



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
ESCUELA DE FARMACIA

**“DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO ACETILADOR EN
POBLACIÓN PANAMEÑA RESIDENTE EN LA PROVINCIA DE
CHIRIQUÍ, USANDO CAFEÍNA COMO SUSTANCIA SONDA”**

PRESENTADO POR

ESPINOZA N. URANIA H.

GONZÁLEZ C. YETZANIA L.

TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO
DE LICENCIADAS EN FARMACIA

ASESORA

Dra. LISBETH GÓMEZ MARTÍNEZ

CHIRIQUÍ

2015

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecotoxicología, Facultad
de Ciencias Naturales y Exactas, UNACHI,
bajo la dirección de la
Doctora Lisbeth Enith Gómez Martínez

RJST4717

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	6
AGRADECIMIENTOS	7
DEDICATORIA	8
AGRADECIMIENTOS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	12
ABREVIATURAS	13
RESUMEN	14
ABSTRACT	16
CAPÍTULO I	18
MARCO INTRODUCTORIO	18
1.1. ASPECTOS GENERALES DEL PROBLEMA	19
1.2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	21
1.2.1. Objetivo General	21
1.2.2. Objetivos específicos	21
CAPÍTULO II	22
MARCO TEÓRICO	22
2.1. ANTECEDENTES	23
2.2. Metabolismo de Xenobióticos	25
2.2.1. Enzimas metabolizadoras	25
2.3. Polimorfismo Acetilador	29
2.4. N-ACETILTRANSFERASAS (NATs)	30
2.5. Arilaminas	32
2.6. Alelos NAT2 humano	33
2.7. NAT y la respuesta a fármacos	36
2.8. NAT 2 y predisposición a enfermedades	37
	3

2.9. Cafeína como medicamento sonda de la actividad de la NAT2	40
2.10. Farmacogenética	42
2.11. Métodos para la Determinación de Fármacos y sus Metabolitos en Humanos. HPLC	43

CAPÍTULO III	45
---------------------	-----------

MARCO METODOLÓGICO	45
---------------------------	-----------

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS	46
3.1.1 Área de trabajo, reactivos y equipo	46
3.1.1.1. Reactivos químicos	46
3.1.1.2. Materiales consumibles	46
3.2.1. Equipos	47
3.2.2. Procedimiento experimental:	47
3.2.3. Procedimiento analítico	48
3.2.4. Análisis de muestras de orina.	49
3.2.5. Análisis de los resultados	49
3.2.6. Esquematización del procedimiento	50

CAPÍTULO IV	51
--------------------	-----------

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	51
--	-----------

4.1. Validación del Método	52
----------------------------	----

CAPÍTULO V	68
-------------------	-----------

DISCUSIÓN	68
------------------	-----------

5.1. DISCUSIÓN	69
----------------	----

CAPÍTULO VI	71
--------------------	-----------

CONSIDERACIONES FINALES	71
--------------------------------	-----------

6.1. CONCLUSIONES	72
-------------------	----

6.2. RECOMENDACIONES	73
----------------------	----

CAPÍTULO VII	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
7.1. BIBLIOGRAFÍAS	75
CAPÍTULO VIII	80
ANEXOS	80
8.1. ANEXO N°1.	81
8.2. ANEXO N°2	87
8.3. ANEXO N°3.	88

DEDICATORIA

Esta investigación se la dedico

A Dios

Por permitirme culminar con éxito este largo camino dándome cada día la salud, la vida y la fortaleza de seguir hasta el final.

A mis padres

Por impulsar con mucho esfuerzo y dedicación mi educación para que pueda lograr un futuro prometedor junto a mi familia.

A mis hermanos

Por siempre desearme éxitos profesionales y por sus apoyos en todo momento.

A mi abuelo y padrino Ovidio Arauz

Por siempre brindarme apoyo y solución para la realización de mi carrera.

A mi hija y mi esposo

Por ser las dos personas más importantes en mi vida, ya que estuvieron siempre a mi lado brindando palabras de ánimo, amor y cariño para sacar este trabajo adelante.

Por todos los momentos difíciles, buenos y no tan buenos que vivimos mi amiga y yo les dedico este trabajo de investigación que con esfuerzo y mucha dedicación fue realizado para así contribuir en generaciones futuras.

Urania Espinoza.

AGRADECIMIENTOS

A nuestra tutora la Dra. Lisbeth Gómez

Por permitirnos llevar a cabo esta investigación y poder lograr la gran meta de Graduarnos.

A mis padres

Son mis mejores guías de vida, hermanos, esposo e hija quienes estuvieron a mi lado siempre, por creer en mí, porque estuvieron en los días y noches más difíciles durante mis horas de estudio.

A todos los compañeros, amigos y familiares

Por participar en los resultados de la encuesta, porque logramos así buenos resultados en la investigación.

A mi amiga Yetzania Gonzalez

Por ser ese pilar que me dió aliento para luchar contra las adversidades, por tu ejemplo de fortaleza, empatía y dedicación absoluta a todo lo que hacíamos. Te admiro porque a pesar de tantas situaciones que tuvimos en la realización de este trabajo y los días que tenías que llegar al laboratorio trasnochada de un día de trabajo arduo ahí estabas junto a mi dando el 101% y más; pero teníamos que sacar la tesis y aquí estamos gracias amiga bendiciones.

Urania Espinoza.

DEDICATORIA

El poder culminar con éxito este trabajo me permite mirar atrás y recordar lo trecho y difícil del camino, en ocasiones con el gran deseo de parar, el trabajar y tener una familia no hacían esto más sencillo pero si eran a la vez el motor que me impulsaba a seguir adelante.

En la vida siempre admire a una persona que me enseñó mucho de la vida, que forjó parte de mi carácter, entereza y aprendí con ella la toma de decisiones y hacerme responsable de cada cosa que hiciera. Con ella podía ser yo misma, nunca me criticaba al contrario gozaba con mi compañía.

Fuiste la nana y cómplice de mi hijo en sus aventuras de viaje a cada rato, disfrutaste con mi hija su niñez (que por cierto es la única nieta que se parece tanto a ti) y cuidaste de mí aún de adulta, recuerdo que a pesar de que el doctor te prohibió esfuerzo decías "te hago la comida y doblo tu ropa porque eso si lo puedo hacer" y te agradezco cada detalle que tuviste conmigo.

Para ti con cariño, dedico este trabajo que con tanto amor realizamos mi amiga y yo, para ti **mi abuela querida María González** que en paz descansa.

A pesar de ser mi mayor fan, Dios no me permitió mostrarte mi logro, a pesar de ello sé, que desde el cielo; lo disfrutaste tanto como yo.

Espero que la vida me permita mayores logros y que tú como mi ángel guardián me sigas acompañando en cada etapa.

Desde aquí te digo gracias mil.

Te extraño.

Yetzania González

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios

En el cual puse mi fe infinita y el cual siempre sentí a mi lado con su bendición y gracia.

A mis hijos

Son mi mundo, Joan y Paola, los cuales miraba todos los días y me motivaban a seguir adelante y que además no me permitían caer. Siempre fue por ustedes.

A mi esposo José Luis

Por apoyarme desde el día 1, fue todo un reto pero lo logramos. Gracias por siempre estar ahí para mí.

A mi padre bello Don Bolívar

No puedes ver mis logros pero si sentir una alegría inmensa al saber que por fin lo terminamos, siéntete orgulloso de mí papá.

A madre hermosa Irma

Con su fuerza imparable y su apoyo incondicional, a pesar de todas tus limitantes hacías de ver que nada pasaba menos preocuparme con tal de que no perdiera mi norte. Siéntete orgullosa de mi mamá.

A mi suegro Dago

Por sus palabras de aliento al inicio de todo esto al decir "si lo hace dele que yo la apoyo en lo que necesita".

A mi suegra Vilma

Por cubrir mis días fuera de casa en las madrugadas por trabajo y cuidar de mis nenes y mi familia en mi ausencia.

A mis hermanos

Iris, Joel y July, mis mayores fan club, gracias por siempre creer en mí. Los quiero mucho.

A mis compañeros de trabajo del Hospital Regional

Que siempre me dieron la mano con los cambios de turno para poder cumplir con mi trabajo así como con la U y que además fueron amigos de verdad apoyándome al 100% en todo.

A mi amiga Urania

Reto asumido reto superado, gracias por tanta paciencia conmigo y seguirme en este largo camino. Ambas nos dimos tanto apoyo cuando creímos que no podíamos. Gracias por ser tú, no pude escoger mejor compañera para esto.

A la profesora Lisbeth Gómez

Por su paciencia con nosotras, el aprendizaje logrado es algo que perdurará a través del tiempo y eso no te lo quita nadie, estoy tan orgullosa de haber decidido tesis y quien mejor que usted para guiarnos, y gracias por la amistad cultivada en el proceso.

Al grupo de cuerpo docente

Que lograron ser parte de este crecimiento personal y profesional. Gracias por sus enseñanzas.

Si se me queda alguien igual gracias infinitas, siempre comenté este título no es mío ya que como verán se debe al apoyo incondicional de muchas personas sin eso tal vez no lo hubiese logrado. Este trabajo es para ustedes con mucho cariño.

Yetzania González

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II

FIGURA N°1. Etapas de la biotransformación de xenobióticos.....	26
FIGURA N°2. Representación esquemática de las reacciones de fase 1 y fase 2 del metabolismo.....	27
FIGURA N°3. Enzimas metabolizadoras de fase I Y II.....	28
FIGURA N°4. Estructura de la enzima NAT2	30
FIGURA N°5. Metabolismo de Cafeína en humanos.....	41

CAPÍTULO III

FIGURA N°6. Esquematización de los procedimientos.....	50
--	----

CAPÍTULO IV

FIGURA N°7. Espectro de absorción y cromatograma representativo del análisis por triplicado de una muestra de AFMU.....	52
FIGURA N°8. Curva de calibración para el análisis de AFMU en orina.....	53
FIGURA N°9. Espectro de absorción de 1- Metilxantina (1-MX).....	54
FIGURA N°10. Curva de calibración para el análisis de 1- metilxantina en orina.	54
FIGURA N°11. Espectro de absorción y un cromatograma correspondiente a la curva de calibración de cafeína.....	55
FIGURA N°12. Cromatograma.....	57
FIGURA N°13. Histograma de Frecuencia.....	59
FIGURA N°14. Histograma de frecuencia de dos poblaciones.....	65
FIGURA N°15. Frecuencia de participantes con familiares diabéticos. (Fenotipo acetilador).....	67

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO II.

TABLA N°1. Fármacos- sustratos para NAT2.....	32
TABLA N°2. Alelos humanos NAT2.....	34
TABLA N°3. Porcentaje de acetiladores lentos según grupos étnicos.....	35
TABLA N°4. Toxicidad de algunos fármacos relacionada con el fenotipo acetilador.....	36
TABLA N°5. Implicación de la actividad de NAT con ciertos tipos de cánceres...	40
TABLA N°6. Otras patologías relacionadas con la actividad metabólica acetilante.....	40

CAPÍTULO IV.

TABLA N°7. Predisposición a enfermedades.....	58
TABLA N°8. RELACIÓN METABÓLICA ENTRE AFMU/1-MX.....	61
TABLA N°9. Resultado de la relación metabólica.....	62
TABLA N°10. Frecuencia de distribución de individuos mestizos de Chiriquí.....	64
TABLA N°11. Individuos participantes en el estudio con familiares Diabéticos...	66
TABLA N°12. Participantes con familiares diabéticos.....	67

ABREVIATURAS

- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- G6PDH:** Glucosa 6- fosfato deshidrogenasa
- NAT1:** N-acetiltransferasa 1
- NAT2:** N-acetiltransferasa 2
- PAS:** Ácido p-salicílico
- PABA:** Ácido p-aminobenzoico
- INH:** Isoniacida
- ARN:** Ácido desoxirribonucleico
- GSTH:** Glutati3n-S-transferasa
- SMZ:** Sulfametazina
- HPLC:** Cromatografía líquida de alta resoluci3n
- CYP:** Citocromo P-450
- AFMU:** 5 Acetilamino-6-formilamino-3- metiluracilo
- XB:** Xenobi3tico
- RPM:** Revoluciones por minuto
- ECV:** Enfermedad cerebrovascular
- HTA:** Hipertensi3n arterial
- MTX:** 1- Metilxantina
- NM:** Nan3metro
- TR:** Tiempo de retenci3n
- LO:** Longitud de onda

RESUMEN

La N-acetilación es un paso metabólico catalizado por N-acetil-transferasas. Que intervienen en la transferencia del grupo acetilo de la Acetil Coenzima A al sustrato. La reacción ocurre en dos pasos secuenciales. Inicialmente la Acetil-Coenzima A se enlaza a la enzima y el grupo acetilo es transferido al sitio activo (residuo de cisteína; Cis⁶⁸ en el humano), liberándose la Coenzima A. En el segundo paso el grupo acetilo es transferido desde la enzima acetilada al grupo amino del sustrato con la regeneración de la enzima.

La enzima NAT2 puede activar o inactivar aminas carcinogénicas aromáticas o heterocíclicas y xenobióticos dependiendo del tipo de acetilación: O- acetilación que por lo general activa carcinógenos ambientales y N-acetilación que se considera que los inactiva.

Los polimorfismos en este gen pueden afectar la susceptibilidad individual a estos compuestos. Dependiendo del tipo acetilador lento o rápido, un individuo puede estar predispuesto a cáncer de colon, pulmón, vejiga, cabeza, cuello y mama, y algunas enfermedades como el asma, Parkinson, Alzheimer, entre otros. Esto también afecta la efectividad de algunos fármacos y la toxicidad de diversos xenobióticos.

Objetivo: Caracterización del fenotipo acetilador de la población chiricana. Este conocimiento puede contribuir en el establecimiento de posibles factores de riesgo de esta población a la exposición de algunos fármacos y contaminantes ambientales y a la predisposición a ciertos tipos de patologías.

Metodología: Se determinó el fenotipo acetilador utilizando cafeína como sustancia sonda. Se tomó una muestra representativa de 52 individuos a los cuales se analizaron mediante una técnica por HPLC la eliminación urinaria de los metabolitos

AFMU 1-MX. La actividad de AFMU se determinó en base a la razón molar AFMU/1-MX de estos dos metabolitos.

Resultados: Se observó una distribución bimodal que permite clasificar a la población estudiada en un 67 por ciento de acetiladores rápidos y 33% de acetiladores lentos.

Conclusión: Estos resultados son cercanamente coincidentes con los reportados previamente por Arias, et al., (2002), en población indígena chiricana y en otras poblaciones de Centroamérica

Palabras claves: Acetilador, fenotipo, cafeína, genes, farmacogenética.

ABSTRACT

N-acetylation is a metabolic pathway catalyzed by n-acetyltransferases. These enzymes intervene in the transference of the acetyl group of acetyl-CoA to a substrate. The reaction occurs in two sequential steps: first, acetyl-CoA binds the enzyme, and the acetyl group is transferred to the active site (a residue of cysteine, Cys in humans), and acetyl-CoA is liberated. Then, the acetyl group is transferred from the acetylated enzyme to the amine group of the substrate with the regeneration of the enzyme.

The enzyme NAT2 can activate or inactivate carcinogenic aromatic amines or heterocyclic compounds and xenobiotics depending on the type of acetylation: O-acetylation is associated with the activation of environmental carcinogens, and N-acetylation inactivates them.

The polymorphisms of this gene can affect the individual susceptibility of the compounds. Determined by the acetylator, whether fast or slow, the individual might be predisposed to various types of cancer like colon, lungs, bladder, brain, neck, or mammary, and illnesses like asthma, Parkinson's, Alzheimer's, etc. The effectiveness of drugs and the toxicity of certain xenobiotics is also affected.

