

Caracterización genotípica y fenotípica CYP2C19 de población mestiza colombiana

Carlos A. Isaza M.

Médico Farmacólogo. Director del Grupo de Investigación en Farmacogenética de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Julieta Henao B.

Médica Genetista. Profesora de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira y Directora del Laboratorio de Genética Médica UTP.

José Hipólito Isaza M.

Doctor en Ciencias (Química). Profesor de la Escuela de Tecnología Química de la Universidad Tecnológica de Pereira. Director del Grupo Polifenoles UTP, de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Juan Carlos Sepúlveda A.

Médico Inmunólogo. Profesor de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Leonardo Beltrán A.

Químico Industrial. Profesional del Laboratorio de Genética Médica de la UTP.

Resumen

La isoenzima CYP2C19, que metaboliza algunos fármacos de uso frecuente, es codificada por un gen polimórfico, algunos de cuyos alelos producen enzima con actividad catalítica defectuosa o nula. Este fenómeno es el responsable de la existencia de individuos que metabolizan los fármacos sustratos de la enzima a velocidad baja (PM, poor metabolizer), intermedia (IM, intermediate metabolizer) o alta (EM, extensive metabolizer).

Las mutaciones defectuosas de la enzima y las frecuencias con que ellas se presentan varían entre los diferentes grupos étnicos; sin embargo, el polimorfismo del gen CYP2C19 no ha sido estudiado en mestizo suramericano, de modo que desconocemos no sólo las mutaciones prevalentes del gen, sino los porcentajes de personas de este grupo étnico cuyo metabolismo es lento, intermedio o rápido y, por lo mismo, carecemos de información acerca de las dosis de los fármacos sustratos de la CYP2C19 que más se ajustan al perfil farmacogenético del mestizo suramericano.

*En este estudio se determinaron las frecuencias del alelo nativo CYP2C19*1 y de las mutaciones *2, *3, *4, *5, *6 y *8 en una muestra de 189 adultos colombianos de rasgos fenotípicos mestizos, de ambos sexos, no consanguíneos y clínicamente sanos y se confirmaron los fenotipos EM, IM y PM para la enzima CYP2C19 en un subgrupo de 44 personas seleccionadas entre las previamente genotipificadas. Para el estudio de los diferentes alelos se empleó la técnica de mini-secuenciación con ABI Prism SNaPshot Multiplex System; la fenotipificación se realizó por HPLC, usando omeprazol como fármaco de prueba de actividad de la enzima in vivo.*

*Se encontró 83,6% de portadores de los dos alelos nativos (fenotipo EM, metabolizador rápido), 15,3% de heterocigotos para un alelo no funcional (fenotipo IM, metabolizador intermedio) y dos personas (1,1%) portadoras de los dos alelos no funcionales (fenotipo PM, metabolizador pobre). El equilibrio de Hardy-Weinberg se confirmó para la distribución genotípica CYP2C19. La variante *2 fue la única identificada entre las mutadas, pues los alelos *3, *4, *5, *6 y *8 no se hallaron en el grupo de estudio. No se encontraron discrepancias entre el genotipo y el fenotipo CYP2C19. La frecuencia de individuos PM entre los mestizos colombianos incluidos en este estudio es similar a la reportada entre mestizos bolivianos (1%), pero menor que la reportada entre mexicano-americanos (3,2%), caucásicos (5%) y afroamericanos (5,4%), lo cual permite suponer que también existan ligeras diferencias en las respuestas farmacogenéticas relacionadas con el metabolismo de los medicamentos que son sustratos de la enzima CYP2C19.*

Palabras clave: farmacogenética, genotipo CYP2C19, fenotipo CYP2C19, polimorfismo genético, omeprazol, hidroxiomeprazol.

Abstract

The isoenzyme CYP2C19 metabolizes some drugs of frequent use. It is encoded by a polymorphic gene and some of its alleles produce enzyme with defective or absent catalytic activity. This phenomenon is the responsible for the existence of individuals that metabolize the drugs substrates of the enzyme at slow (PM, poor metabolizer), intermediate (IM, intermediate metabolizer) or fast (EM, extensive metabolizer) rates.

