

TECNOLOGICO DE MONTERREY



Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

Doctorado en Ciencias Clínicas.

“Modulación de la actividad metabólica de CYP1A2 y CYP2E1 en una cohorte de mujeres con embarazo pretérmino con ingesta de cafeína confirmada”

**Tesis que para obtener el grado de:
Doctor en Ciencias Clínicas.**

presenta:

Mario Rene Alcorta García

Director de tesis:

Dr. Víctor Javier Lara Díaz

Codirector de tesis:

Dra. Fabiola Castorena Torres

Monterrey, Nuevo León México

Abril, 2019

DEDICATORIA

A mi esposa Sandra, mi compañera de vida por su paciencia y amor infinitos, su aliento, entrega, tolerancia y apoyo incondicional, junto con mis hijos Roberto, Ricardo y Rodrigo por ser todos la fuente de inspiración y motivación en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas instituciones y personas que han hecho posible la realización de esta tesis Doctoral:

En primer lugar, a la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud del Tecnológico de Monterrey y a los hospitales Regional Maternoinfantil y Dr. Bernardo Sepúlveda, de la Secretaría de Salud de Nuevo León, donde se realizó este trabajo.

Al Dr. Víctor Javier Lara Díaz, director de esta tesis y mi mentor. Su compromiso, profesionalismo, ética en el trabajo, su amistad y cariño han hecho que esta tesis se lleve a cabo, gracias a su exigencia y la oportunidad para culminar mi sueño.

A la Dra. Fabiola Castorena Torres co-director de tesis, quiero agradecer su paciencia, tolerancia, compromiso y profesionalismo, su papel como profesora ha sido muy importante en mi formación, su ayuda ha sido parte fundamental en la culminación de esta etapa en mi vida.

A la Dra. Julieta Rodríguez de Ita, directora del Doctorado en Ciencias Clínicas, gracias por su apoyo incondicional, su aliento, por su ayuda invaluable en estos años.

A la Dra. Claudia Nohemí López Villaseñor y al Dr. Gabriel Sánchez Ferrer, compañeros Neonatólogos por su ayuda y apoyo en la culminación del protocolo.

Al programa de Neonatología del sistema Multicéntrico de residencias médicas, a los residentes que participaron en el protocolo, gracias por su apoyo, aliento y comprensión, por ser mi ejemplo como excelentes maestros y amigos, gracias por confiar en mi trabajo y apoyarme siempre.

A los pacientes razón fundamental del ser médico e inspiración, por permitirme a través de la investigación clínica intentar contribuir a mejorar la salud.

A mis amigos, gracias por su aliento en todo momento, y ser escuchado en mis horas de desaliento y cansancio.

GLOSARIO

CYP1A2, citocromo P450 family 1 subfamilia A miembro 2; CYP2E1, citocromo P450 familia 2 subfamilia E miembro 1; IQR, rango intercuartil; TPTss%, transferencia transplacentaria en estado basal; Css, concentración en estado basal; FAO; OCDE Organización para la cooperación y el desarrollo económico; Cmax Concentración máxima; NAT N Acetil transferesa; 17X paraxantina, 1,7 dimetilxantina; 137X Cafeína 137 trimetilxantina; 37X Teobromina 3, 7 dimetilxantina; 13X Teofilina 1. 3 dimetilxantina; XO xantinoxidasa; 1U 1 metilurato; 1X 1metilxantina; 17U1,7 dimetilurato; AFMU 5acetilamino6formimilamino3metiluracil; SNP polimorfismo de nucleótido único; PAH Hidrocarburos poliaromáticos; ADORA1 receptor de adenosina 1; ADORA2A receptor de adenosina 2A; cAMP adenilmonofosfato ciclico; cGMP guanilmonofosfato ciclico; GABA ácido gamma aminobutírico; tcPO₂ presión parcial de oxígeno transcutáneo; tcPCO₂ presión parcial de dióxido de carbono transcutáneo; T/T genotipo nativo; T/C genotipo heterocigoto; C/C genotipo mutado; DRD $\frac{1}{2}$ complejos heteroméricos con receptor de dopamina; HPLC cromatografía de líquido de alta presión; FTA tarjeta para traslado de ácidos nucleicos; CITES centro de innovación y transferencia en salud; CTAE clasificación de eventos adversos; WHO organización mundial de salud; CFR formato de recolección de datos; F/M relación fetomaterna; AFR africana; AMR americana; EUR europea; EAS asiáticos del este; SAS asiáticos del sur; NEM noreste de México; FBS suero fetal bovino.

ÍNDICE

Portada	
Hoja de Firmas	
Acta de aprobación de tesis	
Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Glosario	iii
Tabla de contenidos	iv
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
Resumen	1
CAPÍTULO 1	3
Planteamiento del Problema	3
Justificación	4
Diseño del estudio	
Objetivo general	4
Objetivos específicos	5
CAPÍTULO 2 MARCO TEORICO	6
Cafeína	
Absorción	8
Distribución	9
Eliminación	9

Factores que modifican la farmacocinética de la cafeína	10
Metabolismo de la cafeína (CYP1A2, CYP2A6, CYP2E1, CYP2C8, NAT2 y XO)	10
Efecto farmacológico de la cafeína	17
Exposición prenatal	20
Metabolismo de la cafeína en el neonato	22
CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA	24
Diseño del estudio	24
Clasificación del estudio	24
Características	24
Tipo de estudio	24
Técnica de muestreo	24
Criterios de Inclusión	24
Criterios de Exclusión	24
Criterios de Eliminación	25
Criterios de Suspensión	25
Metodología	
Determinación de la concentración plasmática de cafeína	25
Determinación de los polimorfismos	28
Lugar de estudio	29
Reclutamiento de pacientes y obtención de muestras	29
Variables del estudio	30
Dependientes	30

Independientes	30
Concurrentes	31
Técnicas de análisis estadístico	33
Aspectos éticos	34
Clasificación de la investigación	34
Riesgos previsibles y probables	34
Protección frente al riesgo físico y/o emocional	35
Archivo confidencial de la investigación	35
Financiamiento	35
CAPÍTULO 4 RESULTADOS	36
Descripción de la población y selección de pacientes	36
Fuentes de ingesta auto reportada de cafeína	39
Transferencia transplacentaria de cafeína y metabolitos	40
Frecuencia de polimorfismos	40
Análisis de frecuencia genotípica	41
Actividad metabólica del citocromo y factores ambientales	42
CAPÍTULO 5 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
Consumo auto reportado de cafeína	46
Cafeína materno fetal y metabolitos de transferencia transplacentaria	46
Frecuencia de alelos y genotipos	47
Factores que modifican el metabolismo de la cafeína	49
Limitaciones	50
CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	53
ANEXOS	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genotipo de los genes asociados al metabolismo y efecto de la cafeína.

Tabla 2. Variables del estudio.

Tabla 3a. Características clínicas, estilo de vida y hábitos de la población de estudio.

Tabla 3b. Características de la población neonatal.

Tabla 4. Valores maternos y neonatales de cafeína y metabolitos.

Tabla 5- Frecuencia de polimorfismos de CYP1A2 y CYP2E1 en madres con consumo habitual de cafeína.

Tabla 6- Análisis comparativo de frecuencias alélicas de polimorfismos de CYP1A2 y CYP2E1 con otras poblaciones.

Tabla 7- Relaciones de actividad metabólica de los citocromos y factores ambientales.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Farmacocinética de la cafeína.

Figura 2- Involucramiento de CYP450 en el metabolismo de la cafeína y sus metabolitos.

Figura 3- Diagrama de flujo de la selección de pacientes para inclusión en el estudio.

Figura 4- Fuentes de cafeína ingerida de 90 embarazos pretérmino.

Figura 5- Efecto de la ingesta de acetaminofén en la actividad metabólica de CYP2E1.

RESUMEN

Antecedentes:

La cafeína es una sustancia ubicua, de la que los factores ambientales y medicamentos durante el embarazo pueden modular su metabolismo. En este trabajo se estudió una cohorte de mujeres con embarazos pretérmino, para determinar los patrones de consumo de cafeína, y explorar los efectos del ambiente y medicamentos que tienen capacidad de modificar el metabolismo de la cafeína. Se exploraron también las correlaciones de diferentes isoformas de dos de los sistemas microsomales involucrados en el metabolismo de la cafeína.

Métodos

Bajo consentimiento informado, se realizó una encuesta a una cohorte de mujeres con embarazo pretérmino menor de 34 semanas. Al nacimiento se obtuvieron muestras de sangre de las madres (vena periférica) y del cordón umbilical para determinar la concentración de cafeína, paraxantina, teobromina y teofilina, y se buscaron tres polimorfismos en dos genes, *CYP1A2* (rs762551) y *CYP2E1* (rs2031920 y rs3813867) relacionados con el metabolismo de la cafeína. Se buscaron asociaciones con el consumo de carne asada al carbón, tabaquismo, exposición al humo de carbón, ingesta de alcohol y medicamentos que afectan las actividades de los citocromos analizados.

Resultados

De 90 mujeres embarazadas se obtuvieron 98 neonatos pretérmino, cuyas muestras fueron analizadas. El reporte de autoconsumo fue de 89 % y fue confirmado en un 97 %

de los pacientes. La teobromina fue el metabolito predominante en la sangre de las madres y en la sangre del cordón. La frecuencia de los polimorfismos de *CYP1A2* y *CYP2E1* fue de 0.737 y 0.835, similar a la reportada para poblaciones americanas y japonesas, pero diferente de la de poblaciones caucásicas, sud asiáticas y africanas. El consumo de carne asada al carbón y la ingesta de acetaminofén correlacionaron significativamente con cambios en el metabolismo de la cafeína (carne asada al carbón: $r^2 = 0.207$, $P = 0.03$; acetaminofén: $r^2 = 0.637$, $P = 0.01$) y fue debida a la activación de vías alternas de metabolismo de la cafeína por el CYP2E1. La fuente principal de cafeína fueron los refrescos de cola. No se observaron otras asociaciones.

Conclusiones

El consumo de carne asada y acetaminofén modificaron la actividad metabólica de CYP2E1. La tasa de consumo de cafeína de nuestra cohorte fue 97 %. El índice de concordancia kappa entre el consumo auto-reportado y el demostrado analíticamente fue -0.053 (IC 95% de -0.087 a 0.416), el desacuerdo se debió a diferencias en el auto-reporte de consumo con el resultado de la determinación en plasma.

CAPÍTULO 1

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La cafeína es el estimulante más ampliamente consumido a nivel mundial, es un ingrediente común en bebidas, alimentos y medicamentos (Reyes & Cornelis, 2018). Además, la cafeína es uno de los diez medicamentos más frecuentemente prescritos en las unidades de cuidados intensivos neonatales (Wikoff et al., 2017). Es ampliamente utilizada como tratamiento de primera línea de la apnea de la prematuridad (Castellanos & Rapoport, 2002; Eichenwald, 2016; Falcão et al., 1997). A pesar de la extensa información en la literatura sobre su farmacocinética a nivel mundial, no existe información sobre el patrón de ingesta de diferentes fuentes de cafeína en madres con parto prematuro, ni acerca de su posible relación con los hábitos socio-culturales (consumo de alimentos y bebidas con cafeína, consumo de medicamentos, exposición a humos de carbón) que pudieran modificar el metabolismo, la tasa de transferencia transplacentaria y el desenlace de los neonatos. La ausencia de datos en esta población pudiera implicar un riesgo para los neonatos (Ginsberg, Hattis, Miller, & Sonawane, 2004).

Adicional a lo anterior, la encuesta nacional en salud reporta que en México, en el estado de Nuevo León se presenta el mayor consumo de refrescos (de cola) (ENSANUT, 2016).

Previamente se realizó un estudio piloto en donde se evaluó la farmacocinética de la cafeína en prematuros con diagnóstico de apnea (Lara y cols., datos no publicados), y se encontró que existen diferencias en la población estudiada (población mestiza mexicana) en comparación con otros estudios previamente publicados (Isaza, Henao,

Martínez, Sepúlveda Arias, & Beltrán, 2007; Sinues et al., 2007; Sosa-Macias & Llerena, 2013; Vargas-Alarcon et al., 2002).

Estos hallazgos nos motivaron a plantear las siguientes preguntas ¿La exposición a inductores o represores de la actividad enzimática modifican el metabolismo de la cafeína en la madre? ¿Estos cambios contribuyen a cambios en la transferencia transplacentaria de cafeína? ¿El uso concomitante de otros fármacos que utilizan la misma vía metabólica altera el metabolismo de la cafeína?

JUSTIFICACIÓN

- No existen estudios a nivel mundial en mujeres embarazadas con embarazo pretérmino que analicen los patrones y orígenes en la ingesta de cafeína.
- Se desconoce el impacto del consumo de medicamentos, de los factores ambientales y del estilo de vida de la madre en el metabolismo de la cafeína.
- Se desconoce la tasa de transferencia transplacentaria de la cafeína en neonatos pretérmino mexicanos.
- Se desconocen los polimorfismos genéticos de los genes que codifican para las proteínas asociadas con el metabolismo de la cafeína en la población mexicana en las madres con parto prematuro.

DISEÑO DEL ESTUDIO

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la modulación de la actividad metabólica de CYP1A2 y CYP2E1 en una cohorte de mujeres con embarazo pretérmino con ingesta de cafeína confirmada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar las concentraciones de cafeína y sus metabolitos en plasma de mujeres con embarazo pretérmino y los neonatos.
2. Establecer la tasa de transferencia transplacentaria de la cafeína ingerida por la madre al feto antes del nacimiento.
3. Establecer la interacción farmacocinética generada por el uso concomitante de otros fármacos, alimentos y bebidas que modifican el metabolismo de la cafeína
4. Determinar los tasa de frecuencia de polimorfismos de los genes *CYP1A2* (rs762551) y *CYP2E1* (rs2031920 y rs3813867), asociados con el metabolismo de la cafeína, en las madres de la cohorte.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

Generalidades de la cafeína

Las metilxantinas cafeína, teofilina y teobromina son alcaloides (Eteng, Eyong, Akpanyung, Agiang, & Aremu, 1997), y se relacionan con un número importante de metabolitos endógenos incluyendo las purinas, las xantinas y el ácido úrico (Eteng et al., 1997).

La cafeína, (1,3,7-trimetilxantina), se produce naturalmente del fruto *Coffea arabica* y otras especies relacionadas (Eteng et al., 1997). Friedlieb Ferdinand Runge, uno de los pocos farmacéuticos que en el siglo XIX tenían un doble doctorado, aisló la cafeína del café en 1819 y E. Fisher en 1875 describió su estructura química.

