

Respuesta terapéutica a mefloquina, estado nutricional y variantes alélicas del gen *CYP3A4* en pacientes con malaria falciparum no complicada; Antioquia (Colombia)

Valentina Guzmán Pérez¹, Jaime Carmona-Fonseca², Fanny Cuesta González³, Amanda Maestre Buitrago², Luis Carlos Burgos Herrera⁴, Rosa Magdalena Uscátegui Peñuela⁵

Resumen

Introducción: hay poca información sobre las relaciones entre la falla de la terapia antimalárica y algunos factores del hospedero (estado nutricional, fenotipo y genotipo del citocromo CYP450 que metaboliza el medicamento antipalúdico).

Objetivo: explorar si la falla terapéutica de la mefloquina dada a pacientes con malaria falciparum no complicada se puede explicar por la influencia del estado nutricional del enfermo y del fenotipo y genotipo de su citocromo CYP3A4.

Materiales y métodos: estudio de casos y controles no pareado. Pacientes: hombres y mujeres adultos, de Turbo y El Bagre (Antioquia, Colombia).

Resultados: se evaluó la respuesta terapéutica en 46 enfermos; hubo solo tres fallas (6.5%); por la muy baja ocurrencia de falla terapéutica ($n = 3/46$), los resultados se presentan en forma descriptiva para los 46 pacientes. La relación dextrometorfano/3-metoximorfino fue 0,39 (mediana); 20% fueron metabolizadores lentos. Las concentraciones sanguíneas medianas de mefloquina a las 24 horas (C_{24h}) y al día 14 (C_{d14}) fueron 1.363 ± 397 ng/mL y 978 ± 106 ng/mL, respectivamente. Los 46 pacientes presentaron el alelo CYP3A4*2 (silvestre).

Conclusión: no se pudo evaluar con profundidad la relación entre la respuesta a la terapia antimalárica, por una parte y, por otra, la actividad del CYP450 y el estado nutricional, pero hubo hallazgos que justifican la evaluación y control de las características del hospedero en estudios posteriores de farmacocinética antimalárica.

Palabras clave

Alelos, Citocromo P-450, Desnutrición, Ferritina, Malaria, Mefloquina, Retinol, Selenio

¹ Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

² Grupo Salud y Comunidad, Universidad de Antioquia.

³ Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

⁴ Departamento de Bioquímica y Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

⁵ Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad de Antioquia; Grupo de Nutrición y Alimentación Humana, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Correspondencia: jaimecarmonaf@hotmail.com Carrera 51D 62-29. Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología. Medellín (Colombia). Telefax (574) 219 60 51 vguzman@javeriana.edu.co; fcuesta@quimbaya.udea.edu.co; aemaestre@quimbaya.udea.edu.co; lcburgos@gmail.com; rosauscategui@gmail.com

Recibido: mayo 15 de 2008

Aceptado: 24 febrero de 2009

SUMMARY

Malaria: efficacy of mefloquine according to nutritional status and allelic variations of the CYP3A4 gen

Introduction: Information on the relationship between treatment failure in malaria and factors of the host (nutritional status, phenotype and genotype of cytochrome CYP450) involved in the metabolism of antimalarials is scarce.

Objective: To explore whether treatment failure of mefloquine administered to patients with non-complicated falciparum malaria can be explained in terms of the patient's nutritional status and the CYP3A4 phenotype and genotype.

Materials and methods: Non-matched case-control study. Patients were adult males and females, inhabitants of Turbo and El Bagre (Antioquia, Colombia).

Results: The therapeutic response was assessed in 46 patients, and there were only three failures (6.5%); due to the rare occurrence of therapeutic failure ($n = 3/46$), results are presented in a descriptive way for the 46 patients. The dextrometorphan/3-methoxymorphinan ratio was 0.39 (median); 20% of the patients were slow metabolizers. The blood concentrations of mefloquine at 24 hours (C24h) and at day 14 (Cd14) were (median) 1.363 ± 397 ng/mL and 978 ± 106 ng/mL, respectively. All 46 patients had the wild CYP3A4*2 allele.

Conclusion: We were unable to assess in depth the relationship between the response to mefloquine, on the one hand and, on the other, CYP450 activity and nutritional status. However, there were findings that justify the assessment and control of the characteristics of the host in subsequent studies of antimalarial pharmacokinetics.

Key words

Alleles, Cytochrome P-450, Ferritine, Malaria, Mefloquine, Malnutrition, Retinol, Selenium

INTRODUCCIÓN

La falta de concordancia entre las respuestas al tratamiento antipalúdico *in vivo* e *in vitro* sugiere que existen factores del hospedero que pueden cumplir un papel determinante. El fenotipo observado *in vivo* en el

paciente (respuesta exitosa, falla terapéutica) y el fenotipo *in vitro* del parásito sometido al medicamento (sensible, resistente) son dos maneras complementarias de evaluar la eficacia de un antimalárico. La dosis del antimalárico, la forma de suministrarlo en el tiempo, la vía de administración, su biodisponibilidad, sus interacciones con otros fármacos administrados simultáneamente con él, la farmacocinética y la respuesta inmune pueden hacer que la concentración y el tiempo de contacto del compuesto antimalárico con el parásito no sean los adecuados para impedir su crecimiento. Los factores del hospedero que pueden afectar la eficacia del tratamiento antimalárico incluyen su estado inmune, su situación nutricional, la presencia de enfermedades concomitantes, una mala absorción intestinal, un metabolismo alterado, una hipoproteínemia, o un acelerado metabolismo del compuesto.¹