The defective mutations of the enzyme and their frequencies changes between the different ethnic groups; however, the polymorphism of the CYP2C19 gene has not been studied in South American mestizo, leading to a lack of information concerning the prevalent mutations and the percentage of slow, intermediate or fast metabolizers, as well as, the doses of drugs substrates for CYP2C19 that better fit to the pharmacogenetic profile of the South American mestizo.

This study was aimed to determine the frequencies of the wild-type allele CYP2C19*1 and the variants *2, *3, *4, *5, *6 and *8 in a sample of 189 Colombian

mestizos, adults, of both gender, unrelated and clinically healthy, as well as to confirm the EM, IM and PM phenotypes for the enzyme CYP2C19 in a sub-group of 44 people previously genotyped. For the study of the different alleles the minisequencing Multiplex SnaPshot technique was used; the phenotyping was carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC), using the omeprazole as probe drug for the CYP2C19 activity in vivo.

It was found 83,6% carriers of the two wild-type alleles (phenotype EM, extensive metabolizer), 15,3% of heterozygous for one nonfunctional allele (phenotype IM, intermediate metabolizer) and two (1,1%) carriers of both nonfunctional alleles (phenotype PM, poor metabolizer). The Hardy-Weinberg equilibrium was confirmed for the CYP2C19 frequencies.

The nonfunctional variant *2 was the only identified, whereas the alleles *3, *4, *5, *6 and *8 were not found. No discrepancies were found between the genotype and the phenotype CYP2C19. The frequency of poor metabolizers in the Colombian mestizos included in this study is similar to the reported between bolivian mestizos (1%), but lower than that of Mexican-Americans (3,2%), Caucasians (5%) and African Americans (5,4%), which allows to suppose that also the pharmacogenetic responses related to the metabolism of the drugs that are substrates of enzyme CYP2C19 are slightly different.

Key words: genetic polymorphism, genotype CYP2C19, phenotype CYP2C19, pharmacogenetics, omeprazole, hydroxyomeprazole.

Recibido para publicación: 23-06-2006

Aceptado para publicación: 12-10-2006

Introducción

El citocromo P-450 2C19 (CYP2C19), un miembro de la superfamilia de enzimas xenobióticas del citocromo P-450, es responsable del metabolismo de fármacos de uso frecuente, tales como inhibidores de la bomba de protones (omeprazol, lanzoprazol, pantoprazol), antidepresivos (citalopram, imipramina), benzodiazepinas (diazepam, flunitrazepam), propranolol y proguanil (1-3).

El gen CYP2C19 es polimórfico, con una serie de SNPs (single nucleotide polymorphisms) que codifican enzimas con actividad catalítica nula o mínima hacia sus sustratos (tabla 1). Dicho polimorfismo divide las poblaciones en tres subgrupos fenotípicos: homocigotos metabolizadores rápidos (EM), heterocigotos metabolizadores intermedios (IM) y metabolizadores lentos (PM), lo que significa que la deficiencia enzimática se hereda como un rasgo autosómico recesivo (4).

Las frecuencias alélicas y fenotípicas varían entre los diferentes grupos étnicos. Así, entre orientales los alelos defectuosos *2 y *3 son responsables de más del 99% de los individuos PMs, los cuales corresponden al 13-23% de la población (5), mientras en caucásicos, en quienes el porcentaje de PMs está cercano al 5% de la población, sólo el alelo *2 es común, aunque también se encuentran las otras variantes descritas en la tabla 1 (6-9). En población negra se han hallado algunas mutaciones nuevas (*9, *10, *12) y el promedio global de individuos PMs es del 5,4% (10,11).