La aminofilina, la teofilina y la cafeína, actúan a nivel del receptor de adenosina compitiendo con el sitio de unión de adenosina. En los últimos años dichos alcaloides han sido ampliamente utilizados para el tratamiento de la apnea del prematuro, también desde hace mucho tiempo se utilizan para el tratamiento del asma. La eficacia de la teofilina y la cafeína son similares, pero esta última tiene la ventaja de una vida media más prolongada, su requerimiento de control con niveles plasmáticos es mucho menos riguroso y se han descrito pocos efectos secundarios (Atik et al., 2017).

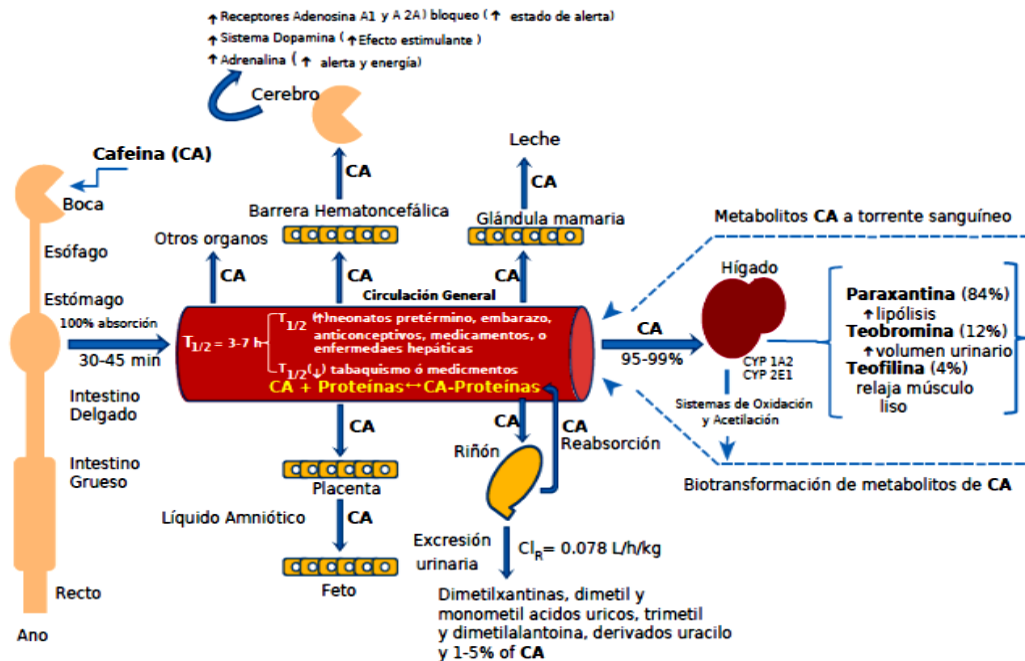


Figura 1 Farmacocinética de la cafeína (Tomado y modificado de González et al., 2014).

El consumo de cafeína en México se da de forma habitual ya que se encuentra en diversas bebidas y alimentos (ENSANUT, 2016).

México es el primer consumidor de refrescos a nivel mundial con 163 litros por persona al año, consumo 40% mayor que el de un estadounidense promedio con 118 litros al año. Paralelo a esta circunstancia, y de conformidad con un estudio reciente de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) de julio 2013, México presenta la tasa más alta de obesidad en adultos entre los países de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) (OMS, n.d.)

Las pautas alimentarias para estadounidenses recomiendan que las mujeres embarazadas y las que están amamantando reciban asesoramiento sobre el consumo de cafeína de parte del proveedor de atención médica. Estas pautas no abordan el consumo seguro de cafeína en niños. Sin embargo, la American Academy of Pediatrics (Academia

Estadounidense de Pediatría) sostiene que los niños y los adolescentes no deben consumir en absoluto bebidas energéticas que contengan estimulantes (Mayo Clinic Staff, n.d.).

Farmacocinética en neonatos

La farmacocinética en los neonatos es única y dinámica, ya que se presentan cambios relativamente rápidos en el proceso de maduración que afectan la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción de fármacos. Estas variaciones están estrechamente relacionadas con la edad gestacional, la edad postnatal y la composición corporal. El recién nacido pretérmino tiene una mayor cantidad de agua corporal total y menor de grasa, lo cual afecta el volumen de distribución de fármacos que disminuye la unión a proteínas y produce concentraciones altas del fármaco libre (Aranda, Gorman, Bergsteinsson, & Gunn, 1977).

La farmacocinética que presenta la cafeína es independiente de la ruta de administración. En el neonato la absorción gástrica de medicamentos depende del pH y del vaciamiento gástrico. Al nacer, los pacientes tienen un pH gástrico neutro por la presencia de líquido amniótico en el estómago y entre 48 a 72 h después es capaz de secretar ácido gástrico. Por otro lado, en los prematuros el vaciamiento gástrico es variable y prolongado (Falcão et al., 1997).

Absorción

La cafeína administrada de forma oral se absorbe rápido y similar a la vía intravenosa, alcanzando el nivel máximo de concentración plasmática (C_{max}) entre 6 - 10 mg/dL, en un periodo de 30 minutos a 4 h. Los alimentos no modifican la

biodisponibilidad de la cafeína en adultos. Sin embargo, Blake et al. (2006) observaron en recién nacidos alimentados con fórmula un incremento de la actividad de CYP1A2 y CYP3A4 en los primeros 6 meses de vida. El estudio fue realizado en bebés que tomaban leche de fórmula comparados con bebés alimentados con leche materna, lo cual refleja modificaciones en la farmacocinética de la cafeína en el recién nacido (Blake, Abdel-Rahman, Pearce, Leeder, & Kearns, 2006; Blake, Castro, Leeder, & Kearns, 2005).

Distribución

La cafeína es un compuesto hidrófobo que atraviesa rápidamente todas las barreras corporales sin acumularse en los tejidos. El volumen de distribución de la cafeína es aproximadamente 0.8 L/kg (rango de 0.73 a 0.92 L/kg) (Castellanos & Rapoport, 2002).

Eliminación

La vida media de la cafeína es de 4 a 5 horas en un adulto sano y se puede prolongar hasta 100 h en pacientes con enfermedades hepáticas, durante el embarazo y en niños. En general, en el neonato la eliminación de fármacos es prolongada por la inmadurez del metabolismo hepático y la excreción renal, por lo que presentan mayor concentración de fármacos y de sus metabolitos (Falcão et al., 1997).

La excreción de la cafeína y sus metabolitos ocurre principalmente por vía renal. En los recién nacidos alrededor del 86% de la cafeína se elimina por orina sin ningún cambio (durante los primeros 6 días) (Falcão et al., 1997). La vida media de la cafeína en recién nacidos es prolongada, entre 65 a 102 horas. La tasa de eliminación es menor a

partir del nacimiento hasta alcanzar los valores normales alrededor de las 60 semanas de vida postmenstrual. Además, en los bebés prematuros la eliminación de la cafeína es más prolongada en comparación con los que nacieron a término (Falcão et al., 1997).

Factores que modifican la farmacocinética de la cafeína

Los estudios de farmacología han centrado su atención en los cambios en la farmacocinética durante la maduración después de la vida perinatal y sus estadios más tardíos durante la infancia. En general, el proceso del nacimiento, ciertas enfermedades específicas, comorbilidades asociadas, los factores ambientales, el estilo de vida y/o los polimorfismos contribuyen a la variación interindividual observada en los primeros meses de vida (Pacifici, 2014).

Hay poca información sobre el impacto de los factores ambientales y el metabolismo de fármacos en los neonatos. La exposición fetal a xenobióticos está determinada por la capacidad metabólica de la madre y por la placenta. Sin embargo, una vez que el compuesto original o el metabolito es liberado en el ambiente intrauterino el feto queda expuesto, y la biotransformación de los xenobióticos depende únicamente del metabolismo fetal, además, los polimorfismos genéticos y los factores ambientales contribuyen a la variación en la respuesta o en el efecto de dichos xenobióticos (Tasnif, Morado, & Hebert, 2016).

Metabolismo de la cafeína

La biotransformación de la cafeína ocurre en el hígado y está determinado por enzimas de fase I a través del sistema de mono-oxigenasa de función mixta formada por

el citocromo P450 (CYP) y por enzimas de fase II, a través de la vía de la enzima xantina oxidasa (XO) y de la N-acetiltransferasa (NAT2) (Castellanos & Rapoport, 2002). Los CYP se localizan en la mitocondria y en el retículo endoplasmático liso, y son el grupo de enzimas más importante del metabolismo de compuestos xenobióticos, entre los que se encuentran las xantinas (Fanni et al., 2014).

La ruta metabólica principal de la cafeína en humanos (70-84%) se da a través de la N-3-desmetilación de la cafeína que forma a la paraxantina también conocida como 1,7-dimetilxantina (17X), esta reacción es dependiente del CYP1A2 en el hígado (Kalow & Tang, 1993). En estudios *in vitro*, en microsomas hepáticos humanos, se encontró que 1-N-desmetilación (formación de teobromina) y la 7-N-desmetilación (formación de teofilina) se presentan entre un 7 - 8%, respectivamente (Kot & Daniel, 2008). En este sentido también existe información de la participación del CYP2E1 en la formación de estos dos metabolitos, y en estudios con proteínas recombinantes se determinó que esta isoforma participa en la formación del 1,3,7- ácido trimetilúrico (Gu, Gonzalez, Kalow, & Tang, 1992; Kot & Daniel, 2008).

Otra de las vías del metabolismo secundario de la cafeína se encuentra en la hidroxilación del carbono 8 de la cafeína que forma al ácido 1,3,7-trimetilúrico, y en donde participan las isoformas CYP2E1, CYP2C8, CYP2C9 y CYP3A4 (Figura 2) que generalmente contribuyen con un 15% de los metabolitos (Gu et al., 1992; Kot & Daniel, 2008).

Si bien el metabolismo de la cafeína depende principalmente del CYP1A2, la relación de los metabolitos urinarios se usa para evaluar el sistema enzimático que converge en el metabolismo de este fármaco (metabolismo secundario) mediante la razón

metabólica de la cafeína. Esta ha sido ampliamente utilizada como un indicador de la actividad enzimática (fenotipo). En plasma se mide la relación de paraxantina (17X) y cafeína (137X) que correlacionan con la actividad del CYP1A2 y que corresponde hasta al 84% del metabolismo de la cafeína. El CYP1A2 también participa en la formación de teobromina (37X) y teofilina (13X) (Figura 1). En la orina se determinan los metabolitos que nos permiten obtener el fenotipo del CYP2A6, NAT2, y de la xantina deshidrogenasa u oxidasa (XO). Los metabolitos evaluados han sido: el 1-metilurato (1U), 1-metilxantina (1X), 1,7 dimetilurato (17U), 1,7- dimetilxantina (17X), y el 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil (AFMU), cuya relación metabólica urinaria se muestra en la Figura 1. Cabe mencionar que el 1X, 1U, 17U, 17X y AFMU son los principales metabolitos urinarios encontrados en adultos. Sin embargo, la 13X y la 37X son los metabolitos plasmáticos que predominan en el neonato (Begas, Kouvaras, Tsakalof, Papakosta, & Asproдини, 2007). El metabolismo de la cafeína es regulado principalmente por factores que modifican los niveles de expresión de las enzimas relacionadas con su metabolismo, entre estas se encuentran: CYP1A2, CYP2A6, CYP2E1, CYP3A (CYP3A4, CYP3A5 y CYP3A7), CYP2C (CYP2C8 y CYP2C9), NAT2 y XO (Figura 2). Entre estos factores tenemos sustratos endógenos y exógenos, que al mismo tiempo son sustratos, inductores o represores de dichas isoformas. Otro factor que modifica el fenotipo son los cambios dentro de la secuencia del genoma de los genes que codifican para estas enzimas, que se presentan como cambios de una sola base o SNP's (por sus siglas en inglés, *Single Nucleotide Polimorphism*), deleciones o inserciones. En este estudio se consideran las variaciones genéticas de una sola base y aquellos factores ambientales que modifiquen los niveles de expresión de dichas enzimas.

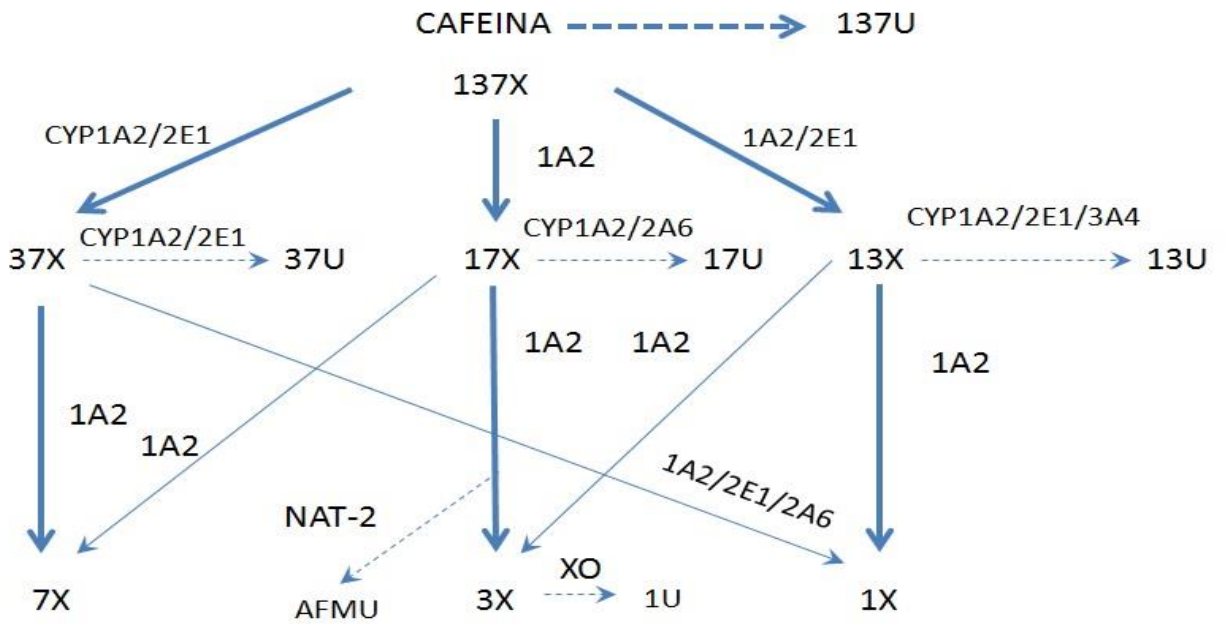


Figura 2. Participación de CYP450 en el metabolismo de cafeína y sus metabolitos (modificado de Perera, Gross y McLachlan, 2012).