La mayoría de las biotransformaciones metabólicas las lleva a cabo el sistema de oxidasas de función mixta, sistema microsomal o citocromo P-450 (CYP450).² Se han identificado alrededor de treinta familias de citocromos (enzimas) y varios están involucrados en el metabolismo hepático de antimaláricos, entre ellos cloroquina, amodiaquina, pirimetamina, primaquina y mefloquina.¹⁻³ En 2004 se informó que había al menos 57 citocromos P450 humanos (llamados isoformas), codificados por genes separados, y que solo 10 de esas enzimas contribuyen al metabolismo de medicamentos, con la principal participación de las isoformas 3A4, 2D6 y 2C9.⁴ De las tres subfamilias CYP450 involucradas en el metabolismo de fase I de los medicamentos (subfamilias 1, 2 y 3), la 2 posee el mayor grado de diversidad genética.^{5,6}

La subfamilia CYP3A (CYP3A4, 5, 7, 43) es una de las que más participación tienen en la biotransformación de medicamentos.⁷ A pesar de que estas variantes no se han relacionado con la respuesta a los antimaláricos, su presencia está asociada con una reducción en la respuesta terapéutica a varios medicamentos.^{5,8,9} La expresión de CYP3A exhibe una sustancial diversidad de uno a otro individuo, mucha de la cual resulta de variación genética.¹⁰ Hace poco tiempo se determinaron las primeras estructuras moleculares del CYP3A4 humano.¹¹

La subfamilia CYP3A participa en el metabolismo de 45-60% de las drogas usadas en la actualidad y de una amplia variedad de otros compuestos.¹² Esta situación hace que CYP3A4 sea muy susceptible a la inhibición tanto

reversible como irreversible (inhibición basada en mecanismo).¹³

La mayoría de los genes CYP450 presentan gran polimorfismo y algunos individuos tienen enzimas con actividad catalítica alterada o que dan lugar a una expresión genética anormal.^{4,14} Las personas se clasifican, de acuerdo con el metabolismo de algunos medicamentos, en tres grupos de metabolizadores: lentos, extensos y ultrarrápidos.⁹ Se conocen variantes alélicas en los genes CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2A13, 2B6, 3A5, 3A4, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, entre otros.^{9,15}

El gen CYP3A4 humano está en el cromosoma 7q21.3-q22.1; es un gen funcional, su longitud es de 27,2 kb y tiene 13 exones.¹⁶ De CYP3A4 se conocían hacia 2005 al menos 40 alelos, de los cuales el silvestre es 3A4*1A¹⁷ y la variante más común es CYP3A4*1B, con frecuencias de 63, 11 y 9-11% en afroamericanos, caucásicos e hispanoamericanos, respectivamente.⁷

Además del estudio del gen que codifica una enzima específica responsable del metabolismo de fármacos, la actividad de esta puede medirse por fenotipificación. El fenotipo, en este caso, es la capacidad natural de la enzima de participar en una reacción que lleva a la activación o inactivación de un sustrato.¹⁸ Hasta hace poco tiempo, el estudio del fenotipo fue el procedimiento predominante para evaluar el CYP-450.

La inflamación causada por infecciones, como la malaria, reduce la actividad del complejo enzimático del CYP-450, que es activado o inducido por las dietas hiperproteicas y por el consumo de ácidos grasos (CYP3A y CYP2A1), mientras que es inhibido por el kwashiorkor y por las dietas deficientes en carbohidratos, ácidos grasos, o en vitaminas A, E, C, B2, niacina, o en Fe, Zn, Ca.¹ La inflamación hepática puede ser responsable de la gran variabilidad farmacocinética descrita en los pacientes tratados con algunos antimaláricos, como amodiaquina.¹⁹

Las variaciones en el consumo de proteínas con relación al de carbohidratos y grasas, así como la reducción del consumo de combustibles por debajo de las necesidades, podrían ser responsables de variaciones en la respuesta terapéutica.²⁰ Algunos estudios han comprobado el papel de la vitamina A, el selenio y el hierro en modular la expresión y función hepáticas de varios citocromos.^{21,22} La vitamina A modula la expresión de genes responsables de transcribir citocromos como el CYP4A. En ratones

sometidos a dietas deficientes en vitamina A ocurre una reducción de 64% en la expresión del CYP4A y de 85% en la de CYP3A.²¹ El estado nutricional en cuanto al hierro y el selenio está relacionado con la vía de síntesis del CYP450.^{22,25}

Las personas que habitan en las regiones maláricas padecen simultáneamente paludismo, parasitosis intestinales, desnutrición proteico-calórica y deficiencias de micronutrientes. Hay muchas pruebas de que la desnutrición y la infección coexisten e interactúan en una misma población humana; también la malaria y las parasitosis intestinales usualmente conviven en las mismas comunidades afectadas por la desnutrición,²⁴ como en las zonas y poblaciones de Colombia donde se hizo esta investigación.²⁵⁻²⁷

La mefloquina (MQ) es un antimalárico sintético (arilamino alcohol), activo contra los estadios eritrocíticos de *Plasmodium falciparum* y *P. vivax*. En Turbo y El Bagre (Antioquia, Colombia) la eficacia de la monoterapia con MQ fue 96% y asociada a sulfadoxina-pirimetamina fue 100%.²⁸ En el departamento de Antioquia se usó en 2006-2007 la combinación mefloquina-artesunato con eficacia mayor de 95% (datos sin publicar). Como antimalárico, la MQ se administra por vía oral en dosis de 25 mg/kg y se sugiere darla fraccionada a partir del día 2 de tratamiento (día 2: 15 mg/kg y día 3: 10 mg/kg), pero también puede ser desde el día 1 (días 1, 2, 3: 8,3 mg/kg/día).^{29,30} En Colombia existe aprobación oficial para el uso de la combinación artesunato-mefloquina. La MQ se absorbe lenta pero satisfactoriamente en el tubo digestivo, proceso estimulado por la presencia de alimentos.³¹ Se elimina completamente por biotransformación hepática mediante el CYP3A4, que origina la formación de su metabolito carboximefloquina, inactivo para *Plasmodium*.^{32,33} La MQ inhibe el citocromo CYP1A2.³⁴