Las consecuencias clínicas del polimorfismo del gen CYP2C19 no se han dilucidado completamente, pero pueden ilustrarse con el caso de los medicamentos inhibidores de la bomba de protones (omeprazol, lanzoprazol y pantoprazol). Las personas pertenecientes al fenotipo EM metabolizan estos fármacos

a una velocidad tal que requieren dosis hasta cuatro veces mayores que los individuos con fenotipo PM, para alcanzar concentraciones séricas y efectos similares del fármaco (12,13). En los grupos étnicos donde ha sido estudiada la relación entre la actividad CYP2C19 y la efectividad de los agentes inhibidores de la bomba de protones, se ha encontrado que esta es una de las razones por las cuales los individuos EM tienen tasas de respuesta menores que los PM a los esquemas convencionales que incluyen agentes inhibidores de la bomba de protones, para el tratamiento de la enfermedad por reflujo gastroesofágico o de la enfermedad ácido-péptica (14-19). Debe advertirse, sin embargo, que la resistencia del *H. pylori* a los antimicrobianos es una causa importante del fracaso terapéutico, y que factores no genéticos, como edad, enfermedades hepáticas, inhibición o inducción enzimática, también modulan la actividad de la enzima CYP2C19 (3, 20, 21).

No existen estudios genotípicos o fenotípicos CYP2C19 en muchas poblaciones, entre ellas la mestiza suramericana (22, 23). Ya que entre los diferentes grupos étnicos varían tanto las frecuencias de los fenotipos como los tipos de mutaciones, nuestra caracterización genotípica y fenotípica CYP2C19 dará información útil para el empleo de fármacos sustratos de esta enzima a dosis más acordes con el propio perfil farmacogenético. Adicionalmente, con esta clase de investigaciones se abre la posibilidad de identificar alelos nuevos, en la medida que se encuentren no concordancias entre genotipo y fenotipo, en cuyo caso cabe suponer la existencia de mutaciones nuevas, no descritas en otros grupos étnicos.

En este estudio se determinaron las frecuencias del alelo nativo (CYP2C19*1) y de las mutaciones *2, *3, *4, *5, *6 y *8, y se confirmaron los fenotipos EM, IM y PM en un subgrupo de las personas genotipificadas.

Tabla 1. Principales alelos mutantes del gen CYP2C19 asociados con el fenotipo IM (intermediate metabolizer) y PM (poor metabolizer).

ALELO	DESCRIPCIÓN	EFEECTO
CYP2C19*2	G ₆₈₁ A en el exón 5	Defecto splicing
CYP2C19*3	G ₆₃₆ A en el exón 4	Codón de terminación prematuro, proteína truncada
CYP2C19*4	A ₁ G en el exón 1	Met,Val, se bloquea la traducción de la proteína
CYP2C19*5	C ₁₂₉₇ T en el exón 9	Arg ₄₃₃ Trp, incapacidad de la apoproteína para incorporar el grupo hemo.
CYP2C19*6	G ₃₉₅ A en el exón 3	Arg ₁₃₂ Gln, enzima inactiva.
CYP2C19*8	T ₃₅₈ C en el exón 3	Trp ₁₂₀ Arg, enzima inactiva.

Materiales y métodos

Individuos. Para la identificación de los polimorfismos del gen CYP2C19 se incluyeron 189 voluntarios adultos, de rasgos fenotípicos mestizos, de ambos sexos, no consanguíneos entre sí y clínicamente sanos. El subgrupo de voluntarios que aceptaron participar en el test de fenotipificación (n=44) requerían además no tener historia de alergia al omeprazol, abuso de alcohol, adicción a drogas o tabaquismo de más de 15 cigarrillos/día y no haber consumido medicamentos por lo menos la semana previa y durante la realización de la prueba (24). Cada participante fue informado sobre el proyecto y firmó su respectivo consentimiento informado. Este protocolo fue aprobado por el Comité de Ética Médica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UTP, en la categoría de investigación con riesgo mínimo, según el artículo 11 del literal b de la resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

Genotipificación. En la genotipificación se aplicó la técnica de mini-secuenciación o “ddNTP primer extension” (25). Las referencias sobre las localizaciones de los nucleótidos están basadas en la secuencia del gen CYP2C19 obtenida de la base de datos GenBank, número de acceso AY796203.