En los siguientes párrafos describiremos particularidades de las enzimas que participan en el metabolismo de la cafeína.

CYP1A2

El CYP1A2 se expresa constitutivamente y se induce en el hígado. Se ha detectado en pulmón, páncreas, tracto gastrointestinal y cerebro. Existen diversos factores que modulan su expresión (reprimiendo o induciendo) y por ende modifican la respuesta a sustratos (fármacos) que son metabolizados por esta enzima. Como ejemplo de esto tenemos el consumo de tabaco y de carne asada, que son fuentes de hidrocarburos poli aromáticos (PAH) y aminas heterocíclicas que se unen a elementos de respuesta a xenobióticos incrementando su nivel de expresión, estos compuestos al ser metabolizados

son bioactivados y generan compuestos con capacidad carcinogénica. Alimentos como los vegetales crucíferos (repollo, brócoli) y fármacos como el omeprazol e inhibidores de la bomba de protones incrementan los niveles de expresión de esta enzima (Zanger & Schwab, 2013).

Mientras que el consumo de ciertos cítricos, anticonceptivos orales, fluvoxamina y antibióticos como la fluoroquinolona, antipsicóticos como la clozapina, psoraleno, idrocilamida y fenilpropanolamina, broncodilatadores (furafilina y teofilina), quinolonas (enoxacina) son considerados represores de la actividad enzimática.

En el gen que codifica para el CYP1A2 se han encontrado algunas variantes, que se asocian con diferencias entre individuos y el metabolismo de algunos fármacos. La variabilidad en los niveles de expresión de este citocromo es del 40% y hasta un 60% en el metabolismo de la cafeína. Hasta el momento pocas variantes dentro del gen explican dicho fenotipo. La más estudiada en diversas poblaciones es la rs762551 (*CYP1A2*1F*; *CYP1A2:734C>A*; -163C>A), y se ha asociado directamente con un incremento en los niveles de expresión de esta enzima (Sachse, Brockmöller, Bauer, & Roots, 2001). Sin embargo, existen pocos estudios que relacionen los efectos de este polimorfismo con la actividad enzimática (metabolismo de cafeína) y el riesgo de desarrollar alguna enfermedad. En este sentido Tan *et al.* (2007) encontraron una asociación positiva entre el metabolismo de la cafeína, la presencia de este polimorfismo y el desarrollo de Parkinson (Tan *et al.*, 2007).

CYP2A6

Este CYP es la proteína más abundante en el hígado, está codificada por los genes *CYP2A6*, *CYP2A7* y *CYP2A13*. Este CYP, a diferencia de otros, participa en el metabolismo de pocos fármacos. Los sustratos más relevantes son la cumarina y la nicotina. La cumarina se usa para medir el fenotipo *in vitro* e *in vivo*. El 80% de la nicotina es metabolizada por este citocromo. El CYP2A6 también participa en el metabolismo de la cafeína, es altamente polimórfico, hasta el momento se han detectado 40 variantes alélicas, sin embargo, la variante *CYP2A6*4* es completamente deficiente en la actividad a diferencia de la *CYP2A6*1* o nativa (Djordjevic, Carrillo, Gervasini, Jankovic, & Aklillu, 2010).

CYP2E1

El CYP2E1 se expresa constitutivamente en el hígado y su activación ocurre rápidamente un día después el nacimiento (Song *et al.*, 1986), este CYP se induce por sustratos endógenos y exógenos de bajo peso molecular como las cetonas, etanol y fármacos como el acetaminofén (paracetamol) que al ser metabolizado por esta isoforma genera la N-acetil-p-benzoquinona amina (compuesto hepatotóxico) (Lee *et al.*, 1996). La clorzoxazona, la teofilina y la cafeína (N, N-desmetilación), algunos estados fisiológicos o patológicos como el ayuno, la obesidad o la diabetes modifican su nivel de expresión. Esta enzima es polimórfica y se han descrito variantes, de las cuales el *RsaI* (rs2031920) confiere diferencias interindividuales en el fenotipo (Hayashi, Watanabe, & Kawajiri, 1991; Sachse *et al.*, 2001; Song, Veech, Park, Gelboin, & Gonzalez, 1988).

CYP2C8

La subfamilia 2C del citocromo P450 está formada por los genes *CYP2C8* y *CYP2C9*. Esta subfamilia metaboliza el 20% de los fármacos que existen actualmente. La subfamilia CYP2C representa el 7% del contenido total del citocromo hepático, la mayoría corresponde al CYP2C8. Este citocromo primeramente se encontró en el hígado, sin embargo, también se expresa en riñón, cerebro, glándulas adrenales, tejido mamario, ovarios, entre otros. A diferencia de los CYP antes mencionados, éste reconoce compuestos con estructura química muy variada como sustratos, y está relacionado con el metabolismo de compuestos endógenos como el ácido araquidónico y el ácido retinoico (Capdevila, *et al.* 1981; Lai *et al.*, 2009).

En el gen que codifica para este CYP se han descrito 16 variantes alélicas *CYP2C8* (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C8>), desde el punto de vista funcional solo dos polimorfismos se han asociado con cambios en los niveles de expresión, *CYP2C8*3* (rs1157208) se ha establecido como sustrato dependiente. Dicho SNP es frecuente en población Caucásica (10-23%), y raro en poblaciones africanas y asiáticas (<5%). Los niveles de expresión de dicho citocromo se incrementan en presencia de compuestos como pioglitazone, rosiglitazone, repaglinida, mientras que el ibuprofeno la disminuye (Solus *et al.*, 2004).

NAT2

La NAT es una enzima que se expresa principalmente en el hígado y en el intestino (Kashuba 1998), una de sus funciones más importantes es que participa en el proceso de detoxificación de varios compuestos carcinógenos (aminas heterocíclicas y aromáticas), en la acetilación de más de 15 fármacos, entre las que se encuentran la cafeína, la isoniazida, la hidralazina, la procainamida, la dapsona y las sulfonamidas.

Hace más de 30 años se detectó el primer polimorfismo genético relacionado con la biotransformación en la N-acetilación de la isoniazida, sin embargo, el metabolismo de la cafeína se ha usado como un indicador de la actividad de dicha enzima observándose una excelente correlación entre el fenotipo y el genotipo de la misma (D. M. Grant et al., 1997; D. Grant, Tang, & Kalow, 1984). Estudios de secuenciación del gen ha revelado más de 50 variantes alélicas, y aproximadamente el 50 % de caucásicos se han clasificado como acetiladores lentos, con base en esto Cascorbi et al (1995) clasificó a la población como metabolizadores lentos y rápidos con base en la secuenciación de las siguientes variantes NAT2_481C>T (rs1799929) y NAT2_590 G>A (rs1799930). (Cascorbi et al., 1995).

Xantina Oxidasa

La xantina oxidasa (XO) es una enzima citoplasmática involucrada en algunos procesos metabólicos, cataliza la producción de ácido úrico y elimina sustancias endógenas como las purinas, pirimidinas y fármacos como la tiopurina y metilxantina. Hasta el momento se han caracterizado 20 variantes alélicas, sin embargo, la frecuencia

de variación es muy baja, y en menos del 4% de los voluntarios se observan cambios en la actividad metabólica (Aklillu, *et al.*, 2003).

Efecto farmacológico de la cafeína

La cafeína actúa como un inhibidor competitivo del receptor de la adenosina. La cafeína cruza fácilmente la barrera hematoencefálica que separa la circulación sanguínea del interior del cerebro. La molécula de la cafeína es estructuralmente similar a la adenosina, por lo que se une a los receptores de la adenosina A₁ y A_{2A} (ADORA 1 y ADORA 2A) en la superficie de las células sin activarlas (efecto antagónico) y que se relacionan con la mayoría de los efectos farmacológicos de la cafeína (estimulación cardíaca, respiratoria y del sistema nervioso central, relajación del músculo liso y aumento de la actividad metabólica) (Jacobson *et al.*, 1993). Otro efecto de la cafeína es la inhibición débil de la fosfodiesterasa, que incrementa los niveles del cAMP y cGMP que produce un aumento en la transducción de señales en la comunicación nerviosa e intensifica la actividad de los neurotransmisores endógenos (Neumann, Schmitz, Scholz, & Stein, 1989). Además, la cafeína se une a los receptores de rianodina y a canales de calcio sensibles a voltaje generando el vaciamiento de los depósitos de almacenamiento de calcio del retículo endoplásmico (McPherson *et al.*, 1991).

La cafeína es un agente somnolítico, se cree que sus efectos ocurren porque bloquea los receptores de adenosina y a su vez, es considerada un estimulante del sistema nervioso central ya que incrementa los niveles de neurotransmisores como: dopamina, noradrenalina, serotonina, además de acetilcolina y aminoácidos excitatorios e inhibitorios. A dosis altas se puede unir a los receptores de benzodiazepinas del ácido γ -

aminobutírico (GABA). Además, se ha descrito un efecto neuro-protector para la cafeína, su administración terapéutica en neonatos mejora la supervivencia sin alteración en el neurodesarrollo (Davis et al., 2010).

En los RN prematuros, la cafeína incrementa la postcarga, el volumen sistólico y la presión arterial media. No modifica el flujo sanguíneo cerebral, tampoco el valor de la presión parcial de oxígeno transcutáneo (tcPO₂), ni de dióxido de carbono transcutáneo (tcPCO₂) pero si aumenta la frecuencia cardíaca (Bauer, *et al.*, 2001).

En el riñón sus efectos ocurren por antagonismo de los receptores de adenosina y por su acción sobre la síntesis de prostaglandinas, aumenta la diuresis y el aclaramiento de creatinina, además incrementa la excreción renal de calcio (Pacifci, 2014).

El efecto antagónico de la cafeína sobre los receptores de adenosina se ha asociado a cambios conductuales y fisiológicos. La generación de un ratón *Knock-out* para los genes *ADORA A1* y *A2a* dejó de manifiesto el efecto de la ausencia de dichos genes al tratarlos con cafeína que normalmente estimula el comportamiento exploratorio, en este modelo se observó una represión en la actividad exploratoria, mayor ansiedad y agresividad. Así también, se detectó una menor respuesta a los estímulos al dolor agudo, aumento de la presión arterial y en la frecuencia cardíaca, así como de la agregación plaquetaria (Johansson et al., 2001; Ledent et al., 1997).

En humanos existe poca información sobre el efecto de variaciones genéticas en los genes *ADORA1* y *ADORA2A*. En este sentido Rogers et al., 2010 encontraron que individuos que presentaban el polimorfismo rs5751876 del gen *ADORA2A*, específicamente el genotipo T/T, presentaban mayor ansiedad con respecto a todos los

individuos C/T o C/C al consumir 150 mg de cafeína (equivalente a 1½ tazas de café) (Rogers et al., 2010).

Así también, en RN de 28 semanas de edad o más que presentaban apnea, y además el polimorfismo rs16851030 C/C del gen *ADORA1*, se observó una mejor respuesta al tratamiento con cafeína que los individuos CT o TT, además en aquellos individuos que presentaban el polimorfismo rs35320474 del gen *ADORA2A*, específicamente los genotipos C/T y T/T, se encontró que presentaban mayor riesgo de desarrollar apnea y displasia pulmonar con respecto a los individuos con el genotipo C/C. (Kumral, Tuzun, Yesilirmak, Duman, & Ozkan, 2012).

Los receptores de adenosina forman complejos heteroméricos con los receptores de dopamina (DRD1/2), por lo que también es modificado por el efecto que genera la cafeína al unirse a ADORA e indirectamente potencia el efecto dopaminérgico, lo que explica hasta cierto punto el efecto estimulante de la cafeína en los individuos. Existe evidencia que señala que la afinidad del receptor DRD disminuye cuando éste se une al receptor A2A (Torvinen et al., 2005). Además, la activación del receptor A2A estimula la actividad de la adenilato ciclasa, mientras que la activación del DRD2 inhibe la actividad de adenilato ciclasa. La interacción de ambos receptores desacopla al DRD2 de su proteína G reduciendo la afinidad del receptor D2 a la dopamina. Por el contrario, la activación de DRD2 contrarresta la señalización a través de A2A, por lo tanto, antagoniza las acciones de la adenosina y la cafeína, que potencian indirectamente la señalización dopaminérgica (Fuxe et al., 2003).

Aunado a esto es posible que el polimorfismo en DRD2 pueda modificar el efecto de la cafeína en el neonato.

Exposición prenatal

La cafeína es rápida y completamente absorbida por el tracto gastrointestinal con un mínimo efecto de primer paso, una vez que se absorbe, inmediatamente entra a todos los tejidos y fácilmente cruza las barreras placentaria, hematoencefálica y testicular.

La cafeína y sus principales metabolitos, paraxantina, teofilina y teobromina, son detectables en todos los líquidos corporales y en la sangre del cordón umbilical (Castellanos & Rapoport, 2002).

La evaluación de la exposición a la cafeína no refleja exactamente la cantidad administrada materna ni la exposición fetal porque no indica específicamente la cantidad de cafeína y de sus metabolitos que pasaron a la circulación fetal a través de la placenta (Wierzejska, *et al.*, 2014).

El metabolismo de la cafeína presenta importantes variaciones interindividuales por variaciones en la actividad enzimática principalmente del CYP1A2, además de numerosos factores endógenos y exógenos que afectan el metabolismo materno y su eliminación (Faber, Jetter, & Fuhr, 2005). Como el trofoblasto en la placenta sirve como una membrana que regula el paso de sustancias entre los compartimientos maternos y fetales, la transferencia a través de la placenta depende de su funcionalidad, del flujo sanguíneo uterino y umbilical, de las proteínas transportadoras localizadas en la membrana, del gradiente químico a través de la membrana y de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos (peso molecular, lipofilicidad, grado de ionización y su capacidad de unión a las proteínas). En general, los compuestos neutros con un peso molecular menor de 1000 g/mol tienen una libre difusión a través de la placenta. La cafeína tiene un peso molecular de 194.2 g/mol, con 99.99% de carga positiva en un pH

fisiológico y es soluble en agua, cruzando libremente la placenta. En un modelo de perfusión placentaria humana *ex vivo*, se demostró que la cafeína cruza rápidamente la placenta por difusión pasiva (Sastry, 1999).

