentan el riesgo de hipersensibilidad a SMX (Ott et al. 2014). Ciertos SNPs de *CYP2D6* están asociados a reacciones adversas cuando CPMX es coadministrado con otros medicamentos (Simic et al. 2016).

Hasta 2016 habían sido registradas 57 variantes polimórficas del gen *CYP2C9* (Chen et al. 2016). Las variantes alélicas más estudiadas del gen *CYP2C9* son *CYP2C9\*2* (rs1799853) y *CYP2C9\*3* (rs1057910), descritas principalmente en poblaciones de Europa, Asia y África (Castelan-Martinez et al. 2013; Sosa-Macías and Llerena 2013). La variante *CYP2C9\*2* tiene actividad catalítica disminuida y la *CYP2C9\*3* tiene menor afinidad por el ibuprofeno, warfarina y fluvastatina (Hirota et al. 2013). Los alelos *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3* tienen amplia distribución global, con mayor frecuencia en poblaciones de Europa y del sur y centro de Asia; están ausentes o en baja frecuencia en Asia Oriental, África y América (Castelan-Martinez et al. 2013; Ross et al. 2010; Sosa-Macías et al. 2013).

En México hay pocos estudios que hayan identificado las variantes *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3*. Sanchez-Pozos et al. (2016) las identificaron en siete grupos indígenas de México con frecuencias de hasta 10% para *CYP2C9\*3* y 3.3% para *CYP2C9\*2* (Sanchez-Pozos et al. 2016). Sosa-Macías et al. (2013) identificaron la variante *CYP2C9\*3* en seris (2.6%) y mayos (5.7%) y la variante *CYP2C9\*2* en tarahumaras (10.4%), mayos (9.1%), tepehuanos (7.5%), guarijíos

(6.7%), huicholes (3.3%) y coras (3.7%). La variante *CYP2C9\*2* predomina en indígenas mexicanos (nahuas, téneks, tarahumaras, purépechas y huicholes) en quienes su frecuencia es mayor que en mestizos de la ciudad de México (Castellan-Martinez et al. 2013). En los estados de Sonora, Zacatecas, Guerrero, Veracruz, Yucatán y Guanajuato, fueron identificadas las variantes *CYP2C9\*2*, *\*3*, *\*4* y *\*5* en grupos indígenas y mestizos. Las variantes *CYP2C9\*2* y *\*3* tienen mayor frecuencia en mestizos (6.0 - 26.5% para *CYP2C9\*2* y 4.0 - 10.0% para *CYP2C9\*3*) y están ausentes o en baja frecuencia en los grupos indígenas (0.0 - 1.7% para *CYP2C9\*2* y 0.0 - 3.8% para *CYP2C9\*3*) (Villegas-Torres et al. 2015). En otro grupo de indígenas mexicanos (coras, mazahuas, téneks, chatinos, mixtecos, chontales y mayas) Sanchez-Pozos et al. (2016) identificaron las variantes *CYP2C9\*3* y *CYP2C9\*2* con frecuencias de 10% y 3.3%, respectivamente. Las variantes *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3* fueron más frecuentes en un grupo de españoles (23.9% y 9.2% para *\*2* y *\*3* respectivamente) que en un grupo indígena (2.02% y 3.03% para *\*2* y *\*3* respectivamente) y en un grupo mestizo de México (13.7% y 2.9% para *\*2* y *\*3* respectivamente) y sólo en españoles fueron encontradas en estado homocigoto (Dorado et al. 2011).

Los parámetros cinéticos de *CYP2C9* ( $V_{max}$  y  $K_m$ ) para la N-hidroxilación de SMX y la depuración intrínseca del fármaco disminuyen en las variantes *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3*, pero más en la última (Gill et al. 1999).

Hay más de 100 variantes conocidas del gen *CYP2D6* que codifican enzimas con cambios de actividad que pueden afectar el metabolismo o aumentar el riesgo de efectos adversos por fármacos (Twist et al. 2016). Las variantes más estudiadas son *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*5*, *CYP2D6\*6*, *CYP2D6\*17*, *CYP2D6\*41* y las duplicaciones del gen (Cai et al. 2016).

Entre los caucásicos 1.9% portan copias múltiples de *CYP2D6* y son metabolizadores ultrarrápidos, 36.4% son metabolizadores rápidos (*CYP2D6\*1A*), 35.7% son metabolizadores intermedios (*CYP2D6\*2, \*9, \*10*) y 25.9% son metabolizadores pobres (*CYP2D6\*3, \*4, \*5, \*6, \*7, \*15, \*16*). Los sujetos con fenotipo metabolizador intermedio y especialmente pobre tienen mayor riesgo de efectos tóxicos con dosis clínicas estándar de fármacos inactivados por *CYP2D6*. En

contraste, los metabolizadores ultrarrápidos no alcanzan concentraciones plasmáticas terapéuticas con las dosis estándar (Sachse et al. 1997).

En un grupo mexicano-americano (n = 349) el 3.2% fue catalogado con fenotipo CYP2D6 metabolizador pobre (Mendoza et al. 2001). Un estudio del gen *CYP2D6* mediante PCR-RFLP en mestizos mexicanos (n = 243) encontró 10% de metabolizadores pobres y 64.2% de metabolizadores rápidos (Lopez et al. 2005).

Se han identificado más de 160 mutaciones del gen *G6PD*. Como los eritrocitos carecen de mitocondrias, su única defensa contra el daño oxidativo depende del GSH, producido indirectamente por la *G6PD*. Mutaciones en el gen *G6PD* que codifican enzimas con actividad deficiente o nula hacen que aumente el daño oxidativo en los eritrocitos (Mason et al. 2007) (Chang et al. 1992).

La actividad enzimática de las variantes *G6PD-Canton* y *G6PD-Mediterranean* es menor al 10% que la de la variante silvestre (Cappellini and Fiorelli 2008). La variante alélica *G6PD-Mediterranean* portada por el 0.4% de la población italiana (n = 3004) (Maffi et al. 2014); no se encontró entre 4777 sujetos de varios estados mexicanos (Vaca et al. 2002). La variante *G6PD-Canton* se encontró en el 50% de los hombres en China (Chang et al. 1992) pero no se ha investigado en México (Vaca et al. 2002).

La *GCLC* es un componente de la *GCL* que sintetiza glutatión (Wang et al. 2012). Se conocen tres variantes clínicamente relevantes del gen *GCLC*: *GCLC* 5' UTR trinucleótido-repetido GAG, *GCLC rs17883901* y *GCLC rs761142* (Koide et al. 2003; McKone et al. 2006; Wang et al. 2012). Frecuencia de genotipos *GCLC* en suizos: 50% con genotipo trinucleótido-repetido GAG 7/7, 44% con genotipo trinucleótido-repetido GAG 7/9, 4% con genotipo trinucleótido repetido GAG 7/8 y 2% con genotipo trinucleótido-repetido GAG 8/9 (Gysin et al. 2007). En un estudio de estadounidenses la variante *GCLC rs761142* se encontró en estado heterocigoto en el 43.1% y en estado homocigoto en el 10.5% de los sujetos (Wang et al. 2012).

La enzima *GSTM1* pertenece a la superfamilia de las *GST* involucradas en el metabolismo de fase II de algunos fármacos, cuyos procesos de detoxificación crucial ocurren en el hígado (Wolkenstein et al. 2000). El genotipo *GSTM1* nulo homocigoto, determinado por la carencia de ambas copias del gen *GSTM1*, se

asocia a hepatotoxicidad inducida por fármacos consecuente a la ausencia de actividad enzimática y acumulación concomitante de productos tóxicos (Li et al. 2013). El 41.7% de los caucásicos tiene el genotipo *GSTM1* nulo (Leiro et al. 2008). Un estudio de una comunidad mestiza del centro de México (n = 150) encontró el genotipo *GSTM1* nulo en el 42.6% de los sujetos (Montero et al. 2007). En San Luis Potosí la frecuencia del genotipo *GSTM1* nulo es 44.0% (n = 140) (Pettet-Ruiz 2017).

Se han identificado 88 alelos del gen *NAT2* cuyos SNPs relevantes determinan tres fenotipos acetiladores: rápido (*NAT2\*4*, *NAT2\*11*, *NAT2\*12* y *NAT2\*13*), pobre (*NAT2\*5*, *NAT2\*6*, *NAT2\*7* y *NAT2\*14*) e intermedio (portadores de un alelo rápido y otro pobre). Frecuencia de genotipos: 24.0% *NAT2\*4/NAT2\*5A*, 18.2% *NAT2\*5B/NAT2\*6A* y 12.4% *NAT2\*4/NAT2\*6A* (Wolkenstein et al. 2000). En 250 sujetos mexicanos se encontraron los alelos *NAT2\*4* (30.4%), *NAT2\*5B* (29%), *NAT2\*6A* (17.4%), *NAT2\*7B* (13.2%), *NAT2\*12A* (4.8%) y *NAT2\*5C* (2.2%) (Taja-Chayeb et al. 2012). El estado acetilador lento basado en genotipificación en Asia Central es más alto en Tajik que en Kirghiz; en África predomina el estado acetilador rápido o intermedio y en India el pobre (McDonagh et al. 2014). Un estudio en caucásicos mostró que el 59% (n = 99) tiene fenotipo *NAT2* lento (Sacco et al. 2012). Un estudio en Francia encontró que el 55% (n = 121) tiene fenotipo *NAT2* lento. En 140 adultos de la ciudad de San Luis Potosí el 31.3% tuvieron fenotipo acetilador lento, 49.3% fenotipo intermedio y 19.4% fenotipo rápido (Pettet-Ruiz 2017).

Las variantes del gen *CYP2D6* se han identificado con sondas TaqMan, PCR en tiempo real (Castelan-Martinez et al. 2013; Dorado et al. 2011; Sanchez-Pozos et al. 2016; Simic et al. 2016; Sosa-Macias et al. 2013; Villegas-Torres et al. 2015) y PCR-RFLP (Gill et al. 1999; Llerena et al. 2004; Maffi et al. 2014; Sachse et al. 1997; Vaca et al. 2002; Wang et al. 2012; Wolkenstein et al. 2000).

En este trabajo empleamos PCR de punto final seguida de secuenciación de los amplicones para identificar 28 polimorfismos clínicamente relevantes de cuatro genes involucrados en el metabolismo e hipersensibilidad a SMX y CPF: 18 de *CYP2C9*, siete de *CYP2D6*, dos de *G6PD* y uno de *GCLC*.

## Justificación

SMX y CPFY, dos de los antimicrobianos más prescritos, tienen efectos adversos en personas con idiosincrasias genéticas (Ott et al. 2014; Shimatsu et al. 2014). Ambos pueden ocasionar anemia hemolítica (Chan and McFadzean 1974; Sansone et al. 2010). La hipersensibilidad a SMX se manifiesta en reacciones cutáneas que son más severas y frecuentes en pacientes con VIH (Pirmohamed et al. 2000). CPFY puede causar síntomas extrapiramidales cuando es coadministrado con otros fármacos (Simic et al. 2016).

Las reacciones adversas a SMX están asociadas a ciertos polimorfismos de los genes *CYP2C9*, *GCLC* y *G6PD* (Ott et al. 2014). En el caso de CPFY los polimorfismos corresponden a los genes *CYP2D6* y *G6PD* (Sansone et al. 2010; Simic et al. 2016). Algunas variantes polimórficas codifican enzimas con actividad catalítica reducida que determinan concentraciones plásmáticas excesivas de los fármacos administrados en dosis estándar (Bohm and Cascorbi 2016).

La identificación de variantes alélicas relevantes generalmente se hace con kits comerciales costosos basados en sondas TaqMan y PCR-RFLP que detectan menos variantes que la secuenciación (Lynch and Price 2007).

En individuos que portan variantes alélicas clínicamente relevantes de los genes *CYP2C9*, *CYP2D6*, *GCLC* y *G6PD* puede disminuir la eficacia del tratamiento por SMX o CPFY y aumentar el gasto para contrarrestar los efectos adversos de ambos antimicrobianos (Novelli 2010; Wang et al. 2012). El uso de métodos confiables, rápidos y baratos para identificar las variantes alélicas clínicamente relevantes de dichos genes mejoraría la eficacia y prevendría o disminuiría las reacciones adversas provocadas por SMX, CPFY y otros fármacos.

La adecuación de las dosis para maximizar la eficacia y minimizar los efectos adversos de SMX y CPFY puede lograrse identificando los polimorfismos clínicamente relevantes de los genes que codifican las enzimas involucradas en su metabolismo. Además de predecir la respuesta individual a SMX y CPFY, la identificación de las variantes alélicas de *CYP2C9*, *CYP2D6*, *GCLC* y *G6PD* serviría para determinar su frecuencia, pues en México los estudios se han limitado al análisis de las variantes *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3*, *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*6* y

*G6PD-Mediterranean* (Castelan-Martinez et al. 2013; Lopez et al. 2005; Sanchez-Pozos et al. 2016; Vaca et al. 2002).

La identificación de variantes alélicas de los genes involucrados en el metabolismo de fármacos es limitada por el costo de los dos métodos convencionales más empleados —sondas TaqMan y PCR-RFLP— que además se basan en evidencias indirectas (Johnson et al. 2012). Este problema puede atacarse desarrollando métodos de bajo costo basados en la evidencia directa, que consiste en la secuenciación de los segmentos génicos que contienen polimorfismos clínicamente relevantes de los genes *CYP2C9*, *CYP2D6*, *G6PD* y *GCLC* consideradas o no en estudios previos.

### **Etapas del estudio**

Este estudio se dividió en cuatro etapas:

1. Diseño y validación in silico de las parejas de oligonucleótidos que generan los seis amplicones que contienen los polimorfismos clínicamente relevantes de los cuatro genes de interés (*CYP2C9*, *CYP2D6*, *GCLC*, *G6PD*).
2. Optimización de las condiciones de PCR para obtener los seis amplicones puros.
3. Secuenciación e identificación de las variantes alélicas de los amplicones generados a partir del DNA de 100 individuos residentes en la ciudad de San Luis Potosí.
4. Determinación de la frecuencia de las variantes identificadas, equilibrio de Hardy-Weinberg, identificación de haplotipos y su desequilibrio de ligamiento, cigosidad, fenotipos del estado metabólico de las enzimas y el riesgo de reacciones adversas a SMX y CPFX en los sujetos incluidos.

### **Resultados y conclusiones principales**

Con las parejas de oligonucleótidos diseñadas y las condiciones de amplificación optimizadas pudimos obtener y secuenciar los seis amplicones de interés: 1) *CYP2C9*\*2 (308 pb) y 2) *CYP2C9*\*3 (381 pb) que contienen respectivamente las secuencias de los exones 3 y 7 del gen *CYP2C9*; 3) *CYP2D6* (347 pb) que contiene las secuencias del intrón y exón 3 del gen *CYP2D6*; 4) *GCLC* (197 pb) que contiene la secuencia del intrón 1 del gen *GCLC*; 5) *G6PD*-Canton (401 pb) y 6) *G6PD*-Med

(350 pb) que contienen respectivamente las secuencias de los exones 12 y 6 del gen *G6PD*, donde se localizan los SNPs clínicamente relevantes.

La identidad de las secuencias de todos los amplicones coincidió con las de secuencias de referencia. El alelo silvestre *CYP2C9\*1* fue identificado en estado homocigótico en el 75% de los 100 sujetos; el 25% porta una de las seis variantes alélicas identificadas en estado heterocigótico, que en orden decreciente de frecuencia son: *CYP2C9\*2* (18%) > *CYP2C9\*3* (6%) > *CYP2C9\*55* (2%) > *CYP2C9\*26* = *CYP2C9\*44* = *CYP2C9\*45* (1%). El fenotipo *CYP2C9* normal es el predominante, pues el 75% porta el alelo silvestre en estado homocigótico. El fenotipo intermedio ocurre en menos de la cuarta parte (22%) de los sujetos, que portan alguna de las seis variantes en estado heterocigótico. El fenotipo pobre ocurre en el 3% de los sujetos, que portan dos variantes alélicas en estado heterocigótico.

El estado cigótico de la variante *GCLC rs761142* determina directamente el fenotipo metabolizador. La frecuencia del fenotipo pobre con la variante en estado homocigótico es del 33%; la del fenotipo intermedio con la variante en estado heterocigótico es del 52%; la del fenotipo normal por ausencia de la variante es del 15%.

La frecuencia del fenotipo *CYP2C9* normal concomitante con el fenotipo *GCLC* intermedio y pobre es del 40% y 23%, respectivamente. Nosotros pensamos que el riesgo de hipersensibilidad a SMX podría ser mayor si el fenotipo *GCLC* intermedio o pobre es concomitante con el fenotipo *CYP2C9* normal.

La frecuencia de la variante *G6PD-Canton* en estado heterocigótico en mujeres es del 19% y determina el fenotipo intermedio; en hombres es del 14% en estado hemocigótico y determina el fenotipo pobre. La variante *G6PD-Mediterranean* no se encontró ni en hombres ni en mujeres.

La concomitancia del fenotipo *G6PD* intermedio con el fenotipo *GCLC* pobre podría aumentar el riesgo de anemia hemolítica inducida por SMX. El 8% de los hombres tiene fenotipo *G6PD* concomitante con *GCLC* intermedio; 2% de los hombres tiene fenotipo *G6PD* concomitante con *GCLC* pobre; 16% de las mujeres

tiene fenotipo G6PD intermedio concomitante con GCLC intermedio; 3% de las mujeres tiene fenotipo G6PD intermedio concomitante con GCLC pobre.

La frecuencia del alelo silvestre *CYP2D6\*1* en estado homocigótico es del 11%. Las frecuencias de las variantes de *CYP2D6* son: *rs1135824*, 89%; \*4, 3%; \*6B, 1%; \*50, 3%; \*90, 2%. La frecuencia del fenotipo *CYP2D6* rápido es del 11%, la del fenotipo intermedio, por la presencia de una variante en estado heterocigoto es del 2%. La frecuencia del fenotipo *CYP2D6* pobre, por la presencia de dos variantes alélicas en estado heterocigótico o de una variante en estado homocigótico es del 6%.

Aunque la gran mayoría (81%) de los sujetos incluidos porta la variante alélica *rs1135824* de *CYP2D6*, el riesgo de efectos adversos por CPF<sub>X</sub> es desconocido en esta fracción de la muestra porque la funcionalidad enzimática de la variante no ha sido determinada.

De los 27 SNPs analizados, las frecuencias de todos excepto cuatro (*CYP2D6\*50*, *CYP2D6\*90*, *rs1135824*, *G6PD-Canton* en mujeres) fueron consistentes con las esperadas para el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p \geq 0.05$ ). No encontramos ningún haplotipo característico para los SNPs identificados.



# Material y métodos

## Selección de las secuencias génicas blanco

Todos los SNPs relevantes de los genes *CYP2C9*, *CYP2D6*, *G6PD* y *GCLC* fueron localizados previamente en dbSNP, la base de datos de variaciones genéticas ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/)). Una vez identificadas las secuencias de las seis regiones génicas con las posiciones de todos los SNPs relevantes, a los extremos de cada secuencia se añadieron secuencias flanqueantes de 350 pb tanto en el extremo izquierdo como en el derecho.

El diseño de iniciadores mediante la aplicación Primer-BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)) se dirigió a obtener amplicones que incluyeran los SNPs clínicamente relevantes de las regiones génicas seleccionadas con los flancos respectivos de 350 pb. Los seis amplicones diseñados de esta manera fueron: 1) el amplicón *CYP2C9*\*2 de 308 pb y 2) el amplicón *CYP2C9*\*3 de 381 pb, que incluyen los exones 3 y 7 del gen *CYP2C9* de referencia (GenBank NG\_008385.1) (Tabla 1) donde se encuentran los SNPs *CYP2C9*\*2, *CYP2C9*\*3 y otros (Tabla 2); 3) el amplicón *CYP2D6* de 347 pb que incluye el exón 3 y el intrón 3 del gen *CYP2D6* de referencia (GenBank NG\_008376.3) donde se encuentran los SNPs *CYP2D6*\*4, *CYP2D6*\*5, *CYP2D6*\*6A, *CYP2D6*\*B, *CYP2D6*\*50, *CYP2D6*\*90 y *A1749G*; 4) el amplicón *G6PD*-Canton de 401 pb y 5) el amplicón *G6PD*-Med de 350 pb que respectivamente incluyen los exones 6 y 12 del gen *G6PD* de referencia (GenBank NG\_009015.2) donde se encuentran los SNPs *Canton* y *Mediterranean*; 5) el amplicón *GCLC* de 197 pb que incluye el intrón 1 de del gen *GCLC* de referencia (GenBank NG\_012071.2) donde se encuentra el SNP rs761142.

## Diseño y validación de las parejas de oligonucleótidos iniciadores

Los oligonucleótidos diseñados para amplificar las secuencias que contienen los SNPs y parte de los flancos fueron probados in silico con el programa OligoAnalyzer 3.1 (IDT Technologies, [www.idtdna.com/calc/analyzer](http://www.idtdna.com/calc/analyzer)) para ver si sus características excluirían la formación de estructuras secundarias de tallo-asa,

homodímeros y heterodímeros, así como para determinar su temperatura de *annealing* y su contenido de GC.

La especificidad de los oligonucleótidos seleccionados fue analizada con la aplicación BLAST. Como los genes *CYP2C9* y *CYP2C19* tienen un alto porcentaje de homología (90%), se eligieron las parejas de iniciadores con las características necesarias cuyas secuencias estuviesen ubicadas en las regiones de mayor variabilidad de los dos genes. Finalmente seleccionamos las parejas de oligonucleótidos EHCYP2C9\*2F/EHCYP2C9\*2R para amplificar el exón 3 de *CYP2C9*; EHCYP2C9\*3F/EHCYP2C9\*3R para amplificar el exón 7 de *CYP2C9*; EHCYP2D6F/EHCYP2D6R para amplificar el exón 3 e intrón 3 de *CYP2D6*; EHG6PDSF/EHG6PDSR para amplificar el exón 12 de *G6PD*; EHG6PDMF/EHG6PDMR para amplificar el exón 6 de *G6PD*; EHGCLCF/EHGCLCR para amplificar el intrón 1 del gen *GCLC*.

A continuación, se detallan las secuencias de las parejas de iniciadores.

Para el amplicón CYP2C9\*2:

- Forward (EHCYP2C9\*2F), 5'-GGGAGGATGGAAAACAGAGACTTA-3' (24 nt).
- Reverse (EHCYP2C9\*2R), 5'-GGTCAGTGATATGGAGTAGGGTC-3' (23 nt).

Para el amplicón CYP2C9\*3:

- Forward (EHCYP2C9\*3F), 5'-GCAAGACAGGAGCCACATG-3' (19 nt).
- Reverse (EHCYP2C9\*3R), 5'-AGCACCTAAGAGTAGCCAAACC-3' (22 nt).

Para el amplicón CYP2D6:

- Forward (EHCYP2D6F), 5'- CTTCTCCGTGTCCACCTTG -3' (19 nt);
- Reverse (EHCYP2D6R), 5'- AAAGCCCGACTCCTCCTTC -3' (19 nt).

Para el amplicón G6PD-Canton:

- Forward (EHG6PDSF), 5'- GGGGATCAGGAAGTGAGTCTTG -3' (22 nt);
- Reverse (EHG6PDSR), 5'- GGACATGACA ACTTGGGCTTC -3' (21 nt).

Para el amplicón G6PD-Med:

- Forward (EHG6PDMF), 5'- AACCGCATCATCGTGGAGAAG-3' (21 nt);
- Reverse (EHG6PDMR), 5'- CCGAAGATCCTGTTGGCAAATC-3' (22 nt).

Para el amplicón GCLC:

- Forward (EHGCLCF), 5'- GCAGGCTTGTTTAGGAGTTAGTG-3' (23 nt);
- Reverse (EHGCLCR), 5'- AGTCCAGGTAGAGTATGCGTG -3' (21 nt).

Los iniciadores fueron adquiridos de T4 Oligo y las soluciones madre de cada uno (100  $\mu$ M) fueron preparadas por disolución en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0 (TE). A partir de las soluciones madre se prepararon soluciones de trabajo (10  $\mu$ M) de cada oligonucleótido que fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

**Tabla 1. Secuencias de referencia de los genes *CYP2C9*, *CYP2D6*, *G6PD* y *GCLC* silvestres**

<b>Gen</b>	<b>Acceso NCBI</b>	<b>Localización cromosómica</b>	<b>Secuencia (pb)</b>
<i>CYP2C9</i>	NG_008385.1	10q23.33	50,733
<i>CYP2D6</i>	NG_008376.3	22q13.2	4,383
<i>G6PD</i>	NG_009015.2	Xq28	16,197
<i>GCLC</i>	NG_012071.2	6p12.1	47,789

**Tabla 2. Variantes clínicamente relevantes y SNPs contenidos en los amplicones de los genes *CYP2C9*, *CYP2D6*, *G6PD* y *GCLC***

Gen	Región	Variante	SNP	Posición		Bases	Cambios Tripletes	Aminoácidos
				ORF	Amplicón			
<i>CYP2C9</i>	---	<i>CYP2C9*1</i>	---	---	---	---	---	---
	Exón 3	<i>CYP2C9*2</i>	rs1799853	430	*2/228	C3608T	CGT→TGT	R144C
		<i>CYP2C9*8</i>	rs7900194	449	*2/247	G3627A	CGC→CAC	R150H
		<i>CYP2C9*14</i>	rs72558189	374	*2/172	G3552A	CGT→CAT	R125H
		<i>CYP2C9*26</i>	rs200965026	389	*2/187	C3567G	ACG→AGG	T130R
		<i>CYP2C9*33</i>	rs200183364	395	*2/193	G3573A	CGG→CAG	R132Q
		<i>CYP2C9*35</i>	---	374	*2/172	G3552T	CGC→CTC	R125L
				430	*2/228	C3608T	CGT→TGT	R144C
		<i>CYP2C9*41</i>	---	356	*2/154	A3534G	AAA→AGA	K119R
		<i>CYP2C9*42</i>	rs12414460	371	*2/169	G3549A	CGG→CAG	R124Q
		<i>CYP2C9*43</i>	rs767576260	370	*2/168	C3548T	CGG→TGG	R124W
		<i>CYP2C9*44</i>	rs200965026	389	*2/187	C3567T	ACG→ATG	T130M
		<i>CYP2C9*45</i>	rs199523631	394	*2/192	C3572T	CGG→TGG	R132W
		<i>CYP2C9*46</i>	rs754487195	445	*2/243	G3623A	GCC→ACC	A149T
	Exón 7	<i>CYP2C9*3</i>	rs1057910	1075	*3/59	A42614C	ATT→CTT	I359L
		<i>CYP2C9*4</i>	rs56165452	1076	*3/60	T42615C	ATT→ACT	I359T
		<i>CYP2C9*5</i>	rs28371686	1080	*3/64	C42619G	GAC→GAG	D360E
		<i>CYP2C9*17</i>	---	1144	*3/128	C42683T	CCC→TCC	P382S
		<i>CYP2C9*24</i>	rs749060448	1060	*3/44	G42599A	GAG→AAG	E354K
			430	*2/228	C3608T	CGT→TGT	R144C	
		1081	*3/65	C42620A	CTT→ATT	L361I		
<i>CYP2D6</i>	---	<i>CYP2D6*1A</i>	---	---	---	---	---	
	Intrón 3	<i>CYP2D6*4</i>	rs3892097	NA	195	G1846A	NA	SA
		<i>CYP2D6*5</i>	---	NA	Delección	NA	NA	PA
	Exón 3	<i>CYP2D6*6A</i>	rs5030655	538	56	T1707ΔT	TGA1711-13	PT
		<i>CYP2C6*6B</i>	---	538	56	T1707ΔT	TGA1711-13	PT

Gen	Región	Variante	SNP	Posición		Bases	Cambios Tripletes	Aminoácidos
				ORF	Amplicón			
					325	G1976A		
		<i>CYP2D6*50</i>	rs267608302	551	69	A1720C	<u>G</u> AG→ <u>G</u> CG	E156A
		<i>CYP2C6*90</i>	rs569229126	524	42	A1693G	<u>A</u> AG→ <u>A</u> GG	K147R
		A1749G	rs1135824	580	98	A1749G	<u>A</u> AC→ <u>G</u> AC	N166D
<i>G6PD</i>	---	<i>G6PD B</i>	---	---	---	---	---	---
	Exón 12	<i>Canton</i>	rs72554665	1376	195	G15318A/C/T	<u>C</u> GT→ <u>C</u> AT	R459H
							<u>C</u> GT→ <u>C</u> CT	R459P
							<u>C</u> GT→ <u>C</u> TT	R459L
	Exón 6	<i>Mediterranean</i>	rs5030868	563	71	C13168T	<u>T</u> CC→ <u>T</u> TC	S188F
<i>GCLC</i>	---	<i>GCLC</i>	---	---	---	---	---	---
	Intrón 1	NA	rs761142	NA	96	T17724G	NA	NA

NA, no aplica; aa, aminoácido. PA, proteína ausente. PT, proteína trunca (153 aa). SA, splicing alternativo.

### **Condiciones preliminares para generar los amplicones**

Las condiciones preliminares de la PCR para obtener los amplicones consistieron en mezclas de 25  $\mu$ L que contenían 40 ng de DNA, la pareja de oligonucleótidos respectiva,  $MgCl_2$  4 mM, temperatura de annealing de 48 °C y 30 ciclos de amplificación.

Para generar el amplicón CYP2C9\*2 se empleó la pareja de oligonucleótidos EHCYP2C9\*2F/EHCYP2C9\*2R. Para generar el amplicón CYP2C9\*3, la pareja EHCYP2C9\*3F/EHCYP2C9\*3R; en este caso la última condición probada fue un gradiente de concentración de oligonucleótidos de 0.1 a 0.3  $\mu$ M. Para generar el amplicón CYP2D6 se empleó la pareja EHCYP2D6F/EHCYP2D6R; para el amplicón G6PD-Canton la pareja EHG6PDS/EHG6PDSR; para el amplicón G6PD-Med la pareja EHG6PDM/EHG6PDMR; para el amplicón GCLC la pareja EHGCLCF/EHGCLCR.

### **Optimización de las condiciones para generar los amplicones**

Primero se probó  $MgCl_2$  1.5 a 4 mM con 20 ng de DNA con 30 ciclos de amplificación, luego un gradiente de temperatura de annealing y finalmente la amplificación fue disminuida a 25 ciclos con un gradiente de temperatura de annealing. En todos los casos se utilizaron mezclas blanco (i.e., controles negativos carentes de DNA) y se determinó el tamaño e integridad de los productos por electroforesis de muestras de 6  $\mu$ L de las mezclas de PCR en geles de agarosa al 2% corridos en buffer de borato de sodio (SB) a 90 V por 70 min. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1  $\mu$ g/mL) por 30 min, transiluminados con luz ultravioleta y las bandas fluorescentes se registraron en el fotodocumentador Gel Doc XR+ (Bio-Rad, Carlsbad, EE UU). La intensidad de fluorescencia de las bandas principales y secundarias se cuantificó en pixeles con el software Image Lab, posteriormente se graficó la intensidad relativa de cada banda obtenido del cociente de la intensidad absoluta entre la intensidad absoluta de la banda de mayor intensidad.