Este informe da cuenta de una investigación que intentó explicar la falla terapéutica antimalárica a partir del posible papel que en ella juegan factores como el fenotipo y el genotipo de las enzimas CYP450 y el estado nutricional del hospedero. Se preguntó específicamente si el fenotipo/genotipo del CYP450 y el estado nutricional del hospedero pueden explicar la falla terapéutica observada en pacientes con malaria falciparum tratados con mefloquina como monoterapia. Esta pregunta ha sido muy poco explorada y por eso se torna más importante y se hace más necesario buscar respuestas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Clase de estudio

Nosotros evaluábamos la respuesta terapéutica a MQ en pacientes con malaria *falciparum*, cuando se diseñó la investigación que es objeto de este informe, anidada en el trabajo de eficacia terapéutica; el resultado final del trabajo de eficacia entregaría dos grupos de pacientes: uno con falla terapéutica y otro con éxito terapéutico. Esta realidad impuso el tipo de diseño epidemiológico que usaríamos en el proyecto anidado: un estudio de casos y controles, en el que los primeros corresponderían a las fallas y los segundos, a los éxitos.

Objetivo específico

Con un diseño de casos-controles no pareado, aplicado a pacientes con malaria *falciparum* no complicada y tratados con MQ, residentes en Turbo (zona de Urabá) o El Bagre (área del Bajo Cauca antioqueño), se evaluó la relación entre la respuesta terapéutica y cada una de estas variables explicativas: concentraciones sanguíneas de MQ a las 24 horas (C24h) y en el día 14 (Cd14), fenotipo y genotipo de CYP3A4, estado nutricional medido con el índice de masa corporal (IMC) y las concentraciones plasmáticas de vitamina A, ferritina y selenio.

Diseño y tamaño de la muestra; población referencia

El protocolo de la Organización Mundial de la Salud (OMS) usado para evaluar la respuesta terapéutica³⁵ propone grupos de 42 personas, que aumentamos a un mínimo de 50 para compensar las pérdidas durante el seguimiento de 28 días.^{38,36}

La población de referencia para el estudio estuvo constituida por hombres y mujeres mayores de 1 año, residentes en áreas urbana o rural de los municipios de Turbo y El Bagre, atendidos de forma ambulatoria en los puestos de malaria de dichos municipios, con malaria no complicada y debida exclusivamente a *P. falciparum*. Hemos descrito las condiciones generales de la población de referencia,^{37,38} que son fundamentales para interpretar la falla terapéutica antimalárica y diferentes hallazgos en ella.

Criterios de inclusión

Todos los pacientes del trabajo fueron captados según el orden de llegada, si cumplían los criterios de inclusión,

sin que interviniera ninguna otra condición; tales criterios fueron:

1. Tener malaria no complicada, debida solo a *P. falciparum*, tratada con MQ y haber sido seguido con controles parasitológico y clínico durante 28 días.
2. No estar en embarazo.
3. No presentar procesos infecciosos diferentes a malaria.
4. No presentar enfermedad cardíaca congestiva ni falla renal o hepática.
5. No tener antecedentes de intolerancia a los medicamentos antimaláricos.
6. Aceptar la participación en el estudio y firmar el consentimiento informado.

Tratamiento de los pacientes y evaluación de la respuesta terapéutica

La MQ se administró en dosis única de 25 mg/kg. Todo medicamento se administró bajo supervisión directa del médico tratante. La respuesta terapéutica se clasificó según el protocolo usado: falla precoz, falla tardía, respuesta adecuada.³⁵ Se hizo medición de la parasitemia los días 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 y 28.

Medición de la concentración sanguínea de MQ

Las muestras de sangre venosa para genotipificar el CYP450 y medir la concentración de MQ (2 mL) se depositaron en discos de papel de filtro Whatman n.º 3, que se almacenaron a -20 °C y se enviaron a Medellín para su procesamiento. La concentración de MQ se midió a las 24 horas de haberla ingerido, en el día 14 (días 14 a 16) y en el día de la falla terapéutica, y se hizo según un protocolo conocido³⁹ y adaptado.⁴⁰ Para la cuantificación de la MQ usamos un equipo de cromatografía marca *Agilent*, serie 1100 (Inyector manual *Rheodyne* serie 1100, bomba isocrática serie 1100, detector ultravioleta programable serie 1100, programa *Agilent ChemStations* para HPLC, computador compatible). Estas fueron las condiciones cromatográficas: columna: *LiChrospher*® 100 RP-18 (5 mm) en *LiChroCART*® 125-4 con precolumna RP-18 marca *Merck*; flujo: 1,2 mL/minuto; fase móvil: acetonitrilo: tampón fosfato de potasio monobásico pH 3,0 (40:60); longitud de onda: 222 nm; cantidad de muestra inyectada: 20 mL. El método para la cuantificación de las muestras de sangre tomadas a partir de papel de filtro usó como patrón de referencia el estándar secundario

de mefloquina lote 106144-01PO133, suministrado por Laboratorios *Mepha SA*.

Genotipificación y secuenciación de CYP3A4

Se procesaron las muestras de acuerdo con el protocolo de Singh y colaboradores,⁴¹ con algunas modificaciones nuestras.⁴² El ADN extraído se almacenó a -20 °C hasta su amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la evaluación mediante polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) para amplificar las regiones polimórficas del gen CYP3A4 (3A4*2). La PCR se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones descritas por García-Martin y colaboradores,⁸ con algunas modificaciones hechas por nosotros. Con cebadores específicos se amplificó el fragmento de 423 pares de bases (pb), correspondiente al área de la mutación. Los productos de la digestión se incubaron con la endonucleasa *Bam HI* que digirió la secuencia del CYP3A4 dando origen a dos fragmentos de 143 y 280 pb, respectivamente; esta enzima no digiere las secuencias correspondientes a los genes CYP3A5 y CYP3A7, de esta forma se evaluó la especificidad de los fragmentos amplificados. Adicionalmente, se incubaron los productos de la PCR con la endonucleasa *XcmI* (*New England Biolabs*), que no digiere la secuencia silvestre, mientras que en la mutada produce fragmentos de 166 y 257 pb.