Objective: To characterize the acetylator phenotype of the population of the Chiriquí Province. This knowledge can contribute to establishing risk factors for the population when exposed to certain drugs, environmental pollution, and their predisposition to illnesses.

Methodology: The acetylator phenotype was determined using caffeine as a metabolic probe. A representative sample of 52 individuals was analyzed by employing the technique of high-performance liquid chromatography (HPLC) of the urinary elimination of the AFMU 1-MX. The activity of the AFMU was established based on the molar ratio AFMU/1-MX.

Results: A bimodal distribution was observed, which allowed us to classify 67% of the individuals as fast acetylators and 33% as slow acetylators.

Conclusion: These results are closely matched with the ones reported previously by Arias et al. (2002) in the indigenous population of Chiriquí Province and other populations of Central America.

Keywords: Acetylator, phenotype, caffeine, gene, pharmacogenetic.

CAPÍTULO I
MARCO INTRODUCTORIO

1.1. ASPECTOS GENERALES DEL PROBLEMA

Estudios étnicos indican que una alta proporción (del 40 al 60%) de caucásicos y africano-americanos son acetiladores lentos, 80 a 90% de Japoneses y esquimales canadienses son acetiladores rápidos, y aproximadamente 20% o menos de la población egipcia y ciertas poblaciones judías son acetiladores rápidos. (Arias, et al., 2002).

Existen pocos estudios en poblaciones mestizas de América. Sin embargo debido al extenso mestizaje ocurrido en estas regiones la caracterización fenotípica y genotípica del patrón de metabolismo es de gran interés porque puede ser determinante de los efectos tanto farmacológicos como tóxicos de fármacos y diversos pululantes ambientales y de la predisposición a ciertas enfermedades.

La población mestiza de Panamá ofrece la particularidad de una extensa mezcla racial, entre los tres principales componentes: el blanco generalmente de origen europeo, el componente negro, generalmente de origen africano y el componente indígena generalmente nativo de la región. Arias, et al.,(2002) Existen muy pocos estudios farmacogenéticos con poblaciones con estas características, por lo que consideramos de gran importancia determinar el fenotipo acetilador de esta población, con el fin de poder establecer posibles riesgos en el uso de múltiples medicamentos y xenobióticos en general que son metabolizados por esta vía.

Existen pocos datos documentados sobre el metabolismo de xenobióticos en la población panameña en cuanto a características genéticas se refiere. El campo de estudio se ha limitado a investigaciones realizadas en nuestros indígenas. Cada día es más notoria la influencia de las diferentes etnias en nuestra población, por lo que es de interés el estudio de estas mezclas interraciales (mestizaje) y tratar de determinar si las mismas podrían ser factores de riesgo frente a contaminantes ambientales, reacciones a

alimentos y medicamentos o si existe una predisposición a ciertas enfermedades y al fracaso en los tratamientos de las mismas.

1.2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.2.1. Objetivo General

Caracterización del fenotipo acetilador de la población chiricana. Esto contribuirá a determinar si existen factores de riesgo en la población expuesta a fármacos y pululantes ambientales además de predisposición a ciertos tipos de patologías.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para determinar los metabolitos de cafeína AFMU y 1-metilxantina (1-MX) en muestras de orina.
2. Determinar el fenotipo acetilador en población chiricana a partir del análisis de la razón molar de los metabolitos AFMU/1-MX en orina después de administración de cafeína como sustancia sonda.
3. Determinar mediante una encuesta algunas patologías en familiares cercanos a los voluntarios investigados que han sido relacionadas en la literatura con ciertos patrones metabólicos de acetilación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

Según Arias, et al., (2002), Panamá posee un alto porcentaje (aproximadamente un 85%) de población mestizada, cuyas poblaciones ancestrales principales son negras, indígenas y blancas. Estos aportan al fondo común de genes 38.72 %, 35.87% y 25.40% respectivamente. Esta proporción, sin embargo tiene variantes significativas en las diferentes provincias, las cuales están relacionadas principalmente con el aporte de genes de inmigrantes de origen negro que llegaron a Panamá durante la colonia y la posterior construcción del Ferrocarril y del Canal. Según estos autores la mezcla racial de la población chiricana presenta un 5.56% de genes negros, 50.6% de genes indígenas y 43.8% de genes blancos, siendo esta provincia la que presenta mayor contribución de genes indígenas y menor contribución de genes negros al pool común.

Es reconocido actualmente el papel determinante de las diferencias individuales e interétnicas en la predisposición a muchas enfermedades y en la respuesta a sustancias exógenas. Las bases moleculares de estas diferencias se asocian con los llamados "polimorfismos genéticos" los cuales son variaciones en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) en un locus determinado.

Se define polimorfismo como la existencia simultánea en una población de genomas con distintos alelos para un locus determinado (Luque, et al., 2002). Los alelos son variaciones de la secuencia de ADN presente en un locus o posición definida en un cromosoma. Consecuentemente, en una célula diploide cada locus autonómico está ocupado por dos alelos, uno de origen paterno y otro materno, situados en dos cromosomas homólogos. El grado de polimorfismo de una población viene determinado por el número de alelos distintos existentes para un locus concreto y se refleja en el grado de heterocigosis, o proporción de individuos heterocigóticos que forman parte de una

población (Luque, et al., 2002). Los polimorfismos genéticos pueden ser usados como marcadores para determinar ciertos patrones y/o procesos. Además, pueden ser utilizados para establecer parentescos. Igualmente la comparación de dos grupos de polimorfismos genéticos de dos especies diferentes puede dar lugar a una mejor clasificación.

Los polimorfismos son causas de las diferencias en la actividad de enzimas metabolizantes y proteínas transportadoras de xenobióticos, y a nivel de proteínas receptoras de diferentes sustancias tanto endógenas como exógenas.

Un fenotipo es cualquier característica o rasgo *observable* de un organismo, como por ejemplo su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas, fisiología y comportamiento.

Los fenotipos resultan de la expresión de los genes de un organismo, así como de la influencia de los factores ambientales, y de las posibles interacciones entre ambos.

El análisis de las características tanto fenotípicas como genotípicas es de gran utilidad para el adecuado entendimiento y análisis de los mecanismos involucrados en la susceptibilidad individual o poblacional a ciertos tóxicos y contaminantes, así como a la predisposición a ciertas patologías.

En las últimas décadas ha existido un interés creciente en el estudio de fenotipos o enfermedades que afectan con especial intensidad a grupos indígenas de América y que los diferencian de poblaciones Caucásicas. Existe información creciente de la transmisión de alguno de estos fenotipos o enfermedades, a las poblaciones mestizas contemporáneas con ancestro indígena americano y ancestros africanos, poblaciones que están distribuidas en la mayor parte de los núcleos poblacionales de Centro y Sudamérica.

2.2. Metabolismo de Xenobióticos

2.2.1. Enzimas metabolizadoras

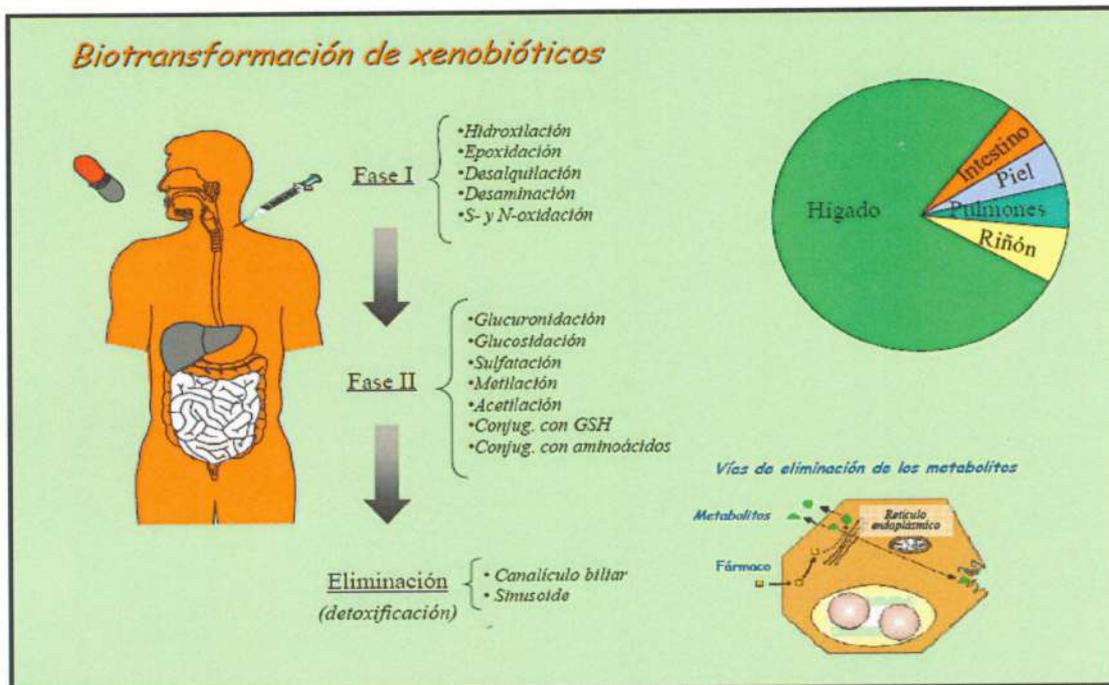
Una enzima es una proteína que cataliza la velocidad de los diferentes procesos bioquímicos y fisiológicos del organismo. Los polimorfismos genéticos, pueden afectar sutilmente el nivel de expresión, estructura, o la actividad catalítica de enzimas metabólicas y reparadoras del DNA.

Cuando un polimorfismo genético afecta a una molécula enzimática involucrada en el metabolismo de xenobióticos determinará el grado de respuesta a sus sustratos específicos. Si éstos son fármacos, variará la respuesta o la toxicidad de los mismos. Si son xenobióticos ambientales, su acción nociva podrá variar dependiendo si la enzima específica se encuentra en su forma activa o inactiva.

Una gran cantidad de enzimas metabolizantes de xenobióticos exhiben polimorfismos genéticos. Sin embargo las de mayor importancia clínica son las isoenzimas del Citocromo P-450 (CYP450) encargadas del metabolismo oxidativo, entre las cuales las del CYP2D6, CYP3A4 y CYP2C19 son las de mayor relevancia. Entre las enzimas que catalizan reacciones metabolizantes de Fase II esto es reacciones de conjugación son de mucha importancia clínica los polimorfismos a nivel del sistema NAT1-NAT2 (N-Acetiltransferasa).

Las reacciones que sufren los xenobióticos durante su metabolismo se encuentran divididas en dos fases como lo muestra la figura N°1:

FIGURA N°1.
Etapas en la biotransformación de xenobióticos.



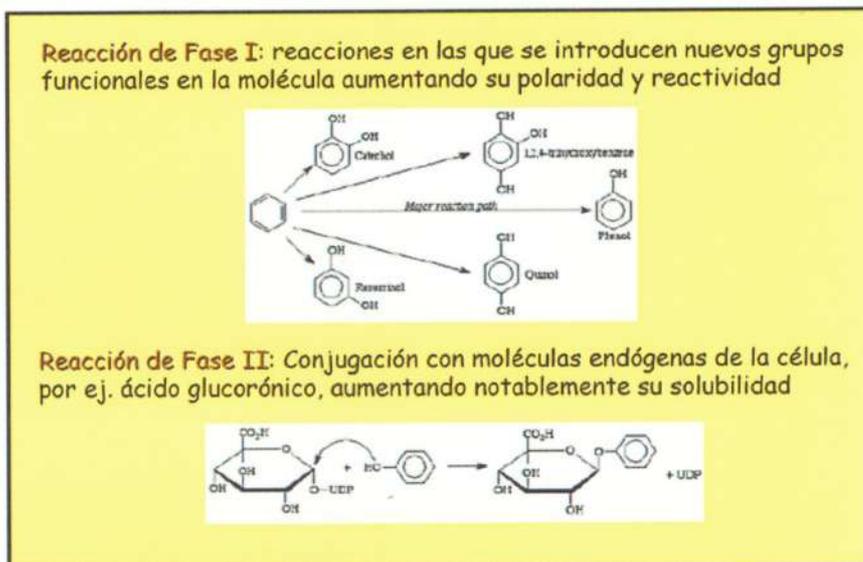
Los xenobióticos sufren distintos procesos en el organismo, encaminados a facilitar su eliminación y evitar su acumulación y potenciales efectos tóxicos. Los procesos se agrupan en *fases*. En la *Fase I*, los xenobióticos sufren reacciones de funcionalización de distinta naturaleza, destinadas a introducir nuevos grupos funcionales en la molécula. En la *Fase II*, los metabolitos son conjugados con moléculas endógenas, lo que finalmente facilita notablemente su eliminación del organismo (*Fase III*). (Tomada de metabolismo de xenobióticos, pdf.)

Las reacciones principales de la Fase I del Metabolismo son oxidación, reducción e hidrólisis siendo la más común la de oxidación. Esta es mediada por el sistema enzimático conocido como Citocromo P450, CYP450 (González, et al., 2001). Este sistema metabólico, conocido también como "sistema oxidasa de función mixta" cataliza la inserción de un átomo de oxígeno molecular en un sustrato (Díaz, 2003). Esta reacción convierte a los xenobióticos en sustancias electrófilas activas que pueden interactuar con moléculas de ADN, ARN y proteínas. El sistema utiliza NADPH como

donador inicial de electrones, oxígeno molecular como oxidante y presenta además una amplia especificidad de sustrato. Aunque este sistema oxidativo forma parte de muchos tejidos, el sitio principal de oxidación de la mayoría de los xenobióticos es el retículo endoplasmático liso del hígado.

FIGURA N°2.

Representación esquemática de ejemplos de reacciones.

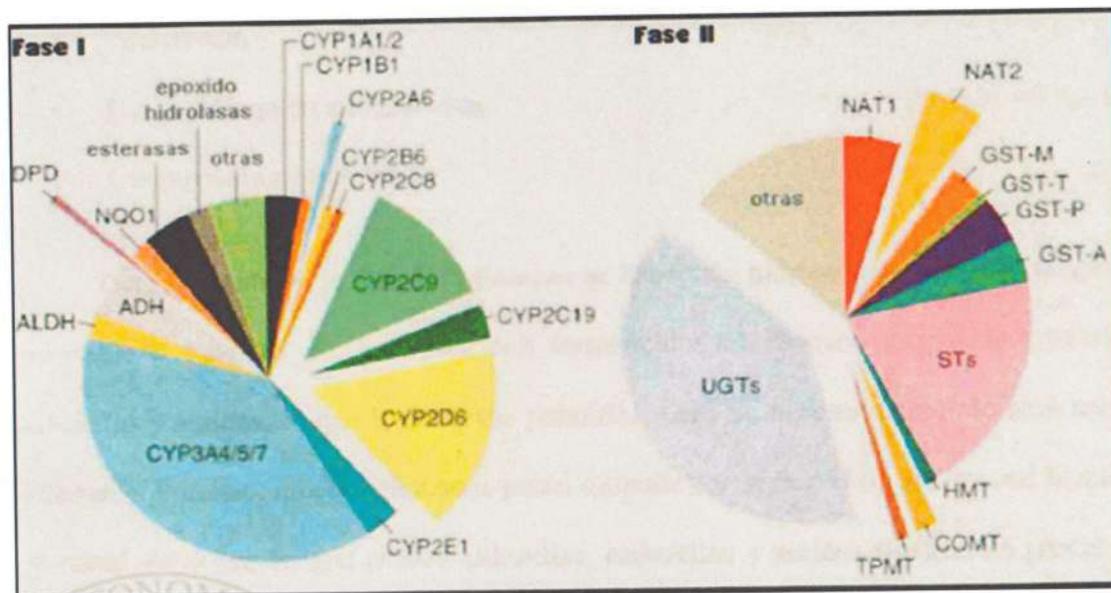


(Fase 1 y Fase 2) del metabolismo de fármacos y xenobióticos.