Metabolismo de la cafeína en el neonato

En los neonatos prematuros el metabolismo de la cafeína aumenta significativamente en los primeros 60 días de vida. Estudios recientes señalan que en el neonato se expresan diversos CYP y que su función está determinada por la ontogenia.

En este sentido Aldridge et al., 1981, encontró que durante el embarazo el tabaquismo casi duplica la tasa de eliminación de la cafeína, ya que el humo del tabaco contiene hidrocarburos aromáticos policíclicos que aumentan la actividad de estas enzimas hepáticas (CYP1A1 y 1A2) (Aldridge, Bailey, & Neims, 1981). Durante el embarazo, específicamente en el primer trimestre, la vida media de la cafeína no se modifica (4 h), pero a las 17 semanas de gestación aumenta a 10 h. En las fumadoras, la vida media de la cafeína aumenta de 11.5 a 18 horas lo que genera una acumulación de la cafeína y sus metabolitos. Además, este aumento de la vida media de la cafeína durante la gestación está relacionado probablemente con una reducción de la actividad enzimática (NAT2 y del CYP1A2) durante todo el embarazo. Debido a que durante el tercer trimestre del embarazo ni la placenta ni el feto tienen la capacidad de metabolizar la cafeína, ya que no expresa al CYP1A2 (solo el CYP1A1) el feto está expuesto a la cafeína por más tiempo. (Cook et al., 1996).

Además, Blake *et al.* documentaron el efecto de la lactancia con leche materna y fórmula sobre el metabolismo de medicamentos en los primeros 6 meses de vida posnatal. Este grupo de investigadores observaron un incremento del metabolismo de cafeína en los lactantes alimentados con fórmula, pero no en otros fármacos como el dextrometorfano, en donde no se observó ningún cambio durante el primer año de vida, lo que implica un incremento en los niveles de expresión del CYP1A2, pero no del CYP3A4 (Blake *et al.*, 2005).

CAPÍTULO 3

DISEÑO DEL ESTUDIO

Clasificación del Estudio

Original

Características del Estudio

Estudio transversal

Tipo de Análisis

Analítico

Método de selección de participantes

Muestreo secuencial no probabilístico, según alguno de los colaboradores estuviera de guardia para captar pacientes que cumplieran los criterios de selección.

Criterios de inclusión

- 1) Recién nacido menor de 34 semanas de edad postmenstrual.
- 2) Género indistinto.
- 3) Cualquier peso al nacimiento.

Criterios de exclusión

- 1) Pacientes cuyos responsables legales se hayan negado a participar en el estudio.

- 2) Administración materna de metilxantinas (aminofilina y/o teofilina) como medicamento, previo al nacimiento por parto vaginal o abdominal.
- 3) Malformaciones congénitas mayores.
- 4) Binomio materno-fetal bajo tratamiento de retrovirales (zidovudina, lamivudina, ritonavir).

Criterios de eliminación

- 1) Imposibilidad de toma de muestra de la mamá o el bebé.
- 2) Deseo de los responsables legales de suspender su participación.

Criterios de suspensión

- 1) Traslado del neonato a otra unidad hospitalaria.

METODOLOGÍA

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE CAFEÍNA

Reactivos y Analitos

Cafeína (1,3,7 trimetilxantina, C0750), 7-(β -Hydroxyethyl) Teofilina (IS) (H9006), Paraxantina (Par, 1,7-Dimethylxanthine) (D5385), Teobromina (3,7 dimetilxantina) (T4500, >98%), fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, USA). Teofilina (Teo, 1,3 dimetilxantina) (J1H052) fue estándar USP (Rockville, MD, USA). Acetonitrilo y metanol, fueron calidad HPLC, ácido acético fue calidad reactivo, todos fueron adquiridas de J.T. Baker (Xalostoc, México). Agua utilizada durante el estudio fue calidad HPLC (Fermont laboratories, Monterrey, México). Suero Fetal Bovino (FBS) fue

utilizado como matriz biológica para preparar las curvas de calibración y las muestras de control de calidad utilizadas durante el método de validación y cuantificación de las muestras de los recién nacidos (Gibco, Life Technologies).

Equipo

El sistema de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) consistió en una bomba cuaternaria con desgasificador, acoplado a un auto muestreador y detector de DAD–UV Agilent 1200 series (Agilent Technologies México). La separación se realizó en una columna de fase reversa Zorbax® SB-Aq Narrow Bore RR (2.1 x 100 mm, 3.5 µm) (Agilent Technologies). El horno de la columna fue mantenido a 40 °C, mientras el auto muestreador se mantuvo a temperatura ambiente. Quince microlitros de muestra procesada fueron inyectados en el sistema HPLC.

Condiciones cromatográficas

Para la optimización de las condiciones cromatográficas, los efectos de varios parámetros como la fase móvil, la columna, la velocidad de flujo, la relación de solventes y los sistemas de detección fueron evaluados y, calculado como factor asimétrico, la eficiencia de la resolución de la columna. Los mejores resultados fueron obtenidos con una mezcla de buffer de fosfatos de 10 mM, pH 6.8 y acetonitrilo, en una composición de gradiente de fase móvil usando un programa de gradiente (Tabla 1) a 0.7 mL/min. Los Cromatogramas se obtuvieron a 273 nm por 15 minutos.

Al final de cada día, la columna fue lavada con una mezcla de acetonitrilo:agua (90:10 v/v) durante 30 min. Los datos cromatográficos fueron procesados utilizando software Chemstation para sistemas LC (Agilent Technologies).

Preparación de suministros y soluciones de trabajo

Se prepararon por separado soluciones de stock de Paraxantina, Teofilina, y Cafeína (4 mg/mL), disolviendo la cantidad apropiada de cada sustancia y diluyente (Milli-Q water). Solución Teb fue preparada a la mitad de concentración que las otras (2 mg/mL) debido a que teobromina tiene la más baja solubilidad acuosa comparado con el resto de los alcaloides de cafeína. Esta solución fue preparada agregando Teb al diluyente (Milli-Q water), calentando y mezclando hasta obtener su volumen total. La solución se enfrió a temperatura ambiente.

Las soluciones de trabajo para los diferentes puntos en la curva de calibración o muestras de control de calidad fueron preparadas simultáneamente para todas las sustancias de interés, en agua. Estas soluciones fueron preparadas mezclando el volumen de reactivo necesario para obtener las diferentes concentraciones: 1, 3, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 and 400 $\mu\text{g/mL}$.

La solución de trabajo IS fue preparada en 20 $\mu\text{g/mL}$ en agua Milli-Q, la cual fue almacenada hasta su uso.

Curvas de calibración estándar y muestras de control de calidad

Se construyeron siete niveles de curvas de calibración por agua FBS libre de fármaco con porciones de Cafeína, Teofilina, Paraxantina, Teobromina para alcanzar

concentraciones de 0.1, 0.3, 1, 2.5, 10, 20, y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se prepararon 3 muestras de control de calidad en niveles de curva de calibración bajo, mediano y alto (0.5, 5, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En todos los casos la dilución de la matriz biológica no excedió del 10 %. Estas soluciones fueron mezcladas durante 1 min alícuotas de 0.5 mL se transfirieron en microtubos de 1.5 mL y almacenados a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Determinación de los polimorfismos

Toma de muestra

Se tomó una muestra de sangre de la madre por punción del dedo índice y otra de sangre del cordón umbilical ($\geq 125\text{ }\mu\text{L}$) la cual se colocó en una tarjeta FTA® (Whatman).

Extracción de DNA

La extracción se realizó siguiendo las especificaciones del proveedor, se utilizó el buffer FTA® purification reagent.

Soluciones

TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)

Solución 1: NaOH 0.1 N, 0.3 mM, de EDTA, pH 13.0

Solución 2 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0

Procedimiento

Lavado de tarjeta FTA

1. Tome una muestra de la tarjeta FTA con dispositivo para perforar el papel (X mm) y colocar en un microtubo de 1.5 ml.

NOTA: Para evitar contaminación cruzada, enjuagar el extremo del corte del dispositivo con etanol y se deja que se seque entre cada muestra.

2. Agregar 1000 μ l solución de lavado de FTA para eliminar la hemoglobina y con el vortex mezclar 5 veces.
3. Incubar 5 min a temperatura ambiente con agitación.
4. Retirar el sobrenadante con una pipeta.
5. Repita los pasos 2 – 4 dos veces más (3 lavados).

Extracción de DNA

1. Adicionar 70 μ l de solución de 1 para una muestra de 6 mm (previamente lavada).
2. Incubar 5 minutos a 65 °C (para incrementar la solubilidad del DNA).
3. Añadir 130 μ l de solución 2 y mezclar con vortex 5 veces.
4. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Mezclar por vortex 10 veces.
6. Presionar el papel para recuperar el máximo de volumen de elución y desecharlo. El eluato contiene DNAg en TE (66

mM Tris-HCl, EDTA 0.1 nM). Utilizar 0.5 µl para una reacción de PCR de 25 µl.

Mezcla de reacción

Master mix (2x)	10
Sonda (20x)	1
DNA	3 6 5
H ₂ O	6 12 4
	20

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando sondas y primer específicos Taqman® (Tabla X) por PCR en Tiempo Real. Se utilizó un termociclador con placas de 96 pozos ABI PRISM® 7200 (*Applied Biosystems®*, Foster City, CA). Para la reacción se utilizó una mezcla de reactivos, Master Mix (Perkin Elmer, Foster City, CA) 10 µL, sonda (20X) 1 µL, y un equivalente a 100 ng de DNA, agua libre de nucleasas cbp 20 µL. Se incluyó un control negativo y un control positivo en la misma placa. La determinación del polimorfismo se determinó por presencia y ausencia del alelo para cada gen.

Control de calidad

La integridad del DNA se determinó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, y la concentración y pureza se obtuvo utilizando un espectrofotómetro.

La cuantificación se realizó en un equipo Quantifluor dsDNA, primero se colocaron los reactivos en hielo para que se descongelen, luego se realizó una dilución de

DNA 1:20, y se preparó el reactivo quantifluor dsDNA (dil 1:200 con buffer TE), se realizó una curva estándar (0.2-1000 ng/mL). Se tomaron 90 microL del reactivo y se le adicionaron 10 microL de la dilución de DNA, se mezcló y se leyó a 260 y a 280 nm. La calidad de la muestra de obtuvo de la relación de las dos longitudes de onda de 260/280.

Determinación del genotipo

Para determinar aquellos genotipos que modulen el metabolismo de la Caféina se usó: PCR en tiempo real para: rs762551 para CYP1A2, y rs2031920 y rs3813867 para CYP2E1. Se usó el siguiente equipo: StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems usando sondas Taqman.

Tabla 1. *Genotipo de los genes asociados con el metabolismo y el efecto de la cafeína.*

Polimorfismo	Efecto	Referencia	
Metabolismo			
CYP1A2*1F	rs762551	Incremento en los niveles	Sachse et al., 1999
CYP2E1 Rsa1/Pst1	rs2031920	Incremento en los niveles	Watanabe et al, 1990
CYP2E1	rs3813867	Incremento en los niveles	Watanabe et al, 1990

Lugar donde se realizó el estudio

Reclutamiento de pacientes y obtención de muestras

Hospital Regional Materno Infantil de Alta Especialidad y Hospital Metropolitano Dr. Bernardo Sepúlveda, Servicios de Salud del Estado de Nuevo León.

Determinación farmacocinéticas y farmacogenómicas

Laboratorio de Investigación Básica del CITES, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnológico de Monterrey.

Universo, muestra y tamaño de la muestra

El universo de la muestra fueron los bebés recién nacidos vivos en el Hospital Regional Materno Infantil de Alta Especialidad y en el Hospital Metropolitano Dr. Bernardo Sepúlveda, de los Servicios de Salud del Estado de Nuevo León entre los meses de Septiembre de 2013 y Agosto de 2014.

Tabla 2. *Variables del estudio*

Tipo de variable y nombre	Definición conceptual	Escala de medición
Independientes		
Edad gestacional	Fecha de la última menstruación	Numérica de intervalo 25-34 SDG
Peso	Al nacimiento expresado en gramos	Numérica, continua
Edad postnatal	Horas de vida extrauterina	Numérica, discreta
Sexo	Determinado por las características sexuales	Categórica, <i>dummy</i> 1= masculino

	primarias	2= femenino
Dependientes		
Concentraciones plasmáticas de 1,3,7-trimetilxantina o cafeína	Nivel plasmático de cafeína expresado en mg/L	Numérica, continua
Concentraciones plasmáticas de 1,3-dimeltixantina o teofilina	Nivel plasmático de teofilina expresado en mg/L	Numérica, continua
Concentraciones plasmáticas de 3,7-dimetilxantina o teobromina	Nivel plasmático de teobromina expresado en mg/L	Numérica, continua
Concentraciones plasmáticas de 1,7-dimetilxantina o paraxantina	Nivel plasmático de paraxantina expresado en mg/L	Numérica, continua
Concurrentes		
Taquipnea	Frecuencia respiratoria mayor de 60 respiraciones por minuto	Categórica clasificado en grados 1-5 (CTAE v4, WHO)
Taquicardia	Frecuencia cardiaca igual o mayor a 180 latidos por minuto	Categórica clasificado en grados 1-5 (CTAE v4, WHO)
Sangrado gastrointestinal	Pérdida de sangre intraluminal en el tubo digestivo	Categórica clasificado en grados 1-5 (CTAE v4, WHO)
Hiperglicemia	Nivel de glucosa igual o mayor a 160 mg/dl	Categórica clasificado en grados 1-5 (CTAE v4, WHO)

Hipokalemia	Nivel sérico menor a 3mEq/L	Categórica clasificado en grados 1-5 (CTAE v4, WHO)
Movimientos anormales	Movimientos involuntarios de manera repetitiva, que no es posible detener mediante restricción del movimiento	Categórica clasificado en grados 1-5 (CTAE v4, WHO)
Apnea	Cese de la respiración durante 20 s o pausa respiratoria acompañada de bradicardia (frecuencia cardíaca menor a 80 latidos por minuto), cianosis o palidez y/o saturación de oxígeno menor a 80%	Categórica con valores 1= si 2= no

Análisis estadístico

La recolección de datos se realizó en un formato de recolección de datos (FRD), posteriormente a su verificación en los documentos fuente se vaciaron todos los datos a una hoja de cálculo electrónica en el programa Excel.