La secuenciación del ADN se hizo a partir del producto amplificado en gel de agarosa empleando el estuche comercial de purificación, *Wizard PCR Preps* (*Promega*). Los productos purificados se enviaron a la compañía de biotecnología *Macrogen* para la secuenciación, que se realizó directamente con fluorescencia, con empleo de los cuatro dideoxinucleótidos terminadores marcados con diferentes grupos fluorescentes.⁴³ Los productos se secuenciaron en un *Big Dye* y en un *ABI Prism 377 Perkin Elmer*, ambos de *Perkin Elmer Applied Biosystems*. Las secuencias se editaron con el programa *BioEdit* versión 7.0.

Evaluaciones antropométrica y de micronutrientes

Al ingresar el paciente al estudio se preguntó por su edad y se le midieron el peso corporal (kilogramos) con báscula electrónica (sensibilidad de 100 g) y la estatura con estadiómetro. En el laboratorio se determinó el índice de masa corporal (IMC) (peso kg/estatura m²) y se

emplearon estos puntos de corte: déficit, menos de 18,5; normal, entre 18,5 y 24,9; exceso de peso, entre 25 y 29,9; obesidad, valores por encima de 29,9.⁴⁴ Para los dos niños (4 y 13 años, un hombre y una mujer) se obtuvieron la edad, el peso corporal y la estatura y se construyeron indicadores de riesgo nutricional peso/edad, peso/estatura y estatura/edad con ayuda del módulo *Epinut* del programa *EpiInfo* 6.00. Los valores inferiores a -1 desviación estándar con respecto a la mediana se consideran como riesgo de desnutrición.

El último día del seguimiento de la respuesta terapéutica (día 28) se tomaron muestras de sangre venosa (5 mL) anticoagulada con EDTA para la medición de la vitamina A (retinol), hierro (ferritina) y selenio en plasma. Se protegió la muestra del aire, la luz y el contacto directo con hielo para evitar la oxidación del retinol. Se enviaron las muestras en hielo seco al Laboratorio de Nutrición del Instituto Nacional de Salud, en Bogotá (retinol y ferritina), y a la Universidad del Valle, en Cali (selenio).

La determinación del retinol en plasma se hizo por el método de cromatografía líquida de alta definición (HPLC), con un cromatógrafo líquido *Water 600 E* con detector UV. Cualquiera que fuese la edad, se consideraron como deficientes los valores inferiores a 20 µg/dL.⁴⁵ La medición de ferritina se hizo en plasma, mediante inmunoensayo enzimático de micropartículas (MEIA). Los puntos de corte empleados para determinar la ferropenia fueron: menos de 12,0 µg/L grave; 12,0-17,9 µg/L moderada y 18-23 µg/L leve.⁴⁵ Para no sesgar los resultados en cuanto al estado de la vitamina A en nuestros pacientes, se excluyó de la medición de retinol a los que estuvieran tomando suplementos alimentarios o vitamínicos de cualquier tipo en las dos semanas antes de la evaluación, y la muestra se obtuvo 28 días después del ingreso, para que ya no hubiera parasitemia y estuviera superada la fase aguda de la enfermedad, la cual reduce el retinol.

La cuantificación del selenio en plasma se hizo en el laboratorio de análisis industriales de la Universidad del Valle, directamente, sin tratamiento previo, por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito. El laboratorio consideró como bajos los valores por debajo de 40 µg/dL y como tóxicos los superiores a 100 µg/dL.⁴²

Fenotipificación metabólica de CYP3A4

Previo conocimiento de la fecha de administración de la última dosis del medicamento antipalúdico y de la respuesta al tratamiento antimalárico, se esperaron 60 días para la fenotipificación del CYP3A4, de manera que se pudiera asegurar una completa eliminación del compuesto. Se excluyó a los pacientes que en el momento de la evaluación estuviesen tomando otros medicamentos, o que en la última semana hubiesen tomado licor, suplementos vitamínicos o hubiesen fumado. Los días 28 y 60 un médico realizó, previo entrenamiento, la evaluación clínica al paciente, tomó una gota gruesa para confirmar la ausencia de parasitemia por *Plasmodium* y procedió según el protocolo establecido.^{42,46} La determinación del dextrometorfano (DMF) y su metabolito 3-metoximorfino (3MM) (fenotipificación metabólica) se hizo en Medellín, en el Laboratorio de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Antioquia, con un cromatógrafo líquido marca *Agilent* serie 1100 (automuestreador de 100 μ L de inyección, detector de fluorescencia, programa *Agilent ChemStations* para HPLC y computador compatible). El método de cuantificación de los datos de la validación y de las muestras de orina de los pacientes se hizo con levalorfanol como estándar interno, según el protocolo.⁴⁶ Se evaluaron los parámetros para la validación de métodos analíticos propuestos por la *Food and Drug Administration (FDA)* de los Estados Unidos, 2001.⁴⁶

La concentración máxima esperada (teórica) se determinó con la siguiente ecuación: $C_{\text{máx teórica}} = (f) \cdot (\text{dosis}) / Vd$, donde: f = biodisponibilidad = 1,0; dosis de MQ administrada = 25 mg/kg; Vd = volumen de distribución del medicamento = 19L/kg.

La C esperada al día 14 se halló así: $t_{1/2} = (C_{24h \text{ teórica}}) \cdot (e^{-\text{Celim} \cdot X}) / \text{promedio de } t_{1/2}$, donde: $C_{24h \text{ teórica}} = 1.315 \text{ ng/mL}$; $\text{Celim} = \log n^2 / \text{promedio de } t_{1/2}$; $\log n^2 = 0.693$; promedio de $t_{1/2} = 19$ días.

Aspectos éticos

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Centro de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. De cada paciente o de su acudiente responsable se obtuvo el consentimiento informado escrito antes de ingresar al

estudio. Se respetaron las normas nacionales e internacionales sobre la materia.