Los metabolitos intermedios procedentes de la biotransformación de Fase 1 son altamente reactivos y pueden ser muy peligrosos si se combinan con elementos macromoleculares estructurales o enzimáticos de la célula. Por ello existen otras enzimas que inmediatamente los unen o conjugan a una macromolécula endógena, lo cual estabiliza el metabolito reactivo intermediario y hace a la molécula más polar (hidrosoluble), facilitando de este modo su excreción posterior principalmente por vía renal. Estas reacciones de conjugación son las biotransformaciones de Fase II.

FIGURA N°3.

Principales enzimas metabolizadoras de las fases I y II .



Las enzimas de fase 1 introducen grupos funcionales a la molécula. Las enzimas de Fase 2 conjugan al fármaco con una sustancia endógena. Todas estas enzimas tienen polimorfismos asociados con cambios en el metabolismo de los fármacos. ADH, alcohol deshidrogenasa; ALDH, aldehído deshidrogenasa; CYP, citocromo 450, DPD, dihidropirimidina deshidrogenasa; NQO, NADPH: quinina oxidoreductasa o DT diaforasa; COMT, catecol O-metiltransferasa; GST, glutatión S-transferasa; HMT, histamina metiltransferasa; NAT, n-acetiltransferasa; STs, sulfotransferasa; TPMT, tiopurina metiltransferasa; UGTs, uridina 5'-trifosfato glucuronosiltransferasas. (Evans, et al., 1999).

En la Fase II diversas reacciones de conjugación añaden una molécula orgánica al xenobiótico, que puede encontrarse en forma original o como metabolito oxidado proveniente de la Fase I. Este proceso reduce generalmente la toxicidad del compuesto (Dunning, et al., 1999).

Las enzimas encargadas de estos procesos son principalmente de tipo transferasas. Dentro de las reacciones metabólicas de Fase 2 destacan:

- ✓ Conjugación con ácido glucorónico mediada por la glucoroniltransferasa.
- ✓ Conjugación mercaptúrica: Aquí interviene la glutatión-S-transferasa (GST). En ésta conjugación se pierden sustancias biológicamente activas como el glutatión y la cisteína.

- ✓ Sulfoconjugación: Es catalizada por una sulfotransferasa.
- ✓ Conjugación con grupos metílicos: Esta reacción requiere de la S-adenosil-metionina como cofactor de las metiltransferasas.
- ✓ Conjugación con el ácido acético. La acetilación es catalizada por las acetiltransferasas y utiliza acetil coenzima A como cofactor.

La localización intracelular de las enzimas de fase 2 influye en la eficacia de la detoxificación. En el citosol se encuentran como enzimas solubles la GST, la sulfotransferasas y las N-acetiltransferasas.

2.3. Polimorfismo Acetilador

Las reacciones de acetilación son utilizadas por xenobióticos que tienen un radical amino (NH₂) en su molécula, especialmente aminas aromáticas de tipo arilaminas o hidracinas (Weber, 1987). Algunas sustancias, como ácido p- salicílico (PAS) (Jenne, 1965), y ácido p- aminobenzoico (PABA) (La Du, 1971), se acetilan con una velocidad similar en todos los individuos, de forma que las frecuencias de las distintas tasas de conjugación se distribuyen de forma unimodal. Se trata de la denominada acetilación monomórfica. Por el contrario, otras sustancias muestran grandes diferencias interindividuales en la velocidad con la que son acetiladas, de modo que la distribución de frecuencias de las tasas de acetilación de un grupo amplio de individuos se refleja en una gráfica bimodal. Es la denominada acetilación polimórfica o polimorfismo acetilador.

Dependiendo de la variabilidad genética y la velocidad con que un individuo puede metabolizar ciertas sustancias se le denomina metabolizador lento y metabolizador rápido.

El polimorfismo de la N-acetilación ha sido implicado en los efectos terapéuticos y reacciones adversas de diversos fármacos que contienen aminas, como es el caso de la

INH, sulfametazina, procainamida, sulfapiridina, dapsona, nitrazepam y cafeína. Igualmente este paso metabólico se ha relacionado con la susceptibilidad a varias enfermedades.

2.4. N-ACETILTRANSFERASAS (NATs)

En humanos se han identificados dos isoenzimas de NAT denominados NAT1 y NAT2, las cuales son productos de distintos loci genéticos designados NAT1 y NAT2, respectivamente. (Blum, et al., 1990). Las NATs comparten una similitud nucleotídica del 87%, la cual se traduce en una identidad aminoacídica del 81%. (Matas, et al., 1997).

FIGURA N°4.

Estructura de la enzima NAT2.

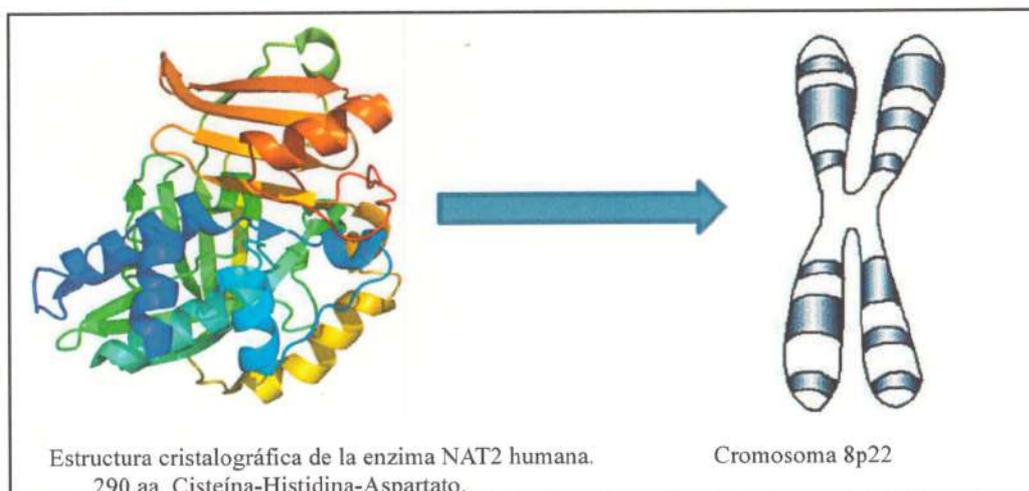


Figura N°4 Se muestra imagen de la estructura de la enzima de NAT2 (Cristalográfica) y su ubicación a nivel de cromosoma en la región 8p22.

Ambos genes NAT1 y NAT2 muestran una pronunciada variación alélica, con 26 diferentes NAT1 humanas y 29 diferentes alelos NAT2 humanos identificados hasta la fecha. El locus NAT2 tiene alelos que contienen desde una hasta cuatro SNPs (Gross, et

al., 1999). Los genes están localizados en el brazo corto del cromosoma 8, más específicamente en la región 8P22, la cual está comúnmente detectada en humanos con cáncer (Bova, et al., 1993).

Varias poblaciones han demostrado que los alelos de NAT2 no se distribuyen en forma aleatoria en las diferentes poblaciones sino que siguen diversos patrones de distribución racial/geográfica. Generalmente las poblaciones han sido divididas en tres grupos étnicos: caucásicos, asiáticos y africanos. Los primeros datos reflejan que entre un 50% y un 70% de los caucásicos y el 75% de los africanos son acetiladores lentos frente a un 10% en asiáticos. Otras poblaciones como los hispanos centroamericanos tienen valores intermedios entre los caucásicos y orientales.

González, et al., (2007) en un estudio comparativo entre poblaciones de Habana (Cuba) y España encontraron que la frecuencia de metabolizadores lentos fue similar entre cubanos y españoles (un 4,6 y un 4,9%, respectivamente). Sin embargo, la prevalencia de metabolizadores ultrarrápidos fue menor en cubanos (3,8%) que en españoles (5,2%).

Aproximadamente en el 50% de la población de Estados Unidos, la *N*-acetiltransferasa hepática es hipoactiva. Estas personas (acetiladores lentos) requieren más tiempo para metabolizar los fármacos que sufren procesos de acetilación y tienden a ser más susceptibles a los efectos indeseables asociados a estos fármacos (p. ej., neuritis periférica por isoniazida, lupus eritematoso por hidralazina o procainamida, sedación y náuseas por fenelzina). En el resto de la población, la acetilación es rápida. En comparación con los acetiladores lentos, estas personas requieren mayores dosis o mayor frecuencia en la administración de fármacos que son acetilados (p.ej., isoniazida) para obtener la respuesta terapéutica deseada. En la figura N°10, se muestra la

representación de la ruta metabólica de la Isoniazida (INH) en NAT2, la cual puede ser terapéuticamente inactivada mediante acetilación en el hígado (Nanashima, et al., 2012).

La INH es metabolizada a acetil-INH por la enzima N-acetiltransferasa 2 (NAT2).

Posteriormente INH y acetil-INH son hidrolizadas, por acción de una amidasa hepática y producen Hidrazina (HZ) y acetil-HZ, respectivamente. La acumulación de estos metabolitos contribuye a la hepatotoxicidad asociada a INH. (Leiro, et al., 2011).

2.5. Arilaminas

Las arilaminas N-acetiltransferasas difieren de muchas otras transferasas dependientes de acetil coenzima A presentes en las células. Inicialmente, se une la acetil coenzima A a la enzima y el acetil es transferido del cofactor a la cisterna (cis68 para la isoforma humana) de la proteína, la coenzima A es entonces liberada.

El segundo paso involucra la unión del sustrato a la enzima acetilada, lo cual es seguido de la transferencia del acetil al sustrato. Finalmente, el producto acetilado es liberado de la enzima. El primer paso de la reacción puede proceder en ausencia del sustrato. La sulfametazina, procainamida y dapsona son sustratos acetilados por la NAT2 humana. Algunos compuestos como 2-aminofluoreno son excelentes sustratos para ambas.

TABLA N°1.

Fármacos- sustratos para NAT2.

Fármacos -Sustratos para NAT2
Amrinona
Cafeína (metabolitos)
Clonazepam (metabolitos)
Dapsona
Dipirona
Fenelzina
Hidralazina
Procainamida

Sulfametazina

Nitrazepam (metabolitos)

Isoniazida

Ejemplo de fármacos que actúan como sustratos específicos para NAT2. (Tomado de Hamilton, et al., 1986; Grant, et al., 1984; Olivera, et al., 1998; Evans, 1962).

2.6. Alelos NAT2 humano

Desde que el locus NAT2 humano fue establecido como el sitio clásico de polimorfismos responsables de la acetilación, el estudio de la variación alélica de NAT2 ha sido un área de intensa investigación.

Hasta la fecha, 29 diferentes alelos NAT2 han sido detectados en la población humana. Cada uno de los alelos variantes se distingue por cuatro sustituciones nucleotídicas, de las cuales 13 han sido identificadas y localizadas en el exón que codifica la enzima. Nueve de estas producen cambios aminoacídicos (C190T, G191A, T341C, A434C, G499A, G590A, A803G, A845C, G857A), mientras que cuatro son silenciosas (T11C, C282T, C481T, C759T).

Diversos estudios han sido realizados para mostrar claramente la correlación entre el genotipo NAT2 y el fenotipo, los cuales causan un fenotipo acetilador lento que tiene un efecto dosis-gen. Los individuos homocigotos para los polimorfismos en NAT2 tienen un fenotipo acetilador lento, mientras que los individuos heterocigotos tienen un fenotipo acetilador intermedio, y los individuos que carecen de los cuatro polimorfismos en NAT2 antes mencionados, tienen un fenotipo acetilador rápido (Hickman, et al., 1992).

Estudios realizados en tejido hepático sugirieron que el fenotipo acetilador lento se asocia con la presencia de ciertas sustituciones nucleotídicas en la región codificante de la proteína del gen NAT2, debido a una marcada disminución en la concentración de la proteína NAT2, mientras que los niveles de RNAm de NAT2 permanecen sin cambios (Hein, et al., 2002).

TABLA N°2.

Alelos humanos NAT2.

Alelos	Fenotipo	Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico
NAT2*4	Rápido	Ninguno	Ninguno
NAT2*5A	Lento	T341C, C481T	Ile 114 → Thr
NAT2*5B	Lento	T341C, C481T, A803G	Ile 114 → Thr, Lis268 → Arg
NAT2*5C	Lento	T341C, A803G	Ile 114 → Thr, Lis268 → Arg
NAT2*5D	Lento	T341C	Ile 114 → Thr
NAT2*5E	Lento	T341C, G590A	Ile 114 → Thr, Arg197 → Gln
NAT2*5F	Lento	T341C, C481T, C759T, A803G	Ile 114 → Thr, Lis268 → Arg
NAT2*6A	Lento	C282T, G590A	Arg197 → Gln
NAT2*6B	Lento	G590A	Arg197 → Gln
NAT2*6C	Lento	C282T, G590A, A803G	Arg197 → Gln, Lis268 → Arg
NAT2*6D	Lento	T111C, C282T, G590A	Arg197 → Gln
NAT2*7A	Lento	G857A	Lis 286 → Glu
NAT2*7B	Lento	C282T, G857A	Lis 286 → Glu
NAT2*10	No se sabe	G499A	Glu 167 → Lis
NAT2*11	No se sabe	C481T	Ninguno
NAT2*12A	Rápido	A803G	Lis268 → Arg
NAT2*12B	Rápido	C282T, A803G	Lis268 → Arg
NAT2*12C	Rápido	C481T, A803G	Lis268 → Arg
NAT2*13	Rápido	C282T	Ninguno
NAT2*14A	Lento	G191A	Arg64 → Gln
NAT2*14B	Lento	G191A, C282T	Arg64 → Gln
NAT2*14C	Lento	G191A, T341C, C481T, A803G	Arg64 → Gln, Ile 114 → Thr Lis268 → Arg
NAT2*14D	Lento	G191A, C282T, G590A	Arg64 → Gln, Arg197 → Gln
NAT2*14E	Lento	G191A, A803G	Arg64 → Gln, Lis268 → Arg
NAT2*14F	Lento	G191A, T341C, A803G	Arg64 → Gln, Ile 114 → Thr, Lis268 → Arg
NAT2*14G	Lento	G191A, C282T, A803G	Arg64 → Gln, Lis268 → Arg
NAT2*17	Lento	A434C	Gln 145 → Pro
NAT2*18	No se sabe	A845C	Lis 282 → Thr
NAT2*19	Lento	C190T	Arg64 → Trp

Comparación de los diferentes alelos humanos con sus respectivos fenotipos y los cambios que ocurren a nivel de nucleótidos y aminoácidos.

Un amplio rango de actividad de N-Acetilación es observada en humanos y ha sido bien caracterizada por algunos autores como una distribución bimodal y por otros como una trimodal. El modelo bimodal clasifica a los individuos en acetiladores rápidos y lentos, y en el modelo trimodal, los individuos son clasificados en acetiladores rápidos, intermedios y lentos.

La frecuencia del fenotipo acetilador lento varía considerablemente entre grupos étnicos, y esto es debido a las diferentes frecuencias de los polimorfismos que corresponden a los alelos acetiladores lentos. Aproximadamente la mitad de los que tienen ancestros europeos heredan dos alelos de NAT2 que se caracterizan por una actividad de acetilación reducida. En la población caucásica y africana la frecuencia del fenotipo acetilador lento varía entre 40 y 70%, mientras que en la población asiática, como japoneses, chinos, coreanos y tailandeses, el rango es de 10 a 30%.

TABLA N°3.
Porcentaje de acetiladores lentos según grupos étnicos.

Grupo Étnico	Porcentajes (%) de Acetiladores Lentos
Blancos-Canadienses	76.0
Blancos-Americanos	76.0
Africanos (Dogon)	75.0
Indios	74.3
Blancos-Europeos	73.7
Africanos (Gabón)	73.0
Africanos-Americanos	65.3
Filipinos	60.5
Hispano-Americanos	59.7
Chinos	46.8
Polinesios	40.0
Amerindios (Colombia)	34.7
Japoneses	32.9
Coreanos	31.9
Amerindios (Panamá)	26.0

La tabla muestra el porcentaje acetilador lento de acuerdo a los diferentes grupos étnicos.