La base de datos elaborada en la hoja de cálculo electrónica se utilizó para el análisis de datos, el cual se realizó con el programa SPSS v24 con licencia institucional del ITESM.

Se describieron las diferencias entre las variables demográficas y antropométricas de los pacientes incluidos en el estudio, mediante *t* de student cuando las variables continuas presentaron distribución normal, o con prueba U de Mann-Whitney para las variables continuas con otras distribuciones. Utilizamos la prueba de χ^2 para las variables categóricas.

Con la prueba de Kolmogorov-Smirnov se contrastaron los datos, para verificar la normalidad y homogeneidad de la varianza.

ASPECTOS ÉTICOS

El protocolo fue revisado y aprobado por las Comisiones de Ética y de Investigación de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud del Tecnológico de Monterrey, y los Comités respectivos del Hospital Regional Materno Infantil de Alta Especialidad y Hospital Metropolitano Dr. Bernardo Sepúlveda, Servicios de Salud del Estado de Nuevo León. Se anexa la cartas del comité de investigación de la escuela de medicina del Tecnológico de Monterrey.

Clasificación de la investigación

Según el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Artículo 17 en su inciso 3 como: Investigación con riesgo mayor que el mínimo.

Riesgos previsible y probables

Riesgo de sangrado y hematoma en el lugar de venopunción para la toma de las muestras de laboratorio.

Contribución al riesgo de anemia por extracción de sangre, al concurrir temporalmente con la toma de otras muestras de sangre necesarias para el cuidado clínico intensivo.

Protección frente el riesgo físico y/o emocional

Se limitó el daño físico al paciente al ser los encargados de la toma de muestras los Médicos Residentes de Neonatología, los cuales cuentan con las habilidades y destrezas necesarias para realizar una punción venosa central o periférica.

Se empleó analgesia durante la obtención de las muestras que requirieron punción venosa, con sacarosa oral al 25%, en solución en los pacientes con posibilidad de recibir ingesta por esta vía.

No se corrió riesgo emocional por parte de los pacientes.

Archivo confidencial de la investigación

La información está disponible para el equipo de investigadores y las autoridades regulatorias, las informaciones sobre los resultados de concentraciones plasmáticas de cafeína fueron cegadas al equipo de médicos tratantes del paciente. Los datos se recabaron en el formato de recolección de datos (FRD) por los investigadores, y una vez

validados contra los documentos fuente, se vaciaron en una hoja de datos electrónica, hecha *ex profeso* con el programa Excel.

FINANCIAMIENTO

Cátedra de Investigación en Crecimiento y Desarrollo Humano, de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud del Tecnológico de Monterrey.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

Descripción de población y selección de pacientes

Este estudio se realizó en un período de 12 meses; nacieron en ese período 21,072 bebés en los hospitales de estudio, 1,042 fueron pretérmino y 400 < 34 semanas. El reclutamiento fue realizado durante las guardias de algunos de los autores. El proceso de elegibilidad y flujo de selección de pacientes se muestra en la Figura 3

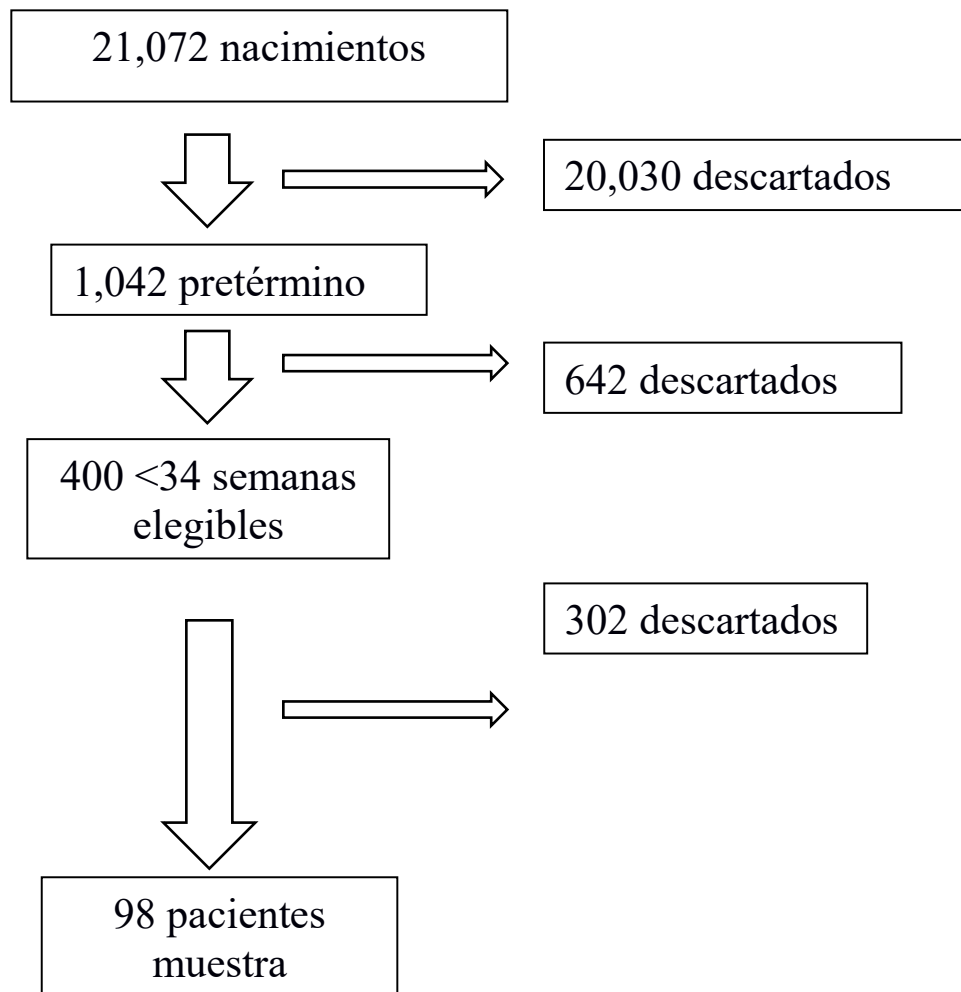


Figura 3. Diagrama de flujo de la selección de pacientes del estudio.

Se incluyeron noventa y ocho neonatos pretérmino de 90 embarazos (8.8 % embarazos múltiples; 55 % neonatos masculinos, 44 % neonatos femeninos). Las características de la población de estudio están descritas en la Tabla 3a y 3b.

Tabla 3a. *Características clínicas, estilo de vida y hábitos de la población de estudio.*

Características maternas, n = 90	Valor
Edad Materna, años ^a	23.8 (6.6)
Edad Gestacional, semanas ^a	29.9 (2.6)
Diabetes Gestacional ^b	5 (5.5)
Hipertensión ^b	10 (11)
Esteroides prenatales ^b	68 (69)
Exposición ambiental durante el embarazo	Valor
Alcohol ^b	1 (1)
Tabaco ^b	None
Acetaminofén ^b	6 (6.6)
Humos de carbón ^b	5 (5.5)
Carne asada al carbón ^b	46 (51)

^a Valores expresados como Promedio (SD).

^b Valores expresados como Frecuencia (proporciones).

^c Valores expresados como Mediana (IQR).

Tabla 3b. *Características clínicas de la población neonatal.*

Características neonatales, n = 98	Valor
---	--------------

Sexo ^b		
	Masculino	54 (55)
	Femenino	44 (45)
Vía de nacimiento ^b		
	Vaginal	37 (38)
	Abdominal	61 (62)
Peso al nacimiento (g) ^a		1,287 (407)
Talla al nacimiento (cm) ^a		38.1 (4.5)
Perímetro cefálico (cm) ^a		27 (2.6)
Apgar 1 min ^c		7 (6 to 8)
Apgar 5 min ^c		9 (8 to 9)

^a Valores expresados como Promedio (SD).

^b Valores expresados como Frecuencia (proporciones).

^c Valores expresados como Mediana (IQR).

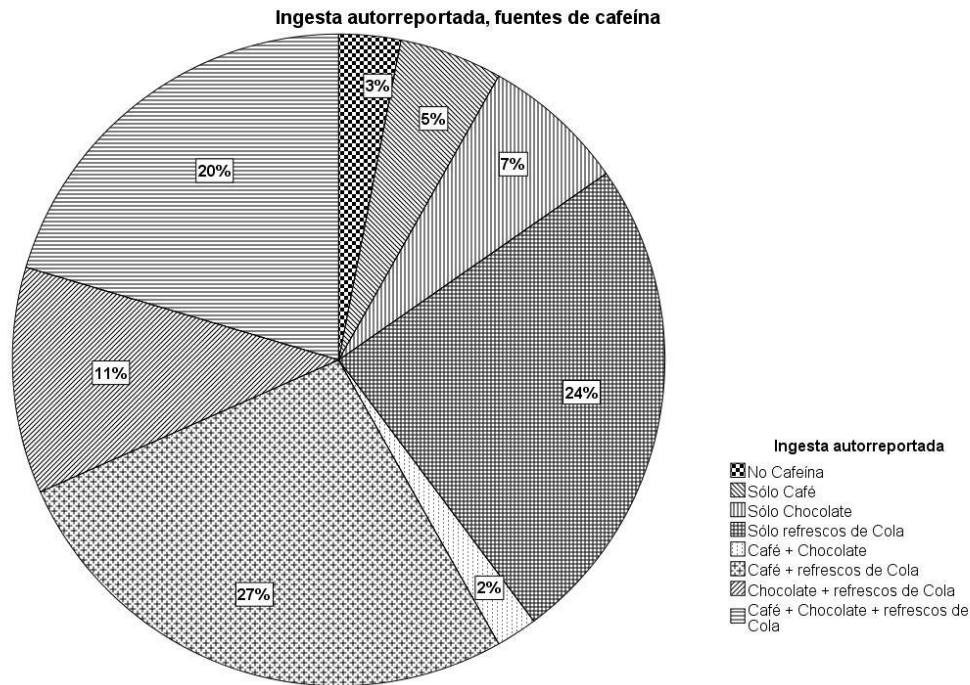


Figura 4. Fuentes de cafeína ingerida durante el embarazo, de 90 pacientes.

La ingesta auto reportada de cafeína (de cualquier fuente) fue positiva en 81 de 90 embarazos evaluados (90 %) y fue confirmado por la detección de cafeína en sangre de 87 de 90 participantes (97 %); el coeficiente de concordancia, que refleja la linealidad entre la ingesta auto reportada y la cuantificación de cafeína en sangre materna fue $\kappa = -0.053$; 95 % intervalo de confianza -0.087 a 0.416 ; este coeficiente refleja que en nuestra muestra el autoreporte fue sobreexpresado y no fue confirmado en 6 pacientes que reportan haber ingerido cafeína. Las fuentes auto reportadas de ingestión de cafeína están detalladas en la Figura 4. En general, las fuentes más comunes de cafeína durante el embarazo fueron café y refrescos de cola juntos (27 %), seguido por refrescos de cola solo (24 %) o la combinación café, chocolate y refrescos de cola (20 %). En nuestra

cohorte no se reportó consumo de té. Considerando todas las fuentes posibles, el consumo de cafeína se autoreportó en el 97 % de las gestantes.

Tabla 4. *Valores maternos y neonatales (plasma) de cafeína y metabolitos.*

Concentración en plasma de cafeína y metabolitos				
µg/mL, median (IQR)				
	Cafeína	Paraxantina	Teobromina	Teofilina
Materna	0.7 (0.4–1.7)	0.2 (0.2–0.4)	0.6 (0.3–1.0)	0.2 (0.1–0.3)
Neonatal	1.0 (0.5–2.0)	0.3 (0.1–0.4)	0.4 (0.3–0.7)	0.2 (0.1–0.3)

IQR, rango intercuartil

La concentración de cafeína, teobromina, teofilina y paraxantina se determinó en la plasma materno y plasma del cordón umbilical (Tabla 4). La cafeína y la teobromina fueron las sustancias más abundantes en la sangre materna, así como en la sangre del cordón umbilical. Las concentraciones de teofilina y paraxantina fueron similares entre los compartimentos de sangre materna y de cordón umbilical. Por lo tanto, la proporción de transferencia fetomaterna (relación entre cafeína materna y fetal, F / M) de cafeína fue de 1.43, lo que indica que la cafeína pasa por la placenta libremente y se acumula en el feto.

Análisis de la frecuencia genotípica

Se seleccionaron polimorfismos relevantes en la práctica clínica. La distribución de los genotipos y la frecuencia alélica de los polimorfismos *CYP1A2*

(*CYP1A2*F*, rs762551) y *CYP2E1* (*CYP2E1*5A*, rs3813867 y *CYP2E1*5B*, rs2031920) se detallan en la Tabla 5.

Comparando nuestra población con los datos del Proyecto 1,000 Genomas, fase III [14], se encontró que los datos reportados en este estudio sobre la distribución del polimorfismo con respecto al *CYP1A2*IF* (73.7%) son similares a los de las poblaciones americanas (75.8%), asiáticos orientales (56%) y poblaciones europeas (68%) y significativamente diferentes ($P < 0,0001$) a poblaciones de África (56.2%) y del sur de Asia (56.2%) (ver Tabla 6).

Tabla 5. Frecuencia de polimorfismos del *CYP1A2* y *CYP2E1* en madres con consumo habitual de cafeína.

Genotipo	Nativo	Heterocigoto	Mutado
<i>CYP1A2*IF</i> n (%) rs762551	9 (10) A/A	31 (33) A/C	53 (57) C/C
<i>CYP2E1*5A</i> n (%) rs3813867	5 (5) G/G	22 (23) G/C	68 (72) C/C
<i>CYP2E1*5B</i> n (%) rs2031920	71 (75) C/C	19 (20) C/T	5 (5) T/T

Tabla 6. Análisis comparativo de frecuencias alélicas de polimorfismos de *CYP1A2* y *CYP2E1* con otras poblaciones.

Población	CYP1A2*1F rs762551			CYP2E1*5A rs3813867			CYP2E1*5B rs2031920		
	A	C	<i>p</i> †	G	C	<i>p</i> †	C	T	<i>p</i> †
AFR	0.562	0.438	<0.0001	0.933	0.067	<0.0001	0.998	0.002	<0.0001
AMR	0.758	0.242	0.303	0.878	0.122	0.0073	0.885	0.115	0.0248
EAS	0.673	0.327	0.002	0.798	0.202	0.0375	0.798	0.202	0.0027
EUR	0.680	0.320	0.006	0.959	0.041	<0.0001	0.959	0.041	<0.0001
SAS	0.535	0.465	<0.0001	0.991	0.009	<0.0001	0.991	0.009	<0.0001
NEM	0.737	0.263	Ref	0.835	0.165	Ref.	0.850	0.150	Ref.