Las tablas 3 y 4 muestran las condiciones empleadas para obtener amplicones puros en cantidad suficiente para la secuenciación.

**Tabla 3. Mezclas de PCR (25  $\mu$ L) optimizadas para los amplicones CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, CYP2D6, G6PD-Canton, G6PD-Med y GCLC**

Componente	$\mu$ L/mezcla						Contenido
	CYP2C9*2	CYP2C9*3	CYP2D6	G6PD-Canton	G6PD-Med	GCLC	
Agua MilliQ estéril	19.25	19.5	19.25	19.5	19.25	19.5	---
Buffer PCR 10x (MgCl <sub>2</sub> 15 mM)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	MgCl <sub>2</sub> 1.5 mM
dNTPs (10 mM c/u)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	200 $\mu$ M c/u
EHCYP2C9*2F / EHCYP2C9*2R (10 $\mu$ M c/u)	0.75	---	---	---	---	---	0.3 $\mu$ M c/u
EHCYP2C9*3F / EHCYP2C9*3R (10 $\mu$ M c/u)	---	0.5	---	---	---	---	0.2 $\mu$ M c/u
EHCYP2D6F / EHCYP2D6R (10 $\mu$ M c/u)	---	---	0.75	---	---	---	0.3 $\mu$ M c/u
EHG6PDSF / EHG6PDSR (10 $\mu$ M c/u)	---	---	---	0.75	---	---	0.3 $\mu$ M c/u
EHG6PDMF / EHG6PDMR (10 $\mu$ M c/u)	---	---	---	---	0.75	---	0.3 $\mu$ M c/u
EHGCLCF / EHGCLCR (10 $\mu$ M c/u)	---	---	---	---	---	0.75	0.3 $\mu$ M c/u
Taq Blue (1 U/ $\mu$ L)	1	1	1	1	1	1	1 U
DNA genómico (20 ng/ $\mu$ L)	1	1	1	1	1	1	20 ng



**Tabla 4. Programas de termociclado optimizados para los amplicones CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, CYP2D6, G6PD-Canton, G6PD-Med y GCLC**

Etapa	°C						t	Ciclos
	CYP2C9*2	CYP2C9*3	CYP2D6	G6PD-Canton	G6PD-Med	GCLC		
Desnaturalización inicial	94.0						5 min	1
Desnaturalización	94.0						30 s	25/30 <sup>a</sup>
Alineación	57.0		58.2	60	61.2	56.2	30 s	
Extensión	72.0						45 s	
Extensión final	72.0						5 min	1
Conservación	25.0						∞	1

<sup>a</sup> GCLC.

### **Purificación y cuantificación de los amplicones**

Después de aplicar 6  $\mu\text{L}$  de las mezclas de PCR para el análisis electroforético de los amplicones CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, CYP2D6, G6PD-Canton, G6PD-Med y GCLC, el volumen restante (19  $\mu\text{L}$ ) se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL. A cada tubo se añadieron 1/10 de volumen (1.9  $\mu\text{L}$ ) de acetato de sodio 3 M y 3 volúmenes (57  $\mu\text{L}$ ) de etanol grado biología molecular frío. El contenido de cada tubo se mezcló y se mantuvo 3 h a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm en la microcentrífuga Sorvall Fresco (16,060 $\times g$ ) por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se descartó el sobrenadante por decantación. Las pastillas se resuspendieron por agitación con el vórtex con 700  $\mu\text{L}$  de etanol frío al 70%, se volvieron a centrifugar y los sobrenadantes se descartaron por decantación. Los tubos se dejaron secar con la tapa abierta en un termoblock (Accublock, Labnet International Inc.) a  $65^{\circ}\text{C}$  por 20 min. Una vez evaporado el etanol se añadió a cada tubo 50  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ y el DNA se dejó hidratar toda la noche a temperatura ambiente. Las muestras se mezclaron con vórtex y el contenido y pureza de DNA se determinaron por su absorbencia a 260 nm ( $A_{260}$ ) y 280 nm ( $A_{280}$ ) y la relación  $A_{260}/A_{280}$  en un espectrofotómetro con lector de microplacas (Epoch, BioTek). En caso necesario a cada tubo se añadió el volumen de agua MilliQ necesario para ajustar la concentración de DNA a 15 ng/ $\mu\text{L}$ .

### **Secuenciación de los amplicones**

A cada tubo Eppendorf de 1.5 mL para la reacción de secuenciación se añadieron 5  $\mu\text{L}$  del oligonucleótido iniciador F o R (5  $\mu\text{M}$ ). Los tubos Eppendorf de 1.5 ml con cada amplicón purificado ( $A_{260}/A_{280}$  1.6-1.9, 15 ng/ $\mu\text{L}$ ) y los tubos con los iniciadores respectivos fueron entregados al LANBAMA para la secuenciación con el método de didesoxinucleótidos marcados.

### **Alineamiento y análisis de secuencias de los amplicones**

De los resultados de secuenciación de cada amplicón recibimos del LANBAMA dos archivos electrónicos: uno con las secuencias forward y reverse y otro con el

cromatograma (formato .ABI) que registra los picos cuya área bajo la curva corresponde al contenido de cada base.

Generamos las secuencias reversas complementarias ('forward') a partir de las secuencias obtenidas con cada iniciador reverse mediante la aplicación Reverse Complement ([www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)) y alineamos las secuencias forward con las de los exones e intrones de referencia para ver si correspondían a los segmentos de interés de los genes *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3*, *CYP2D6*, *G6PD* y *GCLC*.

La identidad de los amplicones *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3*, *CYP2D6*, *G6PD-Canton*, *G6PD-Med* y *GCLC* se basó en la alineación de sus secuencias forward y reversas complementarias con las secuencias de referencia mediante la aplicación MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

### **Identificación de las variantes alélicas relevantes**

Una vez verificada la idoneidad del método con muestras de los seis amplicones en los 10 primeros sujetos, se llevó a cabo la amplificación, purificación, secuenciación y análisis de las muestras en los 90 sujetos restantes.

Las variantes alélicas fueron identificadas con la aplicación FinchTV utilizando las etiquetas de decanucleótidos marcadores corriente arriba de cada SNP (Tabla 5). En el caso de muestras con todas las variantes alélicas identificadas se analizaron además los picos de las bases afectadas para determinar si se encontraban en estado homocigoto o heterocigoto. La identificación de las variantes permitió calcular su frecuencia en todas las muestras.

### **Equilibrio de Hardy-Weinberg, haplotipos y desequilibrio de ligamiento**

Las frecuencias de los haplotipos se obtuvieron a partir de los datos de los genotipos de los SNP's con el programa PHASE v2.1 (Stephens and Donnelly 2003; Stephens et al. 2001). El equilibrio de Hardy-Weinberg se calculó mediante la prueba de  $\chi^2$  de cada SNP y el desequilibrio de ligamiento de cada haplotipo se obtuvo con el programa PyPop (Lancaster et al. 2007).

**Tabla 5. Decanucleótidos adyacentes a los SNPs relevantes de los genes *CYP2C9*, *CYP2D6*, *G6PD* y *GCLC***

Gen	Variante	Decanucleótidos	
		Corriente arriba	Corriente abajo
<i>CYP2C9</i>	<i>CYP2C9*14</i>	GAGATCCGGC	TTTCTCCCTC
	<i>CYP2C9*17</i>	CTATCTCATT	CCAAGGTAAG
	<i>CYP2C9*2</i>	CATTGAGGAC	GTGTTCAAGA
	<i>CYP2C9*24</i>	TGTGGTGCAC	AGGTCCAGAG
	<i>CYP2C9*26</i>	TCCCTCATGA	GCTGCGGAAT
	<i>CYP2C9*3</i>	CCAGAGATAC	TTGACCTTCT
	<i>CYP2C9*33</i>	ATGACGCTGC	GAATTTTGGG
	<i>CYP2C9*35</i>	GAGGAAGCCC	CTGCCTTGTG
	<i>CYP2C9*4</i>	CAGAGATACA	TGACCTTCTC
	<i>CYP2C9*41</i>	AATGGAAAGA	ATGGAAGGAG
	<i>CYP2C9*42</i>	AAGGAGATCC	GCGTTTCTCC
	<i>CYP2C9*43</i>	GAAGGAGATC	GGCGTTTCTC
	<i>CYP2C9*44</i>	TCCCTCATGA	GCTGCGGAAT
	<i>CYP2C9*45</i>	CATGACGCTG	GGAATTTTGG
	<i>CYP2C9*46</i>	TCAAGAGGAA	CCCGCTGCCT
	<i>CYP2C9*5</i>	GATACATTGA	CTTCTCCCCA
	<i>CYP2C9*55</i>	ATACATTGAC	TTCTCCCCAC
	<i>CYP2C9*8</i>	GAGGAAGCCC	CTGCCTTGTG
<i>CYP2D6</i>	<i>CYP2D6*4</i>	CCCACCCCCA	GACGCCCT
	<i>CYP2D6*6A</i>	GCTGGAGCAG	GGGTGACCGA
	<i>CYP2D6*6B</i>	GCTCAGGAGG	ACTGAAGGAG
	<i>CYP2D6*50</i>	GTGACCGAGG	GGCCGCCTGC
	<i>CYP2D6*90</i>	CTGGGCAAGA	GTCGCTGGAG
	<i>rs1135824</i>	CGCCTTCGCC	ACCACTCCGG
<i>G6PD</i>	<i>G6PD-Canton</i>	CACCAACTCA	ATGACGTCCG
	<i>G6PD-Mediterranean</i>	AACCACATCT	CTCCCTGTTC
<i>GCLC</i>	<i>rs761142</i>	GTTTGGGCCA	TGCAAGAGAG

# Resultados

## **Montaje de la PCR para obtener el amplicón CYP2C9\*2 puro**

### ***Condiciones de amplificación preliminares***

Como primer paso en el montaje, probamos en las condiciones preliminares la pareja de oligonucleótidos EHCYP2C9\*2F/CYP2C9\*2R para amplificar el exón 3 del gen *CYP2C9*. En la mezcla de PCR con 40 ng de DNA humano obtuvimos la banda principal esperada de ~308 pb con bandas adicionales menos intensas de tamaño menor y mayor (Fig. 3). El barrido y las bandas menores adicionales a la principal nos llevaron a disminuir a la mitad el contenido de DNA y optimizar la concentración de MgCl<sub>2</sub> en los siguientes experimentos.

### ***Optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub>***

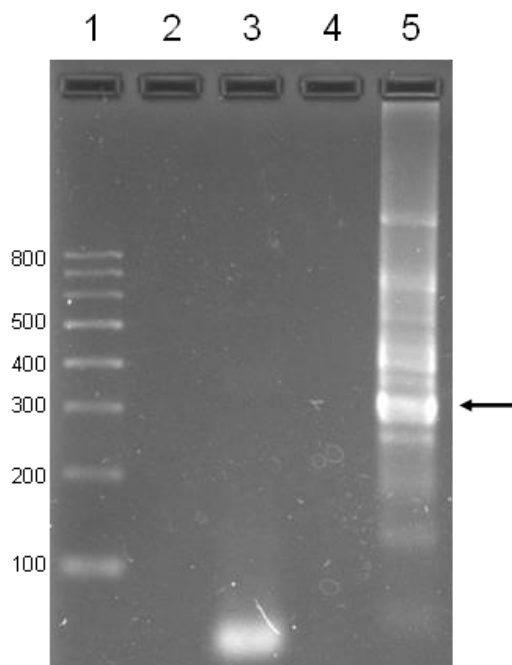
Determinamos la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> para generar el amplicón CYP2C9\*2 en mezclas de PCR con 20 ng de DNA y MgCl<sub>2</sub> 1.5, 2, 3 o 4 mM. En todos los casos obtuvimos la banda principal esperada de 308 pb más intensa y el número e intensidad de las bandas inespecíficas fue mínimo con MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Fig. 4), concentración que consideramos óptima para generar el amplicón CYP2C9\*2.

### ***Determinación de la temperatura de annealing óptima***

En mezclas con 20 ng de DNA y MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM probamos luego un gradiente de temperatura de annealing de 48.2 a 56.2 °C. En todos los casos obtuvimos la banda principal esperada de 308 pb cuya intensidad fue máxima y tuvo el menor número de bandas inespecíficas a 55.0 °C (Fig. 5).

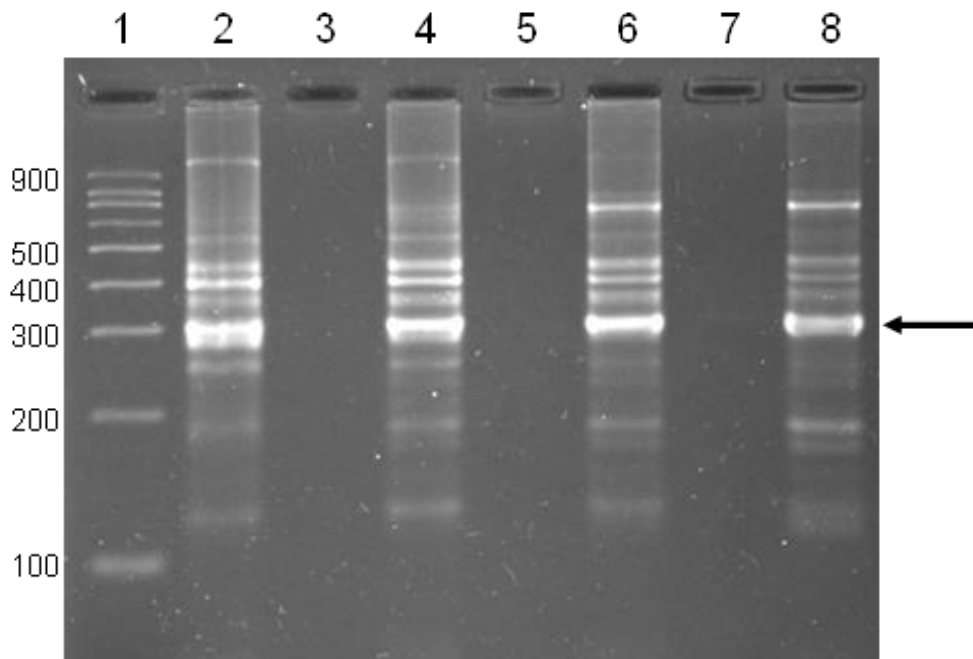
### ***Determinación del número de ciclos y temperatura de annealing***

Para generar el amplicón CYP2C9\*2 sin bandas adicionales disminuimos la incubación a 25 ciclos con un gradiente de temperatura de annealing de 54.9 a 60 °C. En todos los casos obtuvimos solamente la banda esperada de 308 pb que tuvo una intensidad máxima con la temperatura de annealing de 56.6 °C (Fig. 6).



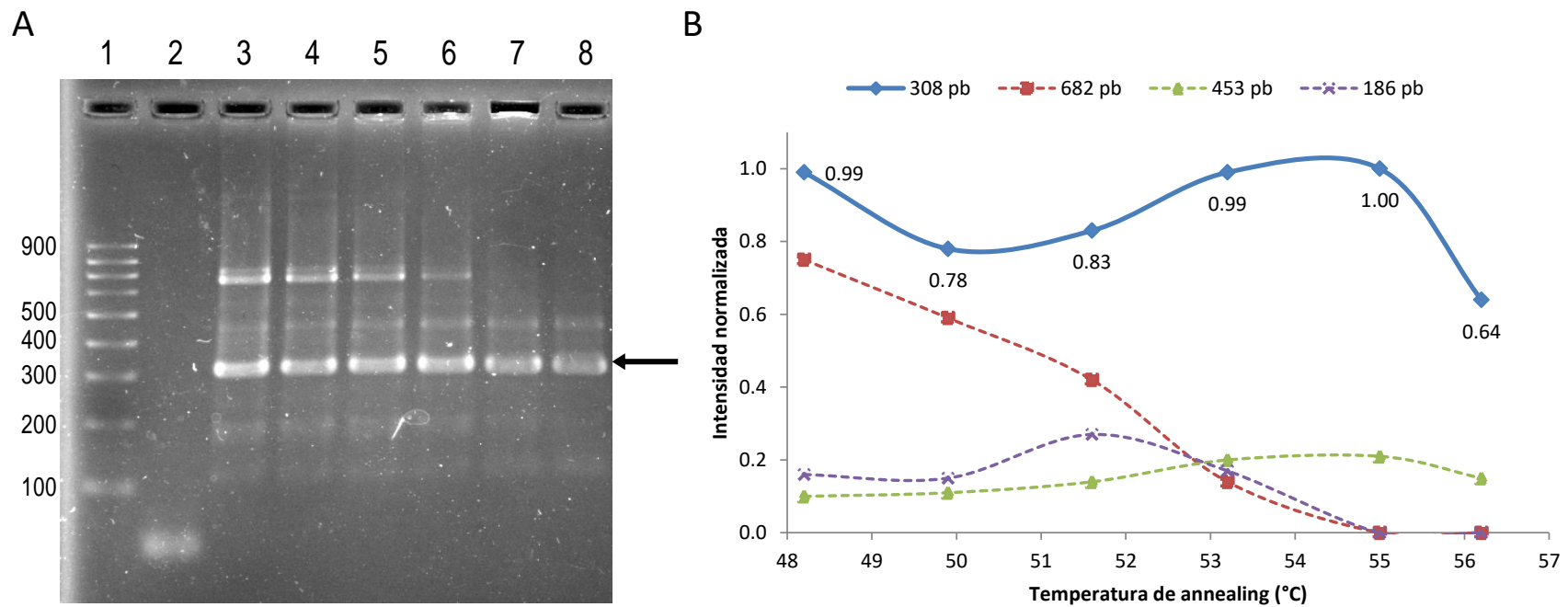
**Fig. 3. Electroferograma de la mezcla de PCR para el amplicón CYP2C9\*2 en condiciones preliminares (40 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, annealing a 48 °C, 40 ciclos)**

Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carriles 2 y 4, sin muestras. Carril 3, Blanco (sin DNA). Carril 5, Mezcla con DNA. La flecha de la derecha señala la banda principal esperada de 308 pb.



**Fig. 4. Electroferograma de las mezclas de PCR para el amplicón CYP2C9\*2 con MgCl<sub>2</sub> 1.5-4 mM (20 ng de DNA, annealing a 48.0 °C, 40 ciclos)**

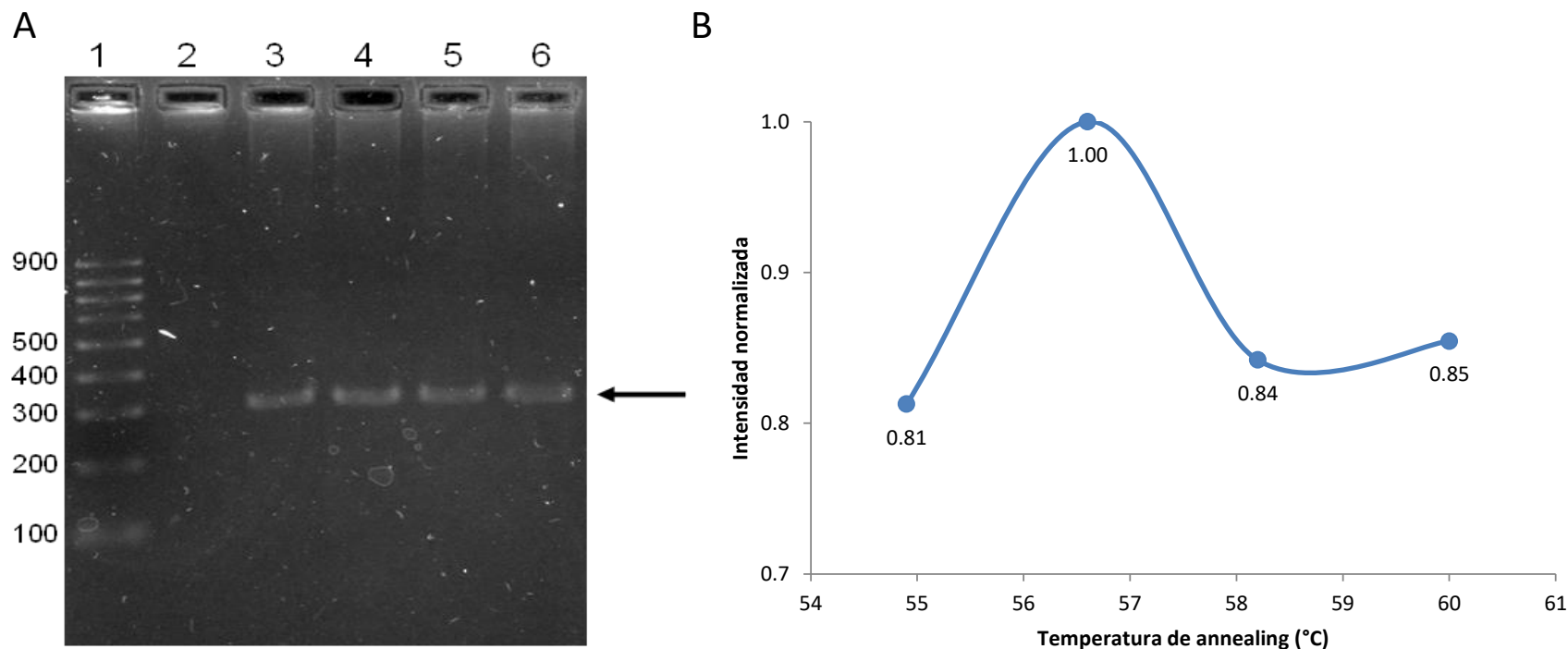
Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carriles 3, 5 y 7, sin muestras. Carriles 2, 4 y 6 y 8, mezclas con DNA y concentraciones variables de MgCl<sub>2</sub>. Carril 2, MgCl<sub>2</sub> 4 mM. Carril 4, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Carril 6, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Carril 8, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM. La flecha de la derecha señala la banda principal esperada (308 pb).



**Fig. 5. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas respecto al valor máximo de la banda principal (308 pb) en mezclas de PCR para el amplicón CYP2C9\*2 con temperaturas de annealing de 48.2 a 56.2 °C (20 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 40 ciclos)**

(A) Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Blanco (sin DNA) 48.2 °C. Carriles 3-8, Mezclas con DNA y temperaturas de annealing crecientes. Carril 3, 48.2 °C. Carril 4, 49.9 °C. Carril 5, 51.6 °C. Carril 6, 53.2 °C. Carril 7, 55 °C. Carril 8, 56.2 °C. La flecha de la derecha señala la banda esperada (308 pb). (B) Gráfica de intensidades relativas de las bandas de 308, 682, 453 y 186 pb con respecto al valor máximo de la banda de 308 a 55 °C.





**Fig. 6. Electroferograma e intensidades relativas de la banda única de 308 pb en mezclas de PCR para el amplicón CYP2C9\*2 con temperaturas de annealing de 54.9 a 61.2 °C (20 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 25 ciclos)**

(A) Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Blanco (sin DNA) 54.9 °C. Carriles 3-6, Mezclas con DNA y temperaturas de annealing crecientes. Carril 3, 54.9 °C. Carril 4, 56.6 °C. Carril 5, 58.2 °C. Carril 6, 60 °C. La flecha de la derecha señala la banda esperada (308 pb). (B) Gráfica de intensidades relativas de la banda única de 308 pb.

## **Montaje de la PCR para obtener el amplicón CYP2C9\*3 puro**

### ***Condiciones de amplificación preliminares***

Como primer paso en el montaje, probamos en las condiciones preliminares la pareja de oligonucleótidos EHCYP2C9\*3F/CYP2C9\*3R para amplificar el exón 7 del gen *CYP2C9*. En la mezcla de PCR con 40 ng de DNA humano obtuvimos la banda principal esperada de ~381 pb con bandas adicionales menos intensas de tamaño menor y mayor (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. 7**). El barrido y las bandas menores adicionales a la principal nos llevaron a disminuir a la mitad el contenido de DNA y optimizar la concentración de MgCl<sub>2</sub> en los siguientes experimentos.

### ***Optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub>***

Determinamos la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> para generar el amplicón CYP2C9\*3 en mezclas de PCR con 20 ng de DNA y MgCl<sub>2</sub> 1.5, 2, 3 o 4 mM. En todos los casos obtuvimos la banda principal esperada de 381 pb más intensa y el número e intensidad de las bandas inespecíficas fue mínimo con MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Fig. 8), concentración que consideramos óptima para generar el amplicón CYP2C9\*3.

### ***Determinación de la temperatura de annealing óptima***

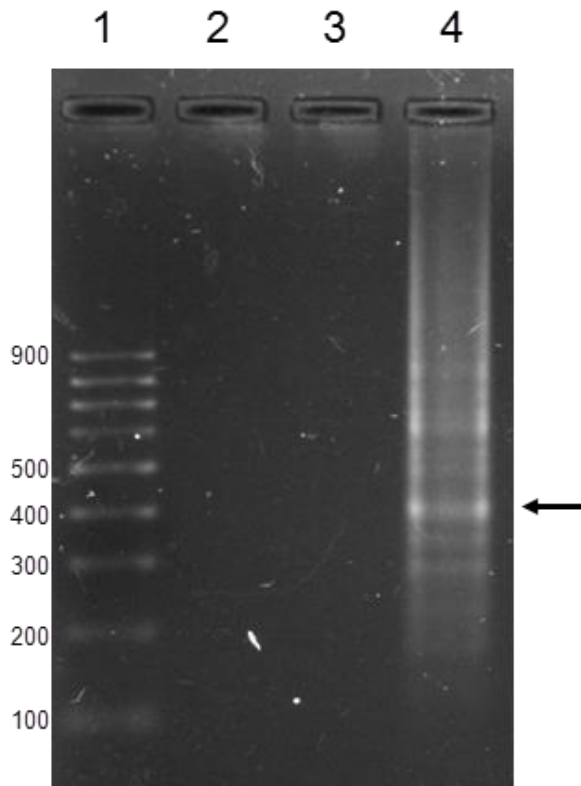
En mezclas con 20 ng de DNA y MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM probamos luego un gradiente de temperatura de annealing de 48.2 a 56.2 °C. En todos los casos obtuvimos la banda principal esperada de 381 pb cuya intensidad fue máxima y tuvo el menor número de bandas inespecíficas a 56.2 °C (Fig. 9).

### ***Determinación del número de ciclos y temperatura de annealing***

Para generar el amplicón CYP2C9\*3 sin bandas adicionales disminuimos la incubación a 25 ciclos con un gradiente de temperatura de annealing de 52.6 a 60.8 °C. En todos los casos obtuvimos solamente la banda esperada de 381 pb que tuvo una intensidad máxima con la temperatura de annealing de 54 °C; con temperaturas de annealing de 57.2 °C a 60 °C las bandas inespecíficas se redujeron en número e intensidad (Fig. 10).

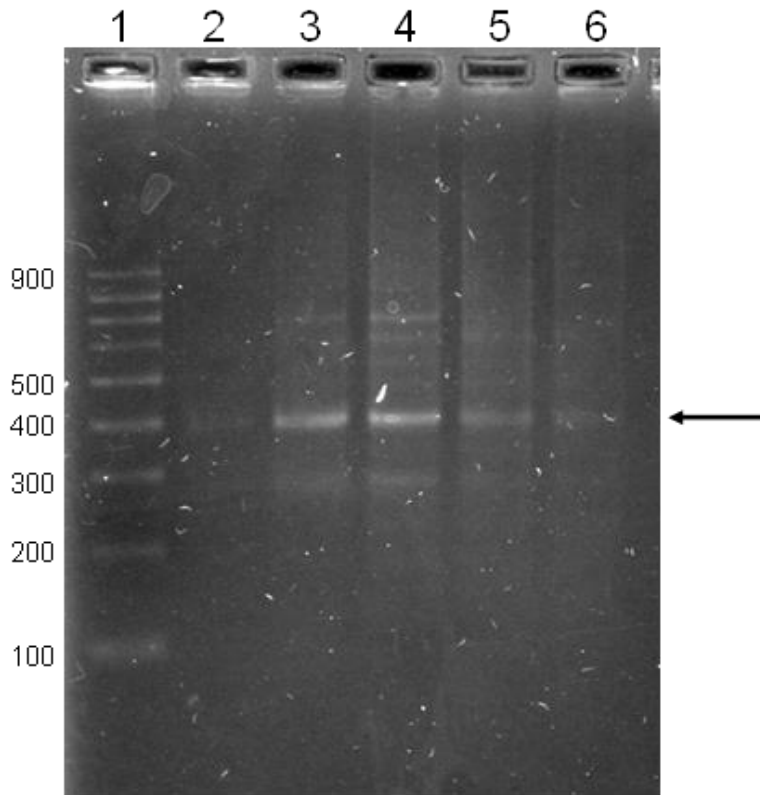
### ***Concentración óptima de oligonucleótidos***

Para eliminar las bandas inespecíficas del amplicón CYP2C9\*3 probamos un gradiente de concentración de iniciadores de 0.1 a 0.3  $\mu\text{M}$  con temperatura de annealing de 57  $^{\circ}\text{C}$ . En todos los casos obtuvimos la banda esperada de 381 pb que tuvo intensidad máxima y fue única con iniciadores 0.2  $\mu\text{M}$  (Fig. 11).