2.7. NAT y la respuesta a fármacos

Los polimorfismos genéticos en la actividad de la N-acetiltransferasa fueron inicialmente descubiertos en pacientes con tuberculosis tratados con isoniazida (INH). Este fármaco es principalmente excretado después de la acetilación catalizada por NAT2. Desde entonces, se han descrito para muchos agentes terapéuticos sus propios polimorfismos de acetilación en humanos. Estos incluyen hidralazina, procainamida, sulfametazina, endralazina, sulfonamidas, nitrazepam y dapsona.

Estudios iniciales mostraron que la actividad antihipertensiva de la hidralazina era menor en acetiladores rápidos y que era necesaria una dosis 40% más alta para igualar el efecto terapéutico comparado con los acetiladores lentos.

TABLA N°4.

Toxicidad de algunos fármacos relacionada con el fenotipo acetilador.

Fármaco	Fenotipo	Efectos
Dapsona	Lento	Neurotoxicidad
Sulfametoxazol	Lento	Hipersensibilidad
Hidralazina	Lento	Lupus sistémico y eritematoso
	Rápido	Disminuye el efecto terapéutico
Isoniacida	Lento	Interacción con fenitoína
	Lento	Interacción con rifampicina
Cotrimoxazol	Lento	Varias reacciones adversas
Sulfazalazina	Lento	Varias toxicidades
	Lento	Hepatotoxicidad
	Lento	Náusea y vómito
Amonafida	Rápido	Leucopenia
Procainamida	Lento	Lupus sistémico y eritematoso
Fenelzina	Rápido	Disminuye el efecto terapéutico
p-Fenilendiamina	Lento	Dermatitis por contacto

La tabla muestra la respuesta acetiladora además del efecto tóxico de algunos fármacos con grupos aminos (Butcher, et al., 2002).

Las Sulfas son_ N-hidroxiladas, consecuentemente individuos con hidroxilación rápida y acetilación lenta están propensos a mayor toxicidad inducida por sulfonamidas.

La Dapsona tiene un patrón metabólico similar por lo que individuos con una mezcla de acetilación lenta e hidroxilación rápida pueden desarrollar efectos colaterales, como neurotoxicidad o anemia hemolítica.

2.8. NAT 2 y predisposición a enfermedades

Una gran cantidad de contaminantes ambientales entre los que se incluyen el humo del cigarrillo, el de los automóviles, el que se produce por la quema de basura al igual que productos metabólicos presentes en carnes asadas y ahumadas. Todos estos procesos originan metabolitos principalmente de tipo arilaminas las cuales sufren detoxificación por acetilación. Las diferencias en la actividad de enzimas acetilantes determinan diferencias en el metabolismo de cada individuo predisponiendo a ciertas toxicidades y al desarrollo de ciertas enfermedades entre estos el cáncer de vejiga, colon y mama, el lupus eritematoso sistémico, diabetes, enfermedad de Gilbert, enfermedad de Parkinson (relacionada con el fenotipo acetilador lento), y además la enfermedad de Alzheimer (relacionado con el fenotipo acetilador rápido) (García, et al., 2005).

Varios estudios han demostrado la relación entre varios tipos de cánceres y el metabolismo de NAT. Un estudio realizado en población de Eslovaquia (Klimkacova, et al., 2011) sugiere una susceptibilidad aumentada a cáncer de vejiga en acetiladores lentos.

Se ha estudiado el cáncer de mama en mujeres que consumen una gran cantidad de carnes rojas bien cocidas (asadas). Hein, et al., 2002, han observado la relación entre la acetilación lenta y el cáncer de cabeza y cuello en individuos caucásicos y con el desarrollo de cáncer de esófago y laringe en Japón.

La actividad lenta del genotipo acetilador NAT2 se ha asociado también con cáncer de boca y faringe, mientras que la acetilación rápida se ha asociado con una predisposición a cáncer de pulmón en individuos fumadores (Agundez, et al., 2000).

El NAT2 puede activar sustancias pro cancerígenas mediante O-acetilación dando lugar a compuestos altamente reactivos y responsables de mutaciones del ADN (Hein, 2002).

En un estudio llevado a cabo en caucásicos españoles en el que se incluyeron 1,150 casos y 1,149 controles se observó un mayor riesgo de cáncer de vejiga en individuos con genotipo NAT2 lento comparado con los individuos con genotipo rápido (García, et al., 2005). La incidencia fue mayor en los individuos fumadores, por lo que el genotipo lento del NAT2 parece aumentar el riesgo de cáncer de vejiga particularmente en individuos fumadores (García, et al., 2005).

Uno de los tipos de tumores más relacionados con el fenotipo acetilador rápido y la susceptibilidad a su desarrollo es el cáncer colorrectal. Agundez, et al., (2000) estudiaron el genotipo acetilador de 120 pacientes afectados por cáncer de colon, observando que el genotipo acetilador rápido constituía un factor de riesgo para aquellos tumores localizados a nivel del colon sigmoide, pero no para aquellos cánceres de colon que presentaban una localización diferente.

En lo referente a otras enfermedades diferentes del cáncer, también se han realizado varios estudios que relacionan el genotipo NAT2 con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Arif, et al., 2007), enfermedad de Parkinson, (Borlak, et al., 2006) y artritis reumatoide, (Pawlik, et al., 2002). Debido a que en la mayoría de estos estudios las muestras de población utilizadas fueron muy pequeñas, las conclusiones no son definitivas. Sin embargo si se observan tendencias que deben ser consideradas en

esas poblaciones. El lupus eritomaso inducido por fármacos (fundamentalmente por procainamida e hidralazina) se ha relacionado claramente con metabolizadores lentos (Woolsey, et al., 1978), asociándose probablemente con un mayor porcentaje de fármaco no acetilado siguiendo rutas metabólicas alternativas, interaccionando con macromoléculas celulares y dando lugar a sustancias que son reconocidas como autoantígenos, lo cual desencadena una respuesta inmunitaria (Woolsey, et al., 1979)

TABLA N°5.

Implicación de la actividad de NAT con ciertos tipos de cánceres.

Patología (Cáncer)	Estado Acetilador
Pulmón	Rápido
Laringe	Lento Rápido
Hígado	Lento
Mama	Rápido
Colon	Rápido
Vejiga	Lento
Estómago	Rápido

Implicación de la actividad de la enzima N-Acetiltransferasa con la tendencia al desarrollo de ciertos tipos de cánceres (Ladero, et al., 2001; Agúndez, et al., 2000; Martínez, et al. 1995, Loer, et al., 1979).

TABLA N° 6.

Otras patologías relacionadas con la actividad metabólica acetilante.

Patología (Otras Enfermedades)	Estado acetilador
Parkinson	Lento
Esclerosis Múltiple	Lento
Alzheimer	Lento
Artritis reumatoide	Rápido
Psoriasis	Lento
Lupus eritematoso discoide	Lento
Lupus inducido por fármacos	Lento

Otras patologías posiblemente relacionadas con la actividad de la enzima NAT2 (Ladero, et al., 1989; Agúndez, et al., 1998; Jiménez, et al., 1989; Woolsey, 1978; Strandberg, 1976).

2.9. Cafeína como medicamento sonda de la actividad de la NAT2

La cafeína es un alcaloide de la familia de las metilxantinas (1, 3,7-trimetilxantina). En estado puro es un polvo blanco y amargo. Posee acciones estimulantes del sistema nervioso central y tiene efecto diurético. A dosis mayores de 1 gramo al día puede producir efectos secundarios como arritmias y ansiedad entre otros varios efectos.

Aproximadamente el 100% de la cafeína administrada en forma oral se absorbe a través del tracto gastrointestinal y alcanza concentraciones plasmáticas en unos 30-45 minutos. Se distribuye ampliamente en el organismo, se metaboliza en el hígado y se excreta parcialmente inalterada y como múltiples metabolitos a través del riñón (Ramírez, 2010).

Los recién nacidos carecen de la adecuada actividad enzimática para metabolizar la cafeína por lo que la vida media en ellos puede ser de 3-4 días y la toxicidad puede ser elevada. En fumadores por el contrario la vida media es corta (Aprox. 3 horas). En las mujeres gestantes la vida media es de 18 horas o más y en los pacientes con insuficiencia hepática (deterioro severo de la función hepática) es también prolongada. Los principales pasos metabólicos de la cafeína son:

1. Desmetilación inicial para dar origen a dimetilxantinas como teofilina, teobromina y paraxantina (1,7-dimetilxantina).
2. Oxidación en C, para generar el ácido 1,3,7-trimetilúrico.
3. Hidratación y ruptura del anillo, en C8 y N9, para dar dimetiluracilo.

Las dimetilxantinas sufren luego una nueva desmetilación y se metabolizan a través de reacciones similares a 2 y 3.

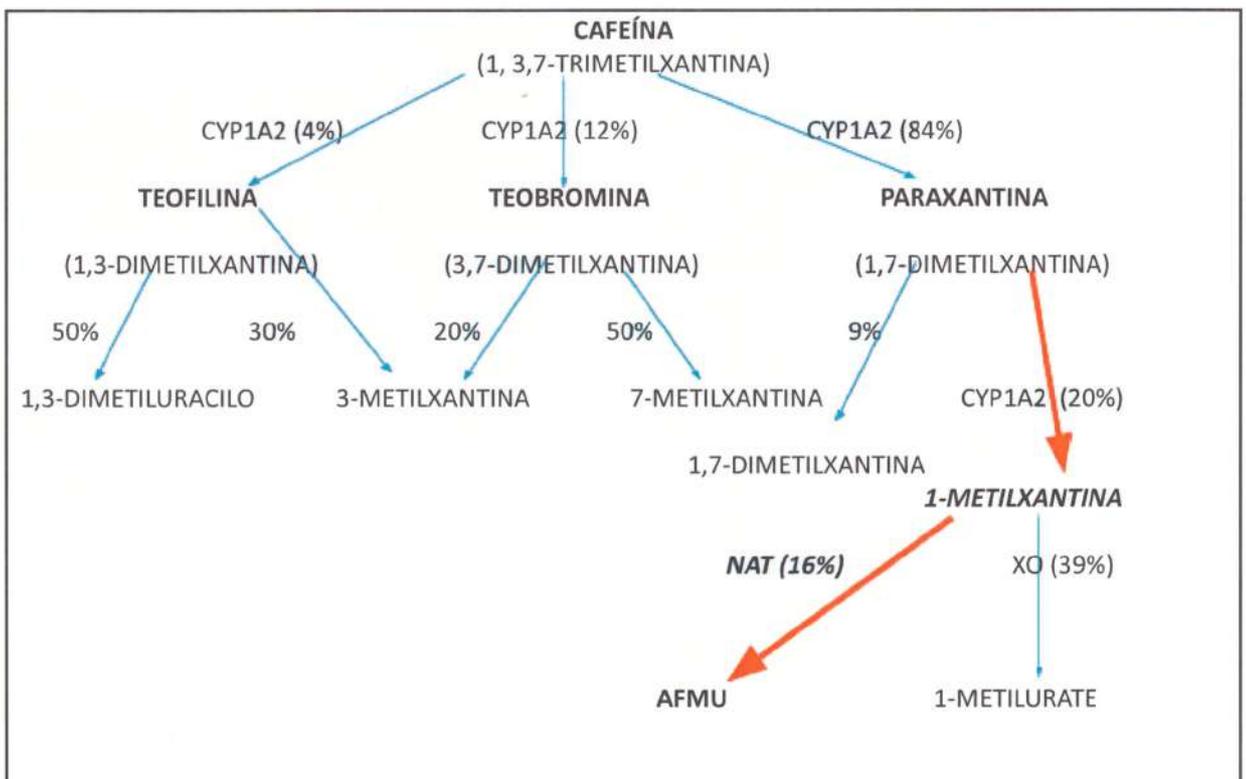
El metabolismo de la cafeína involucra la isoenzima del citocromo P-450 (CYP) hepático, subfamilia 1A, gen 2 (CYP1A2) el cual metaboliza por desmetilación la mayor parte de cafeína (95%), transformándola en:

- ✓ Paraxantina (84%), Teobromina (12%) y teofilina Teofilina (4%): Posteriormente se metaboliza también por la CYP1A2 en monoxantinas, que serán sustrato de la xantinaoxidasa. La N-acetiltransferasa-2 metaboliza la paraxantina a 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracilo (AFMU). Intervienen de forma minoritaria otras enzimas como la CYP2E1 (isoenzima del citocromo P450, subfamilia 2E, gen 1), y CYP3A3 (isoenzima del citocromo P450, subfamilia 2A, gen 3). Se han descrito hasta 25 metabolitos. Sólo entre un 1-2% de la dosis ingerida de cafeína se excreta sin cambios en la orina.

En el siguiente esquema se observan los principales pasos metabólicos de la cafeína.

FIGURA N° 5.

Metabolismo de Cafeína en humanos.



Esquemmatización del metabolismo de Cafeína

Para que una sustancia sea utilizada como sonda en la determinación de una enzima debe tener alta biodisponibilidad y ser metabolizada en alto grado por la enzima que se pretende estudiar. Todas estas características las cumple la cafeína por lo que es sustrato prototipo de elección y marcador del fenotipo metabolizador del CYP1A2 (razón paraxantina/cafeína) en plasma y saliva, de la Xantina-Oxidasa y de la N-acetiltransferasa.

En el caso de la NAT² se determina la razón metabólica urinaria para dos metabolitos de cafeína; el 5-acetilamino-6-amino-3-metiluracilo (AFMU) y la 1-metilxantina (1X) utilizándose la razón mola AFMU/1-MX (Kalow, 1991).

2.10. Farmacogenética

La Farmacogenética es la ciencia que estudia las bases genéticas involucradas en las diferencias interindividuales en la respuesta a fármacos, tanto a nivel de eficacia como de seguridad. Su principal objetivo es el desarrollo de la medicina individualizada que permita optimizar la eficacia de los fármacos, limitar la toxicidad de los mismos, reducir los costos de la terapia con fármacos. El primero en proponer el término «Farmacogenética» fue Friedrich Vogel en 1959. En 1962 Kalow escribió la primera monografía sobre el tema (Tabáres, 2004).

La primera observación escrita relacionada con la farmacogenética se remonta al año 510 a.C. cuando Pitágoras observó que la ingesta de habas producía en algunos individuos una reacción potencialmente fatal. Con el tiempo se reconoció que se trataba de una anemia hemolítica que aparecía en individuos con deficiencia en la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). El primer informe de la farmacogenética moderna fue publicado a principios de 1930 por Snyder. Pero no fue hasta los años 1950 cuando la Farmacogenética se estableció como campo de estudio al tomar en consideración las opiniones de diversos investigadores que expresaban que algunas

reacciones adversas a medicamentos podrían estar relacionadas con variaciones en la actividad enzimática y que estas se determinan genéticamente (Daudén, 2006).

Motulsky, (1957), fue quien primero documentó el concepto de las alteraciones heredadas en el metabolismo de los fármacos podían explicar las diferencias individuales en respuesta a los medicamentos.

El campo de la Farmacogenética fue estimulado en los años 1970, con hechos como la descripción que Robert Smith hizo en 1977 sobre la deficiencia en el metabolismo de la debrisoquina, cuando personalmente experimentó una hipotensión ortostática tras tomar el medicamento. Actualmente se conoce que el efecto correspondiente es debido a la deficiencia de la enzima Citocromo P450 2D6. A este polimorfismo se conoce como polimorfismo de la Debrisoquina (Mahgoub, 1977).