(1000 Genomes Project Consortium et al., 2015) †Prueba exacta de Fisher. AFR, africana; AMR, americana; EAS, asiática del este; EUR, europea; SAS, asiáticos del sur; NEM, noreste de México; Ref., valor de referencia de la población estudiada; A y C, alelos. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para la comparación de las frecuencias alélicas reportadas con los valores de referencia.

Con respecto a los datos reportados en este estudio sobre la distribución del polimorfismo con respecto al *CYP2E1*5A* rs3813867 (83.5%), son similares a los de las poblaciones americanas (87.8%), asiáticos orientales (79.8%), y significativamente diferentes ($P < 0.0001$) a poblaciones de África (99.8%), sur de Asia (99.1%) y poblaciones europeas (95.9%) (ver Tabla 6). Con respecto a los datos reportados en este estudio sobre la distribución del polimorfismo con respecto al *CYP2E1*5B* rs20131920

(85%) son similares a los de las poblaciones americanas (88.5%), asiáticos orientales (79.8%), y significativamente diferentes ($P < 0.0001$) a poblaciones de África (93.3%), sur de Asia (99.1%) y poblaciones europeas (95.9%) (ver Tabla 6).

Tabla 7. Relación entre actividad metabólica de los citocromos y factores maternos

	n	Px/Caf	Tb/Caf	Teo/Caf
Diabetes	3/77	0.18	0.97	0.27
Hipertensión	8/72	0.73	0.015*	0.53
Esteroides prenatales	55/25	0.006*	0.43	0.16

Px/Caf= Relación nanomolar paraxantina cafeína; Tb/Caf= Relación nanomolar teobromina cafeína; Teo/Caf= relación nanomolar Teofilina Cafeína; * $p < 0.05$ U de Mann-Whitney

Actividad metabólica del citocromo y factores maternos

Se analizó la actividad metabólica de los citocromos y se exploró por la posible correlación con la presencia de hipertensión, diabetes y aplicación de esteroides prenatales. En cuanto a las pacientes con diabetes gestacional y sin la enfermedad no se encontró diferencias significativas entre los grupos (Tabla 7.).

En el análisis de medianas de las actividades metabólicas entre pacientes con y sin hipertensión se encontró diferencia significativa entre la actividad metabólica del CYP2E1 representado por la relación nanomolar entre teobromina y cafeína con una p de 0.015, no se encontró diferencias entre la actividad metabólica de CYP1A2 (Relación Paraxantina:Cafeína) ó entre la actividad metabólica de CYP2E1 (Relación Teofilina:Cafeína). En cuanto a la aplicación de esteroides prenatales, se encontró diferencia significativa (p 0.006) entre el grupo expuesto y el no expuesto a esteroides

prenatales en cuanto a la actividad metabólica del CYP1A2 (Tabla 7.); en cuanto a la actividad metabólica de CYP2E1 (relación nanomolar Teobromina:Cafeína y relación nanomolar Teofilina:Cafeína) no se encontró diferencia entre los grupos.

Actividad metabólica del citocromo y los factores ambientales.

El metabolismo de la cafeína está determinado principalmente por la actividad del citocromo CYP1A2 que también metaboliza algunos componentes de la carne asada y del humo de carbón (Faber et al., 2005). También en el metabolismo de cafeína participa el CYP2E1, que además metaboliza el etanol y fármacos como el acetaminofén. Por ello se realizó un análisis de correlación entre estos factores y la actividad metabólica. Se encontró que la actividad metabólica de CYP2E1 (medida como la relación Teobromina: Cafeína) es mayor en aquellos individuos que consumen carne asada al carbón y con la ingesta de acetaminofén (tabla 8). La proporción de conversión de cafeína a teobromina, la cuál es un reflejo de la actividad metabólica de CYP2E1 aumentó significativamente en las madres que consumieron carne asada, así como en aquellas que tomaron acetaminofén durante el embarazo.

Tabla 8. Efecto de los factores ambientales (consumo de carne al carbón, humo y acetaminofén) en la actividad metabólica de los citocromos.

Actividad Metabólica (n)	Carne asada al carbón			Humos de carbón			Acetaminofen		
	Expuestos (46)	No expuestos (45)	<i>p</i>	Expuestos (5)	No expuestos (86)	<i>p</i>	Expuestos (6)	No expuestos (85)	<i>p</i>
CYP1A2 ^a	0.10 (0–0.3)	0 (0–0.2)	NS	0.10 (0–0.3)	0 (0–0.2)	NS	0 (0–0.1)	0.05 (0–0.3)	NS
CYP2E1 ^b	0.52 (0.2–1.8)	0.25 (0–1.0)	0.03	0.46 (0.2–1.8)	0.34 (0–1.2)	NS	2 (1.2–5.4)	0.40 (0–1.2)	0.02
CYP2E1 ^c	0.08 (0–0.2)	0 (0–0.1)	NS	0.08 (0–0.2)	0 (0–1.2)	NS	0.08 (0–0.2)	0.05 (0–0.2)	NS

Valores expresados como mediana (IQR); Prueba *U* Mann–Whitney, Actividad Metabólica: ^a Relación nano molar Paraxantina-cafeína; ^b Relación nano molar Teobromina-cafeína; ^c Relación nano molar Teofilina-cafeína.

El consumo de carne asada es una práctica común en la población de estudio, 46 de las 90 madres estudiadas solían comer este alimento (51%), 34 (79%) de ellas una vez a la semana. Se detectaron cafeína y sus metabolitos en la sangre de 35 de estas mujeres embarazadas (76 %), se encontró diferencia significativa de la actividad metabólica de CYP 2E1 (relación Teobromina:Cafeína) entre el grupo que consumió carne asada respecto al grupo que no la consumió (ya descrito).

En cuanto a la ingesta de acetaminofén, fue positiva en seis de las 91 madres estudiadas (6.7%). El patrón más habitual de ingesta de acetaminofén fue un comprimido

de 500 mg una vez al día, uno o dos veces a la semana durante el mes anterior al parto.

En ninguno de los casos el acetaminofén fue prescrito por un médico.

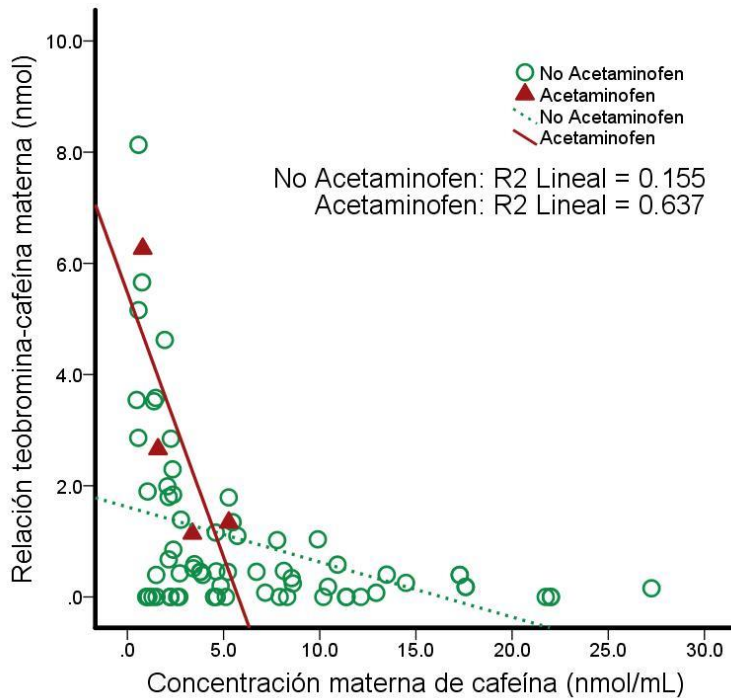


Figura 5. Efecto de la ingesta de acetaminofén en la actividad metabólica de CYP2E1. La actividad metabólica del grupo con ingesta de acetaminofén mostro diferencia significativa respecto al otro grupo ($P < 0.01$, Prueba *U* Mann–Whitney).

Este fármaco es metabolizado por el CYP2E1, lo que se confirma en el gráfico de dispersión en la Figura 5 que muestra un fuerte y distintivo efecto que ejerció el acetaminofén sobre la actividad metabólica del CYP2E1, la cual aumentó significativamente en las madres con ingesta de paracetamol ($r^2 = 0.637$; $P < 0.01$) en comparación con aquellas que no usaron este medicamento ($r^2 = 0.155$). También se

evaluó el efecto sobre la actividad metabólica de CYP1A2 y CYP2E1 respecto a la exposición a humo de carbón, y no se mostró efecto en ninguno de ellos.

Se realizó análisis bivariado entre los genotipos y la actividad metabólica, y no se encontró correlación significativa entre los grupos (Tabla 9.)

Tabla 9. Análisis de correlación de la actividad metabólica de los genotipos (CYP1A2 y CYP2E1).

	CYP1A2*1F rs762551	CYP2E1*5A rs3813867	CYP2E1*5B rs2031920
Px/Caf	0.02 (0.81)		
Tb/Caf		0.04 (0.66)	0.11 (0.21)
Teo/Caf		0.13 (0.17)	0.19 (0.53)

r (p); Px/Caf Relación nanomolar Paraxantina Caféina; Tb/Caf relación nanomolar Teobromina Caféina; Teo/Caf relación nanomolar Teofilina cafeína.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

Consumo de cafeína auto reportada

La ingesta de cafeína auto reportada (de cualquier fuente conocida) fue positiva en el 88% de las pacientes que participaron en el estudio, sustancialmente más que el 74% reportado por Frary et al (Frary, Johnson, & Wang, 2005) o el 57% en el estudio de Bracken et al (Bracken et al., 2002). La principal fuente de ingesta de cafeína en nuestra cohorte fueron los refrescos, solos o en combinación (hasta un 82%), como se muestra en la Figura 2. El consumo de bebidas gaseosas además de altos niveles de azúcar que se asocia con obesidad en la población es una fuente de cafeína, En 2005, Frary et al, (Frary et al., 2005) informaron que los refrescos representaban el 16% entre las fuentes de cafeína en la población general, mientras que en la población embarazada, los informes anteriores sobre la frecuencia de los refrescos como fuentes de ingesta de cafeína oscilan entre el 8 y el 66%, respectivamente (Chen et al., 2018; Dott, Rasmussen, Hogue, & Reefhuis, 2010); otros investigadores han demostrado que la frecuencia y la fuente de cafeína ingerida dependen de los hábitos y costumbres de la población (Błaszczyk-Bębenek et al., 2018), en el sur de Polonia la principal fuente de cafeína durante el embarazo fue el té negro, seguido del café. En nuestra población, el café como única fuente de cafeína representó el 5% de la cafeína ingerida, mientras que el café y las combinaciones aumentaron a 53% de las fuentes de cafeína. Ningún caso de consumo de té negro, verde o rojo fue informado en nuestra población.

Cafeína materno-fetal y metabolitos de transferencia transplacentaria.

La placenta es responsable de la nutrición fetal, y que también actúa como una barrera para el paso de algunas sustancias. Entre las xantinas, la cafeína, un alcaloide trimetilxantina, es el estimulante psicoactivo presente en el café, el té, bebidas carbonatadas y energéticas (Comer et al., 2001; Interest, 2014). La tasa de transferencia de fármacos al embrión y al feto es diferente de la magnitud de la transferencia de fármacos porque diferentes factores determinan estas dos variables farmacocinéticas (Nau, 1986). La cafeína puede atravesar la placenta sin dificultad y se acumula en el lado fetal, que en teoría no tiene metabolismo (Mose et al., 2008).

Anteriormente, Hentges et al. (Hentges, Guedes, Silveira, & Procianoy, 2010), Wierzejska et al. (Wierzejska et al., 2014), y Grosso et al. (Grosso, Triche, Benowitz, & Bracken, 2008) midieron los niveles de cafeína en mujeres embarazadas y no encontraron niveles terapéuticos de cafeína en una población fetal, lo cual es similar a nuestro hallazgo. Además, Grosso (Grosso et al., 2008) encontró niveles de teobromina mucho más bajos que los de nuestro estudio, aunque las características genéticas y ambientales en su población de estudio pueden haber influido en los resultados.

Frecuencia de alelos y genotipos.

La frecuencia del polimorfismo CYP1A2 * 1F (rs762551) fue similar a la de una población mestiza chilena, 7.11% nativa, 30.02% heterocigótica y 60.87% mutada (Roco et al., 2012), y ligeramente más alta que la de las poblaciones costarricenses y japonesas (Cornelis, El-Sohemy, & Campos, 2007; Kobayashi et al., 2013).

CYP2E1 es miembro de la familia citocromo P 450 que metaboliza varios xenobióticos y pro-carcinógenos y se expresa no solo en el hígado sino también en otros tejidos, como riñón, pulmón, cerebro, tracto gastrointestinal, tejido mamario, placenta y linfocitos. Se induce en varias afecciones patológicas, como el cáncer, la obesidad y la diabetes tipo II, lo que implica que esta enzima está implicada en el metabolismo y en otros procesos biológicos (Neafsey et al., 2009). A pesar de la descripción detallada del papel de CYP2E1 en el hígado, sus funciones en otros tejidos siguen sin estar claras (Neafsey et al., 2009). En particular, dos polimorfismos participan en el metabolismo de la cafeína; rs3813867 (CYP2E1*5A), cuya frecuencia en nuestro estudio fue similar a la reportada en individuos americanos y asiáticos orientales y significativamente diferente de la reportada para poblaciones caucásicas, del sur de Asia y africanas en el informe internacional del genoma. La frecuencia de rs2031920 (CYP2E1*5B) fue similar a la de las poblaciones estadounidenses y asiáticas orientales y significativamente diferente de la de las poblaciones caucásica, sudafricana y africana (1000 Genomes Project Consortium et al., 2015), esas similitudes o diferencias son reflejo de la migración de las diferentes poblaciones a nivel mundial y tiene implicaciones sobre la susceptibilidad o resistencia a algunas enfermedades o diferentes tipos de cáncer.

Actividad metabólica en CYP1A2 y CYP2E1 en el embarazo.