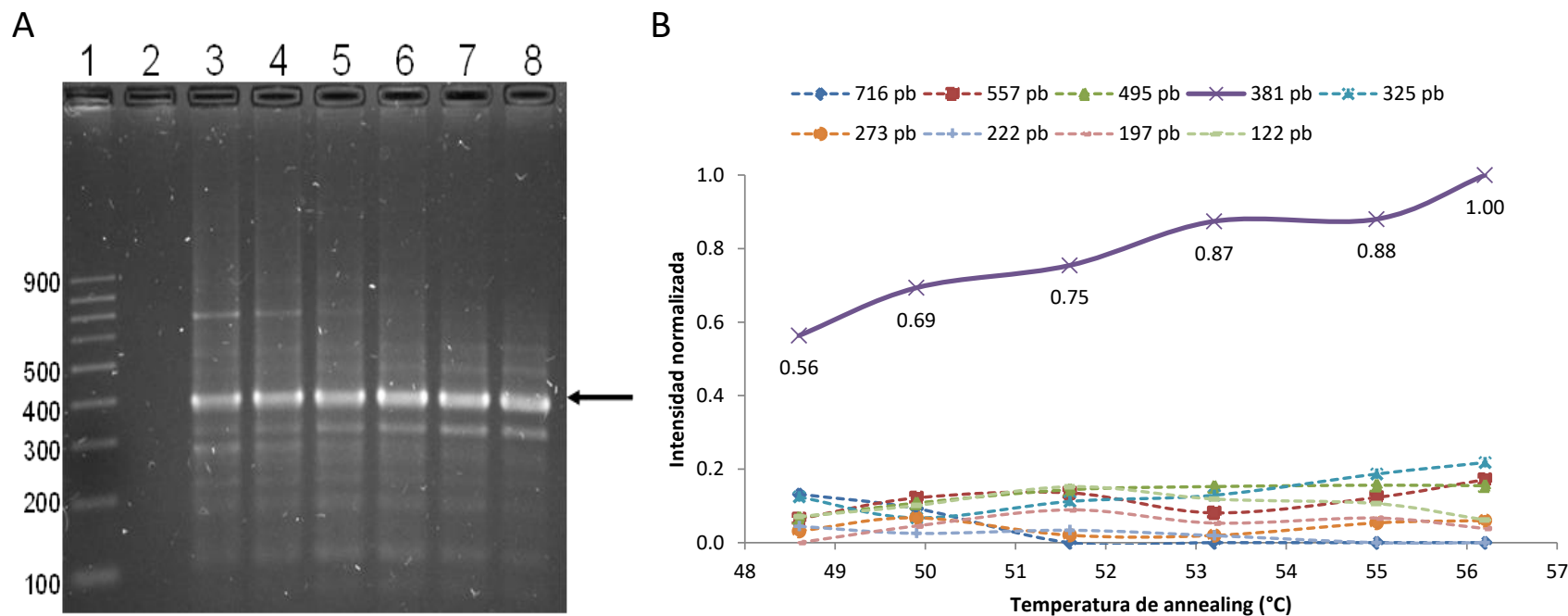
**Fig. 7. Electroferograma de la mezcla de PCR para el amplicón CYP2C9\*3 en condiciones preliminares (40 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, annealing a 48.0 °C, 30 ciclos)**

Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 3, sin muestra. Carril 2, Blanco (sin DNA). Carril 4, Muestra DNA. La flecha de la derecha señala la banda principal esperada (~381 pb).



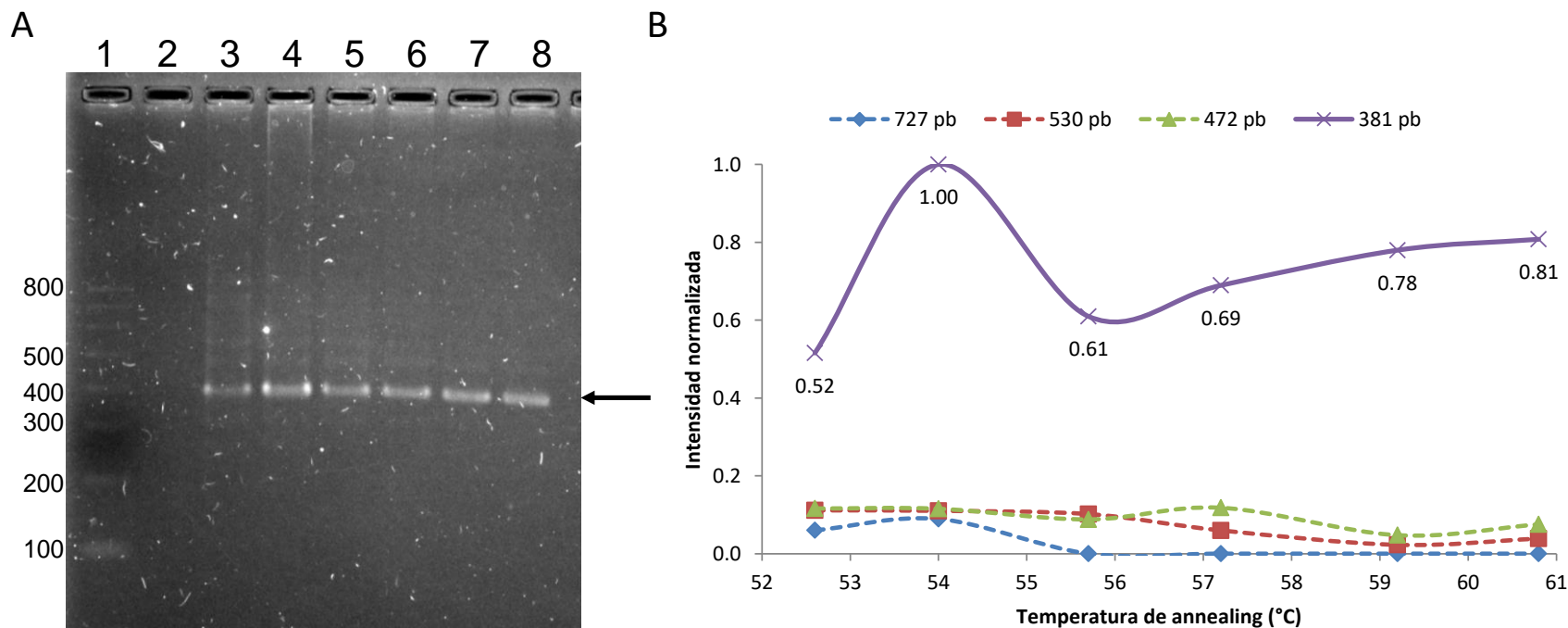
**Fig. 8. Electroferograma de las mezclas de PCR para el amplicón CYP2C9\*3 con MgCl<sub>2</sub> 1.5-4.0 mM (20 ng de DNA, annealing a 48.0 °C, 30 ciclos)**

Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Blanco (sin DNA). Carriles 3-6, Mezclas con DNA y concentraciones crecientes de MgCl<sub>2</sub>. Carril 3, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM. Carril 4, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Carril 5, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Carril 6, MgCl<sub>2</sub> 4 mM. La flecha de la derecha señala la banda principal esperada (381 pb).



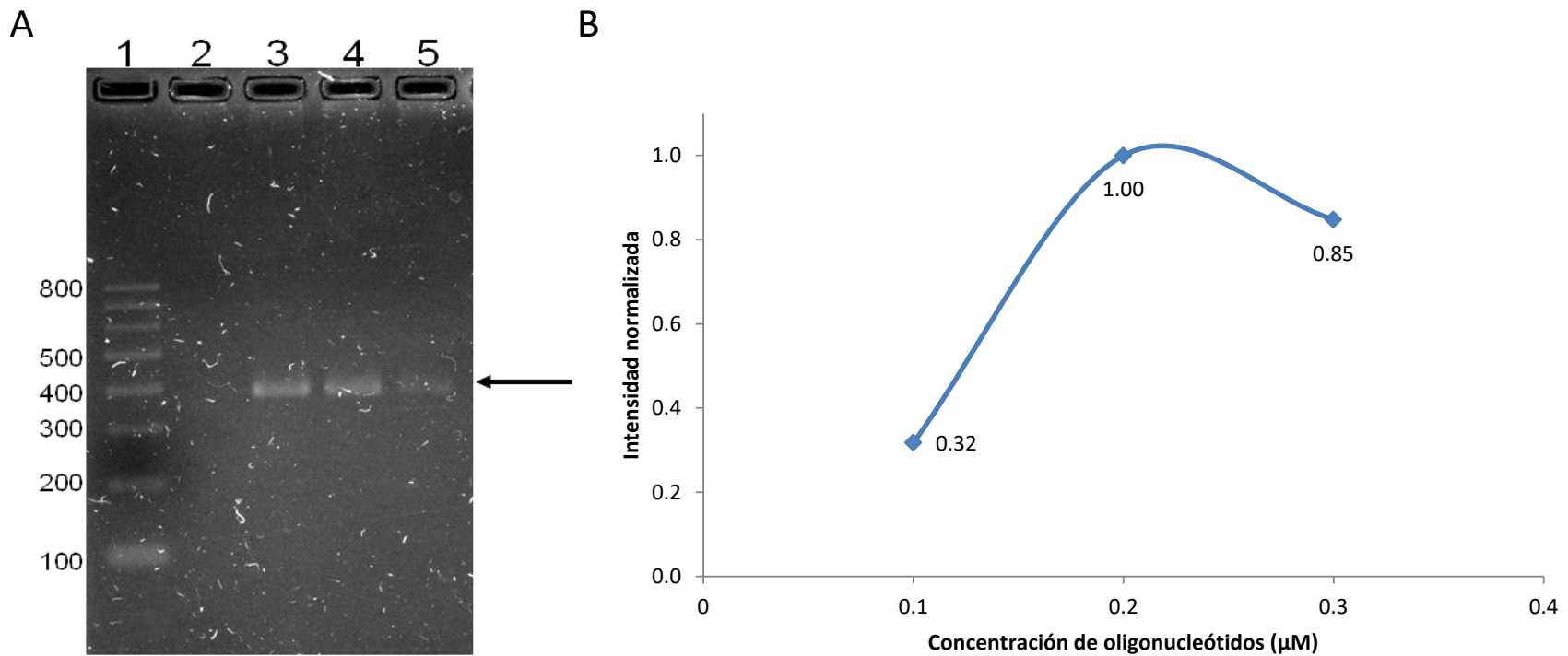
**Fig. 9. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas respecto al valor máximo de la banda principal (381 pb) en mezclas de PCR para el amplicón CYP2C9\*3 con temperaturas de annealing de 48.2 a 56.2 °C (20 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 30 ciclos)**

(A) Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Blanco (sin DNA), 48.2 °C. Carriles 3-8, Mezclas con DNA y temperaturas de annealing crecientes. Carril 3, 48.2 °C. Carril 4, 49.9 °C. Carril 5, 51.6 °C. Carril 6, 53.2 °C. Carril 7, 55 °C. Carril 8, 56.2 °C. La flecha de la derecha señala la banda esperada (381 pb). (B) Gráfica de intensidades relativas de las bandas de 716, 557, 495, 381, 235, 273, 222, 197 y 122 pb respecto al valor máximo de la banda de 381 pb a 56.2 °C.



**Fig. 10. Electroferograma e intensidades relativas de la bandas observadas respecto al valor máximo de la banda de 381 pb en mezclas de PCR para el amplicón CYP2C9\*3 con temperaturas de annealing de 52.6 a 60.8 °C (20 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 25 ciclos)**

(A) Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Blanco (sin DNA), 52.6 °C. Carriles 3-8, Mezclas con DNA y temperaturas de annealing crecientes. Carril 3, 52.6 °C. Carril 4, 54.0 °C. Carril 5, 55.7 °C. Carril 6, 57.2 °C. Carril 7, 59.2 °C. Carril 8, 60.8 °C. La flecha de la derecha señala la banda esperada (~381 pb). (B) Gráfica de intensidades relativas de las bandas de 727, 530, 472 y 381 pb respecto al valor máximo de la banda de 381 pb a 54.0 °C.



**Fig. 11. Electroferograma e intensidades relativas de la banda única de 381 pb en mezclas de PCR para el amplicón CYP2C9\*3 con oligonucleótidos 0.1, 0.2 y 0.3 μM (20 ng de DNA, annealing a 57.0 °C, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 25 ciclos)**

(A) Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Blanco (sin DNA) 57.0 °C. Carriles 3-5, Mezclas con DNA y concentraciones decrecientes de oligonucleótidos. Carril 3, 0.3 μM. Carril 4, 0.2 μM. Carril 5, 0.1 μM. La flecha de la derecha señala la banda esperada (~381 pb). (B) Gráfica de intensidades relativas de la banda única de 381 pb normalizada respecto a su valor máximo (oligonucleótidos 0.2 μM).



## **Montaje de la PCR para obtener el amplicón CYP2D6 puro**

### ***Condiciones de amplificación preliminares***

Como primer paso en el montaje, probamos en las condiciones preliminares la pareja de oligonucleótidos EHCYP2D6F/CYP2D6R para amplificar el exón e intrón 3 del gen *CYP2D6*. En la mezcla de PCR con 40 ng de DNA humano obtuvimos la banda principal esperada de ~347 pb con bandas adicionales menos intensas de tamaño menor y mayor (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** 12). El barrido y las bandas menores adicionales a la principal nos llevaron a disminuir a la mitad el contenido de DNA y optimizar la concentración de MgCl<sub>2</sub> en los siguientes experimentos.

### ***Optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub>***

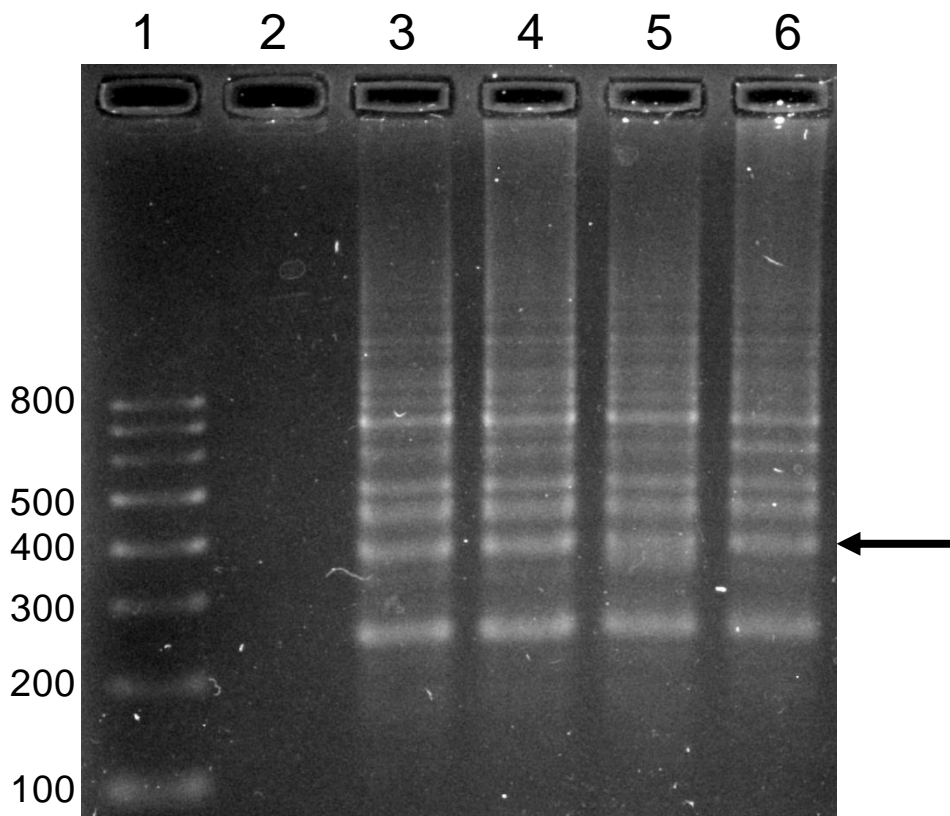
Determinamos la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> para generar el amplicón CYP2D6 en mezclas de PCR con 20 ng de DNA y MgCl<sub>2</sub> 1.5, 2, 3 o 4 mM. En todos los casos obtuvimos la banda principal esperada de 347 pb más intensa y el número e intensidad de las bandas inespecíficas fue mínimo con MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Fig. 13), concentración que consideramos óptima para generar el amplicón CYP2D6.

### ***Determinación de la temperatura de annealing óptima***

En mezclas con 20 ng de DNA y MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM probamos luego un gradiente de temperatura de annealing de 48.2 a 56.2 °C. En todos los casos obtuvimos la banda principal esperada de 347 pb cuya intensidad fue máxima y tuvo el menor número de bandas inespecíficas a 53.2 °C (Fig. 14).

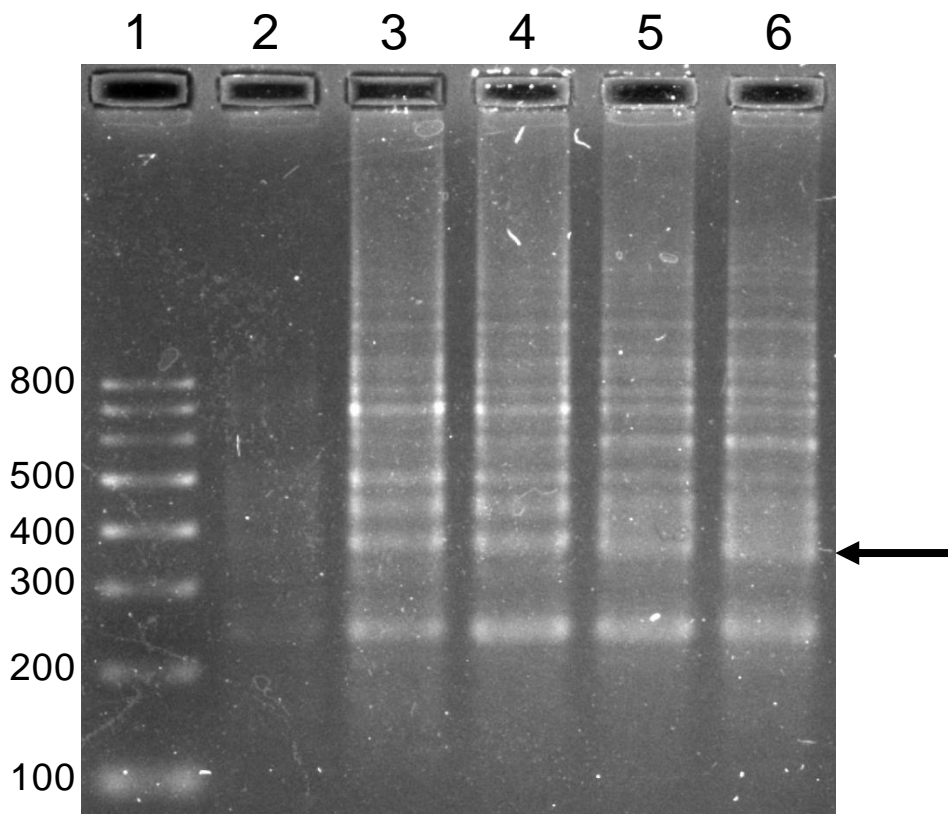
### ***Determinación del número de ciclos y temperatura de annealing***

Para generar el amplicón CYP2D6 sin bandas adicionales disminuimos la incubación a 25 ciclos con un gradiente de temperatura de annealing de 53.2 a 61.2 °C. En todos los casos obtuvimos solamente la banda esperada de 347 pb que tuvo una intensidad máxima con la temperatura de annealing de 58.2 °C (Fig. 15).



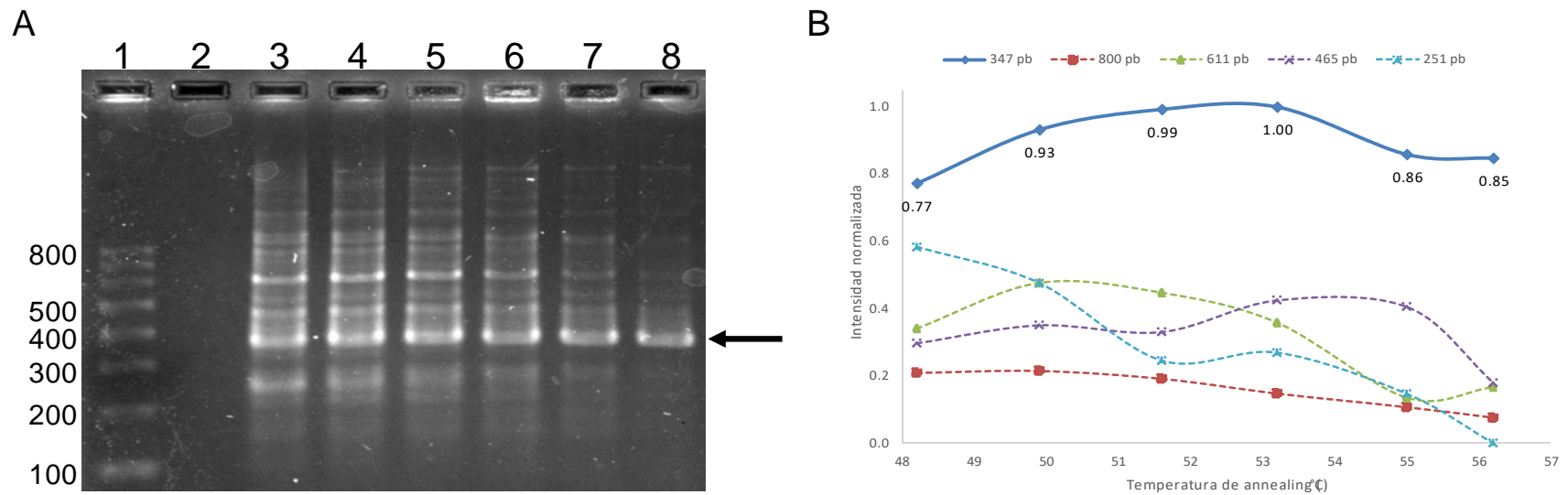
**Fig. 12. Electroferograma de la mezcla de PCR para el amplicón CYP2D6 en condiciones preliminares (40 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, annealing a 48 °C, 30 ciclos)**

Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Blanco (sin DNA). Carril 3, Muestra 51. Carril 4, Muestra 49. Carril 5, Muestra 48. Carril 6, Muestra 44. La flecha de la derecha señala la banda principal esperada de 347 pb.



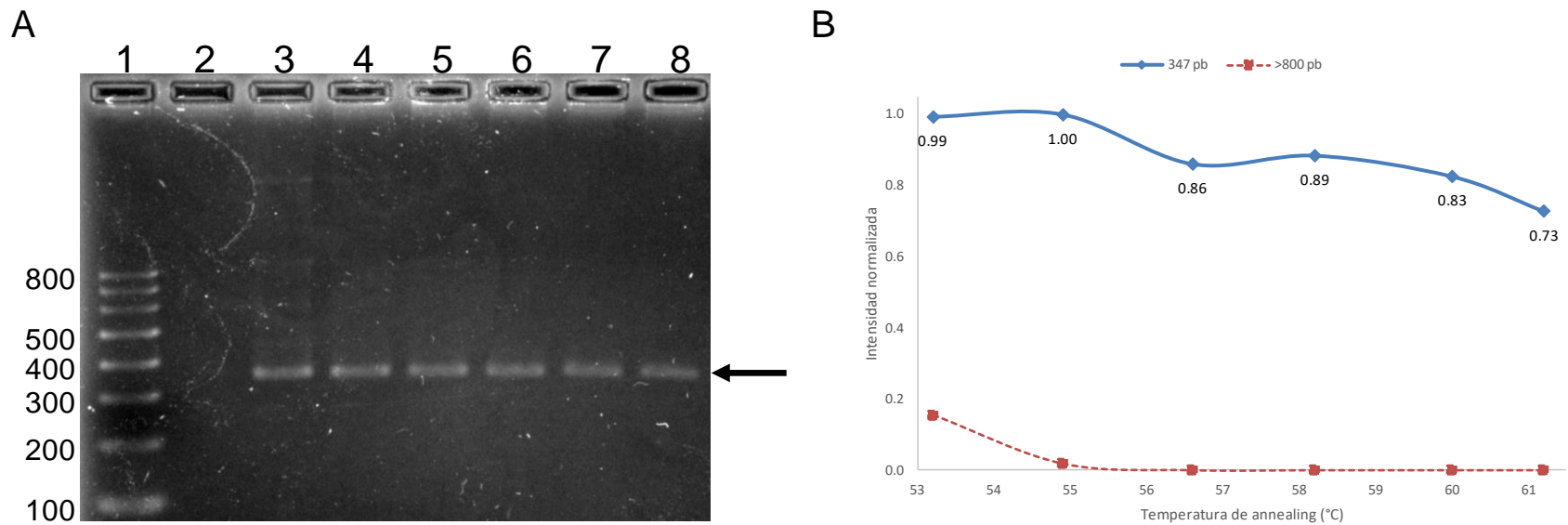
**Fig. 13. Electroferograma de las mezclas de PCR para el amplicón CYP2D6 con  $\text{MgCl}_2$  1.5-4 mM (20 ng de DNA, annealing a 48.0 °C, 30 ciclos)**

Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Blanco (sin DNA). Carril 3,  $\text{MgCl}_2$  4 mM. Carril 4,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, Carril 5,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, Carril 6,  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM. La flecha de la derecha señala la banda principal esperada de 347 pb.



**Fig. 14. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas respecto al valor máximo de la banda de 347 pb de mezclas de PCR para el amplicón CYP2D6 con temperaturas de annealing de 48.2 a 56.2 °C (20 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 30 ciclos)**

(A) Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Bk (sin ADN) 48.2 °C. Carril 3, 48.2 °C. Carril 4, 49.9 °C. Carril 5, 51.6 °C. Carril 6, 53.2 °C. Carril 7, 55 °C. Carril 8, 56.2 °C. La flecha de la derecha señala la banda esperada de 347 pb. (B) Gráfica de intensidades relativas de las bandas de 347, 800, 611, 465 y 251 pb con respecto al valor máximo de la banda de 347 a 53.2 °C.



**Fig. 15. Electroferograma e intensidades relativas de la banda única de 347 pb de mezclas de PCR para el amplicón CYP2D6 con temperaturas de annealing de 53.2 a 61.2 °C (20 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 25 ciclos)**

(A) Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Bk (sin ADN) 53.2 °C. Carril 3, 53.2 °C. Carril 4, 54.9 °C. Carril 5, 56.6 °C. Carril 6, 58.2 °C. Carril 7, 60 °C. Carril 8, 61.2 °C. La flecha de la derecha señala la banda esperada de 347 pb. (B) Gráfica de intensidades relativas de la banda única de 347 pb.

## **Montaje de la PCR para obtener el amplicón G6PD-Canton puro**

### ***Condiciones de amplificación preliminares***

Como primer paso en el montaje, probamos en las condiciones preliminares la pareja de oligonucleótidos EHG6PDSF/G6PDSR para amplificar el exón 12 del gen *G6PD*. En la mezcla de PCR con 40 ng de DNA humano obtuvimos la banda principal esperada de ~401 pb con bandas adicionales menos intensas de tamaño menor y mayor (Anexo 1). El barrido y las bandas menores adicionales a la principal nos llevaron a disminuir a la mitad el contenido de DNA y optimizar la concentración de MgCl<sub>2</sub> en los siguientes experimentos.

### ***Optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub>***

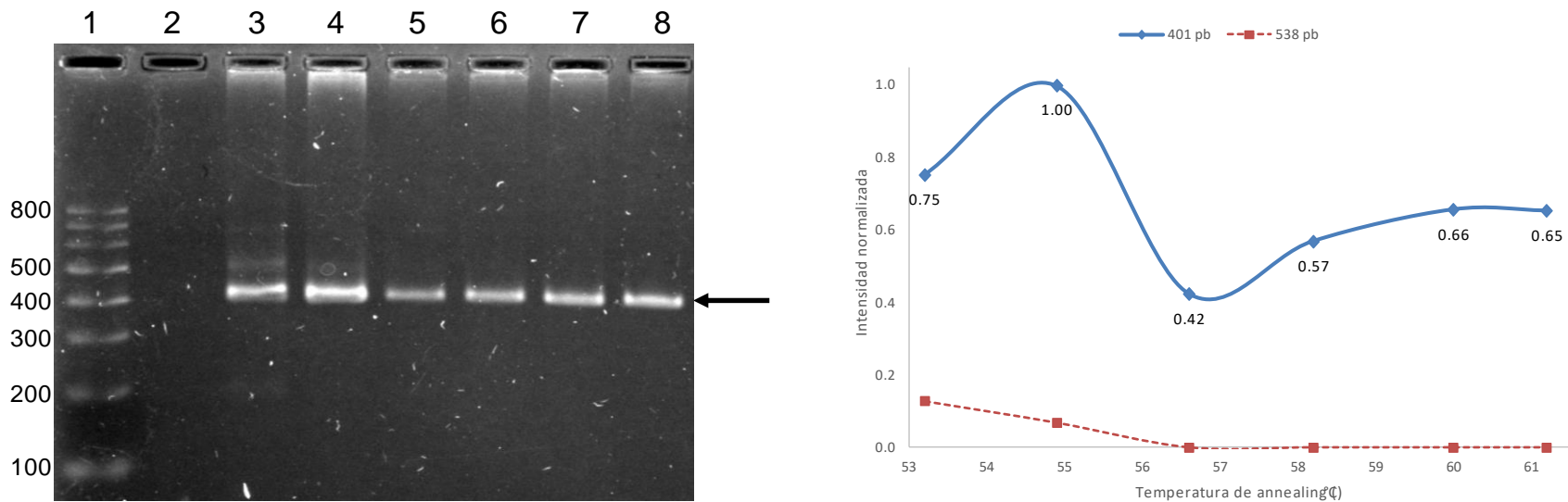
Determinamos la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> para generar el amplicón G6PD-Canton en mezclas de PCR con 20 ng de DNA y MgCl<sub>2</sub> 1.5, 2, 3 o 4 mM. En todos los casos obtuvimos la banda principal esperada de 401 pb más intensa y el número e intensidad de las bandas inespecíficas fue mínimo con MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Anexo 2), concentración que consideramos óptima para generar el amplicón G6PD-Canton.

### ***Optimización de la temperatura de annealing***

En mezclas con 20 ng de DNA y MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM probamos luego un gradiente de temperatura de annealing de 48.2 a 56.2 °C. En todos los casos obtuvimos la banda principal esperada de 401 pb cuya intensidad fue máxima y tuvo el menor número de bandas inespecíficas a 56.2 °C (Anexo 3).

### ***Número de ciclos y temperatura de annealing***

Para generar el amplicón G6PD-Canton sin bandas adicionales disminuimos la incubación a 25 ciclos con un gradiente de temperatura de annealing de 53.2 a 61.2 °C. En todos los casos obtuvimos solamente la banda esperada de 401 pb que tuvo una intensidad máxima con la temperatura de annealing de 60 °C (Fig. 16).



**Fig. 16. Electroferograma e intensidades relativas de la bandas observadas respecto al valor máximo de la banda de 401 pb de mezclas de PCR para el amplicón G6PD-Canton con temperaturas de annealing de 53.2 a 61.2 °C (20 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 25 ciclos)**

(A) Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Bk (sin ADN) 53.2 °C. Carril 3, 53.2 °C. Carril 4, 54.9 °C. Carril 5, 56.6 °C. Carril 6, 58.2 °C. Carril 7, 60 °C. Carril 8, 61.2 °C. La flecha de la derecha señala la banda esperada de 401 pb. (B) Gráfica de intensidades relativas de la bandas de 401 pb y 538 pb con respecto al valor máximo de la banda de 401 a 54.9 °C.

## **Montaje de la PCR para obtener el amplicón G6PD-Med puro**

### ***Condiciones de amplificación preliminares***

Como primer paso en el montaje, probamos en las condiciones preliminares la pareja de oligonucleótidos EHG6PDMF/G6PDMR para amplificar el exón 6 del gen *G6PD*. En la mezcla de PCR con 40 ng de DNA humano obtuvimos la banda principal esperada de ~350 pb con bandas adicionales menos intensas de tamaño menor y mayor (Anexo 4). El barrido y las bandas menores adicionales a la principal nos llevaron a disminuir a la mitad el contenido de DNA y optimizar la concentración de MgCl<sub>2</sub> en los siguientes experimentos.