Otro hallazgo de importancia en la farmacogenética es el de Vesell quienes demostraron que las vidas medias plasmáticas de muchos fármacos eran menos divergentes entre parejas de gemelos monocigotos que entre parejas de gemelos dicigotos (Vesell, 1980). Concluyeron entonces, que la herencia multifactorial podía determinar el metabolismo farmacológico individual (herencia multigénica).

Las bases genéticas de estos patrones hereditarios se han empezado a poner en claro a finales de los años 1980 con la clonación y caracterización de numerosos genes humanos codificantes de enzimas metabolizadoras de fármacos, receptores y varios sistemas de transporte.

2.11. Métodos para la Determinación de Fármacos y sus Metabolitos en Humanos. HPLC

La Cromatografía es un método usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los estos se distribuyen en dos fases, una de las

cuales es estacionaria, mientras la otra fase es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película.

La técnica HPLC permite ejecutar análisis con alta precisión, especificidad y sensibilidad. Presenta como ventaja la posibilidad de obtener información cuantitativa y cualitativa de los componentes de la muestra a analizar. La medición del tiempo de retención se inicia desde el momento que se introduce la muestra en la columna hasta el momento en que aparece el máximo pico en la gráfica. La forma de identificar dos o más sustancias que tengan el mismo tiempo de retención es comparando el espectro obtenido con el de los estándares analíticos de las sustancias patrones. (Mc Nair, et al., 1973).

CAPÍTULO III
MARCO METODOLÓGICO

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1 Área de trabajo, reactivos y equipo

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecotoxicología, del Centro de Investigación en productos naturales y Biotecnología (CIPNABIOT), de la Universidad Autónoma de Chiriquí, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas.

3.1.1.1. Reactivos químicos

Los reactivos utilizados para la preparación de las muestras fueron:

- ✓ Ácido Ascórbico
- ✓ Ácido Acético glacial, Biopack, Industria Argentina.
- ✓ Sulfato de amonio JT Baker, PW132.14.
- ✓ Cloroformo para análisis Merck KGaA.
- ✓ Isopropanol grado analítico Panreac, Química S.A., USA.
- ✓ Metanol grado cromatografía líquida, Merck KGaA

3.1.1.2. Materiales consumibles

✓ El material de plástico que se utilizó fueron:

1. Recipientes de 2000 ml.
 2. Envases estériles de orina de 100ml, Intermedic S.A.
 3. Envases para alícuota de orina de 30ml, Intermedic S.A.
 4. Jeringas estériles de 1ml Ultra Fine y 10 ml Biopharm.
- ✓ Guantes látex desechables, Médica y Farmacia.
 - ✓ Tubos de ensayo de vidrio VWR Ed.

- ✓ Micropipetas y puntas de pipeta desechables.
- ✓ Filtros de jeringa para HPLC: Unidad de filtración Millex-FH; 0,45 μm , PTFE, 4 mm, no estéril.

3.2.1. Equipos

Centrífuga Eppendorf 5430 modelo 5427, Vortex, LW Scientific, Inc., Bomba de presión al vacío (Branson serie 5510), Sistema de purificación de agua: Elga Model UHQ-11, MK3, VK., Campana de flujo laminar CFAUT Mex 120, Plancha caliente: Modelo Kern 572, Balanza semi-analítica Boeco, Germany, Modelo BBa 51, Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) equipado con:

- Detector: con arreglo de diodos a cuatro longitudes de ondas simultáneas correspondientes a la máxima absorción de AFMU de 280 nm, Metilxantina de 268 nm, Cafeína de 274 nm.

3.2.2. Procedimiento experimental:

En el estudio participaron individuos sanos entre 18 y 51 años, no fumadores, a los que se les solicitó no haber tomado bebidas alcohólicas ni bebidas con contenido de cafeína por lo menos 4 días antes del experimento. Cada voluntario firmó un formulario de consentimiento voluntario y se le hizo una encuesta con el fin de conocer antecedentes familiares de importancia como enfermedades, hábitos alimenticios, etc.

Recolección de la muestra:

1. Se administró por vía oral una taza de café soluble (Nescafé, 5 gramos equivalentes a 100 mg de Cafeína) a 52 voluntarios sanos de 18 a 50 años.

2. Previamente, se colectó una muestra de orina control a cada individuo y se le requirió a vaciar totalmente la vejiga.
3. Se le agregó 100 mg de ácido ascórbico al recipiente donde se depositaría toda la orina excretada.
4. Se colectó toda la orina durante las 6 horas posteriores a la administración del café.
5. Se analizó cada muestra de orina para determinar la presencia de cafeína y sus metabolitos; mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando el método establecido por Tang, et al.,(1991).
6. Se analizó los resultados mediante histogramas de frecuencia.

3.2.3. Procedimiento analítico

- Se tomó 1 ml de muestra de orina de cada individuo.
- Se añadió 0.2g de Sulfato de Amonio.
- A dicha muestra se le adicionaron 7 ml de cloroformo: Isopropanol (19:1).
- Se mezcló por 10 minutos en Vortex y luego se llevó a centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos.
- Se desechó la fase acuosa. La fase orgánica se pasó a un tubo de concentración.
- Se llevó a sequedad con corriente de nitrógeno.
- Se reconstituyó con 200 μ l de fase móvil.
- Se filtró con una membrana d 0.45 μ m.
- Se inyectaron 50 μ L en el cromatógrafo.

3.2.4. *Análisis de muestras de orina.*

Las muestras de orina se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un equipo Agilent Technologies 1200 equipado por bomba cuaternaria, detector por arreglo de Diodos (DAD), Degasificador de vacío, Inyector Manual, Columna Eclipse XDB-C18 de 4 pulgadas x 150mm, con un tamaño de partícula de 5µm. El equipo se trabajó bajo las siguientes condiciones analíticas: Fase Móvil: se realizó mediante un método isocrático V/V utilizando metanol grado analítico 12% + 88% de una solución de Ácido Acético al 0.45% (0.45 de Ácido Acético y 99.55 de agua); previamente filtrados y degasificados. Modo Isocrático, Flujo: 1.500ml/min, Tiempo de corrida 15 min a longitud de onda de 254nm; 268nm; 270nm; 274nm; 280nm; 284nm.

3.2.5. *Análisis de los resultados*

Se construyó una curva de calibración añadiendo concentraciones conocidas de los analitos de interés AFMU, Metilxantina y Cafeína a 1 ml de orina blanco en los rangos de concentración esperados a encontrar en las muestras basándose en datos de la literatura. El análisis se basó en el área de los picos de los cromatogramas de los analitos respectivos con respecto a las concentraciones de los mismos. Las concentraciones de las muestras de los desconocidos se obtuvieron por interpolación en la curva de calibración respectiva. La cantidad de cada muestra se obtuvo multiplicando la concentración obtenida en cada muestra por el volumen excretado.

3.2.6. Esquemización del procedimiento

FIGURA N° 6.
Esquemización de los procedimientos.



(Espinoza y González, 2015).

CAPÍTULO IV
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS
RESULTADOS

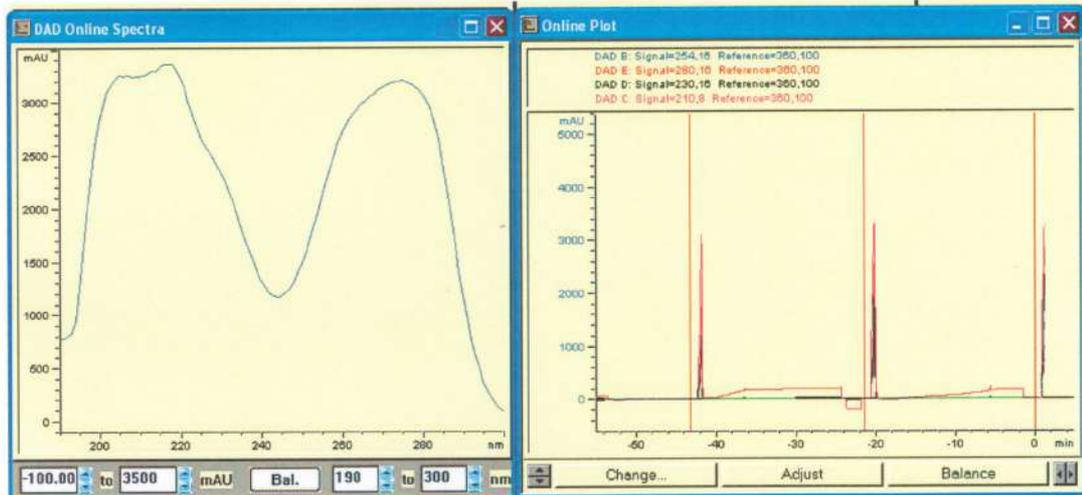
4.1. Validación del Método

1. Técnica analítica

En la figura N° 7 se muestra los espectros de absorción de AFMU y el Cromatograma respectivo el cual eluye según las condiciones analíticas con un tiempo de retención de 1.7 minutos.

Espectro de Absorción de 5-acetil-amino-6-formilamino-3 metil-uracilo (AFMU).

FIGURA N° 7.
Espectro de absorción y cromatograma representativo del análisis por triplicado de una muestra de AFMU.

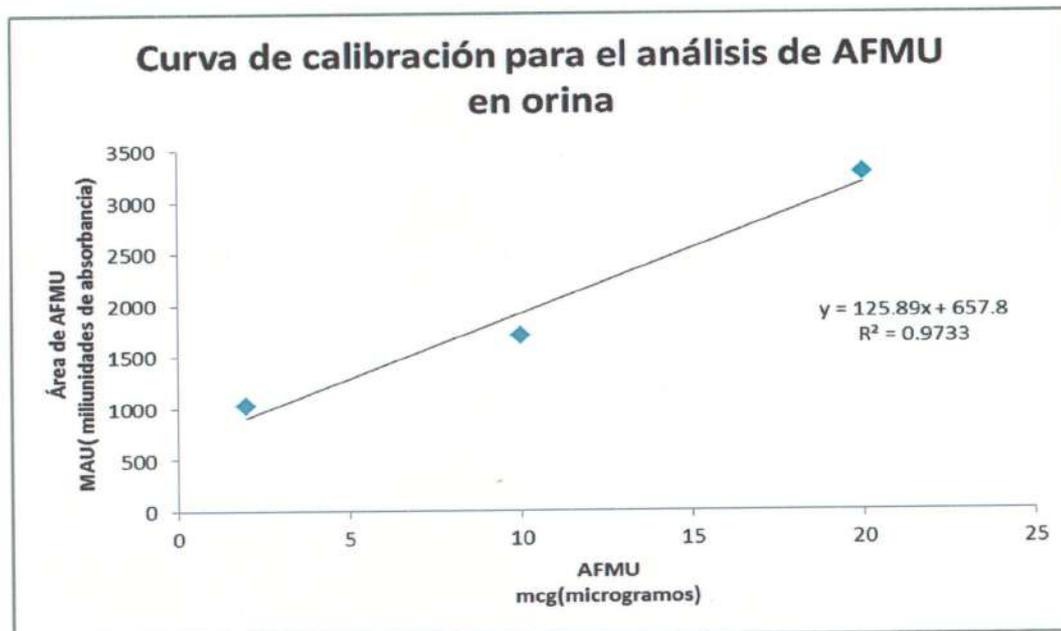


(Espinoza y González, 2015).

La figura N°8 muestra la curva de calibración del método por HPLC para el análisis del metabolito de cafeína 5-acetil-amino-6-formilamino-3 metil-uracilo (AFMU). Como puede observarse existe linealidad en el rango de concentraciones analizadas.

FIGURA N°8.

Curva de calibración para el análisis de AFMU en orina.



(Espinoza y González, 2015).

En la figura N°9 se muestra el espectro de absorción y el cromatograma correspondiente a 60 µg de 1-metilxantina. El tiempo de retención de 1-metilxantina es 3.7 min.

FIGURA N° 9.
Espectro de absorción de 1- Metilxantina (1-MX).

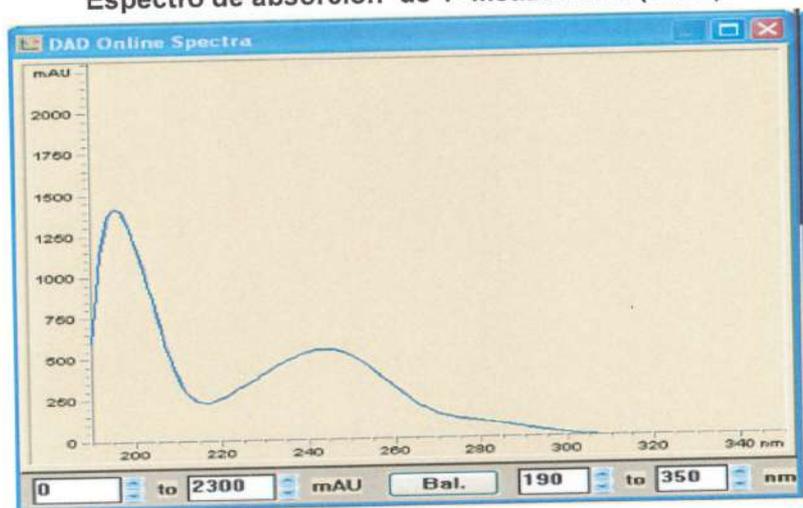
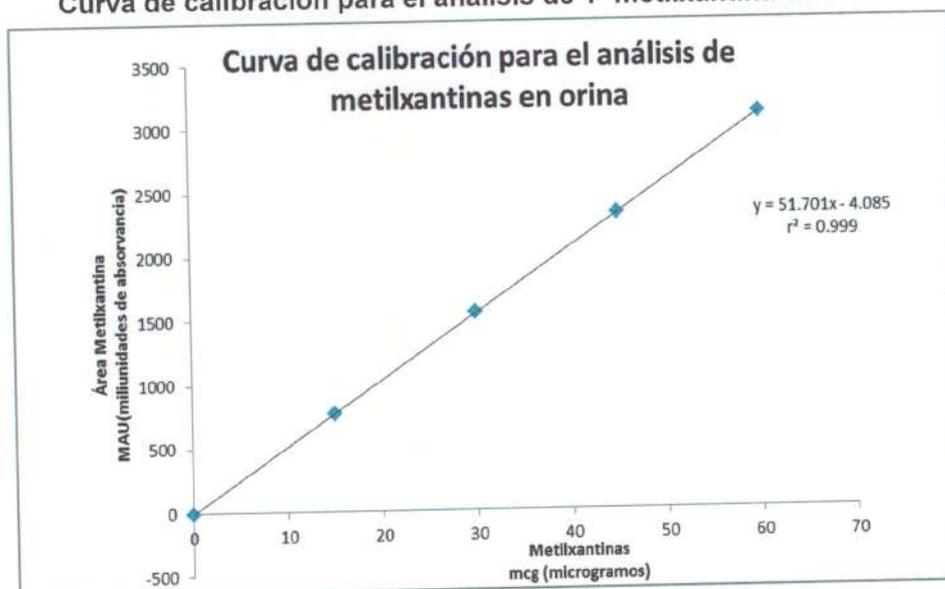


Figura N° 9. La figura muestra el espectro de absorción del metabolito de cafeína, el 1-metilxantina (1-MX), en tiempo de retención 2.6 y una longitud de onda de 260nm. (Espinoza y González, 2015).

FIGURA N° 10
Curva de calibración para el análisis de 1- metilxantina en orina.



En la Figura N°10, podemos observar las curvas de calibración para el análisis de 1-MX en orina, otro metabolito de gran importancia para la determinación de la enzima NAT2. (Espinoza y González, 2015).

Espectro de cafeína

En la Figura N°11 se muestra el espectro de absorción y un cromatograma correspondiente a la curva de calibración de cafeína. El tiempo de retención de cafeína fue de 11.8 min.

FIGURA N° 11.

Espectro de absorción y un cromatograma correspondiente a la curva de calibración de cafeína.