RESULTADOS

Se captaron y trataron con MQ 46 pacientes (más que la muestra prevista en el protocolo $n = 42$), que se siguieron por los 28 días previstos, sin que hubiese pérdidas. Todos pudieron someterse a la evaluación de fenotipo y genotipo de CYP-450. En los 46 pacientes tratados con MQ hubo 43 éxitos terapéuticos y apenas 3 fallas, lo que imposibilitó aplicar el diseño de casos y controles en el análisis de los datos y nos llevó a tratar estos bajo un diseño descriptivo y transversal, centrado en la presentación de las características de un grupo de pacientes con malaria falciparum no complicada.

Los pacientes presentaron parasitemia (mediana) de 3.075 parásitos asexuales/ μ L. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre la parasitemia de los pacientes con falla terapéutica (mediana = 4.880, $n = 3$) y la de los que tuvieron respuesta exitosa (mediana = 2.940, $n = 40$) ($p[\text{K-W}] = 0.412755$). La edad de los 46 pacientes varió entre 4 y 50 años (96% mayores de 18 años); 63% fueron hombres. La mediana del IMC (kg/m^2) fue 21.6 (valor que indica estado sano); en 5% el IMC era bajo, es decir menor de 18. Los valores (mediana) en la sangre de los micronutrientes fueron: 42,7 $\mu\text{g/dL}$ para retinol (en 12% fue bajo: menos de 20 $\mu\text{g/dL}$); 29,2 $\mu\text{g/L}$ para ferritina (en 45% el valor fue bajo: menos de 23 $\mu\text{g/L}$), y 4,4 $\mu\text{g/dL}$ para selenio.

La relación DMF/3MM fue 0,39 (valor mediana) y 20% de los pacientes pudieron clasificarse como metabolizadores lentos (más de 1,5 ng/mL de DMF/3MM). La C_{24h} de MQ fue baja en 7% de los pacientes (ellos tuvieron menos de 620 ng/mL, que es la concentración necesaria para la inhibición del crecimiento del parásito). La mediana de la C_{24h} de MQ fue $1.363 \pm 397 \text{ ng/mL}$ ($n = 41$); la concentración es inferior a la calculada con base en los parámetros farmacocinéticos (1.315 ng/mL), que es la C_{24h} teórica promedio estimada para la dosis de MQ administrada y los pesos máximo y mínimo observados en los pacientes; sin embargo, estas medianas (teórica y observada) son superiores a 620 ng/mL, que es la mínima C_{24h} requerida para la inhibición del parásito.

La mediana de la C_{d14} de MQ fue $978 \pm 106 \text{ ng/mL}$; la concentración teórica promedio estimada para este día

con base en los parámetros farmacocinéticos fue de 789 ng/mL.

No hubo relación entre el fenotipo de CYP3A4 y la C24h de MQ, ni entre dicho fenotipo y la concentración en el día 14.

Los análisis de correlación lineal simple entre la relación metabólica DMF/3MM y cada una de las variables concentración de micronutrientes, C24h y Cd14 no mostraron asociación estadísticamente significativa y el coeficiente r siempre fue menor de 0,30 (excepto para el retinol, con $r = -0,476$).

Los 46 pacientes presentaron el genotipo silvestre de la variante CYP3A4*2, es decir, los fragmentos de 423 pb amplificados no fueron digeridos por la enzima *XcmI*, lo que indica ausencia en ellos de la mutación.

DISCUSIÓN

El dextrometorfano (DMF) se usó aquí como fármaco de prueba para evaluar el fenotipo del citocromo 3A4; se determinaron las concentraciones en orina del DMF y de su metabolito 3MM por medio de la técnica HPLC con detector de fluorescencia,⁴⁷⁻⁵⁰ pero algunos autores cuestionan el empleo del DMF como fármaco de prueba y dicen que este medicamento, después de ser administrado, sigue dos vías metabólicas: la O-demetilación a dextrofanano, mediada por el CYP2D6, y la N-demetilación a 3-metoximorfino (3MM), debida a CYP3A4;⁵¹ sin embargo, en 2001 se demostró que el DMF era metabolizado mayoritariamente por CYP2D6 y CYP3A4 y que este último era responsable del 90% de la N-demetilación, es decir, que el DMF es una prueba adecuada para valorar el fenotipo del CYP3A4.⁵²

Los estudios de fenotipificación dan información valiosa sobre la actividad de las enzimas metabolizadoras de fármacos,¹⁸ pero en los estudios de población y aún más en los sujetos de zonas maláricas es difícil y costosa tal evaluación, porque dichas zonas tienen problemas para el acceso, su población es muy flotante, está expuesta permanentemente a la reinfección y gran parte de los pacientes maláricos son niños (en quienes el metabolismo del CYP450 podría ser distinto). Por lo tanto, es aconsejable abordar el problema de la actividad del CYP450 por medio de análisis farmacogenético, el cual es menos invasivo, menos costoso y proporciona información más rápida sobre el estado genotípico de la proteína.

El comportamiento fenotípico del CYP3A4 en este estudio mostró 80% de metabolizadores rápidos, dato que concuerda con la mayor parte de la información. El fenotipo enzimático de este citocromo se comporta de manera unimodal por ser escasamente polimórfico,⁵⁰ tal como aquí lo constatamos. Los tres pacientes con falla presentaron metabolismo rápido, lo que concuerda con lo esperado, puesto que solo un metabolismo de este tipo de la MQ podría predisponer al paciente al fracaso terapéutico, dado que este medicamento es activo como tal y su metabolito carboximefloquina no tiene actividad antiparasitaria. Ningún paciente presentó mutaciones en el CYP3A4, por lo tanto los metabolizadores lentos (20%) observados en este estudio no pueden explicarse por estas mutaciones o por deficiencia nutricional.