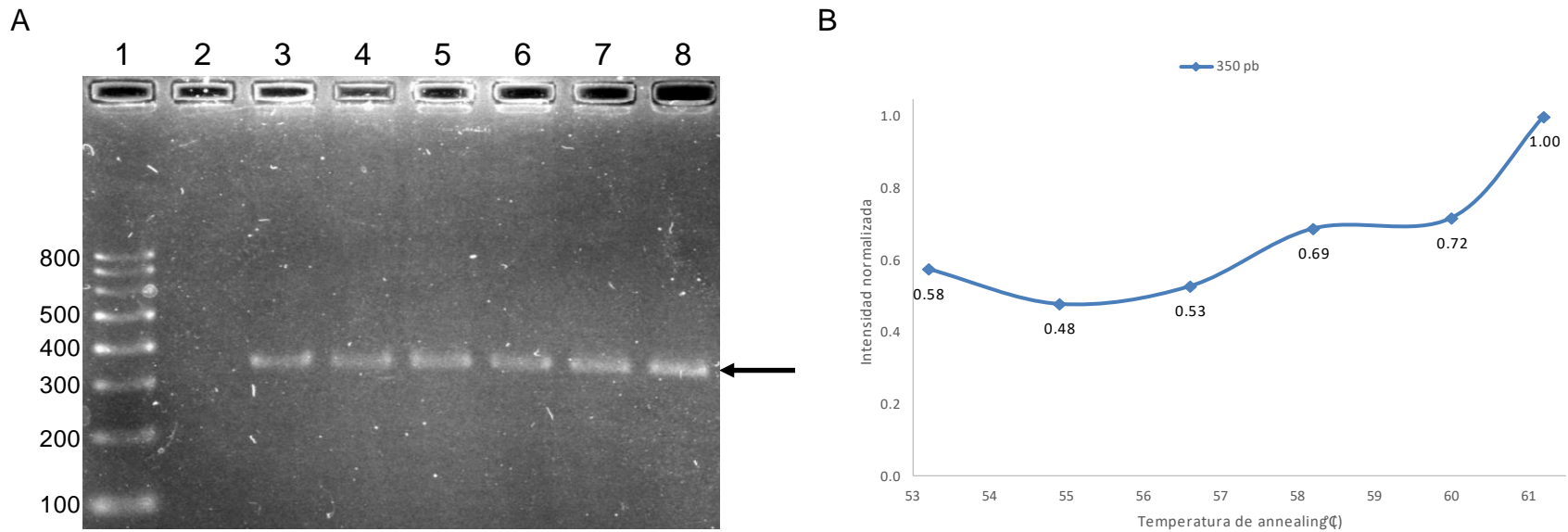
### ***Optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub>***

Determinamos la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> para generar el amplicón G6PD-Med en mezclas de PCR con 20 ng de DNA y MgCl<sub>2</sub> 1.5, 2, 3 o 4 mM. En todos los casos obtuvimos la banda principal esperada de 350 pb más intensa y el número e intensidad de las bandas inespecíficas fue mínimo con MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Anexo 5), concentración que consideramos óptima para generar el amplicón G6PD-Med.

### ***Número de ciclos y temperatura de annealing***

Para generar el amplicón G6PD-Med sin bandas adicionales disminuimos la incubación a 25 ciclos con un gradiente de temperatura de annealing de 53.2 a 61.2 °C. En todos los casos obtuvimos solamente la banda esperada de 350 pb que tuvo una intensidad máxima con la temperatura de annealing de 61.2 °C (Fig. 17).





**Fig. 17. Electroferograma e intensidades relativas de la bandas observadas respecto al valor máximo de la banda de 350 pb de mezclas de PCR para el amplicón G6PD-Med con temperaturas de annealing de 53.2 a 61.2 °C (20 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 25 ciclos)**

(A) Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Bk (sin ADN) 53.2 °C. Carril 3, 53.2 °C. Carril 4, 54.9 °C. Carril 5, 56.6 °C. Carril 6, 58.2 °C. Carril 7, 60 °C. Carril 8, 61.2 °C. La flecha de la derecha señala la banda esperada de 350 pb.  
 (B) Gráfica de intensidades relativas de la banda única de 350 pb.

## **Montaje de la PCR para obtener el amplicón GCLC puro**

### ***Condiciones de amplificación preliminares***

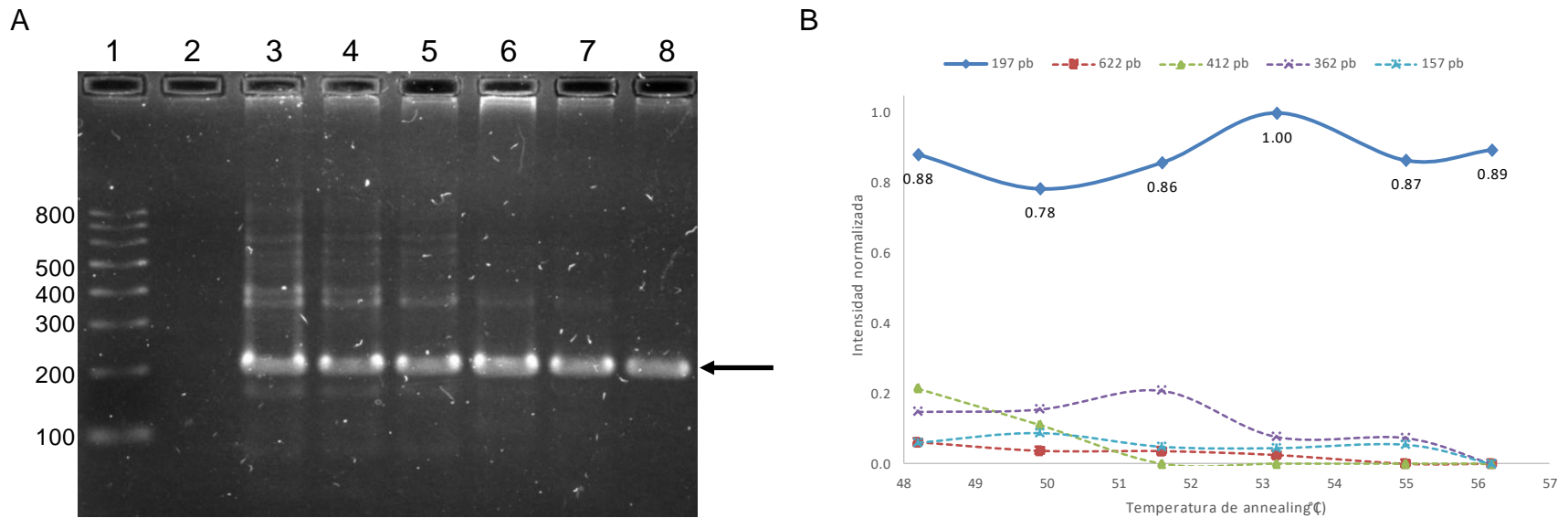
Como primer paso en el montaje, probamos en las condiciones preliminares la pareja de oligonucleótidos EHGCLCF/GCLCR para amplificar el intrón 1 del gen *GCLC*. En la mezcla de PCR con 40 ng de DNA humano obtuvimos la banda principal esperada de ~197 pb con bandas adicionales menos intensas de tamaño menor y mayor (Anexo 6). El barrido y las bandas menores adicionales a la principal nos llevaron a disminuir a la mitad el contenido de DNA y optimizar la concentración de MgCl<sub>2</sub> en los siguientes experimentos.

### ***Optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub>***

Determinamos la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> para generar el amplicón GCLC en mezclas de PCR con 20 ng de DNA y MgCl<sub>2</sub> 1.5, 2, 3 o 4 mM. En todos los casos obtuvimos la banda principal esperada de 197 pb más intensa y el número e intensidad de las bandas inespecíficas fue mínimo con MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Anexo 7), concentración que consideramos óptima para generar el amplicón GCLC.

### ***Temperatura de annealing***

En mezclas con 20 ng de DNA y MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM probamos luego un gradiente de temperatura de annealing de 53.2 a 61.2 °C. En todos los casos obtuvimos la banda principal esperada de 197 pb cuya intensidad fue máxima y única a 56.2 °C (Fig. 18).



**Fig. 18. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas respecto al valor máximo de la banda de 197 pb de mezclas de PCR para el amplicón GCLC con temperaturas de annealing de 48.2 a 56.2°C (20 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 30 ciclos)**

(A) Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Bk (sin ADN) 48.2 °C. Carril 3, 48.2 °C. Carril 4, 49.9 °C. Carril 5, 51.6 °C. Carril 6, 53.2 °C. Carril 7, 55 °C. Carril 8, 56.2 °C. La flecha de la derecha señala la banda esperada de 197 pb. (B) Gráfica de intensidades relativas de las bandas de 347, 622, 412, 362 y 157 pb con respecto al valor máximo de la banda de 197 a 53.2 °C.

### **Alineamiento y análisis de la secuencia de los amplicones**

Una vez que obtuvimos bandas únicas de los amplicones CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, CYP2D6, G6PD-Canton, G6PD-Med y GCLC en los geles de agarosa, los purificamos, los secuenciamos y los analizamos.

Obtuvimos las secuencias F, R y consenso de cada muestra y verificamos que los productos de amplificación eran los esperados comparando las secuencias de las muestras alineadas con las secuencias de los alelos silvestres *CYP2C9\*1* de GenBank (Acceso No. NG\_008385.1), *CYP2D6\*1A* de GenBank (NG\_008376.3), *G6PD B* de GenBank (NG\_009015.2) y *GCLC* de GenBank (NG\_012071.2).

### **Identificación de las variantes de los genes CYP2C9, CYP2D6, G6PD y GCLC**

Después de confirmar la identidad de los amplicones en las muestras iniciales, se amplificaron y secuenciaron las muestras de los 100 sujetos incluidos en el estudio. Las secuencias se analizaron con el programa FinchTV y los SNPs clínicamente relevantes conocidos se buscaron con las etiquetas marcadoras de decanucleótidos corriente arriba de cada SNP (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Encontramos 18 variantes del gen *CYP2C9* en los amplicones CYP2C9\*2 y CYP2C9\*3; siete variantes del gen *CYP2D6* en el amplicón CYP2D6; dos variantes del gen *G6PD* en los amplicones G6PD-Canton y G6PD-Med; y una variante del gen *GCLC* en el amplicón GCLC (Tabla 2).

El alelo silvestre *CYP2C9\*1* estuvo presente en 75 sujetos e identificamos un total de 25 variantes alélicas del gen *CYP2C9* en el grupo incluido: la variante *CYP2C9\*2* en 18 sujetos, la *CYP2C9\*3* en seis sujetos, la *CYP2C9\*55* en dos y las variantes *CYP2C9\*26*, *CYP2C9\*44* y *CYP2C9\*45* en un sujeto en cada una. Todas las variantes se encontraban en estado heterocigoto. (Anexo 8).

La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** ejemplifica la secuencia de un sujeto que porta el alelo *CYP2C9\*3* en estado heterocigoto (A) y otro que porta el alelo silvestre *CYP2C9\*1* en estado homocigoto (B).

El alelo silvestre *CYP2D6 1A* estuvo presente en 11 sujetos e identificamos 98 variantes alélicas del gen *CYP2D6*. La variante *rs1135824* en 89 sujetos, la

*CYP2D6\*4* y la *CYP2D6\*50* en tres sujetos cada una, la *CYP2D6\*90* en dos sujetos y la *CYP2D6\*6B* en uno (Anexo 9).

El alelo silvestre *G6PD B* estuvo presente en 67 sujetos e identificamos 33 variantes alélicas del gen *G6PD*. Encontramos la variante *Canton* en 14 hombres y 19 mujeres. No encontramos la variante *Mediterranean* (Anexos 10 y 11).

Ochenta y cinco sujetos portan la variante *rs761142* del gen *GCLC*, 52 en estado heterocigoto y 33 en estado homocigoto (Anexo 12).

### ***Frecuencia de las variantes de CYP2C9***

La identificación de las variantes permitió calcular su frecuencia en todas las muestras. El alelo silvestre *CYP2C9\*1* se identificó 75% de los sujetos. Las variantes alélicas se presentaron en 18%, 6%, 3%, 1%, 1% y 1% para las variantes *CYP2C9\*2*, *\*3*, *\*55*, *\*26*, *\*44* y *\*45*, respectivamente (Tabla 6). El fenotipo pobre representa el 3%, el fenotipo intermedio 22% y el fenotipo normal predomina con un 75% (Tabla 7).

### ***Frecuencia de las variantes de CYP2D6***

La identificación de las variantes permitió calcular su frecuencia en todas las muestras. El alelo silvestre *CYP2D6\*1* se identificó 11% de los sujetos. Las variantes alélicas se presentaron en 89%, 3%, 3%, 2% y 1% para las variantes *CYP2D6\*rs1135824*, *\*4*, *\*50*, *\*90* y *\*6B*, respectivamente (Tabla 6). El fenotipo pobre representa el 6%, el fenotipo intermedio 2%, el fenotipo rápido con un 11% y el 81% con fenotipo desconocido (Tabla 7).

### ***Frecuencia de las variantes de G6PD***

La identificación de las variantes permitió calcular su frecuencia en todas las muestras. El alelo silvestre *G6PD B* se identificó 77% de los sujetos. La variante alélica *Canton* se presentó en estado hemocigoto polimórfico en hombres en un 14% (fenotipo pobre) mientras que en mujeres se presentó en estado heterocigoto polimórfico en 19% (fenotipo intermedio) (Tabla 8). La variante *Mediterranean* no se encontró (Tabla 8).

### ***Frecuencia de las variantes de GCLC***

La identificación de las variantes permitió calcular su frecuencia en todas las muestras. El alelo silvestre *GCLC* se identificó 15% de los sujetos. La variante alélica *rs761142* se presentó en estado homocigoto polimórfico, que determina el fenotipo pobre, en 33%; mientras que en estado heterocigoto, que determina el fenotipo intermedio, en 52% (Tabla 9).

### ***Frecuencia de los fenotipos G6PD y GCLC intermedio y pobre concomitantes en hombres y mujeres***

Se identificó la presencia simultánea del fenotipo pobre/intermedio de las enzimas G6PD y GCLC. Se encontró que 8% de hombres tienen el fenotipo G6PD pobre y fenotipo GCLC intermedio; 2% de hombres tienen el fenotipo G6PD pobre y fenotipo GCLC pobre; 16% de mujeres tienen el fenotipo G6PD intermedio y fenotipo GCLC intermedio y 3% de mujeres tienen el fenotipo G6PD intermedio y fenotipo GCLC pobre (3%) (Tabla 10).

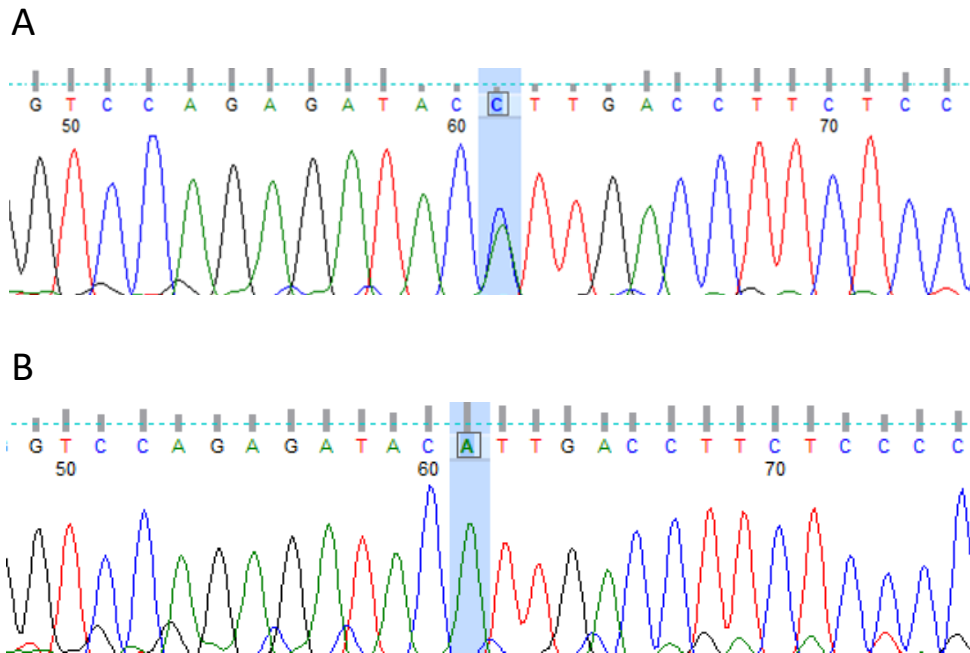
### ***Frecuencia de los fenotipos G6PD y GCLC intermedio y pobre concomitantes en hombres y mujeres***

Se identificó la presencia simultánea del fenotipo normal de CYP2C9 y el fenotipo pobre/intermedio de la enzima GCLC. Se encontró el fenotipo CYP2C9 normal y fenotipo GCLC intermedio (40%); individuos con fenotipo CYP2C9 normal y fenotipo GCLC pobre (23%); individuos con fenotipo CYP2C9 intermedio y fenotipo GCLC intermedio (11%); individuos con fenotipo CYP2C9 intermedio y fenotipo GCLC pobre (9%); individuos con fenotipo CYP2C9 pobre y fenotipo GCLC intermedio (1%); individuos con fenotipo CYP2C9 pobre y fenotipo GCLC pobre (1%) (Tabla 11).

### ***Equilibrio de Hardy-Weinberg, haplotipos y desequilibrio de ligamiento***

Entre los 27 SNPs analizados, la frecuencia de todos excepto cuatro (*CYP2D6\*50*, *CYP2D6\*90*, *rs1135824*, *G6PD-Canton* en mujeres) fue consistente con el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p \geq 0.05$ ) (Tabla 12). Debido al alto número de heterocigotos, las variantes *rs1135824* y *G6PD-Canton* fueron excluidas del análisis posterior.

Para descubrir si los SNPs ocurren juntos por azar o ligamiento, se determinaron los haplotipos y su desequilibrio de ligamiento. Se identificaron cuatro haplotipos de los cuales sólo uno (CYP2D6 T1707ΔT/G1976A) está en completo desequilibrio de ligamiento ( $D' \sim 1.00$ ) y tres (CYP2C9\*2/\*3, CYP2C9\*2/\*55, CYP2D6\*50/\*90) no lo están ( $D' \sim 0.00$ ) (Tabla 13).



**Fig. 19. Cromatogramas de una secuencia con el SNP *CYP2C9\*3* en estado heterocigoto y otra del alelo *CYP2C9\*1* (silvestre) en estado homocigoto**

Ejemplo de secuencia de un sujeto heterocigoto para la variante *CYP2C9\*3*. (A) La presencia de dos picos de A y C de intensidad similar en la posición del SNP (61), categoriza al sujeto 8 como heterocigoto. (B) La presencia de un solo pico de A en la misma posición indica que el alelo silvestre *CYP2C9\*1* de otro sujeto es homocigoto.



**Tabla 6. Frecuencia (%) de las variantes alélicas identificadas**

<b>CYP2C9</b>		<b>CYP2D6</b>		<b>GPD</b>		<b>GCLC</b>	
*1	75%	*1A	11%	<i>G6PD B</i>	67%	<i>GCLC</i>	15%
*2	18%	<i>rs1135824</i>	89%	<i>Canton</i>	33%	<i>rs761142</i>	85%
*3	6%	*4	3%	<i>Mediterranean</i>	0%		
*26	1%	*6B	1%				
*44	1%	*50	3%				
*45	1%	*90	2%				
*55	2%						

**Tabla 7. Frecuencia de los fenotipos CYP2C9 y CYP2D6**

<b>CYP2C9</b>		<b>CYP2D6</b>	
Normal	75%	Rápido	11%
Intermedio	22%	Intermedio	2%
Pobre	3%	Pobre	6%
		Indeterminado	81%

**Tabla 8. Frecuencia de genotipos *G6PD* y fenotipos *G6PD***

<b>Variante alélica</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>%</b>
<i>G6PD-Canton</i>	Homocigoto silvestre (G/G)	Normal	48
	Heterocigoto polimórfico (G/C)	Intermedio	19
	Hemicigoto polimórfico (C/-)	Pobre	14
	Hemicigoto silvestre (G/-)	Normal	19
<i>G6PD-Mediterranean</i>	Homocigoto silvestre (C/C)	Normal	100
	Heterocigoto polimórfico (C/T)	Intermedio	0
	Homocigoto polimórfico (C/C)	Pobre	0

**Tabla 9. Frecuencia de genotipos y fenotipos *GCLC rs761142* y los fenotipos correspondientes**

<b>Variante alélica</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>%</b>
<i>GCLC rs761142</i>	Homocigoto silvestre (T/T)	Normal	15
	Heterocigoto polimórfico (T/G)	Intermedio	52
	Homocigoto polimórfico (G/G)	Pobre	33

**Tabla 10. Frecuencia de fenotipos G6PD/GCLC concomitantes en hombres y mujeres**

Sexo	Fenotipos concomitantes		%
	G6PD	GCLC	
Mujeres	Intermedio	Intermedio	16
	Intermedio	Pobre	3
Hombres	Pobre	Intermedio	8
	Pobre	Pobre	2

**Tabla 11. Frecuencia de fenotipos CYP2C9/GCLC concomitantes**

<b>Fenotipos concomitantes</b>		<b>%</b>
<b>CYP2C9</b>	<b>GCLC</b>	
Normal	Intermedio	40
Normal	Pobre	23
Intermedio	Intermedio	11
Intermedio	Pobre	9
Pobre	Intermedio	1
Pobre	Pobre	1

**Tabla 12. Distribución de los genotipos**

Gen	Variante	SNP	Cambio de nucleótido	Genotipo	Observado	$\chi^2$	P <sup>a</sup>		
CYP2C9	CYP2C9*2	rs1799853	C3608T	CC	82	0.98	>0.05		
				CT	18				
				TT	0				
	CYP2C9*8	rs7900194	G3627A	GG	100	0.00	>0.05		
				GA	0				
				AA	0				
	CYP2C9*14	rs72558189	G3552A	AA	100	0.00	>0.05		
				AG	0				
				AA	0				
	CYP2C9*26	rs200965026	C3567G	CC	99	0.00	>0.05		
				CG	1				
				GG	0				
	CYP2C9*33	rs200183364	G3573A	GG	100	0.00	>0.05		
				GA	0				
				AA	0				
	CYP2C9*35	---	G3552T	GG	100	0.00	>0.05		
				GT	0				
				TT	0				
			C3608T	CC	100			0.00	>0.05
				CT	0				
				TT	0				
	CYP2C9*41	---	A3534G	AA	100	0.00	>0.05		
				AG	0				
				GG	0				
	CYP2C9*42	rs12414460	G3549A	GG	100	0.00	>0.05		
				GA	0				
				AA	0				
	CYP2C9*43	rs767576260	C3548T	CC	100	0.00	>0.05		
				CT	0				
				TT	0				
CYP2C9*44	rs200965026	C3567T	CC	99	0.00	>0.05			
			CT	1					
			TT	0					
CYP2C9*45	rs199523631	C3572T	CC	99	0.00	>0.05			
			CT	1					
			TT	0					
CYP2C9*46	rs754487195	G3623A	GG	100	0.00	>0.05			
			GA	0					
			AA	0					
CYP2C9*3	rs1057910	A42614C	AA	94	0.10	>0.05			
			AC	6					
			CC	0					

Gen	Variante	SNP	Cambio de nucleótido	Genotipo	Observado	$\chi^2$	P <sup>a</sup>
	CYP2C9*4	rs56165452	T42615C	TT	100	0.00	>0.05
				TC	0		
				CC	0		
	CYP2C9*5	rs28371686	C42619G	CC	100	0.00	>0.05
				CG	0		
				GG	0		
	CYP2C9*17	---	C42683T	CC	100	0.00	>0.05
				CT	0		
				TT	0		
	CYP2C9*24	rs749060448	G42599A	GG	100	0.00	>0.05
				GA	0		
				AA	0		
	CYP2C9*55	---	C3608T	CC	82	0.98	>0.05
				CT	18		
				TT	0		
C42620A			CC	98	0.01	>0.05	
			CA	2			
			AA	0			
CYP2D6	CYP2D6*4	rs3892097	G1846A	GG	97	0.02	>0.05
				GA	3		
				AA	0		
	CYP2D6*6A	rs5030655	T1707ΔT	TT	99	0.00	>0.05
				T ΔT	1		
				ΔTΔT	0		
	CYP2D6*6B	---	T1707ΔT	TT	99	0.00	>0.05
				TΔT	1		
				ΔTΔT	0		
			G1976A	GG	99	0.00	>0.05
				GA	1		
				AA	0		
	CYP2D6*50	rs267608302	A1720C	AA	97	23.99	<0.05
				AC	2		
				CC	1		
CYP2D6*90	rs569229126	A1693G	AA	98	43.77	<0.05	
			AG	1			
			GG	1			
A1749G	rs1135824	A1749G	AA	11	33.66	<0.05	
			AG	79			
			GG	10			
G6PD <sup>b</sup>	Canton	rs72554665	G15318A/C/T	G-	19 (H)	0.00 (H)	>0.05 (H)
				C-	14 (H)		
				GG	48 (M)		



Gen	Variante	SNP	Cambio de nucleótido	Genotipo	Observado	$\chi^2$	P <sup>a</sup>
	<i>Mediterranean</i>	rs5030868	C13168T	GC	19 (M)	36.01 (M)	<b>&lt;0.05 (M)</b>
				CC	0 (M)		
				CC	100	0.00	>0.05
				CT	0		
				TT	0		
GCLC	NA	rs761142	T17724G	TT	15	0.56	>0.05
				TG	52		
				GG	33		

<sup>a</sup> Los valores de  $P \geq 0.05$  son consistentes con el equilibrio de Hardy-Weinberg.

<sup>b</sup> Gen ligado al sexo. (H), hombres. (M), mujeres.

**Tabla 13. Distribución de haplotipos y desequilibrio de ligamiento<sup>a</sup>**

Gen	Variantes	Haplotipo		
		Composición	Frecuencia	D'
CYP2C9	*2/*3	TC	0.0024	0.17
	*2/*55	CA	0.0018	0.39
CYP2D6	*6A/G1976A	ΔTA	0.0033	1.00
	*50/*90	CG	0.0008	0.28

<sup>a</sup> Los valores de D' ~ 1.00 indican desequilibrio total.

# Discusión

En este trabajo desarrollamos un método rápido, barato y confiable para secuenciar seis amplicones que contienen polimorfismos clínicamente relevantes de cinco genes —*CYP2C9*, *CYP2C9*, *CYP2D6*, *G6PD* y *GCLC*— implicados en las reacciones adversas a SMX y CPFX, dos de los antimicrobianos más prescritos en México y en el mundo. Con el nuevo método identificamos y determinamos la frecuencia de las variantes alélicas relevantes de dichos genes en 100 residentes de la ciudad de San Luis Potosí.

## **Diseño de los ensayos de PCR**

Diseñamos los ensayos de PCR para generar los amplicones que contienen los polimorfismos clínicamente relevantes de los cuatro genes de interés involucrados en el metabolismo de SMX y CPFX empleando la estrategia desarrollada previamente en nuestro laboratorio por Guillermo Pettet (comunicación personal), en las cinco etapas descritas a continuación.

### **1. Selección de las variantes clínicamente relevantes**

Para identificar los genes involucrados en el metabolismo de SMX y CPFX y sus variantes clínicamente relevantes consultamos las publicaciones científicas pertinentes en PubMed y Google Scholar y dos bases de datos: The Pharmacogenomics Knowledgebase (<https://www.pharmgkb.org/>) y ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>). Además de las variantes clínicamente relevantes, identificamos otras variantes adicionales cercanas en tres bases de datos NCBI-SNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), GeneCards (<https://www.genecards.org>) y CYPALLELES (<https://www.cypalleles.ki.se/>).

### **2. Delimitación de las regiones génicas que contienen las variantes**

Usando las etiquetas obtenidas en NCBI-SNP buscamos las variantes en la secuencia de cada uno de los genes de referencia en NCBI-RefSeq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>). Confirmamos la localización de las variantes y que éstas estuvieran bien anotadas comparando los datos de NCBI-RefSeq,

NCBI-SNP, PharmaGKB, GeneCards, ClinVar y las publicaciones originales citadas en ellas. Finalmente delimitamos la región que incluyera todas las variantes identificadas y localizadas para cada gen de referencia.

### **3. Regiones delimitadas con flancos adicionales de ~350 pb**

Para poder diseñar una amplia combinación de parejas de oligonucleótidos iniciadores que generen amplicones con la totalidad de cada región delimitada, a la secuencia de ésta adicionamos alrededor de 350 pb en el flanco corriente arriba y abajo.

### **4. Diseño de las parejas de oligonucleótidos**

Para diseñar las parejas de oligonucleótidos iniciadores utilizamos Primer-BLAST-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) introduciendo manualmente la secuencia de la región delimitada con los flancos adicionales para humanos (*Homo sapiens*), la posición de los flancos donde deseábamos que estuvieran localizados los oligonucleótidos, su rango de temperatura de annealing y los parámetros de especificidad.

El rango de temperatura de annealing para todos los oligonucleótidos se ajustó para que el mínimo fuera 54 °C, el óptimo 57 °C y el máximo 60°C.

Con OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer/>) seleccionamos los amplicones cuyas parejas de oligonucleótidos tuvieran 1) T<sub>m</sub> de 55.5-57.5 °C, 2) contenido de GC 40-60%, 3) energía libre de Gibbs en estructuras tallo-asa > -2.0 kcal/mol, 4) energía libre de Gibbs en homodímeros > -5.0 kcal/mol, y 5) energía libre de Gibbs en heterodímeros > -5.0 kcal/mol.

### **5. Validación *in silico***

Cada pareja de oligonucleótidos seleccionadas fue evaluada con Primer-BLAST-NCBI para verificar su especificidad hacia el gen de interés.

## **Obtención de los amplicones**

### ***Condiciones preliminares***

Las condiciones preliminares para generar los seis amplicones incluyeron los componentes de las mezclas de PCR en las concentraciones recomendadas por Bartlett y Stirling (2003) excepto por dos condiciones que aumentan la eficiencia pero disminuyen la especificidad de la amplificación: mayor concentración de MgCl<sub>2</sub> (4 mM) y temperatura de annealing más baja (48 °C). En estas condiciones los amplicones estaban contaminadas con bandas inespecíficas (Figs. 3, 7 y 12; anexos 1, 4 y 6).

### ***Ajuste del contenido de DNA***

Después de obtener los primeros amplicones en condiciones preliminares disminuimos el contenido de DNA a la mitad (20 ng) para bajar la intensidad y la cantidad de bandas inespecíficas.

### ***Ajuste de la concentración de MgCl<sub>2</sub>***

El rango de concentraciones usuales de MgCl<sub>2</sub> para la Taq polimerasa es 1.0-2.5 mM, pero en cada caso la concentración debe optimizarse experimentalmente pues el exceso genera productos inespecíficos y la insuficiencia disminuye la eficiencia (Salazar et al. 2011). Los ensayos de PCR con MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM dieron las bandas de productos inespecíficos menos numerosas e intensas (Figs. 4, 8 y 13; anexos 2, 5 y 7). Otros autores también han utilizado MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM para identificar las variantes alélicas de *CYP2C9* mediante PCR-RFLP (Gill et al. 1999; Llerena et al. 2004), de *CYP2D6* mediante PCR anidada (Gan et al. 2003), de *G6PD* mediante PCR anidada (Beutler et al. 1991) y de *GCLC* mediante PCR-RFLP (Phompradit et al. 2011) (Anexos 13-18).