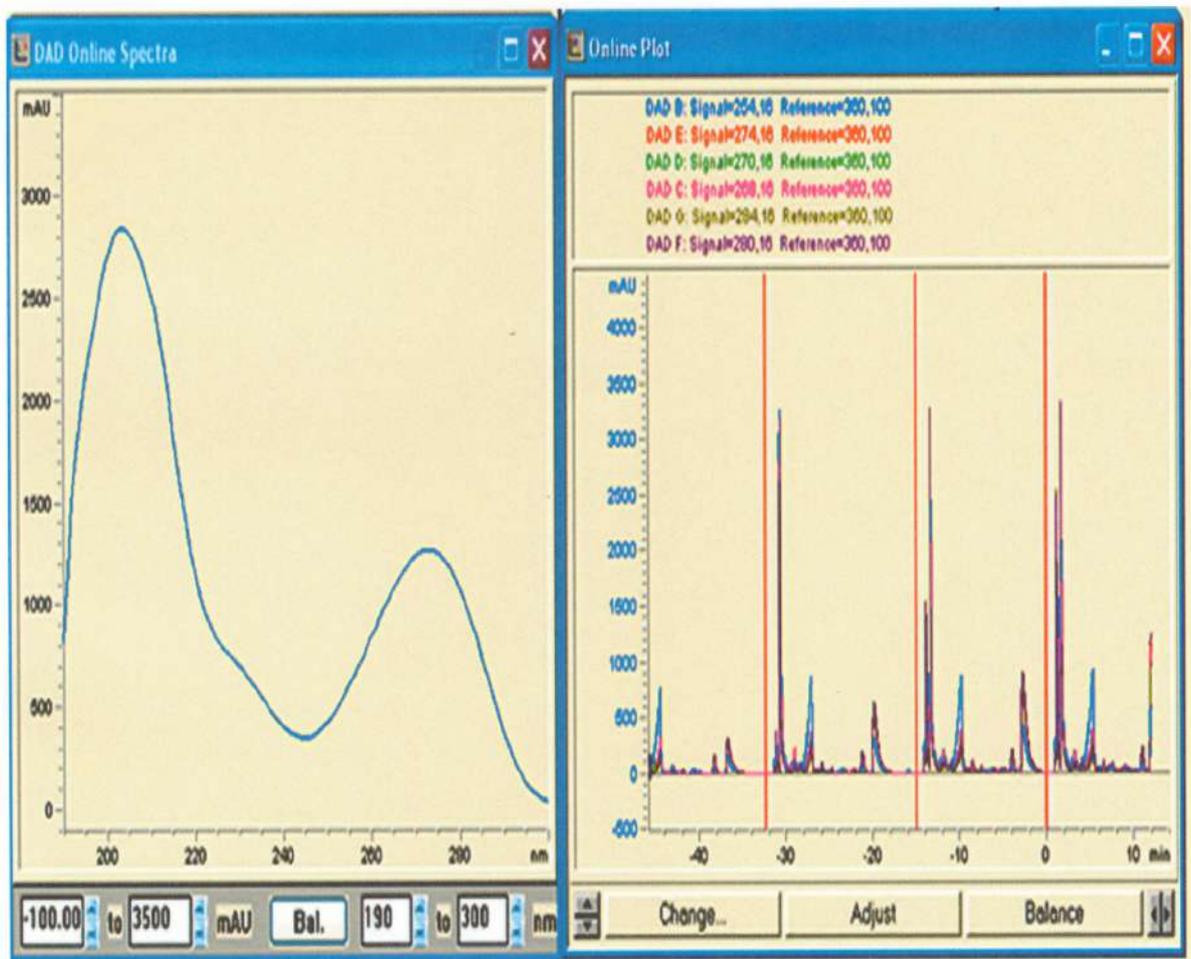


Figura N° 11 se muestra el espectro de cafeína en tiempo de retención 11.8 min a longitud de onda 274nm; flujo: 1.500mL/min. Los tiempos de retención de AFMU en esta muestra son 1.7 min y el de 1-MX es de 3.5 min. (Espinoza y González, 2015).

Análisis de muestras de orina.

Las muestras de orina se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un equipo Agilent Technologies 1200 equipado por bomba cuaternaria, detector por arreglo de Diodos (DAD), Desgasificador de vacío, Inyector Manual, Columna Eclipse XDB-C18 de 4 pulgadas x 150mm, con un tamaño de partícula de 5µm. El equipo se trabajó bajo las siguientes condiciones analíticas: Fase Móvil: se realizó mediante un método isocrático V\V utilizando metanol grado analítico 12% + 88% de una solución de Ácido Acético al 0.45% (0.45 de Ácido Acético y 99.55 de agua); previamente filtrados y desgasificados. Modo Isocrático, Flujo: 1.500ml/min, Tiempo de corrida 15 min a longitud de onda de 254nm; 268 nm; 270 nm; 274 nm; 280 nm; 284 nm.

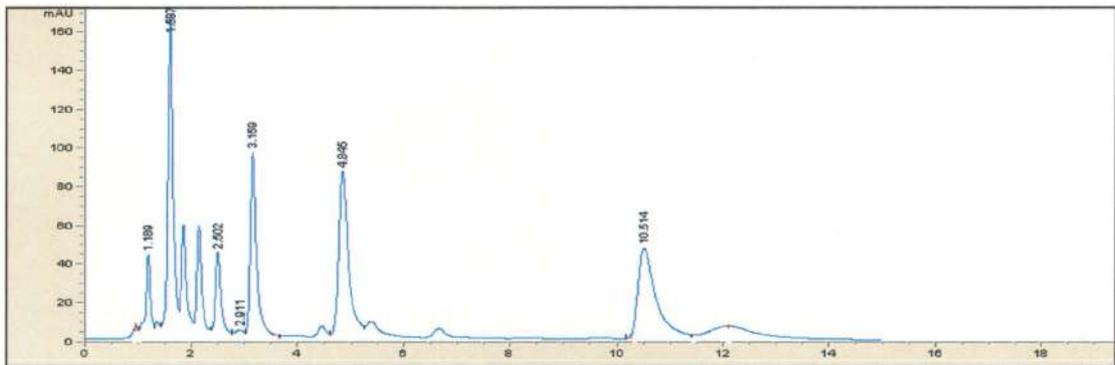
Extracción de AFMU- 1-MX- Cafeína.

De la muestra concentrada se tomaron 1ml para realizar la extracción y análisis.

- Se llevó a pH 4 adicionando Ácido ascórbico.
- Se le agregó 7 ml de solución de Cloroformo-Isopropanol (19:1). Se mezcló mediante Vortex por 1 min. Luego se centrifugó (Centrífuga Eppendorf 5430 modelo 5427) a 3500 rpm durante 10 minutos.
- Luego desechó la fase acuosa. La fase orgánica, se reconstituyó con 100µl de fase móvil (En esta ocasión se adiciona los 100µl para asegurarnos de recuperar la mayor cantidad posible de muestra).
- Finalmente antes de inyectar la muestra de HPLC, se filtró utilizando los filtros Millipore para asegurarnos de tener la muestra libre de trazas y contaminantes que interfieran en la lectura de la misma.

En la figura N °12 se muestra un cromatograma tipo, obtenido de una muestra de orina de un participante en el estudio. Las concentraciones de los metabolitos de interés (AFMU y 1-MX) se obtuvieron por interpolación de las áreas de estos metabolitos en las correspondientes curvas de calibración mostradas previamente.

FIGURA N°12.
Cromatograma.



(Espinoza y González, 2015).

Patrón fenotípico a partir de muestra de orina.

Según el análisis de las encuestas realizadas a los voluntarios, se demuestra una predisposición muy alta a enfermedades como cáncer, diabetes e hipertensión. Estas enfermedades están relacionadas con el fenotipo acetilador por lo que se involucra la enzima NAT2.

TABLA N°7.

Predisposición a enfermedades.

PREDISPOSICIÓN A ENFERMEDADES	FRECUENCIA
Cáncer	26
Enfermedades Pulmonares	11
ECV	6
Diabetes	26
HTA	30
Enfermedades Gástricos	9
Enfermedades Óseas	15
Anemia	6
Enfermedades Cardiacas	15
Alergias	6
Enfermedades Renales	5
Obesidad	2
Depresión	2
Cataratas	1
Diverticulitis	2
Alzheimer	5
Parkinson	2
Enfermedades neurológicas	7
Enfermedades de la Tiroideas	5
Hiperlipoproteinemia	6

Análisis de las encuestas realizadas a los 52 voluntarios sanos. (Espinoza y González, 2015).

FIGURA N° 13.

Histograma de Frecuencia.

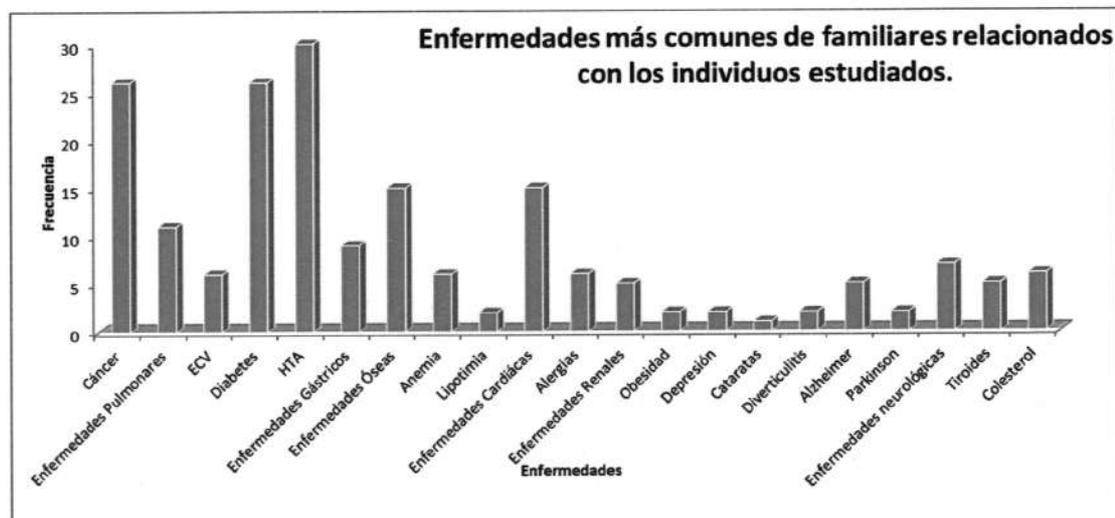


Figura de frecuencia de las enfermedades más comunes de los familiares de los voluntarios sanos.

En el análisis de las encuestas podemos ver la diabetes como una de las enfermedades más comunes de nuestra población estudiada, debido a que de los 52 encuestados 30 tienen familiares con esta enfermedad, algunos incluso por ambos lados de consanguinidad. Existen estudios como el realizado por... que nos habla de la relación que existe entre la diabetes y la NAT2.

Condiciones cromatográficas:

MEOH: 12%; H₂O: 88%; ACT Glacial: 0.45%

Tiempo de Corrida: 15 min; Flujo: 1.500mL/min; Inyector: Loop 50µL

Longitud de onda: 254 nm; 268 nm; 270 nm; 274 nm; 280 nm; 284 nm.

Figura N° 11. El cromatograma muestra los espectros de absorción de los metabolitos de cafeína en una muestra de orina de un voluntario sano, 5-acetil-amino-6-formilamino-3 metil-uracilo (AFMU) con T.R 1. 597 en L.O 284 nm, 1-metilxantina (1-MX) con T.R 2.502 en L.O 2.60 nm y Cafeína con T.R 10.514 en L.O 2.74nm.

Linealidad del método

El análisis de la linealidad fue calculado por duplicado en sólo dos muestras dentro del intervalo de concentraciones de 1 a 81 mcg/mL, se obtuvo una media de 0.97 para AFMU y 1 MTX, respectivamente. Además, el método se mantuvo lineal ($r^2 > 0.98$) para todas las concentraciones de los dos analitos, dentro del rango de concentraciones estudiado.

CURVA DE CALIBRACIÓN DE AFMU

Condiciones cromatográficas:

MEOH: 12%; H₂O: 88%; ACT Glacial: 0.45%.

Tiempo de Corrida: 15 min; Flujo: 1.500mL/min; Inyector: Loop 50µL

Longitud de onda: 254 nm; 268 nm; 270 nm; 274 nm; 280 nm; 284 nm.

CURVA DE CALIBRACIÓN DE 1-METILXANTINA (1-MX).

Condiciones cromatográficas:

MEOH: 12%; H₂O: 88%; ACT Glacial: 0.45%

Tiempo de Corrida: 15 min; Flujo: 1.500mL/min; Inyector: Loop 50µL

Longitud de onda: 254nm; 268nm; 270nm; 274nm, 280nm; 284nm.

TABLA N°8.

RELACIÓN METABÓLICA ENTRE AFMU/1-MX

Individuo	AFMU mAU's	1-MX mAU's	Relación (%)	Individuo	AFMU mAU's	1-MX mAU's	Relación (%)
CH1	3000	6195	0.48	CH27	900	1674	0.54
CH2	798	7392	0.11	CH28	2600	2561	1.01
CH3	4750	4500	1.06	CH29	2400	15480	0.15
CH4	12012	12039.5	0.99	CH30	3600	5832	0.62
CH5	1972	11815	0.17	CH31	9478	17038	0.56
CH6	550	2952	0.18	CH32	2814	13680	0.21
CH7	16282	16786	0.97	CH33	3768	10960	0.34
CH8	2376	2372	1.00	CH34	1000	5080	0.19
CH9	316	3756	0.08	CH35	3000	7860	0.38
CH10	17927.5	7155	2.51	CH36	6800	20842	0.33
CH11	2130	1516	1.4	CH37	1890	3538	0.53
CH12	1100	1672	0.66	CH38	6200	13547	0.46
CH13	624	11808	0.05	CH39	2100	3066	0.68
CH14	2674	4606	0.58	CH40	3600	3348	1.07
CH15	1800	6066	0.29	CH41	1572.5	1647.3	0.95
CH16	6368	5240	1.22	CH42	1900	703	2.70
CH17	900	2340	0.38	CH43	86112	45903	1.87
CH18	3156	7280	0.43	CH44	1800	4383	0.41
CH19	2092.5	5340	0.39	CH45	2400	3504	0.68
CH20	1600	2312	0.69	CH46	11979	2691	4.45
CH21	1300	3965	0.33	CH47	4800	17472	0.27
CH22	2000	11700	0.17	CH48	1100	3839	0.29
CH23	2800	5544	0.5	CH49	800	2048	0.39
CH24	1400	1232	1.14	CH50	10140	5370	1.89
CH25	1300	1131	1.15	CH51	2400	5424	0.44
CH26	1700	2703	0.63	CH52	1000	620	1.61

Tabla N°8. Relación metabólica entre AFMU y 1-MX en 52 individuos sanos estudiados para determinar el fenotipo acetilador de los mismos. (Espinoza y González, 2015).

TABLA N° 9.
Resultado de la relación metabólica.