CYP1A2 y CYP2E1 son responsables del metabolismo de primer paso de sustancias endógenas y xenobióticas, en particular del metabolismo de primer paso de la cafeína. Durante el embarazo, y especialmente a partir del segundo trimestre, la actividad metabólica del CYP1A2 se reduce hasta en un 65% y la actividad metabólica de CYP2E1

y otros citocromos aumentan (Tasnif et al., 2016). Diferentes factores en el ambiente son importantes porque podrían activar o inhibir el rendimiento de los citocromos. Por ejemplo, fumar y la exposición a hidrocarburos aromáticos (humo de tabaco, contaminación y exposición ocupacional al humo de carbono) inducen la actividad de CYP1A2, mientras que el consumo de alcohol, alimentos con nitrosaminas (carne asada) y la inhalación de hidrocarburos aromáticos volátiles son inductores y sustratos importantes de CYP2E1 (Neafsey et al., 2009).

La actividad metabólica del citocromo se expresó como la tasa de conversión entre el producto y el sustrato. Por lo tanto, la actividad de CYP1A2 se puede expresar mediante la relación de Paraxantina: Cafeína. En consecuencia, la actividad de CYP2E1 puede expresarse por la relación Teofilina: Cafeína o la relación Teobromina:Cafeína (Eichelberger et al., 2015; Neafsey et al., 2009).

En la tabla 7 se comparó la presencia de diabetes gestacional, hipertensión y la exposición de esteroides prenatales con la actividad metabólica de los citocromo; no se encontró diferencia entre la presencia de diabetes mellitus, aunque las pacientes expuestas a la enfermedad fueron solo 3 individuos lo que podría representar un sesgo, en cuanto a la presencia de hipertensión durante el embarazo se encontró diferencia significativa en la actividad metabólica de CYP2E1 (representado por la relación nanomolar de Teobromina:Cafeína) $p= 0.015$, en el resto de las actividades metabólicas no hubo diferencia, esto puede representar modulación de la actividad metabólica por la hipertensión presente durante el embarazo; en cuanto a la exposición a esteroides prenatales el valor p fue de 0.006, lo cuál podría representar la modificación adicional al

metabolismo de los citocromos por la presencia de hipertensión, en el caso de los esteroides prenatales, estos podrían potenciar el efecto bloqueador de la actividad metabólica producido por los esteroides placentarios sobre CYP1A2. La Tabla 8 muestra datos sobre el efecto de las exposiciones ambientales seleccionadas en nuestra cohorte de madres embarazadas sobre las actividades metabólicas de CYP1A2 y CYP2E1. Se encontraron diferencias significativas en la actividad metabólica del CYP2E1 en las madres que consumieron carne asada durante el embarazo (que fue casi la mitad de la muestra) en comparación con las que no lo hicieron (prueba U de Mann-Whitney, $p = 0,03$). El consumo de carne asada en el noreste de México es muy común, con una frecuencia de una a dos veces por semana en algunas familias.

Factores que modifican el metabolismo de la cafeína.

Las madres que ingirieron acetaminofén tuvieron una actividad metabólica CYP2E1 más alta ($P < 0.01$) que el grupo no expuesto. De hecho, a pesar de que la cafeína y sus metabolitos solo se detectaron en cuatro madres que habían ingerido acetaminofén, mostraron el mayor efecto. No se encontró ningún efecto con respecto a la exposición ocupacional al humo de carbón.

El metabolismo del acetaminofén a través de citocromo 2E1, puede producir N-acetil-p-benzoquinonaimina (Ramachandran & Jaeschke, 2017). En los neonatos prematuros, la conjugación hepática con ácidos glucurónicos y los mecanismos de sulfuración para metabolizar y detoxificar el acetaminofén son deficientes, mientras que el sistema de glutatión, a pesar de estar presente, tiene una capacidad de reacción muy limitada (Küster et al., 2011). Este escenario aumenta la posibilidad de toxicidad neonatal

si la madre ingiere acetaminofén durante el embarazo, ya que el acetaminofén se difunde libremente a través de la placenta y puede activar el CYP2E1 neonatal. Si por cualquier circunstancia después del nacimiento, este medicamento se administra al bebé prematuro (van den Anker & Allegaert, 2018), podría fácilmente provocar efectos tóxicos. Además, según nuestro conocimiento, este informe de la modulación de la actividad metabólica del CYP2E1 por ingestión esporádica de acetaminofén durante el embarazo es el primero en abordar este problema.

En México, así como en los Estados Unidos y en muchos otros países, el acetaminofén es uno de los analgésicos de elección durante el embarazo (Servey & Chang, 2014), y está disponible para compra libre en el mostrador de las farmacias.

El consumo de cafeína es una práctica habitual en nuestra población, por lo que la población debe de ser informada de los posibles riesgos que representa el consumo de este y otros fármacos como el acetaminofén.

Limitaciones

Finalmente reconocemos que la muestra donde mayormente se vieron los efectos es muy pequeña y sería importante hacer un estudio con mayor número de pacientes para confirmar la presencia de este fenómeno, sin olvidar que este fue un estudio observacional donde se eligió a un grupo de madres con embarazo pretérmino y la ingesta de acetaminofén fue elección durante el embarazo de las madres.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

- La tasa de ingesta de cafeína en nuestra muestra de población fue similar a la reportada en otras poblaciones latinoamericanas (Reyes & Cornelis, 2018).
- La activación metabólica de CYP2E1 participa en la farmacocinética de la cafeína exógena, lo que llevó a un aumento en la tasa de conversión a teobromina.
- El consumo de carne asada y la ingesta de acetaminofén durante el embarazo modificó la actividad metabólica del CYP2E1, y este efecto fue aún mayor con la ingesta de acetaminofén.
- La ingesta auto reportada de cafeína presentó una muy pobre concordancia con la medida en sangre por lo que en nuestra muestra la utilización del autoreporte sobre expresó el consumo de cafeína y no fue una buena alternativa para valorar el consumo de cafeína.
- Las fuentes principales de ingesta de cafeína fueron los refrescos de cola, lo cual es un reflejo del consumo en toda la población en el noreste de México, por lo que es muy importante realizar campañas de concientización para disminuir el consumo de refrescos de cola por los riesgos que implica su uso.

REFERENCIAS

- 1000 Genomes Project Consortium, Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Garrison, E. P., Kang, H. M., ... Abecasis, G. R. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, *526*(7571), 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>
- Akllilu, E., Carrillo, J. A., Makonnen, E., Bertilsson, L., & Ingelman-Sundberg, M. (2003). Xanthine oxidase activity is influenced by environmental factors in Ethiopians. *European Journal of Clinical Pharmacology*, *59*(7), 533–536. <https://doi.org/10.1007/s00228-003-0653-8>
- Aldridge, A., Bailey, J., & Neims, A. H. (1981). The disposition of caffeine during and after pregnancy. *Seminars in Perinatology*, *5*(4), 310–314. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7302604>
- Aranda, J. V., Gorman, W., Bergsteinsson, H., & Gunn, T. (1977). Efficacy of caffeine in treatment of apnea in the low-birth-weight infant. *The Journal of Pediatrics*, *90*(3), 467–472. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(77\)80718-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(77)80718-X)
- Atik, A., Harding, R., De Matteo, R., Kondos-Devicic, D., Cheong, J., Doyle, L. W., & Tolcos, M. (2017). Caffeine for apnea of prematurity: Effects on the developing brain. *NeuroToxicology*, *58*, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.11.012>
- Bauer, J., Maier, K., Linderkamp, O., & Hentschel, R. (2001). Effect of caffeine on oxygen consumption and metabolic rate in very low birth weight infants with idiopathic apnea. *Pediatrics*, *107*(4), 660–663. <https://doi.org/10.1542/peds.107.4.660>
- Begas, E., Kouvaras, E., Tsakalof, A., Papakosta, S., & Asproдини, E. K. (2007). In vivo evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and xanthine oxidase activities in a Greek

- population sample by the RP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios. *Biomedical Chromatography*, 21(2), 190–200. <https://doi.org/10.1002/bmc.736>
- Blake, M. J., Abdel-Rahman, S. M., Pearce, R. E., Leeder, J. S., & Kearns, G. L. (2006). Effect of diet on the development of drug metabolism by cytochrome P-450 enzymes in healthy infants. *Pediatric Research*, 60(6), 717–723. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000245909.74166.00>
- Blake, M. J., Castro, L., Leeder, J. S., & Kearns, G. L. (2005). Ontogeny of drug metabolizing enzymes in the neonate. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 10(2), 123–138. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2004.11.001>
- Błaszczyk-Bębenek, E., Piórecka, B., Kopytko, M., Chadzińska, Z., Jagielski, P., & Schlegel-Zawadzka, M. (2018). Evaluation of Caffeine Consumption among Pregnant Women from Southern Poland. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(11), 2373. <https://doi.org/10.3390/ijerph15112373>
- Bracken, M. B., Triche, E., Grosso, L., Hellenbrand, K., Belanger, K., & Leaderer, B. P. (2002). Heterogeneity in assessing self-reports of caffeine exposure: Implications for studies of health effects. *Epidemiology*, 13(2), 165–171. <https://doi.org/10.1097/00001648-200203000-00011>
- Capdevila, J., Chacos, N., Werringloer, J., Prough, R. A., & Estabrook, R. W. (1981). Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(9), 5362–5366.
- Cascorbi, I., Drakoulis, N., Brockmoller, J., Maurer, A., Sperling, K., & Roots, I. (1995). Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in

- unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *American Journal of Human Genetics*, 57(3), 581–592.
- Castellanos, F. X., & Rapoport, J. L. (2002). Effects of caffeine on development and behavior in infancy and childhood: a review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 40(9), 1235–1242.
<https://doi.org/10.2165/00128072-200103010-00005>
- Chen, L.-W., Fitzgerald, R., Murrin, C. M., Mehegan, J., Kelleher, C. C., & Phillips, C. M. (2018). Associations of maternal caffeine intake with birth outcomes: results from the Lifeways Cross Generation Cohort Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1–8. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy219>
- Comer, A. M., Perry, C. M., Figgitt, D. P., Bhatia, J., Neonatology, S., College, M., ... Neonatology, D. (2001). A Review of its Use in Apnoea of Prematurity. *Drugs*, 3(1), 61–79.
- Cook, D. G., Peacock, J. L., Feyerabend, C., Carey, I. M., Jarvis, M. J., Anderson, H. R., & Bland, J. M. (1996). Relation of caffeine intake and blood caffeine concentrations during pregnancy to fetal growth: prospective population based study. *Bmj*, 313(7069), 1358–1362. <https://doi.org/10.1136/bmj.313.7069.1358>
- Cornelis, M. C., El-Sohemy, A., & Campos, H. (2007). Genetic polymorphism of the adenosine A2A receptor is associated with habitual caffeine consumption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(1), 240–244.
- Davis, P. G., Schmidt, B., Roberts, R. S., Doyle, L. W., Asztalos, E., Haslam, R., ... Tin, W. (2010). Caffeine for Apnea of Prematurity Trial: Benefits May Vary in

- Subgroups. *The Journal of Pediatrics*, 156(3), 382–387.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.09.069>
- Djordjevic, N., Carrillo, J. A., Gervasini, G., Jankovic, S., & Aklillu, E. (2010). In vivo evaluation of CYP2A6 and xanthine oxidase enzyme activities in the Serbian population. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 66(6), 571–578.
<https://doi.org/10.1007/s00228-010-0785-6>
- Dott, M., Rasmussen, S. A., Hogue, C. J., & Reefhuis, J. (2010). Association between pregnancy intention and reproductive health related behaviors before and after pregnancy recognition, National Birth Defects Prevention Study, 1997-2002. *Maternal and Child Health Journal*, 14(3), 373–381.
<https://doi.org/10.1007/s10995-009-0458-1>
- Eichelberger, K. Y., Baker, A. M., Woodham, P. C., Haeri, S., Strauss, R. A., & Stuebe, A. M. (2015). Second-Trimester Maternal Serum Paraxanthine, CYP1A2 Activity, and the Risk of Severe Preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology*, 126(4), 725–730.
<https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001041>
- Eichenwald, E. C. (2016). Apnea of Prematurity. *Pediatrics*, 137(1), e20153757.
<https://doi.org/10.1542/peds.2015-3757>
- ENSANUT. (2016). *ENSANUT2016*. Retrieved from
<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf>
- Eteng, M. U., Eyong, E. U., Akpanyung, E. O., Agiang, M. A., & Aremu, C. Y. (1997). Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51(3), 231–243. <https://doi.org/10.1023/A:1007976831684>
- Faber, M. S., Jetter, A., & Fuhr, U. (2005). Assessment of CYP1A2 activity in clinical

- practice: why, how, and when? *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 97(3), 125–134. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_973160.x
- Falcão, A. C., Fernández de Gatta, M. M., Delgado Iribarnegaray, M. F., Santos Buelga, D., García, M. J., Dominguez-Gil, A., & Lanao, J. M. (1997). Population pharmacokinetics of caffeine in premature neonates. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 52(3), 211–217. <https://doi.org/10.1007/s002280050276>
- Fanni, D., Ambu, R., Gerosa, C., Nemolato, S., Castagnola, M., Van Eyken, P., ... Fanos, V. (2014). Cytochrome P450 Genetic Polymorphism in Neonatal Drug Metabolism: Role and Practical Consequences towards a New Drug Culture in Neonatology. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 27(1), 5–13. <https://doi.org/10.1177/039463201402700102>
- Frary, C. D., Johnson, R. K., & Wang, M. Q. (2005). Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. *Journal of the American Dietetic Association*, 105(1), 110–113. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2004.10.027>
- Fuxe, K., Agnati, L. F., Jacobsen, K., Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., ... Ferre, S. (2003). Receptor heteromerization in adenosine A2A receptor signaling: Relevance for striatal function and Parkinson's disease. *Neurology*, 61(Issue 11, Supplement 6), S19–S23. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000095206.44418.5C>
- Ginsberg, G., Hattis, D., Miller, R., & Sonawane, B. (2004). Pediatric pharmacokinetic data: implications for environmental risk assessment for children. *Pediatrics*, 113(4 Suppl), 973–983. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15060190>
- Grant, D. M., Hughes, N. C., Janezic, S. A., Goodfellow, G. H., Chen, H. J., Gaedigk, A., ... Grewal, R. (1997). Human acetyltransferase polymorphisms. *Mutation*

- Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 376(1–2), 61–70. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00026-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00026-2)
- Grant, D., Tang, B., & Kalow, W. (1984). A simple test for acetylator phenotype using caffeine. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 17(4), 459–464. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1984.tb02372.x>
- Grosso, L. M., Triche, E., Benowitz, N. L., & Bracken, M. B. (2008). Prenatal caffeine assessment: fetal and maternal biomarkers or self-reported intake? *Annals of Epidemiology*, 18(3), 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2007.11.005>
- Gu, L., Gonzalez, F. J., Kalow, W., & Tang, B. K. (1992). Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine and theophylline by cDNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. *Pharmacogenetics*, 2(2), 73–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1302044>
- Hayashi, S., Watanabe, J., & Kawajiri, K. (1991). Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *Journal of Biochemistry*, 110(4), 559–565. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1778977>
- Hentges, C. R., Guedes, R. R., Silveira, R. C., & Procianoy, R. S. (2010). Serum levels of caffeine in umbilical cord and apnea of prematurity. *Jornal de Pediatria*, 86(2), 137–142. <https://doi.org/doi:10.2223/JPED.1990>
- Interest, C. for S. in the P. (2014). Caffeine content of food & drugs, 1–4. Retrieved from <http://www.cspinet.org/new/cafchart.htm>
- Isaza, C., Henao, J., Martínez, J. H. I., Sepúlveda Arias, J. C., & Beltrán, L. (2007). Phenotype-genotype analysis of CYP2C19 in Colombian mestizo individuals. *BMC*

Clinical Pharmacology, 7, 6. <https://doi.org/10.1186/1472-6904-7-6>

Jacobson, K. A., Nikodijevic, O., Shi, D., Gallo-Rodriguez, C., Olah, M. E., Stiles, G. L., & Daly, J. W. (1993). A role for central A₃-adenosine receptors. *FEBS Letters*, 336(1), 57–60.