### ***Ajuste de la temperatura de annealing***

Las parejas diseñadas tienen el contenido de GC y la longitud adecuados para que sus temperaturas de annealing apropiadas para la PCR sean de 55 a 61 °C. Al aumentar la temperatura de annealing fueron generados menos productos inespecíficos (Figs. 5, 9 y 14; anexo 3). Nuestras condiciones no se pueden

comparar con las de otros autores porque la temperatura de annealing depende de la composición y tamaño de cada iniciador (Salazar et al. 2011).

### ***Ajuste del número de ciclos***

Con el ajuste de la concentración de MgCl<sub>2</sub> y la temperatura de annealing sólo pudimos obtener el amplicón GCLC puro (Fig.18), por lo cual decidimos disminuir el número de ciclos para el resto de los amplicones. De esta manera obtuvimos bandas únicas de los amplicones CYP2C9\*2, CYP2D6, G6PD-Canton y G6PD-Med con rendimiento suficiente para la secuenciación (Figs. 6, 15, 16 y 17).

### ***Ajuste de la concentración de oligonucleótidos***

La disminución en el número de ciclos fue suficiente para obtener todos los amplicones puros excepto el de CYP2C9\*3, para el cual decidimos probar un gradiente de concentración de oligonucleótidos (Fig. 10). El rango de concentraciones de oligonucleótidos recomendado es de 0.05 a 1.0 µM y el exceso puede hacer que se formen productos inespecíficos dados por los dímeros de iniciadores parcialmente complementarios (Pelt-Verkuil et al. 2008). Disminuyendo la concentración de 0.3 µM a 0.2 µM obtuvimos la banda única del amplicón (Fig. 11).

### **Secuenciación, identificación y frecuencia de las variantes alélicas**

La optimización de las condiciones de los ensayos de PCR nos permitió obtener bandas únicas de los amplicones CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, CYP2D6, G6PD-Canton, G6PD-Med y GCLC que luego purificamos por precipitación con etanol en presencia de acetato de sodio.

El DNA de los ensayos con bandas puras obtenidas de los primeros 10 sujetos tuvo la masa y pureza requerida ( $\geq 100$  ng,  $A_{260}/A_{280}$  1.7-2.0) para ser secuenciadas. La identidad de las secuencias de los amplicones fue confirmada por alineamiento con las secuencias de referencia. Luego obtuvimos, identificamos y comparamos las secuencias de los amplicones de los 90 sujetos restantes.

Analizamos las 100 secuencias de cada amplicón mediante la búsqueda de etiquetas marcadoras corriente arriba del SNP. Así encontramos las variantes

*CYP2C9\*2*, \*26, \*44 y \*45 en el amplicón *CYP2C9\*2* (Tabla 6); las variantes *CYP2C9\*3* y \*55 en el amplicón *CYP2C9\*3* (Tabla 6); las variantes *CYP2D6\*4*, \*6B, \*50, \*90 y *rs1135824* en el amplicón *CYP2D6* (Tabla 6); la variante *G6PD-Canton* en el amplicón *G6PD-Canton* (Tabla 8); la variante *G6PD-Mediterranean* en el amplicón *G6PD-Med* (Tabla 8); y la variante *GCLC rs761142* en el amplicón *GCLC* (Tabla 8).

### **Variantes de *CYP2C9***

Los 18 sujetos que portan la variante alélica *CYP2C9\*2* en estado heterocigoto se consideran metabolizadores intermedios de SMX por ser portadores de una copia del alelo mutado y otra del alelo silvestre (Lynch and Price 2007).

La variante *CYP2C9\*2* consiste en un SNP ubicado en el exón 3 con el cambio C430T que cambia el triplete CGT por TGT y deriva en el cambio Arg144Cys en la enzima *CYP2C9*. El cambio de aminoácido afecta la interacción con la reductasa P450 y explica el lento metabolismo de algunos sustratos de la enzima *CYP2C9* (Hirota, Eguchi, and Ieiri 2013a). Aunque la mutación no afecta sustancialmente la afinidad por el sustrato, sí afecta la actividad catalítica pues reduce la tasa de metabolismo hasta en un 50% respecto a la variante silvestre *CYP2C9\*1* (Kirchheiner and Brockmoller 2005). Gill et al. (1999) encontraron que la  $V_{max}$  de la N-hidroxilación de SMX por la enzima *CYP2C9\*2* disminuye a la cuarta parte sin cambios significativos en la  $K_m$ , en tanto que la depuración intrínseca de SMX disminuye a la tercera parte. Como *CYP2C9* actúa en la bioactivación de la SMX, algunos autores consideran a la variante *CYP2C9\*2* como un factor de protección contra la hipersensibilidad al fármaco (Gill et al. 1999; Gueant et al. 2008; Vig and Wang 2012). Como *CYP2C9* participa en el metabolismo del 15% de los medicamentos, el de muchos de ellos podría estar comprometido, especialmente los que tienen índices terapéuticos estrechos tales como warfarina, acenocumarol (anticoagulantes), fenitoína (antiepiléptico) y glipizida (antidiabético) (Zhou, Zhou, and Huang 2010).

No hay estudios publicados sobre la variante *CYP2C9\*44* en la población mexicana, por lo cual consideramos al único sujeto identificado por nosotros con esta variante en estado heterocigoto como un metabolizador intermedio, con

repercusiones potenciales sobre los efectos de SMX y otros fármacos metabolizados por la enzima (Lynch and Price 2007). La variante *CYP2C9\*44* fue descrita por primera vez en dos de 2,127 chinos Han y se sabe que el cambio Thr130Met en la enzima repercute en el metabolismo de algunos fármacos (Dai et al. 2014). Los mismos autores determinaron la actividad catalítica de la enzima con dos métodos: el ensayo P450-Glo que utiliza un sustrato quimioluminiscente y con un ensayo *in vitro* a través de la metabolización de diclofenaco, sustrato específico de CYP2C9. La variante *CYP2C9\*44* tuvo menor actividad catalítica que la *CYP2C9\*2*, pero mayor que la *CYP2C9\*3* (Dai et al. 2014). Al comparar la actividad catalítica de 36 variantes de CYP2C9 en el metabolismo de fenitoína Chen et al. (2016) encontraron que *CYP2C9\*44* afecta significativamente la Vmax pero no la Km ni la depuración intrínseca respecto a la enzima silvestre *CYP2C9\*1*; Qian et al. (2013) encontraron una disminución en la depuración intrínseca de tolbutamida (empleada para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2).

La variante *CYP2C9\*45* fue identificada en dos de 2,127 individuos chinos Han y tuvo actividad catalítica *in vitro* casi nula (Dai et al. 2014). La mutación provoca que la Vmax y la depuración intrínseca de fenitoína disminuyan y la Km aumente significativamente (Chen et al. 2016). La depuración intrínseca de tolbutamida y carvediol disminuye significativamente respecto a la enzima silvestre (Dai et al. 2013; Pan et al. 2016). Ji et al. (2015) evaluaron las características de 39 variantes de CYP2C9, entre ellas *CYP2C9\*45*, sobre el antidepresivo fluoxetina y encontraron que la enzima mutante tuvo inhibición por sustrato y que la actividad catalítica aumentó y la depuración intrínseca disminuyó respecto a la enzima silvestre. Quizás por tratarse de una mutante descubierta recientemente no ha habido estudios para identificar esta variante en la población mexicana ni sobre sus efectos en el metabolismo de la SMX. No puede afirmarse que la mutación en estado heterocigoto determine el fenotipo metabolizador intermedio, pues aunque se ha visto actividad catalítica aumentada para fluoxetina, las variantes deben caracterizarse empleando SMX como sustrato.

Encontramos la variante *CYP2C9\*26* en un sujeto en estado heterocigoto. No hay estudios de la actividad catalítica de esta variante frente a SMX y sólo se ha



reportado en población japonesa (Maekawa et al. 2006). La variante contiene un SNP en el exón 3 con el cambio de nucleótido C389G que resulta en un cambio del triplete ACG por AGG y la sustitución T130R en la enzima CYP2C9. Comparada con la enzima silvestre CYP2C9\*1, la Vmax de la variante disminuye un 90% ante diclofenaco (Maekawa et al. 2006) y es inactiva ante warfarina (Niinuma et al. 2014).

Los seis sujetos que portan CYP2C9\*3 en estado heterocigoto pueden considerarse metabolizadores intermedios de SMX porque portan una copia del alelo mutado y otra del alelo silvestre (Lynch and Price 2007). La variante determina un cambio de aminoácido en el sitio catalítico de la enzima y afecta el reconocimiento del sustrato (Hirota et al. 2013b; Kirchheiner et al. 2005). CYP2C9\*3, igual que CYP2C9\*2, se considera como un factor de protección contra la hipersensibilidad al fármaco (Gill et al. 1999; Gueant et al. 2008; Wang et al. 2012).

Encontramos CYP2C9\*55 en estado heterocigoto en dos sujetos; la variante contiene un SNP en el exón 7 con el cambio de nucleótido C1081A que resulta en un cambio del triplete CTT por ATT y la sustitución L361I en la enzima. El aminoácido 361 está cerca del grupo hemo de CYP2C9, su Vmax y Km frente a fenitoína están disminuidas 62% y 9% respectivamente, y la depuración intrínseca de tolbutamida y carvediol también están disminuidas al 42 y 6%, respectivamente en comparación con la enzima silvestre; sin embargo, la depuración intrínseca de bosentan está aumentada casi cinco veces (Chen et al. 2016). Un estudio en células de insecto mostró que la depuración intrínseca de fluoxetina aumenta respecto a la enzima frente a tolbutamida o losartan (Ji et al. 2015) y la actividad catalítica frente a propofol es similar a la silvestre (Lian et al. 2015).

La mayoría (71%) de los sujetos incluidos en este estudio portan el alelo silvestre CYP2C9\*1 en estado homocigoto. Este hallazgo concuerda con estudios previos de poblaciones indígenas mexicanas del norte (mayos, seris, tepehuanos, tarahumaras, guarijíos, coras, huicholes, mexicaneros), del centro (nahuas, tének, mazahuas, purépechas, del sur (chontales, mixtecos, mayas, chantinos y zapotecas) y de grupos de mestizos de los estados de Sonora, Zacatecas, Guerrero, Veracruz, Yucatán y Guanajuato y de la ciudad de México, así como mexicoamericanos. En todos los casos las frecuencias del alelo silvestre CYP2C9\*1

han sido altas, desde 100% en grupos nativos hasta 69% en mestizos del estado de Sonora (Castelan-Martinez et al. 2013; Dorado et al. 2011; Llerena et al. 2004; Sanchez-Pozos et al. 2016; Sosa-Macías et al. 2013; Villegas-Torres et al. 2015).

En poblaciones mexicanas no se han descrito algunas variantes alélicas que son más frecuentes en otras poblaciones del mundo o han sido descubiertas en los últimos años. Por ejemplo, las variantes *CYP2C9\*41*, *\*42*, *\*43*, *\*44*, *\*45*, *\*46* y *\*55* fueron descubiertas recientemente en la población china (Dai et al. 2014). Las variantes *CYP2C9\*5* y *CYP2C9\*8* se han identificado principalmente en afroamericanos; *CYP2C9\*5* tiene una frecuencia cercana al 3% en esta última población y *CYP2C9\*8* está relacionada con bajos requerimientos para la dosis de warfarina (Scott et al. 2009; Zhou et al. 2010). Zhao et al. (2004) identificaron por primera vez las variantes *CYP2C9\*14* y *CYP2C9\*17* en individuos del sur de Asia. Las frecuencias de *CYP2C9\*14* en europeos rondan el 0.3% y en asiáticos van del 0.2 al 0.4% (Lee et al. 2014). La actividad catalítica de *CYP2C9\*14* está disminuida hasta 90% para tolbutamida y 60% para *CYP2C9\*17* (DeLozier et al. 2005). Las variantes alélicas *CYP2C9\*26* y *CYP2C9\*33* fueron descubiertas en la población japonesa (Maekawa et al. 2009; Yin et al. 2008). Las variantes *CYP2C9\*24*, *CYP2C9\*26*, *CYP2C9\*33* y *CYP2C9\*35* tienen actividad catalítica casi nula sobre warfarina y tolbutamida y su baja frecuencia en japoneses es baja (Niinuma et al. 2014). La variante *CYP2C9\*4* es una mutante rara descubierta en un paciente japonés epiléptico con reacciones adversas a fenitoína (Zhou et al. 2010). Las variantes *CYP2C9\*26*, *CYP2C9\*44*, *CYP2C9\*45* y *CYP2C9\*55* identificadas en este trabajo no se habían descrito en la población mexicana.

Clasificamos con fenotipo intermedio a los 22 sujetos que portan las variantes *CYP2C9\*2*, *\*3*, *\*44*, *\*45* y *\*55* en baja frecuencia y estado heterocigoto. La identificación de variantes de *CYP2C9* en poblaciones mexicanas se ha enfocado principalmente a *CYP2C9\*2*, *\*3* y en algunos casos a *CYP2C9\*4*, *\*5* y *\*6*, (Dorado et al. 2011; Llerena et al. 2004; Sosa-Macías et al. 2013; Villegas-Torres et al. 2015). Sin embargo las variantes *CYP2C9\*44*, *\*45* y *\*55* han sido encontradas solamente por Villegas-Torres et al. (2015), quienes entre mestizos de la ciudad de Veracruz identificaron un individuo con la variante *CYP2C9\*1/\*5* clasificado como

metabolizador intermedio y dos con la variante *CYP2C9\*2/\*5* (uno de Zacatecas y otro de Yucatán) clasificados como metabolizadores pobres. Las frecuencias de las variantes *CYP2C9\*2* (5.7%) y *CYP2C9\*3* (10.4%) son mayores en el norte que en el centro y sur de México (Castelan-Martinez et al. 2013; Dorado et al. 2011; Sanchez-Pozos et al. 2016; Sosa-Macías et al. 2013; Villegas-Torres et al. 2015). En contraste, nosotros encontramos la variante *CYP2C9\*2* (18%) con mayor frecuencia que *CYP2C9\*3* (6%), aunque solo en estado heterocigoto. En poblaciones españolas las frecuencias de *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3* llegan a 24% y 15%, respectivamente, y es más común encontrarlas en estado homocigoto (Dorado et al. 2011; Llerena et al. 2004). Las frecuencias de *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3* obtenidas por nosotros son cercanas, aunque mayores, a las encontradas en poblaciones mestizas de la ciudad de Guanajuato (*CYP2C9\*2* 6%, *CYP2C9\*3* 4%) (Villegas-Torres et al. 2015) y la ciudad de México (*CYP2C9\*2* 8%, *CYP2C9\*3* 6%) (Castelan-Martinez et al. 2013; Villegas-Torres et al. 2015).

La distribución étnica de *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3* es muy amplia en el resto del mundo. La frecuencia de *CYP2C9\*2* es nula en poblaciones de Asia Oriental, y es del 3.2% en afroamericanos, 8-16% en caucásicos y 12% en 'hispanos'. La frecuencia de la variante *CYP2C9\*3* es 3.3-16.2% en caucásicos, 3.4% en 'hispanos', 1.1-3.3% en poblaciones de Asia Oriental, 3.3% en chinos y 1.3% en afroamericanos (Xie et al. 2002). Aunque las frecuencias varían según los grupos étnicos, en todos los casos son bajas. Las variantes *CYP2C9\*44*, *\*45* y *\*55* fueron descubiertas recientemente en China (Dai et al. 2014) y sus frecuencias en poblaciones mexicanas son desconocidas.

La actividad enzimática de las variantes *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3* está disminuida frente a SMX. La actividad de las variantes *CYP2C9\*26* y *CYP2C9\*44* también está disminuida frente a diclofenaco y fenitoína, pero no hay estudios con SMX como sustrato. La actividad catalítica de *CYP2C9\*55* varía según el sustrato pero tampoco hay estudios con SMX (Chen et al. 2016; Maekawa et al. 2006). Los sujetos que portan las variantes *CYP2C9\*2/\*3* y *CYP2C9\*44/\*26* pueden tener un fenotipo metabolizador intermedio si ambas variantes están en el mismo alelo y pobre si están alelos diferentes. El sujeto que porta las variantes *CYP2C9\*2/\*55*

puede tener un fenotipo intermedio o pobre dependiendo de la distribución alélica de las variantes y de las características de la enzima codificada por la variante alélica *CYP2C9\*55*, que no ha sido estudiada frente a SMX. Sin embargo, nosotros clasificamos a estos tres sujetos como metabolizadores pobres para evitar el riesgo de reacciones adversas a SMX.

La frecuencia de la variante *CYP2C9\*26* es del 0.2% en japoneses (Maekawa et al. 2006) y no hay estudios en poblaciones mexicanas. Con respecto a metabolizadores pobres, Sosa-Macías et al. (2016) identificaron un tepehuano nativo con genotipo *CYP2C9\*3/\*3* (1.57%) en el estado de Durango. Castelán et al. (2013) identificaron mestizos homocigotos y heterocigotos en la ciudad de México con las variantes *CYP2C9\*2/\*2*, *CYP2C9\*2/\*3* y *CYP2C9\*3/\*3* con frecuencias de 0.4, 0.7 y 0.2%, respectivamente. Nosotros encontramos posibles metabolizadores no descritos previamente en la población mexicana que portan las variantes *CYP2C9\*2/\*55* (1%) y *CYP2C9\*44/\*26* (1%) y al igual que Castelán et al. (2013), encontramos un sujeto (1%) con las variantes *CYP2C9\*2/\*3*.

### **Variantes de *CYP2D6***

La variante alélica *CYP2D6* (*rs1135824*) encontrada por nosotros en estado homocigoto en 10 sujetos y en estado heterocigoto en 79 sujetos, contiene un SNP en el exón 3 que cambia el nucleótido A580G y resulta en el cambio de triplete ACC por GAC y la sustitución N166D en la enzima *CYP2D6*. Esta variante, descrita por primera vez en 1997, se encontró con una frecuencia de 0.1% en 672 sujetos europeos (Marez et al. 1997). El haplotipo *CYP2D6\*3B* está conformado por las variantes *rs1135824* y *rs35742686*; la última causa un desfase en el marco de lectura abierto que produce una enzima no funcional (Marez et al. 1997). Sin embargo, no hay estudios sobre la actividad enzimática de la variante *CYP2D6 rs1135824*.

La variante *CYP2D6\*4* contiene un SNP en el intrón 3 que cambia el nucleótido G1846A resultante en splicing alternativo que genera una proteína no funcional. Los portadores de esta variante pueden tener muy afectada la metabolización de xenobióticos mediada por *CYP2D6*. Por ejemplo, mujeres con el genotipo *CYP2D6\*4/\*4* tienen efecto analgésico disminuido para el dolor posparto

tratado con codeína (VanderVaart et al. 2011). Otro efecto es la acumulación de altas concentraciones de fármacos metabolizados por CYP2D6 (Shams et al. 2006). En nuestro estudio encontramos la variante *CYP2D6\*4* en tres sujetos en estado heterocigoto.

Los estudios sobre la variante *CYP2D6\*50* son limitados. En el único estudio sobre su implicación en el metabolismo de bufuralol y dextrometorfano se encontró que la actividad enzimática está disminuida significativamente ( $p < 0.05$ ) en células COS-7 (Sakuyama et al. 2008). Nosotros encontramos dos sujetos con la variante en estado heterocigoto y uno en estado homocigoto.

Encontramos la variante *CYP2D6\*90* en dos sujetos: en uno en estado homocigoto y en otro en estado heterocigoto. A pesar de no haber estudios en humanos, el análisis de la actividad de esta variante en células de insecto frente a bufuralol y dextrometorfano mostró una eliminación relativa de 82.0% y 58.4%, respectivamente en comparación con la enzima silvestre (Cai et al. 2016). Otro estudio encontró actividad disminuida contra risperidón en microsomas de insecto (Wang et al. 2015).

La variante *CYP2D6\*6B* contiene dos SNPs en el exón 3. El primero es la delección puntual T1707 $\Delta$ T y el segundo el cambio G1976A; ambos resultan en un cambio del marco de lectura abierto que genera un codón de paro TGA prematuro en los nucleótidos 1711-1713, cerca del sitio de la delección (Rasmussen and Werge 2011) y una proteína CYP2D6 trunca de 153 aminoácidos a diferencia de la silvestre de 497 aminoácidos. En un paciente *CYP2D6\*6* homocigoto fue coadministrado haloperidol con CPFX, que inhibe la enzima CYP3A4 involucrada en la ruta alterna de haloperidol; el paciente desarrolló síntomas extrapiramidales porque la única ruta metabólica disponible para haloperidol era a través de la enzima CYP3A4 inhibida por CPFX (Simic et al. 2016). Por otra parte, los genotipos *CYP2D6\*6B/\*6B* y *CYP2D6\*3/\*6B* están asociados a disminución de la supervivencia libre de eventos en mujeres con cáncer de mama tratadas con tamoxifeno (Province et al. 2014). En nuestro estudio encontramos esta variante solamente en un sujeto en estado heterocigoto.

Encontramos también que 11/100 sujetos no portan las variantes *CYP2D6*\*4, \*5, \*6A, \*6B, \*50, \*90 y *rs1135824*, pero no investigamos variantes clínicamente relevantes como *CYP2D6*\*17 y \*41 ni las duplicaciones del gen. *CYP2D6* está involucrada en el metabolismo de muchos neurolépticos, antidepresivos tricíclicos, inhibidores selectivos de serotonina y bloqueadores  $\beta$  (Hersberger et al. 2000). Poco más de un tercio de caucásicos (36.4%) son metabolizadores rápidos (fenotipo normal), pero el 25.9% son metabolizadores pobres (fenotipo reducido) y tienen mayor riesgo de efectos tóxicos con las dosis clínicas rutinarias de fármacos inactivados por *CYP2D6*. Por otra parte, 1.9% de caucásicos son metabolizadores ultrarrápidos (fenotipo acelerado) y pueden no alcanzar concentraciones plasmáticas terapéuticas con las dosis rutinarias (Sachse et al. 1997). En una población mexicoamericana (n = 349) el 3.2% fue catalogado con fenotipo metabolizador pobre (Mendoza et al. 2001). Un estudio de PCR-RFLP en una población de mestizos mexicanos (n = 243) encontró 10% de metabolizadores pobres y 64.2% de metabolizadores rápidos (fenotipo normal) (Lopez et al. 2005).

Encontramos el fenotipo *CYP2D6* intermedio solamente en los dos sujetos que portan las variantes alélicas *CYP2D6*\*50/*rs1135824* y *CYP2D6*\*50/\*90 en estado heterocigoto. *CYP2D6*\*50 fue identificada en población japonesa con una frecuencia del 0.23%; puede tener repercusiones clínicas pues el cambio de aminoácido E156A genera un cambio en la carga (Soyama et al. 2004). Los mismos autores demostraron actividad enzimática disminuida en la variante (Sakuyama et al. 2008). La variante *CYP2D6*\*90 fue descrita por Qian et al. (2013) y la actividad enzimática fue determinada en células de insecto frente a bufuralol y dextrometorfano (Cai et al. 2016). Nuestro estudio parece ser el primero en identificar las variantes *CYP2D6*\*50 y *CYP2D6*\*90 en población mexicana.

Tienen fenotipo *CYP2D6* pobre el 6% de los sujetos incluidos en este estudio que portan las variantes *CYP2D6*\*4 o *CYP2D6*\*6B en estado heterocigoto y *CYP2D6*\*50 o *CYP2D6*\*90 en estado homocigoto. La variante *CYP2D6*\*50 ha sido reportada únicamente en población japonesa con una frecuencia del 0.23% (Soyama et al. 2004). De la variante *CYP2D6*\*90 solo hay datos recientes de actividad enzimática in vitro en células de insecto (Cai et al. 2016; Qian et al. 2013).

La frecuencia de *CYP2D6\*4* y *CYP2D6\*6* es del 20.7% y del 0.9% en caucásicos (Sachse et al. 1997); mientras que en mestizos mexicanos es del 11.21% y 0% (Lopez et al. 2005). En nuestro estudio es menor la frecuencia de la variante *CYP2D6\*4*, pero es mayor la de la variante *CYP2D6\*6*. Las variantes *CYP2D6\*50* y *CYP2D6\*90* no se han asociado con casos clínicos, pero sí las variantes *CYP2D6\*4* y *CYP2D6\*6*. Los portadores homocigotos de *CYP2D6\*4* transforman la codeína a morfina más lentamente que los portadores del alelo silvestre (VanderVaart et al. 2011). Por otra parte, la homocigocidad de *CYP2D6\*4* y la heterocigocidad de *CYP2D6\*6* predisponen a la aparición de síntomas extrapiramidales en pacientes que reciben tratamiento con antipsicóticos (Crescenti et al. 2008). Un paciente con genotipo *CYP2D6\*6/\*6* (metabolizador lento) desarrolló síntomas extrapiramidales por cotratamiento CPF-X-haloperidol. La causa aparente fue la inhibición por CPF-X de CYP3A4, principal enzima metabolizadora de haloperidol. Una vía alterna de metabolización del haloperidol es a través de CYP2D6, pero los niveles plasmáticos de haloperidol se elevaron porque el paciente era metabolizador pobre (Simic et al. 2016). CPF-X es un potente inhibidor de las enzimas CYP1A2 y CYP3A4, por lo cual debe tenerse especial cuidado si se coadministra con algún fármaco metabolizado por dichas enzimas y cuya ruta secundaria involucre a CYP2D6; el riesgo de efectos secundarios aumenta si el paciente porta una variante de *CYP2D6* que determine fenotipo pobre. Haloperidol, clozapina, cafeína, codeína, clorfeniramina, dextrometorfano, risperidona y tamoxifeno son fármacos de riesgo al ser coadministrados con CPF-X.

El 89% de los sujetos de este estudio que portan la variante alélica *CYP2D6 rs1135824* tienen fenotipo CYP2D6 indeterminado, porque la funcionalidad enzimática de esta variante es desconocida. La única descripción de la variante *rs1135824* parece ser la de Marez et al. (1997) quienes la encontraron en 1/672 europeos. En el modelo de la proteína variante (Fig. 29), la mutación característica de *rs1135824* está lejos de los aminoácidos E216, D301, S304, T309 y V370 de unión al sustrato (Ingelman-Sundberg 2005). El cambio de asparagina por ácido aspártico sería grave si la asparagina formara parte de una triada catalítica N-H-C, N-X-S/T o si el cambio distorsionara la nube de electrones de los aminoácidos

cercanos por impedimento estérico (como un cambio por triptófano). Como no es el caso, y la mutación se da en la zona superficial de la proteína, suponemos que el efecto de esta variante sobre la actividad enzimática es minúsculo o nulo.

### **Variantes de *G6PD***

Phompradit et al. (2011) demostraron que entre 317 individuos tailandeses solamente dos hombres (0.6%) portan la variante *G6PD-Canton*. En contraste, en nuestro estudio encontramos que 19% de las mujeres portan la variante en estado heterocigoto y 14% de los hombres en estado hemocigótico. La variante alélica *G6PD-Canton* contiene un SNP en el exón 12 del cromosoma X que cambia el nucleótido G1376A/C/T y resulta en un cambio del triplete CGT por los tripletes CAT/CCT/CTT que provocan las sustituciones R459H/R459P/R459L en la enzima G6PD. Como el gen se localiza en el cromosoma X, los hombres son hemocigotos; es decir, pueden tener expresión normal o deficiente del gen. La interpretación de los resultados debe ser más cuidadosa en las mujeres heterocigotas porque en ellas hay un efecto de mosaico genético por inactivación del cromosoma X (Cappellini and Fiorelli 2008). La variante alélica disminuye la actividad enzimática (< 10%) y ocasiona anemia hemolítica dosis-dependiente por SMX (Cappellini and Fiorelli 2008; Chan and McFadzean 1974). Serpa et al. (2010) encontraron que 5/75 pacientes con deficiencia en la actividad enzimática de G6PD (medida directamente, no inferida por genotipificación) desarrollaron anemia hemolítica al ser tratados con TMP-SMX.

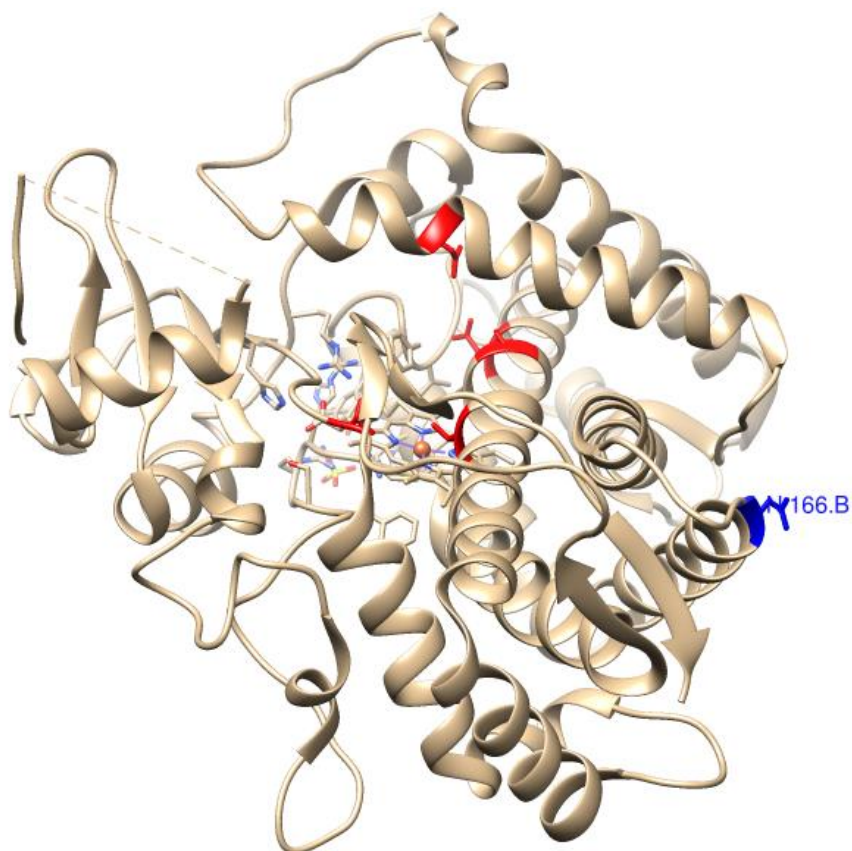
La G6PD está involucrada en la primera reacción de la ruta de las pentosas fosfato. Además de ayudar a sintetizar distintos azúcares, genera NADPH que sirve como donador de electrones y protege del estrés oxidativo, función que se logra indirectamente a través de la reducción del glutatión (GSH). Los eritrocitos no contienen mitocondrias y su única defensa ante el daño oxidativo depende principalmente del papel de la G6PD. El estrés oxidativo se manifiesta como anemia hemolítica que puede ser desencadenada por drogas, infecciones o consumo de habas. SMX y otros fármacos causan estrés oxidativo que conduce a anemia hemolítica en pacientes G6PD-deficientes por lo que la FDA ha colocado una advertencia en la etiqueta de la SMX. En el caso de SMX la oxidación de SMX-N<sup>4</sup>



hidroxilamina (SMX-HA) a SMX-nitroso libera radicales de oxígeno libres responsables del estrés oxidativo (Cappellini and Fiorelli 2008; Chan and McFadzean 1974; Mason et al. 2007; Wang et al. 2012).