Código de Voluntarios sanos	Relación	Metabolizador
CH20	0.69	Rápido
CH25	1.15	Lento
CH13	0.05	Rápido
CH19	0.39	Rápido
CH23	0.50	Rápido
CH24	1.14	Lento
CH15	0.29	Rápido
CH17	0.38	Rápido
CH12	0.66	Rápido
CH14	0.58	Rápido
CH16	1.22	Lento
CH27	0.54	Rápido
CH18	0.43	Rápido
CH22	0.17	Rápido
CH26	0.63	Rápido
CH21	0.33	Rápido
CH3	1.06	Lento
CH1	0.48	Rápido
CH5	0.17	Rápido
CH4	0.99	Lento
CH34	0.19	Rápido
CH29	0.15	Rápido
CH31	0.56	Rápido
CH33	0.34	Rápido
CH30	0.62	Rápido
CH46	4.45	Lento
CH47	0.27	Rápido
CH6	0.18	Rápido
CH11	1.40	Lento
CH9	0.08	Rápido
CH48	0.29	Rápido
CH49	0.39	Rápido
CH36	0.33	Rápido
CH42	2.70	Lento
CH37	0.53	Rápido
CH39	0.68	Rápido
CH41	0.95	Lento
CH40	1.07	Lento
CH43	1.87	Lento
CH44	0.41	Rápido
CH45	0.68	Rápido

CH38	0.46	Rápido
CH35	0.38	Rápido
CH50	1.89	Lento
CH7	0.97	Lento
CH8	1.00	Lento
CH10	2.51	Lento
CH51	0.44	Rápido
CH32	0.21	Rápido
CH2	0.11	Rápido
CH28	1.01	Lento
CH52	1.61	Lento

Tabla N° 9. Resultado final de la relación AFMU/1-MX, que permite determinar el fenotipo acetilador de los individuos estudiados. (Espinoza y González, 2015).

ANÁLISIS

Se determinó la razón molar de los metabolitos 5-acetil-amino-6-formilamino-3 metil-uracilo (AFMU) y 1-metilxantina (1-MX).

$$\text{Razón molar: } \frac{\text{AFMU}}{1\text{-MX}}$$

Se realizó un histograma del número de individuos en relación con el logaritmo de la razón molar. Se transformó el porcentaje de individuos a Probit con el fin de determinar las antimodas.

TABLA N° 10.

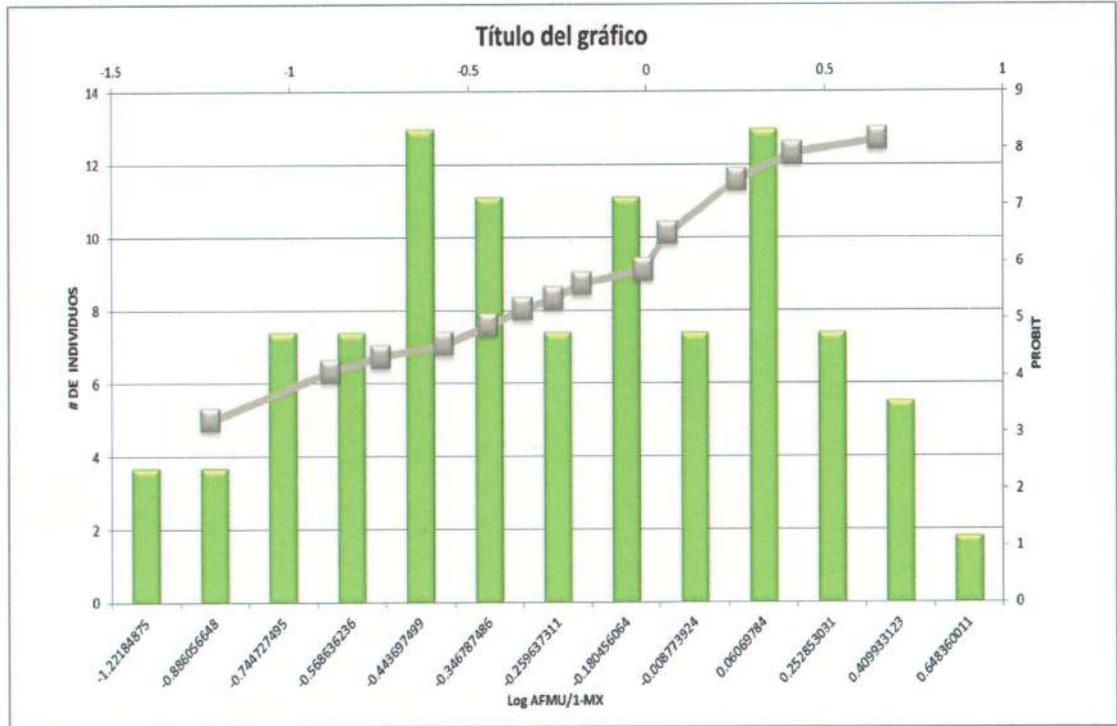
Frecuencia de distribución de individuos mestizos de Chiriquí.

Log [AFMU]/[MX]	% de Individuos	PROBIT
-1.22184875	3.7	3.21
-0.88605665	3.7	4.06
-0.74472749	7.41	4.32
-0.56863624	7.41	4.54
-0.4436975	12.96	4.87
-0.34678749	11.11	5.16
-0.25963731	7.41	5.35
-0.18045606	11.11	5.61
-0.00877392	7.41	5.86
0.06069784	12.96	6.5
0.25285303	7.41	7.44
0.40993312	5.55	7.91
0.64836001	1.85	8.15

Tabla N° 10. Frecuencia de distribución de 52 individuos mestizos originarios de la provincia de Chiriquí, respecto a la relación molar de excreción urinaria de AFMU/1-MX, 6 horas después de la ingestión de 100 mg de cafeína. (Espinoza y González, 2015).

FIGURA N° 14.

Histograma de frecuencia de dos poblaciones.



El histograma de frecuencia nos muestra dos poblaciones, una población que va desde 1.2218 a -0.1804 equivalente a 35 individuos que representan un acetilador rápido o intermedio y una segunda población cuyo rango va de -0.0087 a 0.6483, equivalente a 17 individuos que representa los acetiladores lentos. (Espinoza y González, 2015).

TABLA N° 11.

Individuos participantes en el estudio con familiares Diabéticos.

Código	Relación	Enfermedades familiares	Parentesco	Metabolizador
CH20	0.69	Diabetes	Abuela materna	Rápido
CH25	1.15	Diabetes	Abuelo materno	Lento
CH13	0.05	Diabetes	Madre, abuela materna	Rápido
CH23	0.50	Diabetes	Madre	Rápido
CH15	0.29	Diabetes	Padre, abuela y abuelo paterno.	Rápido
CH17	0.38	Diabetes	Familiares maternos	Rápido
CH12	0.66	Diabetes	Tía materna	Rápido
CH14	0.58	Diabetes	Abuela paterna	Rápido
CH16	1.22	Diabetes	Familiares paternos, Familiares maternos. Abuelo materno.	Lento
CH18	0.43	Diabetes	Familiares maternos.	Rápido
CH26	0.63	Diabetes	Familiares maternos	Rápido
CH3	1.06	Diabetes	Padre	Lento
CH1	0.48	Diabetes	Sobrinas y hermanas maternas.	Rápido
CH5	0.17	Diabetes	Padre, Familiares maternos. Abuelo paterno y sus familiares.	Rápido
CH4	0.99	Diabetes	Padre y familiares paternos y maternos.	Lento
CH29	0.15	Diabetes	Abuelo Paterno y materno	Rápido
CH47	0.27	Diabetes	Abuelo y abuela paterno	Rápido
CH37	0.53	Diabetes	Padre	Rápido
CH39	0.68	Diabetes	Padre, Abuela Paterno	Rápido
CH43	1.87	Diabetes	Abuelo y abuela paterno	Lento
CH38	0.46	Diabetes	Tíos materno	Rápido
CH35	0.38	Diabetes	Abuela materna	Rápido
CH8	1.00	Diabetes	Abuelo Paterno	Lento
CH10	2.51	Diabetes	Padre, Abuela materna	Lento
CH2	0.11	Diabetes	Abuelo materno	Rápido
CH28	1.01	Diabetes	Padre, Abuela Paterna	Lento

La tabla muestra que de 52 individuos sanos estudiados 26 poseen familiares con Diabetes, de los cuales 18 presentan un fenotipo acetilador rápido y 8 fenotipo acetilador lento. (Espinoza y González, 2015).

TABLA N°12.

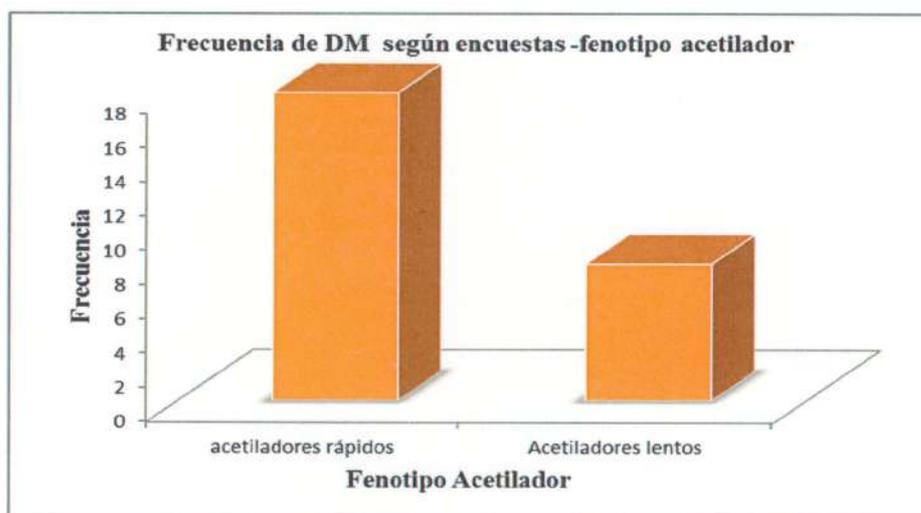
Participantes con familiares diabéticos.

Participantes en el estudio con familiares diabéticos (% de la población en estudio)	Acetiladores rápidos con familiares cercanos diabéticos	Acetiladores lentos con familiares cercanos diabéticos
26 (50%)	18 (69%)	8 (31%)

(Espinoza y González, 2015).

FIGURA N° 15.

Frecuencia de participantes con familiares diabéticos. (Fenotipo acetilador).



(Espinoza y González, 2015).

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

5.1. DISCUSIÓN

El histograma de frecuencia que describe nuestros resultados muestra una distribución por lo menos bimodal de la razón metabólica AFMU/1MX en población chiricana. Sin embargo considerando que la inflexión del histograma es bastante marcada a una razón molar de 0.09, obtuvimos una población que va desde 1.2218 a -0.1804 equivalente a 35 individuos que representan un acetilador rápido o intermedio y una segunda población cuyo rango va de -0.0087 a 0.6483, equivalente a 17 individuos que representan los acetiladores lentos.

Pocos estudios existen sobre índices de acetilación en población mestiza de Panamá. Un estudio en población costarricense mostró un 40 % de acetiladores lentos y 60% de acetiladores rápidos pero el mayor porcentaje de la población muestra valores intermedios (González, 2000).

En un estudio realizado en población mexicana (Castañeda, et al., 1995) se encontró una distribución trimodal con una frecuencia de 0.30 para acetiladores lentos, 0.42 para acetiladores intermedios y 0.28 para acetiladores rápidos. Nuestros resultados están cercanamente de acuerdo con los resultados obtenidos en la primera población mencionada, pero en Chiriquí se observa un porcentaje mayor de acetiladores rápidos y menor en los acetiladores lentos.

En la población chiricana existe una importante contribución del componente indígena al pozo genético de la población mestiza, lo que podría explicar nuestros resultados. Estudios en poblaciones indígenas puras de Centro América demuestran un reducido porcentaje de acetiladores lentos en estas poblaciones, probablemente por la contribución de genes asiáticos en las mismas (Arias, et al., 1993). Un porcentaje más

elevado de acetiladores lentos en población mestiza costarricense podría estar explicado por la mayor contribución de genes caucásicos en esa población.

Este es el primer estudio realizado en población mestiza chiricana sobre el fenotipo acetilador.

Puede observarse la cercana relación de la distribución del fenotipo acetilador con la proporción de familiares que han padecido diabetes y diversos cánceres. Aunque la población estudiada es hasta el momento sana, puede inferirse posibles tendencias a sufrir estos padecimientos.

CAPÍTULO VI
CONSIDERACIONES FINALES

6.1. CONCLUSIONES

Se validó un método con adecuada sensibilidad para determinar los metabolitos de cafeína AFMU y 1-MX.

Se determinó el fenotipo acetilador de población chiricana mestiza el cual demuestra una distribución bimodal en la que un 67 % representan acetiladores rápidos y 37% acetiladores lentos.

Estos resultados son cercanamente coincidentes con los reportados previamente por Arias, et al., (2002), en población indígena chiricana y en otras poblaciones de Centroamérica.

La incidencia de diabetes y cánceres en población relacionada con la población estudiada es alta. Aunque en este estudio no puede establecerse relación causa efecto con estas enfermedades sí es sugerente una posible predisposición a las mismas.

6.2. RECOMENDACIONES

Este es el primer estudio en población chiricana en que se obtiene el fenotipo acetilador. Es interesante continuar con estudios relacionados con el fin de obtener la incidencia de polimorfismos de enzimas oxidantes para establecer en forma más consistente las posibles predisposiciones a varias enfermedades.

Es interesante también realizar este tipo de estudios en poblaciones con padecimientos asociados con la actividad de la enzima, como por ejemplo en cánceres y diabetes y en pacientes con respuestas tóxicas o idiosincráticas a fármacos relacionados con la actividad de NAT².

CAPÍTULO VII
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.1. BIBLIOGRAFÍAS

- Agundez, J., Lozano, J., Sastre, J., Cerdán, F., Díaz, M., y Benítez, J. (2000). *N-acetyltransferase2 (NAT2) genotype and colorectal carcinoma: riskvariability according to tumour site? Scand J Gastroenterol*, 35(10), 1087-1091. 10.1080/003655200451225. PMID: 11099063
- Arias, T., Nebert, L., y Ramiro, E. (2002). La mezcla racial. 27; *Revista Médica de Panamá* p-5-17.
- Arif, E., Vibhuti, A., Alam, P., Deepak, D., Singh, B., Athar, M., y Pasha, M. (2007). Association of CYP2E1 and NAT2 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. *Clinic Chim*, 382:37-42.
- Arnaud, M., y Welskh, C. (1980). Caffeine metabolism in human subjects. *Congresos y Conferencias*. Londres. p.385-356.
- Aznar, S. (2011). Proyecto final, Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales.
- Bell, D., Taylor, J., Butler, M., Stephens, E., Wiest, J., Brubaker, L., Kadlubar, F., y Lucier, G. (1993). Genotype:phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase (NAT2) reveals a new slow-acetylator allele common in African-Americans. *Carcinogenesis*. 14:1689-1692.
- Blum, M., Grant, D., McBride, W., Heim, M., y Meyer, U. (1990). Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and functional expression. *DNA & Cell Biol*. 9:193-203.
- Blum, M., Demierre, A., Grant, D., Heim, M., y Meyer, U. (1991) Molecularmechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*. 88: 5237-524.
- Borlak, J., y Reamon, S. (2006). N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene polymorphisms in Parkinson's disease. *BMC Medical Genetics*; 7:30.

- Bova, G., Carter, B., Bussemakers, M., Emi, M., Fujiwara, Y., y Kyprianou, N. (1993). Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res.* 53:3869-3873.
- Butcher, N., Boukouvala, S., Sim, E., y Minchin, R. (2002). Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases. *The Pharmacogenomics Journal.* 2: 30-42.
- Daudén, Tello. (2006). "Farmacogenética I. Concepto, historia, objetivos y áreas de estudio". *Actas Dermosifiliográficas*, 97 (10), p 623-9.
- Deguchi, T. (1992). "Sequences and expression of alleles of polymorphic arylamine N-acetyltransferase of human liver". *J. Biol. Chem.* 267:18140-18147.
- Espinoza, U., y González, Y. (2015). *Determinación del fenotipo acetilador en población panameña residente en la provincia de Chiriquí, usando cafeína como sustancia sonda.* [Trabajo de Grado, Universidad Autónoma de Chiriquí].
- Evans, W., y Relling, M. (1999). Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*, 286:487-491.
- García, M., Malats, N., Silverman, D., Dosemeci, M., Kogevinas, M., Hein, D., Tardon, A., Serra, C., Carrato, A., García, R., Lloreta, J., Castaño, G., Yeager, M., Welch, R., Chanock, S., Chatterjee, N., Wacholder, S., Samanic, C., Tora, M., Fernández, F., Real, F., y Rothman, N. (2005). NAT2 slow acetylation and GSTM1 null genotypes increase bladder cancer risk: results from the Spanish bladder cancer study and meta-analyses. *Lancet*, 20:649-659.
- Gibaldi, M. (1992). Pharmacogenetics: Part II. *The Annals of Pharmacotherapy*, 26; p255-61.
- Gross, M., Kruisselbrink, T., Anderson, K., Lang, N., McGovern, P., DeLongchamp, R., y Kadlubar, F. (1991). Distribution and Concordance of N-Acetyltransferase Genotype and Phenotype in an American Population. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 8: 683-692.