Johansson, B., Halldner, L., Dunwiddie, T. V., Masino, S. A., Poelchen, W., Gimenez-Llort, L., ... Fredholm, B. B. (2001). Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A₁ receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(16), 9407–9412.
<https://doi.org/10.1073/pnas.161292398>

Kalow, W., & Tang, B. (1993). The use of caffeine for enzyme assays: A critical appraisal. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 53(5), 503–514.
<https://doi.org/10.1038/clpt.1993.63>

Kobayashi, S., Sata, F., Sasaki, S., Ban, S., Miyashita, C., Okada, E., ... Kishi, R. (2013). Genetic association of aromatic hydrocarbon receptor (AHR) and cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1) polymorphisms with dioxin blood concentrations among pregnant Japanese women. *Toxicology Letters*, 219(3), 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.03.013>

Kot, M., & Daniel, W. A. (2008). Relative contribution of rat cytochrome P450 isoforms to the metabolism of caffeine: The pathway and concentration dependence. *Biochemical Pharmacology*, 75(7), 1538–1549.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.12.017>

Kumral, A., Tuzun, F., Yesilirmak, D. C., Duman, N., & Ozkan, H. (2012). Genetic basis of apnoea of prematurity and caffeine treatment response: role of adenosine receptor

- polymorphisms. *Acta Paediatrica*, 101(7), e299–e303.
<https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2012.02664.x>
- Küster, A., Tea, I., Ferchaud-Roucher, V., Borgne, S., Plouzenec, C., Winer, N., ...
Darmaun, D. (2011). Cord blood glutathione depletion in preterm infants:
Correlation with maternal cysteine depletion. *PLoS ONE*, 6(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027626>
- Lai, X.-S., Yang, L.-P., Li, X.-T., Liu, J.-P., Zhou, Z.-W., & Zhou, S.-F. (2009). Human
CYP2C8: structure, substrate specificity, inhibitor selectivity, inducers and
polymorphisms. *Current Drug Metabolism*, 10(9), 1009–1047.
<https://doi.org/10.2174/138920009790711832>
- Ledent, C., Vaugeois, J. M., Schiffmann, S. N., Pedrazzini, T., El Yacoubi, M.,
Vanderhaeghen, J. J., ... Parmentier, M. (1997). Aggressiveness, hypoalgesia and
high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature*, 388(6643),
674–678. <https://doi.org/10.1038/41771>
- Mayo Clinic Staff. (n.d.). No Title. Retrieved from <https://www.mayoclinic.org/es-es/healthy-lifestyle/nutrition-and-healthy-eating/in-depth/caffeine/art-20049372>
- McPhersonx, P. S., Kim, Y., Valdivia, H., Knudson, C. M., Takekura, H., Franzini-
Armstrong, C., ... Campbell, K. P. (1991). The brain ryanodine receptor: A caffeine-
sensitive calcium release channel. *Neuron*, 7(1), 17–25.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90070-G](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90070-G)
- Mose, T., Kjaerstad, M. B., Mathiesen, L., Nielsen, J. B., Edelfors, S., & Knudsen, L. E.
(2008). Placental Passage of Benzoic acid, Caffeine, and Glyphosate in an Ex Vivo
Human Perfusion System. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*,

- 71(15), 984–991. <https://doi.org/10.1080/01932690801934513>
- Nau, H. (1986). Species differences in pharmacokinetics and drug teratogenesis. *Environmental Health Perspectives, Vol. 70*(Table 1), 113–129. <https://doi.org/10.1289/ehp.8670113>
- Neafsey, P., Ginsberg, G., Hattis, D., Johns, D. O., Guyton, K. Z., & Sonawane, B. (2009). Genetic polymorphism in CYP2E1: Population distribution of CYP2E1 activity. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews, 12*(5–6), 362–388. <https://doi.org/10.1080/10937400903158359>
- Neumann, J., Schmitz, W., Scholz, H., & Stein, B. (1989). Effects of adenosine analogues on contractile response and CAMP content in guinea-pig isolated ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 340*(6), 689–695. <https://doi.org/10.1007/BF00717746>
- OMS. (n.d.). Los Impuestos a los Refrescos y a las Bebidas Azucaradas como Medida de Salud Pública. Retrieved from https://www.paho.org/mex/index.php?option=com_content&view=article&id=627:los-impuestos-refrescos-bebidas-azucaradas-medida-salud-publica&Itemid=499
- Pacifici, G. M. (2014). Clinical pharmacology of caffeine citrate in preterm infants. *Medical Express, 1*(5), 243–250. <https://doi.org/10.5935/MedicalExpress.2014.05.06>
- Ramachandran, A., & Jaeschke, H. (2017). Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to the human pathophysiology. *Journal of Clinical and Translational Research, 3*(Suppl 1), 157–169. <https://doi.org/10.18053/jctres.03.2017S1.002>
- Reyes, C., & Cornelis, M. (2018). Caffeine in the Diet: Country-Level Consumption and

- Guidelines. *Nutrients*, 10(11), 1772. <https://doi.org/10.3390/nu10111772>
- Roco, Á., Quiñones, L., Agúndez, J. A. G., García-Martín, E., Squicciarini, V., Miranda, C., ... Varela, N. (2012). Frequencies of 23 functionally significant variant alleles related with metabolism of antineoplastic drugs in the chilean population: Comparison with caucasian and asian populations. *Frontiers in Genetics*, 3(NOV), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00229>
- Rogers, P. J., Hohoff, C., Heatherley, S. V, Mullings, E. L., Maxfield, P. J., Evershed, R. P., ... Nutt, D. J. (2010). Association of the Anxiogenic and Alerting Effects of Caffeine with ADORA2A and ADORA1 Polymorphisms and Habitual Level of Caffeine Consumption. *Neuropsychopharmacology*, 35(9), 1973–1983. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.71>
- Sachse, C., Brockmöller, J., Bauer, S., & Roots, I. (2001). Functional significance of a C?A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 47(4), 445–449. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1999.00898.x>
- Sastry, B. (1999). Techniques to study human placental transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 38(1), 17–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837744>
- Servey, J., & Chang, J. (2014). Over-the-Counter Medications in Pregnancy. *American Family Physician*, 90(8), 548–555. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25369643>
- Sinues, B., Vicente, J., Fanlo, A., Vasquez, P., Medina, J. C., Mayayo, E., ... Martinez-Jarreta, B. (2007). CYP3A5*3 and CYP3A4*1B allele distribution and genotype

- combinations: differences between Spaniards and Central Americans. *Therapeutic Drug Monitoring*, 29(4), 412–416. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e31811f390a>
- Solus, J. F., Arietta, B. J., Harris, J. R., Sexton, D. P., Steward, J. Q., McMunn, C., ... Dawson, E. P. (2004). Genetic variation in eleven phase I drug metabolism genes in an ethnically diverse population. *Pharmacogenomics*, 5(7), 895–931. <https://doi.org/10.1517/14622416.5.7.895>
- Song, B. J., Veech, R. L., Park, S. S., Gelboin, H. V., & Gonzalez, F. J. (1988). Structure and Regulation of the Ethanol-Inducible Cytochrome P450j. *Advances in Alcohol & Substance Abuse*, 7(3–4), 205–207. https://doi.org/10.1300/J251v07n03_25
- Sosa-Macias, M., & LLerena, A. (2013). Cytochrome P450 genetic polymorphisms of Mexican indigenous populations. *Drug Metabolism and Drug Interactions*. <https://doi.org/10.1515/dmdi-2013-0037>
- Tan, E. K., Chua, E., Fook-Chong, S. M., Teo, Y. Y., Yuen, Y., Tan, L., & Zhao, Y. (2007). Association between caffeine intake and risk of Parkinson's disease among fast and slow metabolizers. *Pharmacogenetics and Genomics*, 17(11), 1001–1005. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3282f09265>
- Tasnif, Y., Morado, J., & Hebert, M. F. (2016). Pregnancy-related pharmacokinetic changes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 100(1), 53–62. <https://doi.org/10.1002/cpt.382>
- Torvinen, M., Marcellino, D., Canals, M., Agnati, L. F., Lluís, C., Franco, R., & Fuxe, K. (2005). Adenosine A2A receptor and dopamine D3 receptor interactions: evidence of functional A2A/D3 heteromeric complexes. *Molecular Pharmacology*, 67(2), 400–407. <https://doi.org/10.1124/mol.104.003376>

- van den Anker, J. N., & Allegaert, K. (2018). Acetaminophen in the Neonatal Intensive Care Unit: Shotgun Approach or Silver Bullet. *The Journal of Pediatrics*, *198*, 10–11. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.02.046>
- Vargas-Alarcon, G., Gamboa, R., Vergara, Y., Rodriguez-Zepeda, J., De La Peña, A., Izaguirre, R., ... Granados, J. (2002). LMP2 and LMP7 gene polymorphism in Mexican populations: Mestizos and Amerindians. *Genes and Immunity*, *3*, 373–377. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363855>
- Wierzejska, R., Jarosz, M., Siuba, M., & Sawicki, W. (2014). Comparison of maternal and fetal blood levels of caffeine and its metabolite. A pilot study. *Polish Gynaecology*, *85*(7), 500–503. <https://doi.org/10.17772/gp/1760>
- Wikoff, D., Welsh, B. T., Henderson, R., Brorby, G. P., Britt, J., Myers, E., ... Doepker, C. (2017). Systematic review of the potential adverse effects of caffeine consumption in healthy adults, pregnant women, adolescents, and children. *Food and Chemical Toxicology*, *109*(Pt 1), 585–648. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.002>
- Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics*, *138*(1), 103–141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>

ANEXOS



Monterrey, N.L. a 27 de Agosto del 2013

Dr. Víctor Javier Lara Díaz
Investigador Principal
PRESENTE

Estimado Dr. Lara,

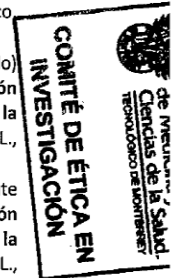
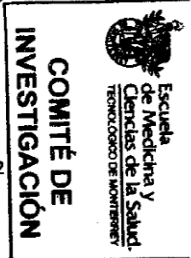
Notificamos a usted, que ha sido **REVISADO Y APROBADO** por el **Comité de Ética en Investigación de la Escuela de Medicina del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey y el Comité de Investigación de la Escuela de Medicina del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey**, el estudio clínico titulado:

Titolado:
Protocolo:CAF_CYP1A2

Titolado: Efectos de la administración prenatal, medicación concomitante postnatal y de los polimorfismos del CYP1A2 sobre la farmacocinética de la cafeína en prematuros, CAF_CYP1A2

Documentos aprobados:

- Protocolo: CAF_CYP1A2 Titulado: "Efectos de la administración prenatal, medicación concomitante postnatal y de los polimorfismos del CYP1A2 sobre la farmacocinética de la cafeína en prematuros, CAF_CYP1A2" Versión 4.2, fechado 08 Agosto 2013, Monterrey, N.L., México, Grupo de Investigación de la Cátedra de Crecimiento y Desarrollo Humano.
- Formato de Consentimiento Informado para la Madre (Componente Materno) Protocolo: CAF_CYP1A2 Titulado: "Efectos de la administración prenatal, medicación concomitante postnatal y de los polimorfismos del CYP1A2 sobre la farmacocinética de la cafeína en prematuros, CAF_CYP1A2" Versión 4.2, fechado 08 Agosto 2013, Monterrey, N.L., México, Grupo de Investigación de la Cátedra de Crecimiento y Desarrollo Humano.
- Formato de Consentimiento Informado para la Madre (Componente del recién Nacido) Protocolo: CAF_CYP1A2 Titulado: "Efectos de la administración prenatal, medicación concomitante postnatal y de los polimorfismos del CYP1A2 sobre la farmacocinética de la cafeína en prematuros, CAF_CYP1A2" Versión 4.2, fechado 08 Agosto 2013, Monterrey, N.L., México, Grupo de Investigación de la Cátedra de Crecimiento y Desarrollo Humano.
- Formato de Consentimiento Informado, estudio Farmacogenético opcional (Componente Materno); Protocolo: CAF_CYP1A2 Titulado: "Efectos de la administración prenatal, medicación concomitante postnatal y de los polimorfismos del CYP1A2 sobre la farmacocinética de la cafeína en prematuros, CAF_CYP1A2" Versión 4.2, fechado 08 Agosto 2013, Monterrey, N.L., México, Grupo de Investigación de la Cátedra de Crecimiento y Desarrollo Humano.
- Formato de Consentimiento Informado, estudio Farmacogenético opcional (Componente del recién Nacido); Protocolo: CAF_CYP1A2 Titulado: "Efectos de la administración prenatal,



Edificio CITES
Ave. Mirones Prieto 3000 Pte
64710, Monterrey, N.L., México
Tel: 52/81 8888 2141
Fax: 52/81 8888 2148