Nuestro estudio complementa estudios previos en los que no ha sido reportada la variante *G6PD-Canton* en México. Un alto porcentaje de los sujetos incluidos (67%) portan el alelo *G6PD* silvestre. Sin embargo, esto no significa que el fenotipo de la enzima *G6PD* sea normal pues hay más de 140 mutaciones conocidas en el gen *G6PD* (Cappellini and Fiorelli 2008). Aunque la anemia hemolítica inducida por SMX se ha asociado únicamente a la variante *G6PD-Canton*, Phompradit et al. (2011) analizaron 10 variantes alélicas del gen *G6PD* en población tailandesa y encontraron que el 94.4% (296/317) no porta ninguna de estas variantes. La búsqueda dirigida de siete variantes del gen *G6PD* en 94 hombres chinos encontró que todos portan al menos una variante y el 50% (47/94) porta la variante *G6PD-Canton* (Chang et al. 1992). Otro estudio en China demostró que la mitad de los hombres (56/112) y 44% (44/100) de las mujeres portan la variante *G6PD-Canton* y que 8.9% de los hombres y 14% de las mujeres no portan ninguna de las nueve variantes analizadas. En 4,777 sujetos mexicanos fueron identificadas 10 variantes del gen *G6PD* con una frecuencia global del 0.71% (Nayarit 1.26%, Veracruz 1.17%, Guerrero 1.03%, Yucatán 0.80%, Sinaloa 0.78%, San Luis Potosí 0.59%, Coahuila-Durango 0.52%, Tamaulipas 0.52% y Colima 0%), pero entre las variantes identificadas no se encontró la *G6PD-Canton* (Vaca et al. 2002).

Joly et al. (2010) encontraron que 4/132 (3.0%) africanos portan la variante *G6PD-Mediterranean* que nosotros no encontramos. Esta variante contiene un SNP en el exón 6 que cambia el nucleótido C563T resultante en un cambio del triplete TCC por TTC y la sustitución S188F en la enzima. *G6PD mediterranean* se encuentra en la Clase II de deficiencia de *G6PD* y la actividad enzimática es menor al 10% en sujetos esta variante (Cappellini and Fiorelli 2008). Los pacientes con la variante *G6PD-Mediterranean* tienen mayor riesgo de anemia hemolítica cuando son tratados con CPFY (Sansone et al. 2010). El daño oxidativo en los eritrocitos probablemente es ocasionado por los radicales libres de oxígeno generados cuando es formado el oxo-CPFY.



**Fig. 20. Monómero de la proteína CYP2D6\*1 modelado en CHIMERA**

Los aminoácidos resaltados en rojo están involucrados en la unión al sustrato (E216, D301, S304, T309 y V370) y el resaltado en azul es el involucrado en la variante *CYP2D6* (*rs1135824*) que ocasiona el cambio N166D.

Treinta y tres de 3,004 italianos (1.1%) tuvieron baja actividad de G6PD y casi la mitad de los afectados (48%) correspondieron a deficiencia de clase II; la variante *G6PD-Mediterranean* se encontró en 13 sujetos (0.4%) (Maffi et al. 2014). En México se analizaron 4,777 sujetos, e igual que en este estudio, fue nula la frecuencia de la variante *G6PD-Mediterranean* (Vaca et al. 2002). Nuestro estudio concuerda con trabajos previos en México con un número mayor de sujetos. A pesar de no haber encontrado la variante *G6PD-Mediterranean*, consideramos que para evitar una posible anemia hemolítica es deseable hacer la genotipificación antes de iniciar el tratamiento con CPMX u otras quinolonas.

### **Variantes de *GCLC***

La variante alélica *GCLC* rs761142 contiene un SNP en el intrón 1 que cambia el nucleótido T17724G y disminuye la expresión del RNAm. Wang et al. (2012) cuantificaron los RNAm producidos por células hepáticas y linfocitos B en pacientes con VIH y encontraron que en heterocigotos polimórficos (T/G) el contenido de RNAm es 1.9 veces menor y en homocigotos polimórficos (G/G) es 3.8 veces menor que en los homocigotos silvestres (T/T) ( $p = 0.00012$ ). Hay una relación entre la hipersensibilidad inducida por SMX y los pacientes VIH positivos que portan la variante *GCLC* rs761142 ( $p = 0.045$ ), pero no hay estudios en pacientes sin VIH (Wang et al. 2012). En contraste con el estudio de Wang et al. (2012) que entre 420 sujetos encontraron 43.1% de heterocigotos polimórficos y únicamente 10.5% de homocigotos polimórficos, nosotros encontramos 52% de heterocigotos polimórficos y 33% de homocigotos polimórficos. Estos resultados implican que el 85% de los sujetos incluidos en nuestro estudio están en riesgo de sufrir efectos adversos por SMX u otros fármacos en los que GSH actúa como agente de protección redox.

Wang et al. (Wang et al. 2012) encontraron que el 46.4% de 420 sujetos caucásicos portan el alelo *GCLC* silvestre en estado homocigoto. En contraste, solamente 15% de los sujetos incluidos en este estudio portan el alelo *GCLC* silvestre en estado homocigoto. La variante *GCLC* 5' UTR trinucleótido-repetido GAG está relacionada con la severidad de la fibrosis quística pulmonar ( $p = 0.001$ ) y la vulnerabilidad a la esquizofrenia (Gysin et al. 2007; McKone et al. 2006). Por otra parte, la variante *GCLC* rs17883901 está implicada en la disfunción vasomotora

endotelial coronaria y el infarto al miocardio (Koide et al. 2003). Sin embargo, ambas variantes no están relacionadas con el riesgo de hipersensibilidad a SMX (Wang et al. 2012). Además del estudio de Wang et al. (2012), el nuestro parece ser el único adicional que demuestra la presencia de la variante *GCLC rs761142* y determina su frecuencia.

A pesar de que la enzima G6PD es el factor principal en la formación de GSH reducido, la presencia de la variante *GCLC rs761142* podría aumentar el riesgo o la severidad de la anemia hemolítica porque con la variante disminuye 1.9-3.8 veces la cantidad de RNA mensajero del gen *GCLC* (involucrado en la biosíntesis de GSH) (Wang et al. 2012). Hasta donde sabemos no hay estudios publicados que relacionen la variante *GCLC rs761142* con el riesgo de anemia hemolítica inducida por SMX. En este estudio encontramos que 8% de los hombres tienen fenotipo G6PD pobre concomitante con fenotipo *GCLC* intermedio; 2% de los hombres tienen fenotipo G6PD pobre concomitante con fenotipo *GCLC* pobre; 16% de las mujeres tienen fenotipo G6PD intermedio concomitante con fenotipo *GCLC* intermedio; y 3% de las mujeres tienen fenotipo G6PD intermedio concomitante con fenotipo *GCLC* pobre. Nuestros resultados concuerdan con los de Chan y McFadzean (1974) de que el fenotipo pobre o intermedio de G6PD, debido a la variante *G6PD-Canton*, es el factor principal que predispone a anemia hemolítica inducida por SMX. Además, proponemos que su concomitancia con el fenotipo intermedio o pobre de la enzima *GCLC* debido a la variante *GCLC rs761142* podría aumentar el riesgo o la severidad de la anemia hemolítica.

La formación de SMX-NO, principal responsable de la hipersensibilidad a SMX, es causada por la oxidación de SMX-HA formado a su vez directamente por acción oxidativa de la enzima CYP2C9. Por eso las variantes alélicas del gen *CYP2C9* que determinan fenotipo metabolizador intermedio o pobre son consideradas como un factor de protección porque catalizan la formación más lenta de SMX-HA (Gill et al. 1999; Gueant et al. 2008; Vig and Wang 2012). A pesar de que el estado funcional de la enzima *CYP2C9* es uno de los principales factores en la formación del metabolito tóxico SMX-NO, Wang et al. (2012) demostraron que la presencia de la variante *GCLC rs761142* está vinculada a la aparición de

hipersensibilidad en pacientes VIH positivos. No obstante, no hay estudios sobre la incidencia de reacciones de hipersensibilidad en pacientes con diversos fenotipos de CYP2C9 y GCLC. En nuestro estudio el 40% de los individuos tiene fenotipo CYP2C9 normal concomitante con fenotipo intermedio de GCLC en tanto que el 23% tiene fenotipo normal de CYP2C9 concomitante con fenotipo GCLC pobre. Creemos que el riesgo de hipersensibilidad a SMX con el fenotipo GCLC pobre o intermedio sería mayor si es concomitante con el fenotipo CYP2C9 normal que con el fenotipo CYP2C9 pobre o intermedio.

### **Equilibrio de Hardy-Weinberg, haplotipos y desequilibrio de ligamiento**

Como el método de reconstrucción de haplotipos usado no depende estrictamente del equilibrio Hardy-Weinberg, excepto cuando la proporción de variantes heterocigotas es alta, solamente las variantes *CYP2D6* rs1135824 y *G6PD-Canton* fueron excluidas del siguiente análisis (Stephens et al. 2001). Debido a que el alelo *CYP2D6\*6B* es un haplotipo que incluye los cambios de base T1707ΔT y G1976A, cada SNP se trató de forma independiente dando lugar a éste haplotipo con alto desequilibrio de ligando lo cual es consistente con reportes previos (Daly et al. 1995).

Además, como los SNPs que componen los haplotipos restantes se encontraron por asociación aleatoria (valores  $D'$  bajos), parece no existir ningún bloque de haplotipos particular con los SNPs identificados en este estudio.

A pesar de no estar en equilibrio de Hardy-Weinberg, la variante *CYP2D6* rs1135824 debe ser estudiada más a fondo porque parece formar parte del haplotipo A2549ΔA/rs1135824 (variante *CYP2D6\*3B*) en la cual A2549ΔA ocasiona una mutación de cambio de fase de lectura que produce una enzima no funcional (Marez et al. 1997). Los valores de  $D'$  and  $r^2$  deben definirse para predecir la actividad funcional de *CYP2D6* dentro de la población estudiada.

### **Implicaciones y perspectivas**

Nuestro método de genotipificación, basado en la evidencia directa que representan las secuencias nucleotídicas, permitió identificar un total de 28 variantes alélicas y

no sólo las siete variantes descritas previamente en poblaciones mexicanas (*CYP2C9*\*2, \*3, \*4 y \*5; *CYP2D6*\*4, \*5, \*6; *G6PD-Canton, Mediterranean*).

Las variantes *CYP2C9*\*26, \*44, \*45, \*55 y *CYP2D6* rs1135824, \*50 y \*90 y *GCLC* rs761142 no habían sido descritas en poblaciones mexicanas.

La capacidad del método para identificar variantes de las enzimas *CYP2C9*, *CYP2D6*, *GCLC* y *G6PD* involucradas en el metabolismo de fármacos con índices terapéuticos estrechos permitirá determinar la frecuencia de dichas variantes en la población y servirá para predecir la respuesta individual, así como adecuar la dosis de los fármacos para aumentar su eficacia y prevenir las reacciones adversas.

Convendría realizar análisis farmacocinéticos de SMX y CPFX en los sujetos que portan las variantes, pues ambos fármacos son ampliamente utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias.

## Referencias

- Anadon A, Martinez-Larranaga MR, Iturbe J, Martinez MA, Diaz MJ, Frejo MT, Martinez M (2001) Pharmacokinetics and residues of ciprofloxacin and its metabolites in broiler chickens. *Res Vet Sci* 71:101-9
- Bartlett JS, Stirling D (2003) *PCR Protocols*. Humana Press, New Jersey
- Beutler E, Kuhl W, Gelbart T, Forman L (1991) DNA sequence abnormalities of human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *J Biol Chem* 266:4145-50
- Bohm R, Cascorbi I (2016) Pharmacogenetics and Predictive Testing of Drug Hypersensitivity Reactions. *Front Pharmacol* 7:396-406
- Bottari NB, Baldissera MD, Tonin AA, Rech VC, Nishihira VS, Thome GR, Schetinger MR, Morsch VM, Camillo G, Vogel FF, Tochetto C, Figuera R, Machado G, Stefani LM, Da Silva AS (2015) Sulfamethoxazole-trimethoprim associated with resveratrol for the treatment of toxoplasmosis in mice: Influence on the activity of enzymes involved in brain neurotransmission. *Microb Pathog* 79:17-23
- Cai J, Dai DP, Geng PW, Wang SH, Wang H, Zhan YY, Huang XX, Hu GX, Cai JP (2016) Effects of 22 Novel CYP2D6 Variants Found in the Chinese Population on the Bufuralol and Dextromethorphan Metabolisms In Vitro. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 118:190-9
- Cappellini MD, Fiorelli G (2008) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 371:64-74
- Castelan-Martinez OD, Hoyo-Vadillo C, Sandoval-Garcia E, Sandoval-Ramirez L, Gonzalez-Ibarra M, Solano-Solano G, Gomez-Diaz RA, Parra EJ, Cruz M, Valladares-Salgado A (2013) Allele frequency distribution of CYP2C9 2 and CYP2C9 3 polymorphisms in six Mexican populations. *Gene* 523:167-72
- Crescenti A, Mas S, Gasso P, Parellada E, Bernardo M, Lafuente A (2008) Cyp2d6\*3, \*4, \*5 and \*6 polymorphisms and antipsychotic-induced

- extrapyramidal side-effects in patients receiving antipsychotic therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35:807-11
- Chan TK, McFadzean JS (1974) Haemolytic effect of trimethoprim-sulphamethoxazole in G-6-PD deficiency. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 68:61-2
- Chang JG, Chiou SS, Perng LI, Chen TC, Liu TC, Lee LS, Chen PH, Tang TK (1992) Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency by natural and amplification created restriction sites: five mutations account for most G6PD deficiency cases in Taiwan. *Blood* 80:1079-82
- Chen LG, Wang Z, Zhu Y, Xiong JH, Sun LR, Dai DP, Cai JP, Hu GX (2016) In vitro metabolism of phenytoin in 36 CYP2C9 variants found in the Chinese population. *Chem Biol Interact* 253:93-9
- Dai DP, Xu RA, Hu LM, Wang SH, Geng PW, Yang JF, Yang LP, Qian JC, Wang ZS, Zhu GH, Zhang XH, Ge RS, Hu GX, Cai JP (2014) CYP2C9 polymorphism analysis in Han Chinese populations: building the largest allele frequency database. *Pharmacogenomics J* 14:85-92
- Daly AK, Leathart JB, London SJ, Idle JR (1995) An inactive cytochrome P450 CYP2D6 allele containing a deletion and a base substitution. *Hum Genet* 95:337-41
- Dorado P, Sosa-Macias MG, Penas-Lledo EM, Alanis-Banuelos RE, Wong ML, Licinio J, Lares-Asseff I, Llerena A (2011) CYP2C9 allele frequency differences between populations of Mexican-Mestizo, Mexican-Tepehuano, and Spaniards. *Pharmacogenomics J* 11:108-12
- Ewald H, Raatz H, Boscacci R, Furrer H, Bucher HC, Briel M (2015) Adjunctive corticosteroids for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with HIV infection. *Cochrane Database Syst Rev*:CD006150
- Gan SH, Ismail R, Wan Adnan WA, Wan Z (2003) Standard CYP2D6 genotyping procedures fail for the CYP2D6\*5 and duplication alleles when hair roots are used as a source of DNA. *Clin Chim Acta* 329:61-8



- Gill HJ, Tjia JF, Kitteringham NR, Pirmohamed M, Back DJ, Park BK (1999) The effect of genetic polymorphisms in CYP2C9 on sulphamethoxazole N-hydroxylation. *Pharmacogenetics* 9:43-53
- Gueant JL, Gueant-Rodriguez RM, Gastin IA, Cornejo-Garcia JA, Viola M, Barbaud A, Mertes PM, Blanca M, Romano A (2008) Pharmacogenetic determinants of immediate and delayed reactions of drug hypersensitivity. *Curr Pharm Des* 14:2770-7
- Gysin R, Kraftsik R, Sandell J, Bovet P, Chappuis C, Conus P, Deppen P, Preisig M, Ruiz V, Steullet P, Tosic M, Werge T, Cuenod M, Do KQ (2007) Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16621-6
- Hersberger M, Marti-Jaun J, Rentsch K, Hanseler E (2000) Rapid detection of the CYP2D6\*3, CYP2D6\*4, and CYP2D6\*6 alleles by tetra-primer PCR and of the CYP2D6\*5 allele by multiplex long PCR. *Clin Chem* 46:1072-7
- Hiratsuka M (2016) Genetic Polymorphisms and in Vitro Functional Characterization of CYP2C8, CYP2C9, and CYP2C19 Allelic Variants. *Biol Pharm Bull* 39:1748-1759
- Hirota T, Eguchi S, Ieiri I (2013) Impact of genetic polymorphisms in CYP2C9 and CYP2C19 on the pharmacokinetics of clinically used drugs. *Drug Metab Pharmacokinet* 28:28-37
- Ingelman-Sundberg M (2005) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 5:6-13
- Ji Y, Chen S, Zhao L, Pan P, Wang L, Cai J, Dai D, Hu G, Cai JP, Huang H (2015) In vitro assessment of 39 CYP2C9 variants found in the Chinese population on the metabolism of the model substrate fluoxetine and a summary of their effects on other substrates. *J Clin Pharm Ther* 40:320-7
- Johnson JA, Burkley BM, Langae TY, Clare-Salzler MJ, Klein TE, Altman RB (2012) Implementing personalized medicine: development of a cost-effective customized pharmacogenetics genotyping array. *Clin Pharmacol Ther* 92:437-9

- Joly P, Lacan P, Garcia C, Martin C, Francina A (2010) Rapid genotyping of two common G6PD variants, African (A-) and Mediterranean, by high-resolution melting analysis. *Clin Biochem* 43:193-7
- Koide S, Kugiyama K, Sugiyama S, Nakamura S, Fukushima H, Honda O, Yoshimura M, Ogawa H (2003) Association of polymorphism in glutamate-cysteine ligase catalytic subunit gene with coronary vasomotor dysfunction and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 41:539-45
- Lancaster AK, Single RM, Solberg OD, Nelson MP, Thomson G (2007) PyPop update--a software pipeline for large-scale multilocus population genomics. *Tissue Antigens* 69 Suppl 1:192-7
- Lee PW (2014) *Handbook of metabolic pathways of xenobiotics*. John Wiley & Sons Inc., Chichester, West Sussex
- Leiro V, Fernandez-Villar A, Valverde D, Constenla L, Vazquez R, Pineiro L, Gonzalez-Quintela A (2008) Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 homozygous null mutations on the risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in a Caucasian population. *Liver Int* 28:835-9
- Li C, Long J, Hu X, Zhou Y (2013) GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity: an updated meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32:859-68
- Lian QQ, Pan PP, Li JW, Lin H, Hu GX, Zuo MZ, Cai JP (2015) Impact of CYP2C9 polymorphism found in the Chinese population on the metabolism of propofol in vitro. *Biol Pharm Bull* 38:531-5
- Lopez M, Guerrero J, Jung-Cook H, Alonso ME (2005) CYP2D6 genotype and phenotype determination in a Mexican Mestizo population. *Eur J Clin Pharmacol* 61:749-54
- Lynch T, Price A (2007) The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician* 76:391-6
- Llerena A, Dorado P, O'Kirwan F, Jepson R, Licinio J, Wong ML (2004) Lower frequency of CYP2C9\*2 in Mexican-Americans compared to Spaniards. *Pharmacogenomics J* 4:403-6

- Maekawa K, Fukushima-Uesaka H, Tohkin M, Hasegawa R, Kajio H, Kuzuya N, Yasuda K, Kawamoto M, Kamatani N, Suzuki K, Yanagawa T, Saito Y, Sawada J (2006) Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of CYP2C9 in Japanese. *Pharmacogenet Genomics* 16:497-514
- Maffi D, Pasquino MT, Mandarino L, Tortora P, Girelli G, Meo D, Grazzini G, Caprari P (2014) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Italian blood donors: prevalence and molecular defect characterization. *Vox Sang* 106:227-33
- Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Lo Guidice JM, Spire C, Lafitte JJ, Meyer UA, Broly F (1997) Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics* 7:193-202
- Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F (2007) G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev* 21:267-83
- McDonagh EM, Boukouvala S, Aklillu E, Hein DW, Altman RB, Klein TE (2014) PharmGKB summary: very important pharmacogene information for N-acetyltransferase 2. *Pharmacogenet Genomics* 24:409-25
- McKone EF, Shao J, Frangolias DD, Keener CL, Shephard CA, Farin FM, Tonelli MR, Pare PD, Sandford AJ, Aitken ML, Kavanagh TJ (2006) Variants in the glutamate-cysteine-ligase gene are associated with cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 174:415-9
- Mendoza R, Wan YJ, Poland RE, Smith M, Zheng Y, Berman N, Lin KM (2001) CYP2D6 polymorphism in a Mexican American population. *Clin Pharmacol Ther* 70:552-60
- Montero R, Araujo A, Carranza P, Mejia-Loza V, Serrano L, Albores A, Salinas JE, Camacho-Carranza R (2007) Genotype frequencies of polymorphic GSTM1, GSTT1, and cytochrome P450 CYP1A1 in Mexicans. *Hum Biol* 79:299-312
- Naisbitt DJ, Farrell J, Gordon SF, Maggs JL, Burkhart C, Pichler WJ, Pirmohamed M, Park BK (2002) Covalent binding of the nitroso metabolite of

- sulfamethoxazole leads to toxicity and major histocompatibility complex-restricted antigen presentation. *Mol Pharmacol* 62:628-37
- Novelli G (2010) Personalized genomic medicine. *Intern Emerg Med* 5 Suppl 1:S81-90
- Ott G, Plitzko B, Krischkowski C, Reichmann D, Bittner F, Mendel RR, Kunze T, Clement B, Havemeyer A (2014) Reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine (SMX-HA) by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *Chem Res Toxicol* 27:1687-95
- Parry MF, Smego DA, Digiovanni MA (1988) Hepatobiliary kinetics and excretion of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 32:982-5
- Pelt-Verkuil E, Belkum A, Hays JP (2008) Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Springer new Jersey
- Pettet-Ruiz G (2017) Farmacogenética basada en la secuencia de regiones polimórficas de los genes involucrados en el metabolismo de isoniacida *Biología Molecular*. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí
- Phompradit P, Kuesap J, Chaijaroenkul W, Rueangweerayut R, Hongkaew Y, Yamnuan R, Na-Bangchang K (2011) Prevalence and distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Thai and Burmese populations in malaria endemic areas of Thailand. *Malar J* 10:368
- Province MA, Goetz MP, Brauch H, Flockhart DA, Hebert JM, Whaley R, Suman VJ, Schroth W, Winter S, Zembutsu H, Mushiroda T, Newman WG, Lee MT, Ambrosone CB, Beckmann MW, Choi JY, Dieudonne AS, Fasching PA, Ferraldeschi R, Gong L, Haschke-Becher E, Howell A, Jordan LB, Hamann U, Kiyotani K, Krippel P, Lambrechts D, Latif A, Langsenlehner U, Lorzio W, Neven P, Nguyen AT, Park BW, Purdie CA, Quinlan P, Renner W, Schmidt M, Schwab M, Shin JG, Stingl JC, Wegman P, Wingren S, Wu AH, Ziv E, Zirpoli G, Thompson AM, Jordan VC, Nakamura Y, Altman RB, Ames MM, Weinshilboum RM, Eichelbaum M, Ingle JN, Klein TE, International Tamoxifen Pharmacogenomics C (2014) CYP2D6 genotype and adjuvant

- tamoxifen: meta-analysis of heterogeneous study populations. *Clin Pharmacol Ther* 95:216-27
- Qian JC, Xu XM, Hu GX, Dai DP, Xu RA, Hu LM, Li FH, Zhang XH, Yang JF, Cai JP (2013) Genetic variations of human CYP2D6 in the Chinese Han population. *Pharmacogenomics* 14:1731-43
- Rasmussen HB, Werge T (2011) Novel variant of CYP2D6\*6 is undetected by a commonly used genotyping procedure. *Pharmacol Rep* 63:1264-6
- Reinhart JM, Motsinger-Reif A, Dickey A, Yale S, Trepanier LA (2016) Genome-Wide Association Study in Immunocompetent Patients with Delayed Hypersensitivity to Sulfonamide Antimicrobials. *PLoS One* 11:e0156000
- Ross KA, Bigam AW, Edwards M, Gozdzik A, Suarez-Kurtz G, Parra EJ (2010) Worldwide allele frequency distribution of four polymorphisms associated with warfarin dose requirements. *J Hum Genet* 55:582-9
- Sacco JC, Abouraya M, Motsinger-Reif A, Yale SH, McCarty CA, Trepanier LA (2012) Evaluation of polymorphisms in the sulfonamide detoxification genes NAT2, CYB5A, and CYB5R3 in patients with sulfonamide hypersensitivity. *Pharmacogenet Genomics* 22:733-40
- Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I (1997) Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 60:284-95
- Sakuyama K, Sasaki T, Ujiiie S, Obata K, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M (2008) Functional characterization of 17 CYP2D6 allelic variants (CYP2D6.2, 10, 14A-B, 18, 27, 36, 39, 47-51, 53-55, and 57). *Drug Metab Dispos* 36:2460-7
- Salazar AM, Sandoval AS, Armendáriz JS (2011) *Biología molecular*. McGraw Hill, México
- Sanchez-Pozos K, Rivera-Santiago C, Garcia-Rodriguez MH, Ortiz-Lopez MG, Pena-Espinoza BI, Granados-Silvestre ML, Llerena A, Menjivar M (2016) Genetic variability of CYP2C9\*2 and CYP2C9\*3 in seven indigenous groups from Mexico. *Pharmacogenomics*

- Sansone S, Rottensteiner J, Stocker J, Rosanelli C, Wiedermann CJ (2010) Ciprofloxacin-induced acute haemolytic anaemia in a patient with glucose-6-phosphate dehydrogenase Mediterranean deficiency: a case report. *Ann Hematol* 89:935-7
- Serpa JA, Villarreal-Williams E, Giordano TP (2010) Prevalence of G6PD deficiency in a large cohort of HIV-infected patients. *J Infect* 61:399-402
- Shams ME, Arneth B, Hiemke C, Dragicevic A, Muller MJ, Kaiser R, Lackner K, Hartter S (2006) CYP2D6 polymorphism and clinical effect of the antidepressant venlafaxine. *J Clin Pharm Ther* 31:493-502
- Shimatsu K, Subramaniam S, Sim H, Aronowitz P (2014) Ciprofloxacin-induced tendinopathy of the gluteal tendons. *J Gen Intern Med* 29:1559-62
- Simic I, Potocnjak I, Kraljickovic I, Stanic Benic M, Cegec I, Juricic Nahal D, Ganoci L, Bozina N (2016) CYP2D6 \*6/\*6 genotype and drug interactions as cause of haloperidol-induced extrapyramidal symptoms. *Pharmacogenomics* 17:1385-9
- Sosa-Macias M, Lazalde-Ramos BP, Galaviz-Hernandez C, Rangel-Villalobos H, Salazar-Flores J, Martinez-Sevilla VM, Martinez-Fierro ML, Dorado P, Wong ML, Licinio J, A LL (2013) Influence of admixture components on CYP2C9\*2 allele frequency in eight indigenous populations from Northwest Mexico. *Pharmacogenomics J* 13:567-72
- Sosa-Macías M, Lazalde-Ramos BP, Galaviz-Hernandez C, Rangel-Villalobos H, Salazar-Flores J, Martinez-Sevilla VM, Martinez-Fierro ML, Dorado P, Wong ML, Licinio J, A LL (2013) Influence of admixture components on CYP2C9\*2 allele frequency in eight indigenous populations from Northwest Mexico. *Pharmacogenomics J* 13:567-72
- Sosa-Macías M, Llerena A (2013) Cytochrome P450 genetic polymorphisms of Mexican indigenous populations. *Drug Metabol Drug Interact* 28:193-208
- Soyama A, Kubo T, Miyajima A, Saito Y, Shiseki K, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Tomoike H, Ozawa S, Sawada J (2004) Novel nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in the CYP2D6 gene. *Drug Metab Pharmacokinet* 19:313-9

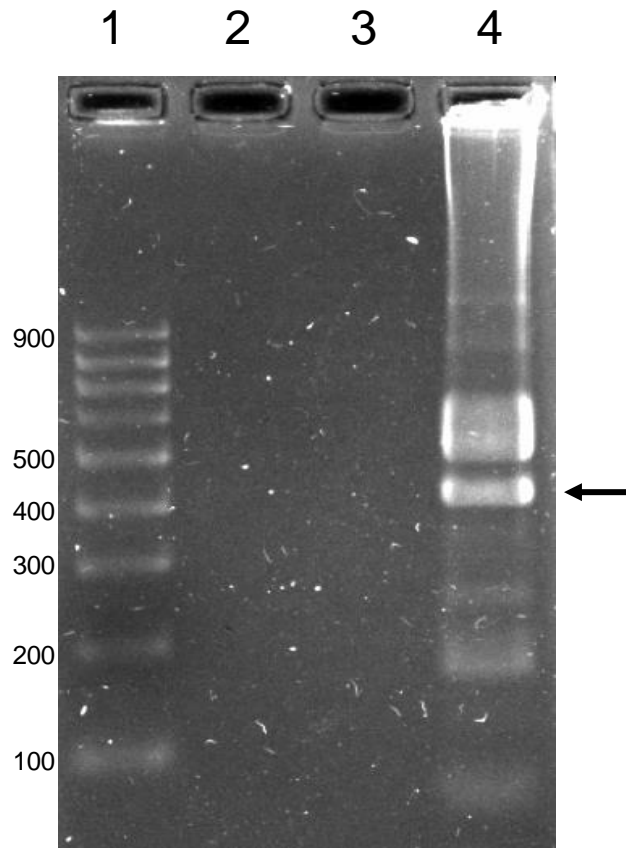
- Stephens M, Donnelly P (2003) A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 73:1162-9
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68:978-89
- Taja-Chayeb L, Agundez JA, Miguez-Munoz C, Chavez-Blanco A, Duenas-Gonzalez A (2012) Arylamine N-acetyltransferase 2 genotypes in a Mexican population. *Genet Mol Res* 11:1082-92
- Twist GP, Gaedigk A, Miller NA, Farrow EG, Willig LK, Dinwiddie DL, Petrikin JE, Soden SE, Herd S, Gibson M, Cakici JA, Riffel KA, Leeder JS, Dinakarbandian D, Kingsmore SF (2016) Constellation: a tool for rapid, automated phenotype assignment of a highly polymorphic pharmacogene, CYP2D6, from whole-genome sequences. *Nature partner journal Genomic medicine*
- Vaca G, Arambula E, Esparza A (2002) Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Mexico: overall results of a 7-year project. *Blood Cells Mol Dis* 28:436-44
- VanderVaart S, Berger H, Sistonen J, Madadi P, Matok I, Gijsen VM, de Wildt SN, Taddio A, Ross CJ, Carleton BC, Hayden MR, Koren G (2011) CYP2D6 polymorphisms and codeine analgesia in postpartum pain management: a pilot study. *Ther Drug Monit* 33:425-32
- Vig HS, Wang C (2012) The evolution of personalized cancer genetic counseling in the era of personalized medicine. *Fam Cancer* 11:539-44
- Villegas-Torres B, Sanchez-Giron F, Jaramillo-Villafuerte K, Soberon X, Gonzalez-Covarrubias V (2015) Genotype frequencies of VKORC1 and CYP2C9 in native and Mestizo populations from Mexico, potential impact for coumarin dosing. *Gene* 558:235-40
- Vogenberg FR, Isaacson Barash C, Pursel M (2010) Personalized medicine: part 1: evolution and development into theranostics. *P T* 35:560-76
- Wang D, Curtis A, Papp AC, Koletar SL, Para MF (2012) Polymorphism in glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) is associated with