Todos los pacientes tratados con MQ tuvieron el fenotipo silvestre de la variante CYP3A4, lo que concuerda con otros estudios, que no reportan la presencia de un alelo que modifique el marco de lectura de la proteína codificada por este citocromo.^{8,53} El único alelo encontrado hasta el momento con estos efectos sobre el marco de lectura es el CYP3A4*6, que tiene muy baja frecuencia.

No hubo diferencia estadísticamente significativa entre la parasitemia de los pacientes con falla terapéutica y la de los que tuvieron respuesta adecuada. Otra causa de falla puede ser la resistencia parasitaria al medicamento y se sabe de clones de *P. falciparum* con resistencia *in vitro* a MQ. En cuanto a los mecanismos de tal resistencia se sabe que hay aumento de la tendencia del eflujo de MQ en los clones resistentes, comparados con los sensibles. En un estudio se demostró la presencia, en clones de *P. falciparum*, de enzimas metabolizadoras de MQ mediadas por CYP-450, ya que se estableció la capacidad plasmodial para biotransformar MQ a carboximefloquina y otro metabolito no identificado.⁵⁴

La deficiencia de retinol de 12% corresponde a adultos (mayores de 18 años), grupo al que en Colombia no se le ha evaluado tal vitamina, pero sí existe un estudio en niños, en quienes la deficiencia es más frecuente y las infecciones que afectan el estado de los micronutrientes son prevalentes.^{45,50} Un estudio llevado a cabo por nosotros en 2000 mostró que el consumo de alimentos que son fuentes de carotenoides y retinol entre los agricultores negros de la zona endémica de malaria en el corregimiento El Valle (Bahía Solano, Chocó), en la zona Pacífica, fue, durante un año consecutivo, inferior a

50%,^{55,56} lo que sugiere que las reservas de este micronutriente en zonas endémicas de malaria deben de ser bajas; en El Bagre se han informado deficiencias en su concentración hasta de 35% en niños sin malaria y hasta de 65% en niños con la enfermedad.²⁶ La malaria incrementa la necesidad de micronutrientes, entre ellos de retinol.⁵⁷

En nuestro estudio no se pudo evaluar a fondo la relación de la concentración de retinol con la respuesta terapéutica y la actividad del CYP3A4; sin embargo, no debe subestimarse la información publicada por otros en la que se muestra claramente el papel del retinol en la reducción de los parásitos del género *Plasmodium* y en la expresión de genes responsables de transcribir citocromos,⁵⁸ puesto que nuestro número de pacientes fue insuficiente para sacar conclusiones al respecto: solo uno de los casos y unos pocos metabolizadores lentos tienen información del retinol.

Llama la atención el alto número de pacientes con ferritina baja (45%), puesto que la hemólisis generada por la malaria aumenta la liberación de hierro que se almacena en forma de ferritina, es decir, que gran parte de la población se encontraba con una deficiencia crónica de hierro. Lo anterior concuerda con otros estudios según los cuales la ferritina puede encontrarse normal o elevada en pacientes con malaria a menos que haya deficiencias graves de hierro.⁵⁹ La concentración de ferritina sérica se modifica con el estado inflamatorio por ser un reactante positivo de fase aguda; por lo tanto, su concentración puede aumentar como respuesta a la inflamación generada por la malaria y enmascarar posibles deficiencias de hierro. La evaluación de la ferritina en nuestros pacientes se hizo cuando ya se encontraban sin parásitos de *Plasmodium* y después de haber superado la fase aguda de la enfermedad, a pesar de lo cual 20% presentaron valores por encima de 70 mg/L. La malaria es una de las mayores causas de anemia pero puede no ser la responsable del agotamiento de las reservas de hierro en el cuerpo;^{60,61} la lisis de los eritrocitos durante la fase aguda de la enfermedad incrementa la disponibilidad de hierro, pero la diseritropoyesis y la reducción de la reticulocitosis limitan la utilización del hierro almacenado.^{60,62} En otro estudio realizado en Colombia la prevalencia de deficiencia de las reservas de hierro fue de 22,5% en mujeres en edad fértil;⁴⁵ nuestros datos son superiores a estos probablemente por los antecedentes de malaria. De los tres pacientes con

fracaso terapéutico solo dos tuvieron evaluación de la reserva de hierro; ellos mostraron el valor más alto y el más bajo observados en la población total; este último presentó la concentración de ferritina más baja.

En resumen, en este estudio no pudo evaluarse con profundidad la relación entre la respuesta antimalárica, por una parte, y la actividad del CYP450 y el estado nutricional, por la otra; sin embargo, hubo varios hallazgos que justifican la evaluación y control de las características del hospedero en estudios posteriores de farmacocinética antimalárica y que vale la pena resaltar: a) el fenotipo hallado, metabolizador lento de la enzima CYP3A4, confirma la posible contribución de otros factores ambientales o genéticos no evaluados por nosotros en la actividad de la enzima; b) hubo carencia de nutrientes como retinol, hierro y selenio, los cuales participan en la vía de síntesis del CYP450, por lo que es necesario explorar su papel en poblaciones de mayor tamaño.

AGRADECIMIENTOS

Al personal de los hospitales de Turbo y El Bagre por su indispensable ayuda. A los pacientes por su participación.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS

Ninguno para manifestar.

FINANCIACIÓN

República de Colombia (mediante un crédito de la *United States Agency for International Development USAID*, administrado por la OPS Colombia, con la que la Universidad de Antioquia celebró los contratos pertinentes); Dirección Seccional de Salud de Antioquia y Universidad de Antioquia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guzmán V, Carmona-Fonseca J. El citocromo P-450 y la respuesta terapéutica antimalárica. *Rev Panam Salud Publ* 2006; 19: 9-22.
2. Guengerich FP. Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry. In: PR OdM, ed. *Human Cytochrome P450 Enzymes*. New York: Plenum Press; 1995. p. 473-535.
3. Giao PT, de Vries PJ. Pharmacokinetic interactions of antimalarial agents. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40: 343-375.