- Hein, D., Doll, M., Rustan, T., Gray, K., Feng, Y., Ferguson, R., y Grant, D. (1993). "Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases". *Carcinogenesis*, 14:1633-1638. 3941-3947.
- Hein, D., Doll, M., Fretland, A., Leff, M., Webb, S., y Xiao, G. (2000). Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prevention*, 9: 29-42.
- Hein, D. (2002). Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res*, 506-507:65-77.
- Hickman, D., Risch, A., Camilleri, J., y Sim, E. (1992). Genotyping human polymorphic arylamine N-acetyltransferase: identification of new slow allotypic variants. *Pharmacogenetics* 2: 217-226.
- Kalow, W., y Bing-Kou, T. (1991). Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities. *Clin Pharm Ther*, 50:p508-19.
- Kazakevich, Y., y Lobrutto, R. (2007). "HPLC for Pharmaceutical Scientists" 8-10; 765-766.
- Klimkáčová, L., Habalobá, V., Sinovová, M., Nagy, V., Salagovic, J., y ZidziK, J. (2011), Effect of NAT2 gene polymorphism on bladder cancer risk in Slovak population, *Mol Bio Rep*, 38: 1287-1293.
- Leiro, V., Valverde, D., Vásquez, R., Botana, M., Constela, L., Agúndez, J., y Fernández, A. (2011). N-acetyltransferase 2-polymorphisms and risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in Caucasians. *The international Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 15(10), 1403-1408.
- Lower, Jr., Nilsson, T., Nelson, C., Wolf, H., Gamsky, T., y Bryan, G. (1979). N-acetyltransferase phenotype and risk in urinary bladder cancer: approaches in molecular epidemiology. Preliminary results in Sweden and Denmark. *Environ Health Perspect*, 29, 71-79.

- Luque, J., y Herraéz, A. (2002). Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. 1a ed. editor. Biología Molecular e ingeniería genética. *Elsevier Science*, España.
- Mahgoub, A., Idle, J., Dring, L., Lancaster, R., y Smith, R. (1977) Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet*, 2(8038), 584-6. 10.1016/s0140-6736(77)91430-1. PMID: 71400.
- Matas, N., Thygesen, P., Stacey, M., Risch, A., y Sim, E. (1997). Mapping AAC1, AAC2 and AACP, the genes for arylamine N-acetyltransferases, carcinogen metabolising enzymes on human chromosome 8p22, a region frequently deleted in tumours. *Cytogenet Cell Genet* 77, 290-295.
- Mc Nair, H., y Esquivel, H. (1973). Cromatografía Líquida de Alta Presión. *Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos*. Washington.40-60.
- Motulsky, A. (1957) Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J Am Med Assoc*, 165(7), 835-7. doi: 10.1001/jama.1957.72980250010016. PMID: 13462859.
- Nanashima, K., Mawatari, T., Tahara, N., Higuchi, N., Nakaura, A., Inamine, T., Kondo, S., Yanagihara, K., Fukushima, K., Suyama, N., Kohno, S., y Tsukamoto, K. (2012). Genetic variants in antioxidant pathway: risk factors for hepatotoxicity in tuberculosis patients. *Tuberculosis*, 92(3), 253-259.
- Pawlik, A., Ostanek, L., Brzosko, I., Gawroska, B., Brzosko, M., y Dabrowska, E. (2002). Increased genotype frequency of Nacetyltransferase 2 slow acetylation in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacol Ther*, 72, 319-325.
- Quattrocchi, O., Abelaria, S., y Laba, R. (1992). "Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica". *Artes Gráficas y Farro S.A*, 3, 6, 40, 91, 94, 302,312-31.
- Ramírez, D. (2010). CAFÉ, CAFEÍNA VS. SALUD REVISIÓN DE LOS EFECTOS DEL CONSUMO DE CAFÉ EN LA SALUD. *Universidad y Salud*, 12(1), 156-167.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-71072010000100017&lng=en&tlng=es.

- Sinclair, J., Sandy, J., Delgadop, R., Sim, E., y Noble, M. (2000). Structure of arylamine, N-acetyltransferase reveals a catalytic triad. *Nat Struc Biol* **7**, 560-564.
- Trujillo, F., y Lares, I. (2001). "Farmacogenética y su importancia en la clínica". *Academia nacional de medicina*, México, 137, 231.
- Vesell, ES. (1989). Pharmacogenetic perspectives gained from twin and family studies. *Pharmacol Ther*, 41(3), 535-52. 10.1016/0163-7258(89)90130-7. PMID: 2654965.
- Vogel, F., y Motulsky, A. (1986). Human genetics. problems and approaches New York, Springer, 435.
- Woolsey, R., Drayer, D., Reidenberg, M., Nies, A., y Carr, K. (1978). Oates J. Effect of acetylator phenotype on the rate at which procainamide induces antinuclear antibodies and the lupus syndrome. *New Engl J Med*, 298, 1157-1159.
- Zenser, T., Lakshmi, V., Rustan, T., Doll, M., Deitz, A., y Davis, B. (1996). "Human N-acetylation of benzidine: role of NAT1 and NAT2". *Cancer Res*.
- Zeron, L. (2014). ¿Qué son los genes?. *Biodiversidad Mexicana*. www.biodiversidad.gob.mx/genes/queson.html

CAPÍTULO VIII

ANEXOS

8.1. ANEXO N°1.

**PROYECTO ECOGENÉTICA Y FARMACOGENÉTICA DE POBLACIÓN
CHIRICANA (ENCUESTA)**

Datos de los Participantes

Lugar y Fecha de la encuesta: _____

Nombres: _____

Apellidos: _____

Fecha de Nacimiento: _____

Edad: _____

Sexo: _____ *Peso:* _____

Estatura: _____

Características Fenotípicas:

Lugar de Nacimiento: _____

Lugar de Residencia: _____

Tiempo de vivir en la región: _____

Estado Civil: _____

Hora de Administración: _____

Fármaco administrado: _____

Tipo de Muestra

***Orina Control:** ____

pH Inicial: _____ **pH Final:** _____ **Volumen Colectado** _____.

***Orina Muestra:** ____

pH Inicial: _____ **pH Final:** _____

Volumen Colectado: _____.

Medicamentos ingeridos en la última semana:

Medicamentos ingeridos previamente:

Reacciones a medicamentos: _____

Alergias:

Enfermedades que padece:

Enfermedades que ha padecido:

Ocupación: _____

Hábitos Alimentarios: _____

Toma café: _____ **Fuma Cigarrillos:** _____

Consume Coca Cola _____ **Chocolate:** _____

Otras sustancias: _____

Etapa del ciclo menstrual: _____

(Último día de la menstruación) _____ **Toma Anticonceptivos:** _____

OTRAS ANOTACIONES DE INTERÉS:

Padre

DATOS FAMILIARES

Nombre: _____ Edad: _____

Lugar de nacimiento: _____

Originario de: _____

Tiempo de vivir en la región: _____

Enfermedades que padece:

Enfermedades que ha padecido:

Reacciones a medicamentos: _____

Alergias: _____

Enfermedades en los familiares cercanos: (Hermanos, Tíos, etc.)

Ingiere alcohol: _____

Otras sustancias: _____

Madre

Nombre: _____ Edad: _____

Lugar de nacimiento: _____

Originario de: _____

Tiempo de vivir en la región: _____

Enfermedades que padece:

Enfermedades que ha padecido:

Reacciones a medicamentos: _____

Alergias: _____

Enfermedades en los familiares cercanos: (Hermanos, Tíos, etc.)

Ingiere alcohol: _____

Otras sustancias: _____

✧ Abuelo Paterno

Nombre: _____

Lugar de nacimiento: _____

Originario de: _____

Tiempo de vivir en la región: _____

Enfermedades que padece: _____

Enfermedades que ha padecido: _____

Reacciones a medicamentos: _____

Alergias: _____

Enfermedades en los familiares cercanos: (Hermanos, Tíos, etc.) _____

Ingiere alcohol: _____

Otras sustancias: _____

✧ Abuela Paterna

Nombre: _____

Lugar de nacimiento: _____

Originario de: _____

Tiempo de vivir en la región: _____

Enfermedades que padece: _____

Enfermedades que ha padecido: _____

Reacciones a medicamentos: _____

Alergias: _____

Enfermedades en los familiares cercanos: (Hermanos, Tíos, etc.) _____

Ingiere alcohol: _____

Otras sustancias: _____

☀ Abuelo Materno

Nombre: _____

Lugar de nacimiento: _____

Originario de: _____

Tiempo de vivir en la región: _____

Enfermedades que padece:

Enfermedades que ha padecido: _____

Reacciones a medicamentos: _____

Alergias: _____

Enfermedades en los familiares cercanos: (Hermanos, Tíos, etc.)

Ingiere alcohol: _____

Otras sustancias: _____

☀ Abuela Materna

Nombre: _____

Lugar de nacimiento: _____

Originario de: _____

Tiempo de vivir en la región: _____

Enfermedades que padece:

Enfermedades que ha padecido: _____

Reacciones a medicamentos: _____

Alergias: _____

Enfermedades en los familiares cercanos: (Hermanos, Tíos, etc.)

Ingiere alcohol: _____

Otras sustancias: _____

OTROS DATOS DE INTERÉS EN FAMILIARES CERCANOS:

8.2. ANEXO N°2

HOJA DE CONSENTIMIENTO VOLUNTARIO

Yo, _____ Panameño(a), mayor de edad, con Cédula de Identidad personal _____, en forma voluntaria y sin coacción declaro que, deseo participar en forma voluntaria en la investigación: "*Determinación del fenotipo acetilador de población mestiza panameña, residente en la Provincia de Chiriquí usando cafeína como sustancia sonda*".

Manifiesto que se me ha explicado de forma detallada el procedimiento a seguir y que básicamente consiste en:

- Ingesta oral de una taza de café soluble (Una cucharada sopera de Nescafé la cual tiene un equivalente aproximado 5 gramos de Nescafé y 100 mg de cafeína.
- Previo a la ingesta del café, cada participante deberá coleccionar una muestra de orina control y deberá vaciar totalmente la vejiga.
- Posterior a la ingesta del café se coleccionará toda la orina que se excrete durante las 6 horas siguientes.
- Las muestras de orina se analizarán mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar la presencia de cafeína y sus metabolitos.

Declaro que he tomado café previamente y que no he tenido efectos indeseables con esta sustancia. También se me han explicado en forma detallada los efectos de la misma y los propósitos del protocolo de investigación actual.

Al conocer la metodología del ensayo, me comprometo a no ingerir ningún medicamento, ni bebidas alcohólicas 48 horas antes del experimento; además declaro que no padezco de ninguna afección crónica ni estoy siguiendo ningún tratamiento terapéutico en este momento.

Certifico que he leído el documento adjunto en el que se explican detalladamente los propósitos y procedimientos de esta investigación y que estoy completamente de acuerdo en participar en la misma por lo que firmo voluntariamente este consentimiento.

ATENTAMENTE,

FIRMA

FECHA

8.3. ANEXO N°3.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
ESCUELA DE FARMACIA**

SOLICITUD DE PARTICIPACIÓN EN INVESTIGACIÓN

**TEMA DE INVESTIGACIÓN: "DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO ACETILADOR EN
POBLACIÓN MESTIZA PANAMEÑA RESIDENTE EN LA PROVINCIA DE CHIRIQUÍ
USANDO CAFEÍNA COMO SUSTANCIA SONDA"**

En el presente proyecto se investigará la capacidad metabólica de acetilación de sustancias en nuestra población. Esto es importante ya que la actividad de las enzimas acetilantes está relacionada con el metabolismo de muchos fármacos y alimentos y también está relacionado con la predisposición a algunas enfermedades.

¿Cuál es el propósito de este informe de consentimiento?

En este documento deseamos explicarle la metodología básica del estudio, de tal modo que usted pueda decidir voluntariamente su participación. Si luego de leer este documento tiene alguna duda, pida al personal del estudio que le explique. Ellos le proporcionarán toda la información que necesite para que usted tenga un buen entendimiento del estudio.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

Caracterizar el fenotipo acetilador de la población chiricana de Panamá. Esto permitirá determinar si existen factores de riesgo en la población expuesta a fármacos y pululantes ambientales además de predisposición a ciertos tipos de patologías (Enfermedades).

¿Cuál es la importancia del estudio?

Existen pocos estudios relacionados con la caracterización fenotípica acetilante en poblaciones mestizas de América. La población mestiza de Panamá ofrece la particularidad de una extensa mezcla racial, entre tres principales componentes: el blanco generalmente de origen europeo, el componente negro, generalmente de origen africano y el componente indígena generalmente nativo de la región.

Estos estudios se han realizado en otras regiones determinándose que que una alta proporción (del 40 al 60%) de caucásicos y africano-americanos son acetiladores lentos, 80 a 90% de Japoneses y esquimales canadienses son acetiladores rápidos, y aproximadamente 20% o menos de la población egipcia y ciertas poblaciones judías son acetiladores rápidos

La determinación de la capacidad acetilante en poblaciones mestizas está poco estudiada, lo cual es particularmente importante ya que estas puede ser determinante de los efectos tanto farmacológicos como tóxicos de fármacos y de diversos pululantes ambientales y a la predisposición a ciertas enfermedades.

En base a la capacidad acetilante las poblaciones se dividen en metabolizadores lentos (ML), y metabolizadores rápidos (MR). Se ha observado que enfermedades como neuropatías periféricas asociadas con algunos fármacos ocurren más frecuentemente en ML.

¿Cuáles son los posibles riesgos?

Con el propósito de evitar cualquier inconveniente sólo se utilizará como sustancia de estudio una taza de café, considerando que la mayoría de las personas no presentan efectos indeseables con ésta sustancia. Sin embargo si a usted le produce cualquier síntoma como gastritis, acidez o estimulación gástrica excesiva favor háganoslo saber. El procedimiento es el siguiente:

- Administración oral de una taza de café soluble.
- Previo a la administración, se coleccionará una muestra de orina control a cada individuo participante y se le requerirá vaciar totalmente la vejiga.
- Tomar aproximadamente un vaso de agua.
- Seguido a esto se le coleccionará toda la orina durante las 6 horas posteriores a la administración del café.

Es importante anotar que **no** hay riesgo de adquirir enfermedades contagiosas, porque **siempre** se usará material nuevo, estéril y desechable.

¿Cuáles son los posibles beneficios de participar en el estudio clínico?

El principal beneficio que Usted recibirá por la participación en este estudio será el que se pueda adquirir conocimiento científico sobre la capacidad de metabolismo de nuestra población, ya que no existen estudios de este tipo en población panameña, actualmente todas las bases de tratamiento se basan en parámetros adquiridos en otras poblaciones que difieren algunas veces de forma muy significativa de la nuestra. Esto puede ser de gran importancia para una selección apropiada de medicamentos en nuestra población

Confidencialidad del participante.

Las únicas personas que sabrán que usted participó en el estudio somos los miembros del equipo de investigación. Si es su voluntad, su nombre no será registrado en la encuesta ni en ninguna otra parte.