- sulfamethoxazole-induced hypersensitivity in HIV/AIDS patients. *BMC Med Genomics* 5:32
- Wang ZH, Zhan YY, Li YX, Yang CC, Cai J, Dai DP, Hu GX, Cai JP (2015) Effects of 24 CYP2D6 Variants Found in the Chinese Population on the Metabolism of Risperidone. *Pharmacology* 96:290-5
- Watkins S, Pichler WJ (2013) Activating interactions of sulfonilamides with T cell receptors. *Open Journal of Immunology* 3:139-157
- Wolkenstein P, Lorient MA, Aractingi S, Cabelguenne A, Beaune P, Chosidow O (2000) Prospective evaluation of detoxification pathways as markers of cutaneous adverse reactions to sulphonamides in AIDS. *Pharmacogenetics* 10:821-8
- Xie HG, Prasad HC, Kim RB, Stein CM (2002) CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Adv Drug Deliv Rev* 54:1257-70
- Yun J, Cai F, Lee FJ, Pichler WJ (2016) T-cell-mediated drug hypersensitivity: immune mechanisms and their clinical relevance. *Asia Pac Allergy* 6:77-89
- Zhou SF, Zhou ZW, Huang M (2010) Polymorphisms of human cytochrome P450 2C9 and the functional relevance. *Toxicology* 278:165-88



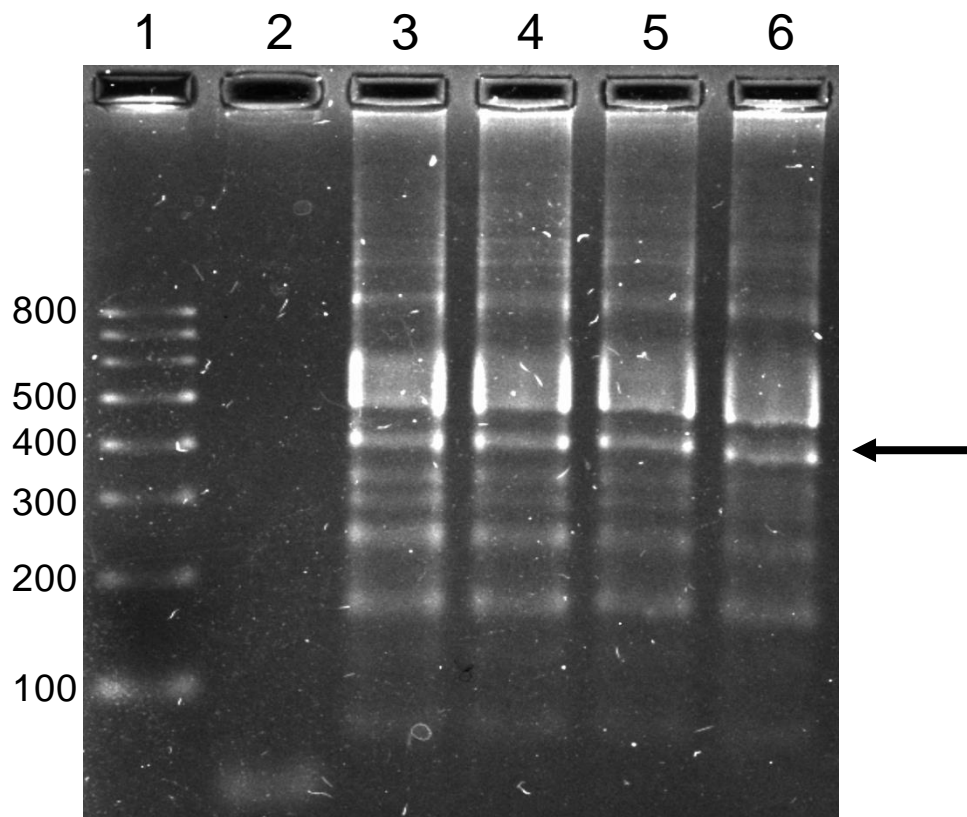
# Anexos

Anexo 1. Electroferograma de la mezcla de PCR para el amplicón G6PD-Canton en condiciones preliminares (40 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, annealing a 48.0 °C, 30 ciclos)



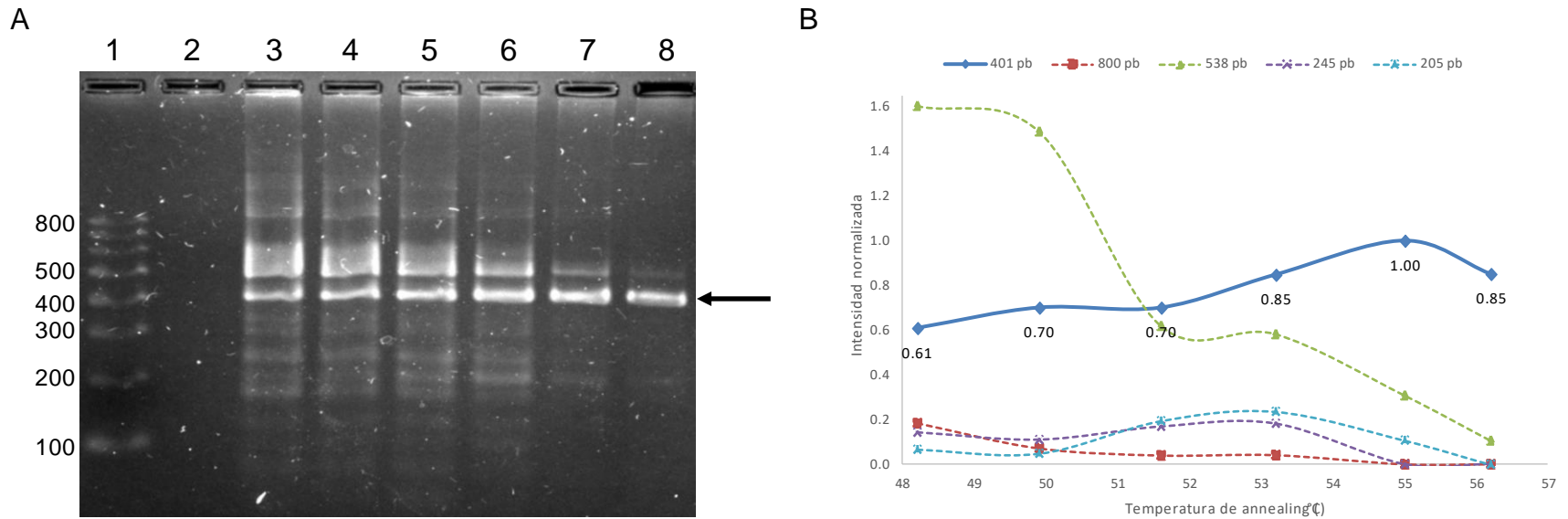
Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Blanco (sin DNA). Carril 3, Sin muestra. Carril 4, Muestra DNA. La flecha de la derecha señala la banda principal esperada de 401 pb.

**Anexo 2. Electroferograma de mezclas de PCR para el amplicón G6PD-Canton con MgCl<sub>2</sub> 1.5-4.0 mM (20 ng de DNA, annealing 48.0 °C, 30 ciclos)**



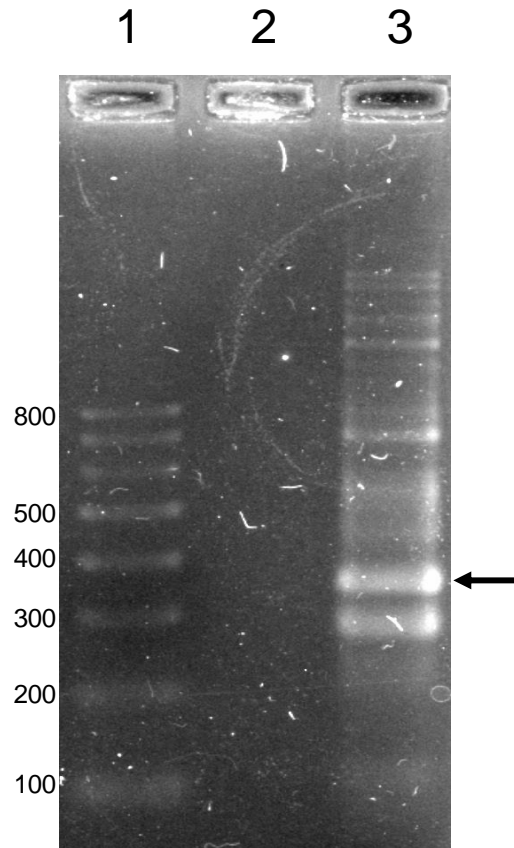
Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Blanco (sin DNA). Carril 3, MgCl<sub>2</sub> 4 mM. Carril 4, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Carril 5, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Carril 6, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM. La flecha de la derecha señala la banda principal esperada de 401 pb.

**Anexo 3. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas respecto al valor máximo de la banda de 401 pb de mezclas de PCR para el amplicón G6PD-Canton con temperaturas de annealing de 48.2 a 56.2 °C (20 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 30 ciclos)**



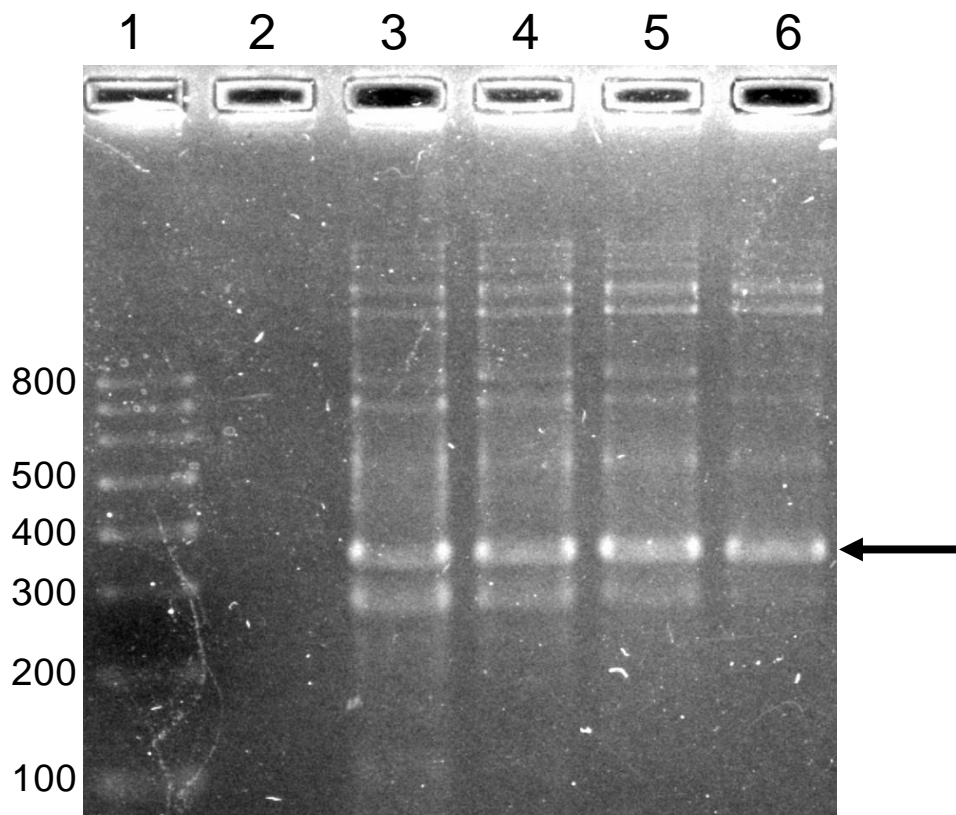
(A) Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Bk (sin ADN) 48.2 °C. Carril 3, 48.2 °C. Carril 4, 49.9 °C. Carril 5, 51.6 °C. Carril 6, 53.2 °C. Carril 7, 55 °C. Carril 8, 56.2 °C. La flecha de la derecha señala la banda esperada de 401 pb. (B) Gráfica de intensidades relativas de las bandas de 347, 800, 538, 245 y 205 pb con respecto al valor máximo de la banda de 401 a 55.0 °C.

**Anexo 4. Electroferograma de la mezcla de PCR para el amplicón G6PD-Med en condiciones preliminares (40 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, annealing a 48.0 °C, 30 ciclos)**



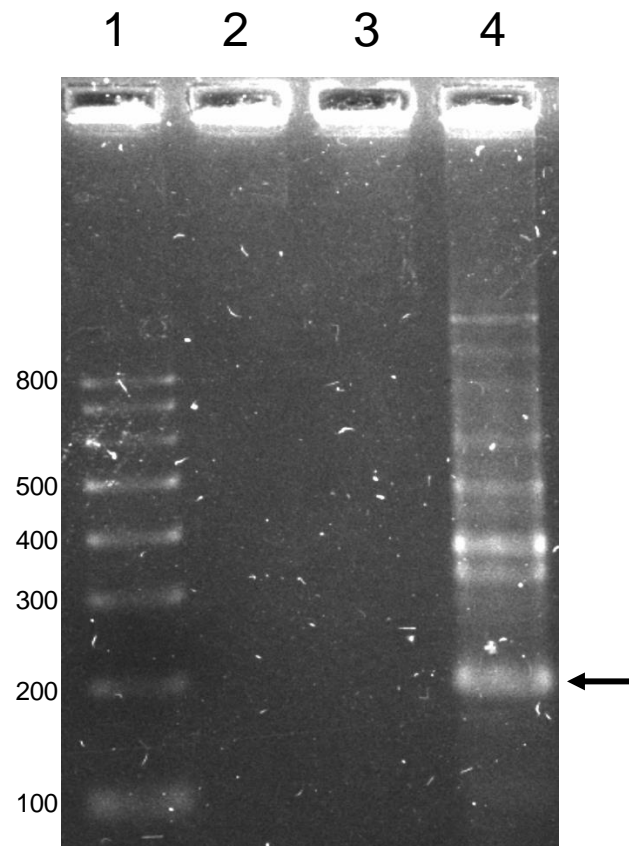
Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Blanco (sin DNA). Carril 3, Muestra DNA. La flecha de la derecha señala la banda principal esperada de 350 pb.

**Anexo 5. Electroferograma de las mezclas de PCR para el amplicón G6PD-Med con MgCl<sub>2</sub> 1.5-4.0 mM (20 ng de DNA, annealing 48.0 °C, 30 ciclos)**



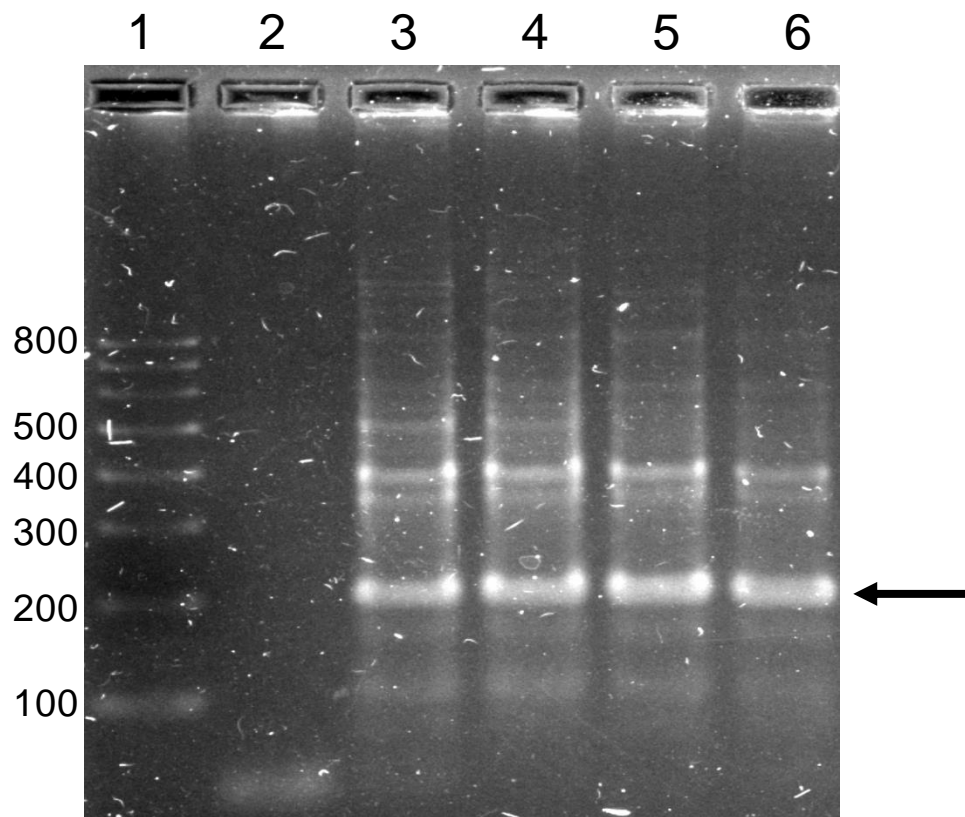
Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Blanco (sin DNA). Carril 3, MgCl<sub>2</sub> 4 mM. Carril 4, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Carril 5, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Carril 6, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM. La flecha de la derecha señala la banda principal esperada de 350 pb.

**Anexo 6. Electroferograma de la mezcla de PCR para el amplicón GCLC en condiciones preliminares (40 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, annealing a 48 °C, 30 ciclos)**



Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Blanco (sin DNA). Carril 3, Sin muestra. Carril 4, Muestra con DNA. La flecha de la derecha señala la banda principal esperada de 197 pb.

**Anexo 7. Electroferograma de las mezclas de PCR para el amplicón GCLC con MgCl<sub>2</sub> 1.5-4 mM (20 ng de DNA, annealing a 48.0 °C, 30 ciclos)**



Gel SB-agarosa al 2%. Carril 1, Escalera 100 pb. Carril 2, Blanco (sin DNA). Carril 3, MgCl<sub>2</sub> 4 mM. Carril 4, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Carril 5, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Carril 6, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM. La flecha de la derecha señala la banda principal esperada de 197 pb.

## Anexo 8. Genotipos CYP2C9 y fenotipos identificados

Muestra	Genotipo	Fenotipo
2i 2	*1/*1	N
2i 3	*1/*1	N
2i 4	*1/*1	N
2i 5	*1/*1	N
2i 6	*1/*1	N
2i 7	*1/*1	N
2i 8	*3/*1	I
2i 9	*1/*1	N
2i 10	*1/*1	N
2i 11	*2/*1	I
2i 12	*1/*1	N
2i 13	*1/*1	N
2i 14	*2/*1	I
2i 15	*1/*1	N
2i 16	*2/*1	I
2i 17	*1/*1	N
2i 20	*1/*1	N
2i 21	*1/*1	N
2i 22	*1/*1	N
2i 23	*1/*1	N
2i 26	*1/*1	N
2i 28	*45/*1	I
2i 30	*44/*1 *26/*1	P
2i 31	*1/*1	N
2i 32	*2/*1	I
2i 36	*1/*1	N
2i 37	*1/*1	N
2i 38	*1/*1	N
2i 39	*1/*1	N
2i 41	*1/*1	N

Muestra	Genotipo	Fenotipo
2i 42	*3/*1	I
2i 43	*1/*1	N
2i 45	*1/*1	N
2i 47	*1/*1	N
2i 48	*1/*1	N
2i 51	*1/*1	N
2i 52	*1/*1	N
1i 21	*2/*1	I
1i 22	*2/*1	I
1i 23	*1/*1	N
1i 24	*3/*1	I
1i 26	*2/*1	I
1i 27	*2/*1	I
1i 28	*2/*1	I
1i 29	*1/*1	N
1i 30	*1/*1	N
1i 31	*2/*1	I
1i 32	*2/*1	I
1i 33	*1/*1	N
1i 34	*1/*1	N
1i 35	*1/*1	N
1i 36	*1/*1	N
1i 37	*1/*1	N
1i 38	*1/*1	N
1i 40	*1/*1	N
1i 101	*1/*1	N
1i 102	*1/*1	N
1i 103	*1/*1	N
1i 104	*1/*1	N
1i 105	*1/*1	N
1i 107	*1/*1	N
1i 108	*3/*1	I

Muestra	Genotipo	Fenotipo
1i 109	*1/*1	N
1i 111	*1/*1	N
1i 113	*1/*1	N
1i 114	*1/*1	N
1i 115	*1/*1	N
1i 116	*1/*1	N
1i 117	*1/*1	N
1i 118	*1/*1	N
1i 119	*1/*1	N
1i 120	*1/*1	N
1i 126	*1/*1	N
1i 127	*1/*1	N
1i 128	*1/*1	N
1i 129	*1/*1	N
1i 130	*1/*1	N
1i 131	*2/*1	I
1i 133	*3/*1	I
1i 134	*2/*1 *55/*1	P
1i 135	*55/*1	I
1i 136	*1/*1	N
1i 137	*1/*1	N
1i 138	*1/*1	N
1i 139	*1/*1	N
1i 140	*1/*1	N
1i 141	*1/*1	N
1i 142	*2/*1 *3/*1	P
1i 143	*1/*1	N
1i 144	*2/*1	I
1i 145	*1/*1	N
1i 146	*1/*1	N
1i 147	*1/*1	N

Muestra	Genotipo	Fenotipo
1i 148	*1/*1	N
1i 150	*1/*1	N
1i 161	*1/*1	N
1i 162	*2/*1	I
1i 163	*1/*1	N
1i 164	*2/*1	I
1i 165	*1/*1	N

N, normal. I, intermedio.  
P, fenotipo pobre



## Anexo 9. Genotipos CYP2D6 y fenotipos identificados

Muestra	Genotipo	Fenotipo
2i 2	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 3	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 4	CYP2D6*1/ CYP2D6*1	N
2i 5	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 6	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 7	CYP2D6*1/ CYP2D6*1	N
2i 8	CYP2D6*1/ CYP2D6*1	N
2i 9	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 10	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 11	CYP2D6*1/ CYP2D6*1	N
2i 12	CYP2D6*1/ CYP2D6*1	N
2i 13	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 14	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 15	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1 CYP2D6*50/ CYP2D6*1 CYP2D6*90/ CYP2D6*1	I
2i 16	CYP2D6*1/ CYP2D6*1	N
2i 17	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 20	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 21	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 22	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 23	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 26	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 28	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 30	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1 CYP2D6*4/ CYP2D6*1	P
2i 31	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 32	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 36	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 37	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 38	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 39	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D

Muestra	Genotipo	Fenotipo
2i 41	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 42	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*rs1135824	D
2i 43	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 45	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 47	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 48	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 51	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
2i 52	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 21	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 22	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 23	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 24	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 26	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*rs1135824	D
1i 27	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 28	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 29	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 30	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1 CYP2D6*4/ CYP2D6*1	P
1i 31	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 32	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 33	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 34	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1 CYP2D6*4/ CYP2D6*1	P
1i 35	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 36	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*rs1135824	D
1i 37	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 38	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 40	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 101	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*rs1135824	D
1i 102	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1 CYP2D6*50/ CYP2D6*1	I
1i 103	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D

Muestra	Genotipo	Fenotipo
1i 104	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*rs1135824	D
1i 105	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 107	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 108	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 109	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 111	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 113	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 114	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 115	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 116	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 117	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*rs1135824	D
1i 118	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*rs1135824	D
1i 119	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 120	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 126	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*rs1135824 CYP2D6*6B /CYP2D6*1	P
1i 127	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*rs1135824	D
1i 128	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 129	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 130	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 131	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 133	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 134	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 135	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 136	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 137	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 138	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 139	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*rs1135824	D
1i 140	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 141	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1 CYP2D6*90 /CYP2D6*90	P
1i 142	CYP2D6*1/ CYP2D6*1	N
1i 143	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1 CYP2D6*50/ CYP2D6*50	P

Muestra	Genotipo	Fenotipo
1i 144	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 145	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 146	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 147	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 148	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 150	CYP2D6*1/ CYP2D6*1	N
1i 161	CYP2D6*1/ CYP2D6*1	N
1i 162	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 163	CYP2D6*1/ CYP2D6*1	N
1i 164	CYP2D6*rs1135824 /CYP2D6*1	D
1i 165	CYP2D6*1/ CYP2D6*1	N

N, normal. I, intermedio. P, pobre. D, desconocido. 2i, muestras ISSSTE 2. 1i, muestras ISSSTE 1.

**Anexo 10. Genotipos G6PD-Canton y fenotipos identificados**

Muestra	Genotipo	Fenotipo
2i 2	G/C	I
2i 3	G/C	I
2i 4	G/G	N
2i 5	G/C	I
2i 6	G/G	N
2i 7	G/G	N
2i 8	G/G	N
2i 9	G/G	N
2i 10	G/G	N
2i 11	G/C	I
2i 12	G/C	I
2i 13	G/C	I
2i 14	G/G	N
2i 15	G/C	I
2i 16	G/G	N
2i 17	G/C	I
2i 20	G/G	N
2i 21	G/C	I
2i 22	G/C	I
2i 23	G/C	I
2i 26	G/G	N
2i 28	G/G	N
2i 30	G/G	N
2i 31	G/G	N
2i 32	G/C	I
2i 36	G/C	I

Muestra	Genotipo	Fenotipo
2i 37	G/C	I
2i 38	G/G	N
2i 39	G/C	I
2i 41	G/C	I
2i 42	G/G	N
2i 43	G/C	I
2i 45	G/C	I
2i 47	G/C	I
2i 48	G/C	I
2i 51	G/G	N
2i 52	G/G	N
1i 21	G/G	N
1i 22	G/G	N
1i 23	G/G	N
1i 24	G/G	N
1i 26	G/G	N
1i 27	G/G	N
1i 28	G/G	N
1i 29	G/G	N
1i 30	G/G	N
1i 31	G/G	N
1i 32	G/G	N
1i 33	G/G	N
1i 34	G/G	N
1i 35	G/G	N
1i 36	G/G	N

Muestra	Genotipo	Fenotipo
1i 37	G/G	N
1i 38	G/G	N
1i 40	G/G	N
1i 101	G/G	N
1i 102	G/G	N
1i 103	G/C	I
1i 104	G/G	N
1i 105	G/C	I
1i 107	G/C	I
1i 108	G/G	N
1i 109	G/C	I
1i 111	G/C	I
1i 113	G/G	N
1i 114	G/G	N
1i 115	G/G	N
1i 116	G/G	N
1i 117	G/G	N
1i 118	G/G	N
1i 119	G/G	N
1i 120	G/G	N
1i 126	G/C	I
1i 127	G/C	I
1i 128	G/C	I
1i 129	G/C	I
1i 130	G/G	N
1i 131	G/G	N

Muestra	Genotipo	Fenotipo
1i 133	G/G	N
1i 134	G/C	I
1i 135	G/C	I
1i 136	G/G	N
1i 137	G/C	I
1i 138	G/G	N
1i 139	G/C	I
1i 140	G/G	N
1i 141	G/G	N

Muestra	Genotipo	Fenotipo
1i 142	G/G	N
1i 143	G/G	N
1i 144	G/G	N
1i 145	G/G	N
1i 146	G/G	N
1i 147	G/G	N
1i 148	G/G	N
1i 150	G/G	N
1i 161	G/G	N

Muestra	Genotipo	Fenotipo
1i 162	G/G	N
1i 163	G/G	N
1i 164	G/G	N
1i 165	G/G	N

N, normal. I, intermedio. P, pobre. 2i, muestras ISSSTE 2. 1i, muestras ISSSTE 1. G/G, homocigoto silvestre. G/C, heterocigoto polimórfico.

## Anexo 11. Genotipos *G6PD-Mediterranean* y fenotipos identificados

.5	Genotipo	Fenotipo
2i 2	C/C	N
2i 3	C/C	N
2i 4	C/C	N
2i 5	C/C	N
2i 6	C/C	N
2i 7	C/C	N
2i 8	C/C	N
2i 9	C/C	N
2i 10	C/C	N
2i 11	C/C	N
2i 12	C/C	N
2i 13	C/C	N
2i 14	C/C	N
2i 15	C/C	N
2i 16	C/C	N
2i 17	C/C	N
2i 20	C/C	N
2i 21	C/C	N
2i 22	C/C	N
2i 23	C/C	N
2i 26	C/C	N
2i 28	C/C	N
2i 30	C/C	N
2i 31	C/C	N
2i 32	C/C	N
2i 36	C/C	N
2i 37	C/C	N
2i 38	C/C	N
2i 39	C/C	N
2i 41	C/C	N
2i 42	C/C	N
2i 43	C/C	N
2i 45	C/C	N
2i 47	C/C	N
	C/C	N
2i 51	C/C	N
2i 52	C/C	N
1i 21	C/C	N
1i 22	C/C	N
1i 23	C/C	N

.5	Genotipo	Fenotipo
1i 24	C/C	N
1i 26	C/C	N
1i 27	C/C	N
1i 28	C/C	N
1i 29	C/C	N
1i 30	C/C	N
1i 31	C/C	N
1i 32	C/C	N
1i 33	C/C	N
1i 34	C/C	N
1i 35	C/C	N
1i 36	C/C	N
1i 37	C/C	N
1i 38	C/C	N
1i 40	C/C	N
1i 101	C/C	N
1i 102	C/C	N
1i 103	C/C	N
1i 104	C/C	N
1i 105	C/C	N
1i 107	C/C	N
1i 108	C/C	N
1i 109	C/C	N
1i 111	C/C	N
1i 113	C/C	N
1i 114	C/C	N
1i 115	C/C	N
1i 116	C/C	N
1i 117	C/C	N
1i 118	C/C	N
1i 119	C/C	N
1i 120	C/C	N
1i 126	C/C	N
1i 127	C/C	N
1i 128	C/C	N
1i 129	C/C	N
1i 130	C/C	N
1i 131	C/C	N
1i 133	C/C	N
1i 134	C/C	N

.5	Genotipo	Fenotipo
1i 135	C/C	N
1i 136	C/C	N
1i 137	C/C	N
1i 138	C/C	N
1i 139	C/C	N
1i 140	C/C	N
1i 141	C/C	N
1i 142	C/C	N
1i 143	C/C	N
1i 144	C/C	N
1i 145	C/C	N
1i 146	C/C	N
1i 147	C/C	N
1i 148	C/C	N
1i 150	C/C	N
1i 161	C/C	N
1i 162	C/C	N
1i 163	C/C	N
1i 164	C/C	N
1i 165	C/C	N

N, normal. I, intermedio. P, pobre. 2i, muestras ISSSTE 2. 1i, muestras ISSSTE 1. C/C, homocigoto silvestre. C/T, heterocigoto polimórfico.