4. Daly AK. Pharmacogenetics of the cytochromes P450. *Curr Top Med Chem* 2004; 4: 1735-1744.
5. Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, Chanas B, Coulter SJ, Ghanayem BI, et al. Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 597-607.
6. Solus JF, Arietta BJ, Harris JR, Sexton DP, Steward JQ, McMunn C, et al. Genetic variation in eleven phase I drug metabolism genes in an ethnically diverse population. *Pharmacogenomics* 2004; 5: 895-931.
7. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 1271-1294.
8. Garcia-Martin E, Martinez C, Ladero JM, Gamito FJ, Agundez JA. High frequency of mutations related to impaired CYP2C9 metabolism in a Caucasian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2001; 57: 47-49.
9. Wormhoudt LW, Commandeur JN, Vermeulen NP. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1999; 29: 59-124.
10. Garsa AA, McLeod HL, Marsh S. CYP3A4 and CYP3A5 genotyping by pyrosequencing. *MC Med Genet* 2005; 6: 19. Disponible en <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1142317&blobtype=pdf> (consultado 6 de mayo de 2009).
11. Scott EE, Halpert JR. Structures of cytochrome P450 3A4. *Trends Biochem Sci* 2005; 30: 5-7.
12. Wojnowski L. Genetics of the variable expression of CYP3A in humans. *Ther Drug Monit* 2004; 26: 192-199.
13. Zhou S, Chan E, Lim LY, Boelsterli UA, Li SC, Wang J, et al. Therapeutic drugs that behave as mechanism-based inhibitors of cytochrome P450 3A4. *Curr Drug Metab* 2004; 5: 415-442.
14. Meyer UA. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 2000; 356: 1667-1671.
15. Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Nebert DW. Nomenclature files for human cytochrome P450 alleles. Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. Disponible en: <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/> (consultado el 22 de abril de 2009).
16. dsi-iniv-paris5. dsi.iniv-paris5. Geneatlas: gene database. Disponible en <http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/fiche.php?symbol=CYP3A4> (consultado el 22 de abril de 2009).
17. KI-IMM. Karolinska Institutet (KI), Institutet för miljömedicin (IMM). CYP3A4 allele nomenclature. Disponible en: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a4.htm> (consultado el 22 de abril de 2009).
18. Williams JA, Hurst SI, Bauman J, Jones BC, Hyland R, Gibbs JP, et al. Reaction phenotyping in drug discovery: moving forward with confidence? *Curr Drug Metab* 2003; 4: 527-534.
19. Li XQ, Bjorkman A, Andersson TB, Ridderstrom M, Masimirembwa CM. Amodiaquine clearance and its metabolism to N-desethylamodiaquine is mediated by CYP2C8: a new high affinity and turnover enzyme-specific probe substrate. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 399-407.
20. Walter-Sack I, Klotz U. Influence of diet and nutritional status on drug metabolism. *Clin Pharmacokinet* 1996; 31: 47-67.
21. Murray M, Sefton RM, Croft KD, Butler AM. Differential regulation of endobiotic-oxidizing cytochromes P450 in vitamin A-deficient male rat liver. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 1487-1497.
22. Pascoe GA, Sakai-Wong J, Soliven E, Correia MA. Regulation of intestinal cytochrome P-450 and heme by dietary nutrients. Critical role of selenium. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 3027-3035.
23. Pascoe GA, Correia MA. Structural and functional assembly of rat intestinal cytochrome P-450 isozymes. Effects of dietary iron and selenium. *Biochem Pharmacol* 1985; 34: 599-608.
24. Koski KG, Scott ME. Gastrointestinal nematodes, nutrition and immunity: breaking the negative spiral. *Annu Rev Nutr* 2001; 21: 297-321.
25. Blair S, Álvarez G, Villa A, Carmona-Fonseca J, Ríos L. Estado nutricional y niveles de inmunoglobulinas y citoquinas en niños con malaria. *Anales de Pediatría (España)* 2003; 58: 418-424.
26. Blair S, Carmona J, Correa A. Malaria en niños: relación entre nutrición e inmunidad. *Rev Panam Salud Publica* 2002; 11: 5-14.
27. Carmona-Fonseca J. Malaria, desnutrición y parasitosis intestinal en los niños colombianos: interrelaciones. *Iatreia* 2004; 17: 354-369.
28. Blair S, Carmona-Fonseca J, Piñeros JG, Ríos A, Álvarez T, Álvarez G, et al. Therapeutic efficacy test in malaria falciparum in Antioquia, Colombia. *Malaria Journal* 2006; 5 (14) (revista en línea). <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=16504002>
29. WHO. World Health Organization. Antimalarial drug combination therapy. WHO/CDS/RBM/2001.35. Geneva: WHO; 2001. p. 14-15.

30. WHO. World Health Organization WHO. Guidelines for the treatment of malaria. WHO/HTM/MAL/2006.1108. Geneva: WHO; 2006.
31. Benet L, Kroetz D, Sheiner L. Dinámica de la absorción, distribución y eliminación de los fármacos. En: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. Las bases farmacológicas de la terapéutica, de Goodman y Gilman. México: McGraw-Hill Interamericana; 2003. p. 3-19.
32. Fontaine F, de Sousa G, Burcham PC, Duchene P, Rahmani R. Role of cytochrome P450 3A in the metabolism of mefloquine in human and animal hepatocytes. *Life Sci* 2000; 66: 2193-2212.
33. Lu AH, Shu Y, Huang SL, Wang W, Ou-Yang DS, Zhou HH. In vitro proguanil activation to cycloguanil is mediated by CYP2C19 and CYP3A4 in adult Chinese liver microsomes. *Acta Pharmacol Sin* 2000; 21: 747-752.
34. Li XQ, Bjorkman A, Andersson TB, Gustafsson LL, Masimirembwa C, M. Identification of human cytochrome P(450)s that metabolise anti-parasitic drugs and predictions of in vivo drug hepatic clearance from in vitro data. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59: 429-442.
35. OMS-OPS. Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud. Evaluación de la eficacia terapéutica de los medicamentos para el tratamiento del paludismo por *Plasmodium falciparum* sin complicaciones en las Américas. OPS/HCP/HCT/113/98. Washington: OPS; 1998.
36. Carmona-Fonseca J, Tobón A, Álvarez G, Blair S. El tratamiento amodiaquina-sulfadoxina-pirimetamina tiene eficacia del 98% para la malaria falciparum no complicada (Antioquia, Colombia; 2003). *Iatreia* 2005; 18: 5-27.
37. Carmona-Fonseca J. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica. Parte 1. *Iatreia* 2003; 16: 299-318.
38. Carmona-Fonseca J. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica. Parte 2. *Iatreia* 2004; 17: 34-53.
39. Guenzi A, Cappelletti G, Scala A, Zanetti M. Simultaneous determination of pyrimethamine and mefloquine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr* 1989; 494: 219-230.
40. Márquez D, Pabón A, Blair S, López CA, Morales G. Desarrollo de un método de análisis para la determinación de mefloquina en sangre humana secada sobre papel de filtro por cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta. *Vitae (Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia)* 2004; 11: 62-66.
41. Singh B, Cox-Singh J, Miller AO, Abdullah MS, Snounou G, Rahman HA. Detection of malaria in Malaysia by nested polymerase chain reaction amplification of dried blood spots on filter papers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 519-521.
42. Guzmán-Pérez V. Respuesta terapéutica a la mefloquina y la amodiaquina según el CYP450 y el estado nutricional de pacientes con malaria falciparum. Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas, área Microbiología y Parasitología. Medellín: Corporación Ciencias Básicas Biomédicas, Grupo Malaria; Universidad de Antioquia; 2005.
43. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.
44. Restrepo CM. Estado nutricional y crecimiento físico. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia; 2000.
45. Castro L, Nicholls RS. Deficiencia de hierro, vitamina A y prevalencia de parasitismo intestinal en la población infantil y anemia nutricional en mujeres de edad fértil, Colombia 1995-1996. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 1998.
46. Ducharme J, Abdullah S, Wainer IW. Dextromethorphan as an in vivo probe for the simultaneous determination of CYP2D6 and CYP3A activity. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 678: 113-128.
47. Gorski JC, Jones DR, Wrighton SA, Hall SD. Characterization of dextromethorphan N-demethylation by human liver microsomes. Contribution of the cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily. *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 173-182.
48. Jacqz-Aigrain E, Funck-Brentano C, Cresteil T. CYP2D6- and CYP3A-dependent metabolism of dextromethorphan in humans. *Pharmacogenetics* 1993; 3: 197-204.
49. Jones DR, Gorski JC, Hamman MA, Hall SD. Quantification of dextromethorphan and metabolites: a dual phenotypic marker for cytochrome P450 3A4/5 and 2D6 activity. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 678: 105-111.
50. Jones DR, Haehner BD, O'Mara EMJ, Hall SD. Determination of cytochrome P450 3A4/5 activity in vivo with dextromethorphan N-demethylation. *Clin Pharmacol Ther* 1996; 60: 374-384.

51. Schmider J, Greenblatt DJ, Fogelman SM, von Moltke LL, Shader RI. Metabolism of dextromethorphan in vitro: involvement of cytochromes P450 2D6 and 3A3/4, with a possible role of 2E1. *Biopharm Drug Dispos* 1997; 18: 227-240.
52. Yu A, Haining RL. Comparative contribution to dextromethorphan metabolism by cytochrome P450 isoforms in vitro: can dextromethorphan be used as a dual probe for both CYP2D6 and CYP3A activities? *Drug Metab Dispos* 2001; 29: 1514-1520.
53. Agundez JA. Cytochrome P450 gene polymorphism and cancer. *Curr Drug Metab* 2004; 5: 211-224.
54. Na-Bangchang K, Bray P, Ward S. Study on the biochemical basis of mefloquine resistant *Plasmodium falciparum*. *Exp Parasitol* 2007; 117: 141-148.
55. Correa AM, Guzmán V, Carmona-Fonseca J, Blair S, Morales DM. Alimentación y malaria: una aproximación biosocial. *Invest Educ Enfermería* 2002; 20: 30-47.
56. Guzmán V, Correa AM, Carmona-Fonseca J, Blair S. Seguridad alimentaria y nutricional en un espacio de riesgo para malaria. *Arch Latinoam Nutr* 2003; 53: 227-237.
57. Sturchler D, Tanner M, Hanck A, Betschart B, Gautschi K, Weiss N, et al. A longitudinal study on relations of retinol with parasitic infections and the immune response in children of Kikwawila village, Tanzania. *Acta Trop* 1987; 44: 213-227.
58. Vecchini F, Lenoir-Viale MC, Cathelineau C, Magdalou J, Bernard BA, Shroot B. Presence of a retinoid responsive element in the promoter region of the human cytochrome P4501A1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 201: 1205-1212.
59. Das BS, Thurnham DI, Das DB. Influence of malaria on markers of iron status in children: implications for interpreting iron status in malaria-endemic communities. *Br J Nutr* 1997; 78: 751-760.
60. Price RN, Simpson JA, Nosten F, Luxemburger C, Hkirjaroen L, ter Kuile F, et al. Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 614-622.
61. Stoltzfus RJ, Chwaya HM, Albonico M, Schulze KJ, Savioli L, Tielsch JM. Serum ferritin, erythrocyte protoporphyrin and hemoglobin are valid indicators of iron status of school children in a malaria-holoendemic population. *J Nutr* 1997; 127: 293-298.
62. Price RN, Nosten F. Drug resistant falciparum malaria: clinical consequences and strategies for prevention. *Drug Resist Updat* 2001; 4: 187-196.