## Anexo 12. Genotipos *GCLC* y fenotipos identificados

Muestra	Genotipo	Fenotipo
2i 2	T/G	I
2i 3	G/G	P
2i 4	G/G	P
2i 5	T/G	I
2i 6	T/T	N
2i 7	T/G	I
2i 8	T/G	I
2i 9	T/T	N
2i 10	G/G	P
2i 11	G/G	P
2i 12	T/G	I
2i 13	T/G	I
2i 14	T/T	N
2i 15	T/G	I
2i 16	G/G	P
2i 17	T/G	I
2i 20	T/G	I
2i 21	G/G	P
2i 22	T/G	I
2i 23	T/G	I
2i 26	G/G	P
2i 28	T/G	I
2i 30	T/G	I
2i 31	T/G	I
2i 32	T/G	I
2i 36	T/T	N
2i 37	T/G	I
2i 38	T/G	I
2i 39	T/G	I
2i 41	G/G	P
2i 42	G/G	P
2i 43	T/T	N
2i 45	T/G	I
2i 47	T/G	I
2i 48	T/G	I
2i 51	T/T	N
2i 52	G/G	P
1i 21	T/G	I
1i 22	T/G	I
1i 23	G/G	P
1i 24	G/G	P
1i 26	T/G	I
1i 27	T/T	N
1i 28	G/G	P
1i 29	G/G	P
1i 30	T/G	I
1i 31	G/G	P
1i 32	G/G	P
1i 33	T/T	N
1i 34	G/G	P
1i 35	T/G	I
1i 36	T/G	I
1i 37	T/T	N
1i 38	T/G	I
1i 40	G/G	P

Muestra	Genotipo	Fenotipo
1i 101	G/G	P
1i 102	T/G	I
1i 103	T/G	I
1i 104	T/G	I
1i 105	T/G	I
1i 107	T/G	I
1i 108	G/G	P
1i 109	T/G	I
1i 111	T/T	N
1i 113	G/G	P
1i 114	T/G	I
1i 115	T/T	N
1i 116	G/G	P
1i 117	T/G	I
1i 118	T/G	I
1i 119	T/G	I
1i 120	T/T	N
1i 126	T/G	I
1i 127	G/G	P
1i 128	T/G	I
1i 129	T/G	I
1i 130	G/G	P
1i 131	T/G	I
1i 133	T/G	I
1i 134	T/T	N
1i 135	T/G	I
1i 136	T/G	I
1i 137	T/G	I
1i 138	G/G	P
1i 139	G/G	P
1i 140	G/G	P
1i 141	G/G	P
1i 142	G/G	P
1i 143	G/G	P
1i 144	T/T	N
1i 145	T/G	I
1i 146	G/G	P
1i 147	T/G	I
1i 148	T/T	N
1i 150	T/G	I
1i 161	G/G	P
1i 162	G/G	P
1i 163	T/G	I
1i 164	T/G	I
1i 165	T/G	I

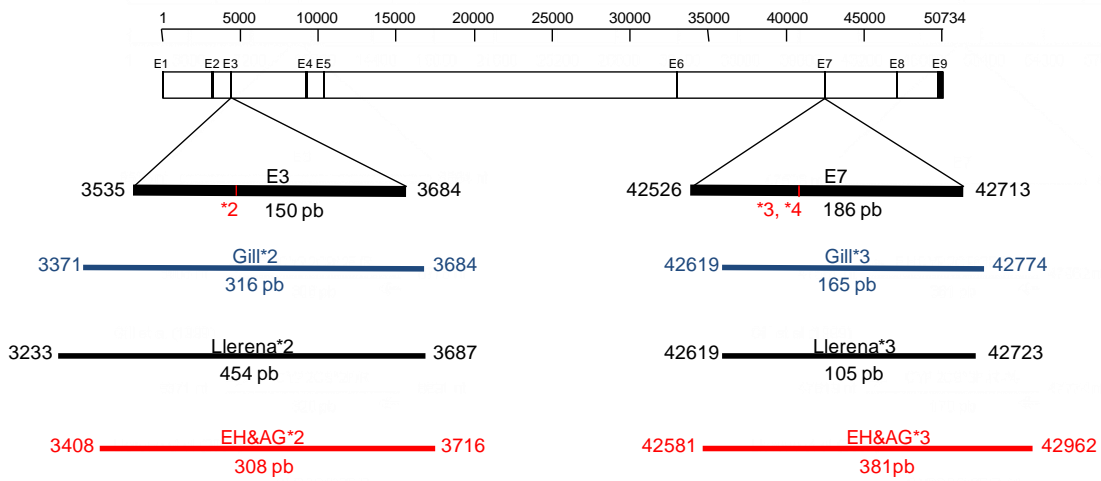
N, normal. I, intermedio. P, pobre. 2i, muestras ISSSTE 2. 1i, muestras ISSSTE 1. T/T, homocigoto silvestre. T/G, heterocigoto polimórfico. G/G, homocigoto polimórfico.

**Anexo 13. Condiciones para generar los amplicones de los genes *CYP2C9*, *CYP2D6*, *G6PD* y *GCLC* en este y en otros estudios**

Amplicón	SNP	Iniciadores		Condiciones de amplificación						Referencias	
		Secuencia	Tm	PCR	Ciclos	DNA	MgCl <sub>2</sub>	Iniciadores	TA		
Gill*2	<i>CYP2C9</i> *2	F1: TGCAAGTGCCTGTTTCAGCA	58.0	PF	35	50 ng	1.5 mM	0.4 µM	60.0	Gill et al. (1999)	
		R1: AGCCTTGTTTTTCTCAACTC	53.3								
Gill*3	<i>CYP2C9</i> *3 <i>CYP2C9</i> *4	F2: AATAATAATATGCACGAGGTCCAGAGATGC	58.3	PF	35	50 ng	1.5 mM	0.25 µM	55.0		
		F3: AATAATAATATGCACGAGGTCCAGAGGTAC	57.7								
		R2: GATACTATGAATTTGGGACTTC	48.6								
Llerena*2	<i>CYP2C9</i> *2	F1: GTATTTTGGCCTGAAACCCATA	53.2	PF	25	NE	1.5 mM	0.5 µM	62.0		Llerena et al. (2004)
		R1: GGCCTTGTTTTTCTCAACTC	54.3								
Llerena*3	<i>CYP2C9</i> *3 <i>CYP2C9</i> *4	F2: TGCACGAGGTCCAGAGGTAC	58.8	PF	30	NE	1.5 mM	0.5 µM	64.0		
		R2: ACAAACTTACCTTGGGAATGAGA	54.1								
Sosa*2	<i>CYP2C9</i> *2	NE	NE	TR	40	20 ng	NE	NE	60.0		Sosa-Macias et al. (2013)
Sosa*3	<i>CYP2C9</i> *3	NE	NE	TR	40	20 ng	NE	NE	60.0		
EH&AG*2	<i>CYP2C9</i> *2	F: GGGAGGATGAAAACAGAGACTTA	56.1	PF	25	20 ng	1.5 mM	0.3 µM	56.6	Este trabajo.	
		R: GGTCACTGATATGGAGTAGGGTC	56.1								
EH&AG*3	<i>CYP2C9</i> *3 <i>CYP2C9</i> *4	F: GCAAGACAGGACCCACATG	56.4	PF	25	20 ng	1.5 mM	0.2 µM	57.0		
		R: AGCACCTAAGAGTAGCCAAACC	56.8								
Gan*4	<i>CYP2D6</i> *4	F: ATTTCCCAGTGGAAATCC	52.2	A	35 y 15	20 ng	1.5 mM	0.25 µM	58 y 60		Gan et al. (2003)
		R: GAGACTCCTCGGTCTCTC	53.4								
Rasmussen*6	<i>CYP2D6</i> *6	F: TCCCAGCTGGAATCCGGTGTCTG	63.5	PF	15 y 27	50 ng	1.5 mM	0.2 µM	63 y 53	Rasmussen and Werge (2011)	
		R: GGAGCTCGCCCTGCAGAGACTCCT	63.3								
Hernández	<i>CYP2D6</i> *4 <i>CYP2D6</i> *6	F: CTTCTCCGTGTCCACCTTG	55.4	PF	25	20 ng	1.5 mM	0.3 µM	58.2	Este trabajo	
		R: AAAGCCCAGCTCCTCTTC	56.9								
Wang	<i>GCLC</i> (rs761142)	F: CAACAGTTGGTTCTAGCAAAGGA	55.6	PF	30	NE	NE	NE	NE	Wang et al. (2012)	
		R1: CCACACTGCTGGCTCTCTGTAA	59.1								
		R2: CCACACTGCTGGCTCTCTGTAC	59.7								
Hernández	<i>GCLC</i> (rs761142)	F: GCAGGCTTGTTTAGGAGTTAGTG	55.8	PF	30	20 ng	1.5 mM	0.3 µM	56.2	Este trabajo.	
		R: AGTCCAGGTAGAGTATGCGTG	56.0								
Phompradit	<i>G6PD</i> -Canton	F: ACGTGAAGCTCCCTGACGC	60.2	PF	1 y 35	NE	1.5 mM	0.25 µM	58	Phompradit et al. (2011)	
		R: GTGAAAATACGCCAGGCCCTTA	55.4								
Chang	<i>G6PD</i> -Canton	F: ACGTGAAGCTCCCTGACGC	60.2	PF	NE	NE	NE	NE	57.8	Chang et al. (1992)	
		R: TGAAAATACGCCAGGCCTCG	57.8								
Hernández	<i>G6PD</i> -Canton	F: GGGGATCAGGAAGTGAGTCTTG	57.0	PF	25	20 ng	1.5 mM	0.3 µM	60.0	Este trabajo.	
		R: GGACATGACAACCTGGGGCTTC	56.3								
Beutler	<i>G6PD</i> -Mediterranean	F: AGGAGTTCTGGCCTCTACT	57.2	A	15 y 35	1000 ng	3.4 mM	NE	58	Beutler et al. (1991)	
		R: TGCCTCGTCACAGATGGGCC	62.4								
		F2: GGTTCAAGGGGTAACGCAG	58.4								
Joly	<i>G6PD</i> -Mediterranean	F: TCTGACCCGGTGTCCAAC	57.4	PF	35	50 ng	1.5 mM	0.4 µM	59	Joly et al. (2010)	
		R: GTCGATGCGGTAGATCTGGT	56.5								
Hernández	<i>G6PD</i> -Mediterranean	F: AACCGCATCATCGTGGAGAAG	57.5	PF	25	20 ng	1.5 mM	0.3 µM	61.2	Este trabajo	
		R: CCGAAGATCCTGTTGGCAAATC	56.4								

NE, no especificada. PF, punto final. TA, temperatura de annealing (°C). Tm, Temperatura de fusión en °C, calculada con el programa Tm calculator (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). TR, tiempo real. F, iniciador forward. R, iniciador reverse. A, PCR anidada.

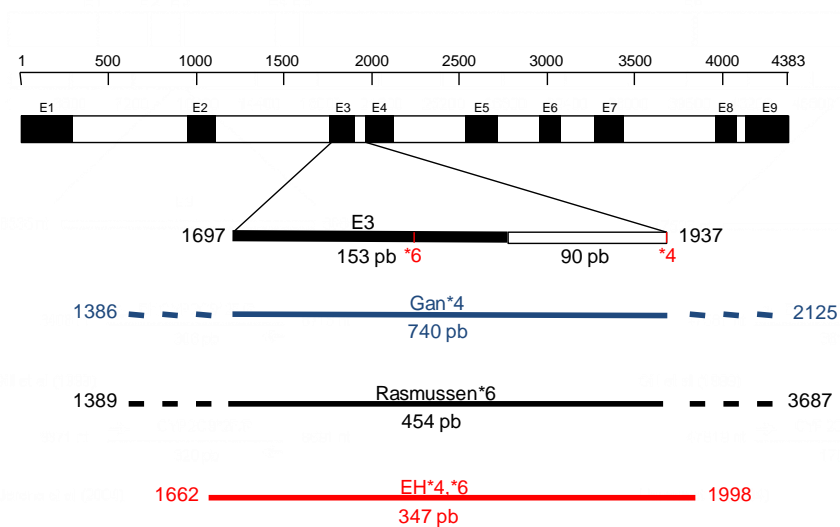
## Anexo 14. Amplicones de los exones 3 y 7 del gen *CYP2C9*



El gen *CYP2C9* (localizado en el cromosoma 10) contiene 8 intrones y 9 exones y tiene una longitud total de 50,734 pb. El exón 3 (E3, 150 pb) contiene el SNP *CYP2C9*\*2 (rs1799853, C430T, R144C). El exón 7 (E7, 186 pb) contiene los SNPs *CYP2C9*\*3 (rs1057910, A1075C, I359L) y *CYP2C9*\*4 (rs56165452, T1076C/A, I359T) (véase la Tabla 2).

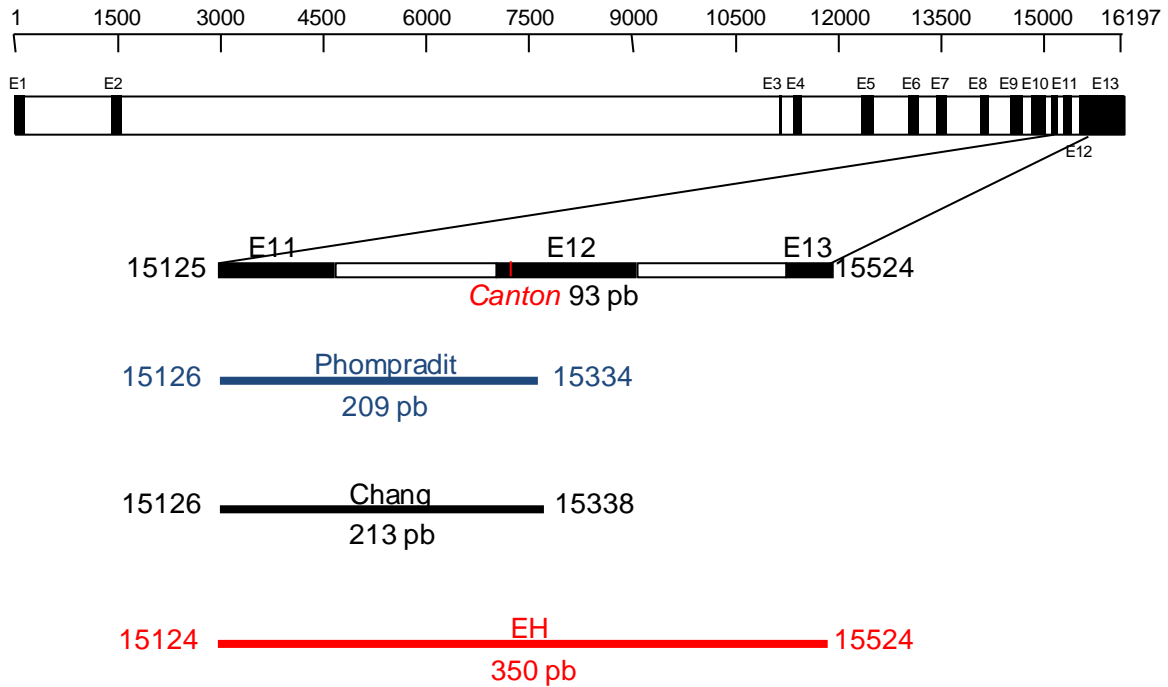


## Anexo 15. Amplificación CYP2D6



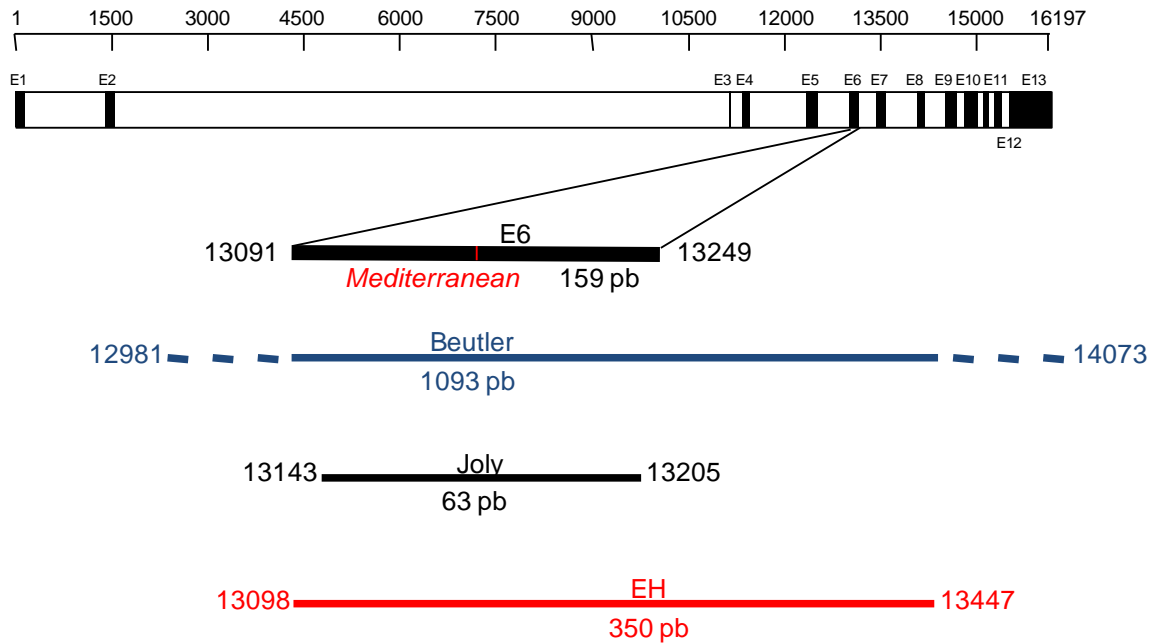
Abarca parte del exón 3 (E3) y del intrón 3 (I3) del gen *CYP2D6* (localizado en el cromosoma 22, con 8 intrones, 9 exones y longitud total de 4,383 nt). Incluye los SNPs *CYP2D6* \*6 (rs5030655) y *CYP2D6* \*4 (rs3892097) (véase la Tabla 2).

## Anexo 16. Amplicón G6PD-Canton



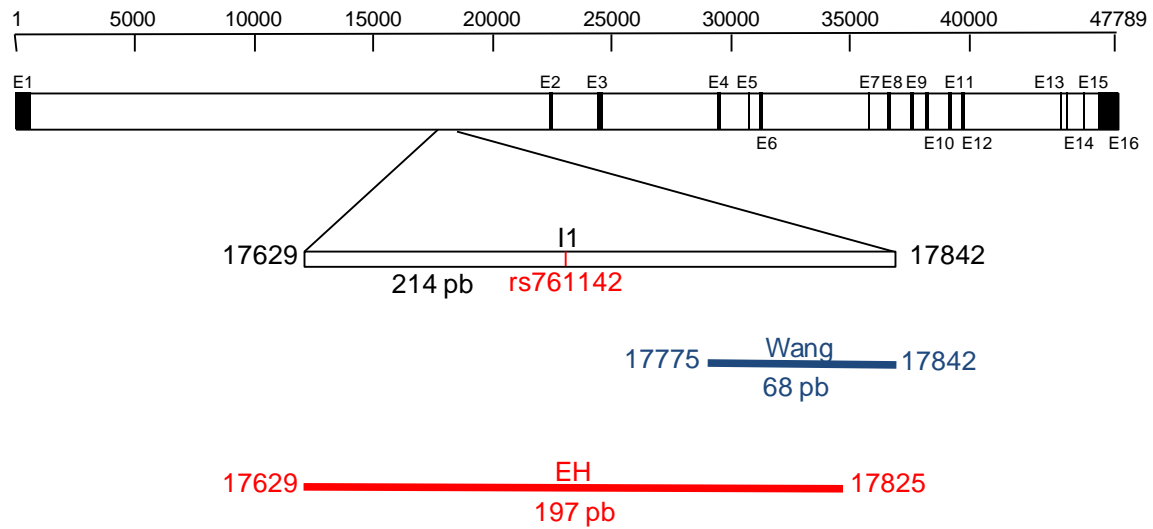
Abarca los exones 11 y 12, parte del exón 13 y los intrones adyacentes del gen *G6PD* (localizado en el cromosoma X, con 12 intrones, 13 exones y longitud total de 16,197 nt). Incluye el SNP *G6PD-Canton* rs72554665 (véase la Tabla 2).

## Anexo 17. Amplicón G6PD-Med



Abarca el exón 6 del gen *G6PD* y parte de los intrones adyacentes (localizado en el cromosoma X, con 12 intrones, 13 exones y longitud total de 16,197 nt). Incluye el SNP *G6PD-Mediterranean* (rs5030868) (véase la Tabla 2).

## Anexo 18. Amplicón GCLC



Abarca parte del intrón 1 del gen *GCLC* (localizado en el cromosoma 6, con 15 intrones, 16 exones y longitud total de 47,789 nt). Incluye el SNP *GCLC* rs761142 (véase la Tabla 2).

## Anexo 19. Código genético

		Segunda letra									
		U		C		A		G			
Primera letra	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U	Tercera letra
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C	
		UUA	Leu	UCA	Ser	<b>UAA</b>	<b>Alto</b>	<b>UGA</b>	<b>Alto</b>	A	
		UUG	Leu	UCG	Ser	<b>UAG</b>	<b>Alto</b>	UGG	Trp	G	
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U	
		CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C	
		CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A	
		CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G	
	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AUU	Asn	AGU	Ser	U	
		AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C	
		AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A	
		<b>AUG</b>	<b>Met</b>	AAG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G	
	G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U	
		GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C	
		GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A	
		GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G	

## Anexo 20. Abreviaturas de los aminoácidos

Aminoácido	Códigos	
	Tres letras	Una letra
Acido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

## **Anexo 21. Equipo**

Micropipetas 1000, 200, 100 y 10  $\mu$ L (Eppendorf, Smart, Rainin, Gilson)

Vortex (Fisher vortex genie 2 Mod-G-560)

Termociclador Touchgene gradient, Techne (Applied Biosystems 2720)

Microcentrífuga (Gm Lab Gilson Mod. Capsulefuge PMC-880)

Congelador (-20 °C)

Refrigerador (4°C)

Balanza analítica (Citizen Mod. CY510)

Fuente de poder (Bio-Rad, Power Pac 300, 2.5A Type T)

Cámara de electroforesis Subcell GT (Bio-Rad Mod. 96)

Fotodocumentador GEL DOC XR+ (Bio-Rad)

Microcentrífuga refrigerada (Sorvall, fresco)

Thermoblock (Labnet international Inc, Accublock)

Lector de microplaca (BioTek, Epoch)

Secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

## **Anexo 22. Reactivos**

Agua MilliQ (estéril)

Buffer PCR 10x (ACTGene, EE UU)

dNTPs 10mM c/u (Fermentas, México)

Iniciadores EHCYP2C9\*2F y EHCYP2C9\*2R 10  $\mu$ M c/u (T4 Oligo, Guanajuato)

Taq polimerasa ACTaq Blue 1U/uL (ACTGene, EE UU)

Agarosa (Invitrogen UltraPure)

Buffer SB 1x (Borato de sodio)

EtBr 1  $\mu$ g/mL

Buffer de carga Orange G 6x (glicerol; xilencianol y azul de bromofenol)

Acetato de sodio 3 M

Etanol grado biología molecular

Etanol al 70%



## Anexo 23. Preparación de soluciones

### Acetato de sodio 3M

Recipiente	Contenido	Exist mín	Reponer
Botella de vidrio 100 mL	100 mL	1×100 mL	1×100 mL
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	2.46 g		
Agua desionizada, cbp	100 mL		

Pesar 2.46 g de acetato de sodio en vaso de precipitado.  
Medir en probeta 100 mL de agua desionizada.  
Agregar el agua desionizada al vaso de precipitados.  
Disolver.  
Pasar el contenido a un recipiente con tapa rosca.  
Etiquetar (nombre, fecha, iniciales del preparador).  
Colocar cinta testigo y cubiertas de papel aluminio.  
Estable indefinidamente.  
Guardar a TA.

### Bromuro de etidio (1 µg/mL)

Recipiente	Contenido	Exist mín	Reponer
Botella de plástico 500 mL	500 mL	1×500 mL	1×500 mL
C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub>	5 mg		
Agua desionizada, cbp	500 mL		

Pesar 5 mg de bromuro de etidio en botella de plástico forrada con papel aluminio.  
Medir 500 mL de agua desionizada en probeta.  
Agregar agua desionizada a la botella de plástico.  
Disolver por inmersión.  
Etiquetar (nombre, fecha, iniciales del preparador).  
Colocar cinta testigo y cubiertas de papel aluminio.  
Guardar a TA.

### Buffer de boratos 10x (SB 10x)

Recipiente	Contenido	Exist mín	Reponer
Botella de vidrio 1000 mL	300 mL	1×300 mL	2×300 mL
Na <sub>2</sub> BO <sub>7</sub> * 10 H <sub>2</sub> O	19.07 g		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	17.7 g		
Agua MilliQ estéril, cbp	1000 mL		

En un vaso de precipitado añadir 700 mL de agua desionizada.  
Entibiarla con agitación en placa de calentamiento.

Añadir 19.07 g de  $\text{Na}_2\text{BO}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  y 17.7 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ .  
 Esperar 20 minutos hasta que se disuelva.  
 Pasar el contenido a una probeta, aforar a 1000 mL.  
 Mezclar por inversión.  
 Medir pH y si es necesario ajustarlo a 8.0 por adición gradual de NaOH 10 N.  
 Guardar en recipiente con tapa rosca.  
 Etiquetar (nombre, fecha, iniciales del preparador).  
 Colocar cinta testigo y cubiertas de papel aluminio.  
 Estable indefinidamente.  
 Guardar a TA.

### Buffer SB 1x

Recipiente	Contenido	Exist mín	Reponer
Botellas de vidrio 1000 mL	1000 mL	1×1000 mL	500 mL
SB 10x	100 mL		
Agua MilliQ estéril, cbp	1000 mL		

Medir en probeta 100 mL de SB 10x.  
 Mezclar con 900 mL de agua desionizada.  
 Guardar en recipiente con tapa rosca.  
 Sellar probeta con Parafilm y mezclar por inversión.  
 Etiquetar (nombre, fecha, iniciales del preparador).  
 Colocar cinta testigo y cubiertas de papel aluminio.  
 Guardar a TA.  
 Estable indefinidamente.

### Etanol al 70%

Recipiente	Contenido	Exist mín	Reponer
Botellas de vidrio 100 mL	100 mL	1×100 mL	50 mL
Etanol absoluto	30 mL		
Agua bd estéril, cbp	100 mL		

A probeta graduada estéril de 100 mL añadir 30 mL de etanol absoluto, aforar con agua, tapar con Parafilm y mezclar por inversión.  
 Guardar en recipiente de vidrio estéril a TA hasta el momento de su uso.

### Geles de SB-agarosa al 2%

1 botella de 100 mL  
 Agarosa 0.8 g  
 Buffer SB 40 mL

Calentar en el horno de microondas hasta fundir la agarosa.  
 Esperar a que se enfríe y vaciar en molde de 8 x 8 cm con peine de 10 dientes.

### TE 10x (Tris-HCl 100 mM EDTA 10 mM, pH 8.0)

<b>Recipiente</b>	<b>Contenido</b>	<b>Exist mín</b>	<b>Reponer</b>
Botella de vidrio 1000 mL	300 mL	1x300 mL	2x300 mL
Tris-HCl 1 M, pH 8.0	60 mL		
EDTA 0.5 M, pH 8.0	12 mL		
Agua MilliQ estéril, cbp	600 mL		

Tris-HCl a probeta de 50 mL  
 Añadir EDTA con pipeta de 10 mL.  
 Mezcla a probeta de polipropileno estéril de 1000 mL.  
 Aforar a 600 mL con agua MilliQ estéril.  
 Sellar con Parafilm y mezclar por inversión.  
 Volúmenes de 300 mL a dos botellas de vidrio 500 mL con tapa rosca.  
 Etiquetar (nombre, fecha, iniciales del preparador).  
 Colocar cinta testigo y cubiertas de papel aluminio.  
 Esterilizar al autoclave con tapas flojas.  
 Estable indefinidamente.  
 Una vez enfriado fuera del autoclave, cerrar las tapas.  
 Guardar a TA.  
 Manejar asépticamente.

#### **TE 1x (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0)**

<b>Recipiente</b>	<b>Contenido</b>	<b>Exist mín</b>	<b>Reponer</b>
Botellas de vidrio 1000 mL	1000 mL	1x1000 mL	500 mL
TE 10x	100 mL		
Agua MilliQ estéril	1000 mL		

100 mL TE 10x a probeta de 500 mL.  
 Aforar a 1000 mL con agua MilliQ estéril.  
 Sellar probeta con Parafilm y mezclar por inversión.  
 Vaciar a botellas de vidrio de 1000 mL con tapa de rosca.  
 Etiquetar (nombre, fecha, iniciales del preparador).  
 Colocar cinta testigo y cubiertas de papel aluminio.  
 Esterilizar al autoclave con tapa floja; escape lento.  
 Una vez enfriado fuera del autoclave, cerrar las tapas.  
 Guardar a TA.  
 Estable indefinidamente.  
 Manejar asépticamente.  
 Reponer cuando quede media botella.

## **Anexo 24. Productos derivados del trabajo de tesis**

### **Presentaciones en congresos**

Hernández-Verdin E, Ganelón-Ríos A, Pettet-Ruiz G, Sánchez-Garza M, Reinoso-Reyes J, López-Revilla R. “Polimorfismos de los genes involucrados en el metabolismo y reacciones adversas a sulfametoxazol y ciprofloxacino en San Luis Potosí: identificación basada en secuenciación”. 2° Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. Organizado por La Sociedad Latinoamericana de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. Durango, Dgo., México, 26 de Octubre de 2017.

### **Artículo enviado a publicación**

Eduardo Hernández-Verdin, Andrea Ganelón-Ríos, Guillermo Pettet-Ruiz, Mireya Sánchez-Garza, Joaquín Reinoso-Reyes, Rubén López-Revilla. *CYP2C9, CYP2D6, G6PD, GCLC* and *NAT2* gene polymorphisms and risk of adverse reactions to sulfamethoxazole and ciprofloxacin in San Luis Potosí, Mexico

Enviado a la revista “The Pharmacogenomics Journal” el 19 de marzo del 2018.