Previa extracción del DNA genómico de células obtenidas por escobillado bucal, utilizando el método de extracción desde tarjetas FTA (26), se procedió a la amplificación de 5 fragmentos del gen CYP2C19 correspondientes a los exones 1 (410 bp), 2-3 (719 bp), 4 (310 bp), 5 (410 bp) y 9 (529 bp), en los cuales quedan incluidos los SNPs a ser estudiados.

La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl con 100-200 ng de DNA genómico, 1x de buffer PCR, dNTPs 0,2 mM, 0,4 µM de cada uno de los primers usados por Morita et al (27), MgCl₂ 2,5 mM y 0,8 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Brazil). La amplificación se realizó en un termociclador automático (DNA Thermal Cycler PBX2, Thermo Electrón Corporation) con los siguientes parámetros: un paso inicial de desnaturalización por 5 min a 94°C, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 min, 57°C por 1 min, 72°C por 1 min, con una extensión final a 72°C por 5 min.

Los productos PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron en el lector de geles GelDoc. Las bandas cortadas se purificaron con el Kit GFX Purification (Amersham Pharmacia Biotech). Usando este producto amplificado como plantilla, se efectuaron las reacciones de multiplex en un solo tubo para la detección de la forma nativa del

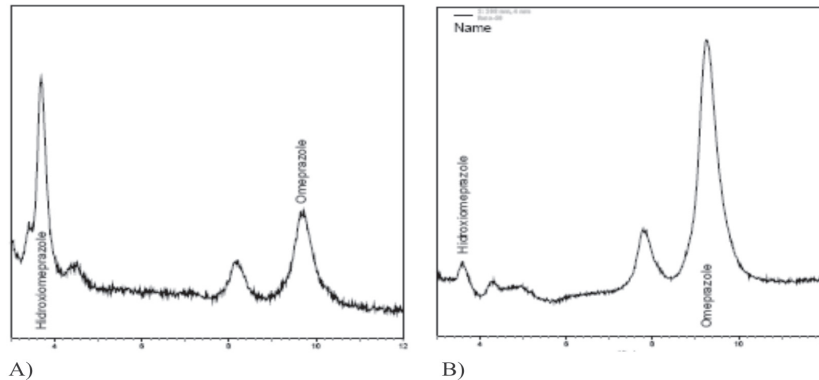
gen y de las mutaciones *2, *3, *4, *5, *6 y *8.

La mini-secuenciación se realizó con el kit ABI Prism SNaPshot ddNTP Primer Extension (PE Applied Biosystems), con base en el método propuesto por Bender K et al (25). Las reacciones de extensión ddNTP de los primers se realizaron en un volumen total de 10 µl conteniendo 0,01 a 0,4 pmol/µl del amplicón, 0,15 pmol/µl de cada uno de los primers y 5 µl de la mezcla de reacción SNaPshot que contiene Amplitaq DNA polimerasa FS y los dye-terminator marcados. La amplificación se hizo durante 25 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 96°C por 10 s, anillaje a 50°C por 5 s y extensión a 60°C por 30 s. Los productos resultantes se inyectaron electroquinéticamente por 5 s a 15 kV y se sometieron a electroforesis por 24 min a 15 kV, 9 µA y 60°C en un capilar de 36 cm de longitud, usando el POP4 (performance optimum polymer 4) con el láser a potencia constante de 9,9 mW. Los datos se analizaron por el color de los picos y el tamaño de los fragmentos, mediante el software Genemapper Analysis (PE Applied Biosystems).

Con el propósito de verificar las mutaciones encontradas e identificar alteraciones adicionales del gen CYP2C19, se tomaron como plantillas para secuenciación de los productos amplificados de los exones 1, 2-3, 4, 5 y 9. Las secuenciaciones se realizaron en el equipo secuenciador de DNA ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Fenotipificación. Se calculó el índice de hidroxilación del omeprazol (HI) en 44 sujetos previamente genotipificados (39, 3 y 2 personas portadoras, respectivamente, de los genotipos *1/*1, *1/*2 y *2/*2) 3 horas después de la administración oral de 20 mg de omeprazol. Ninguno de los voluntarios reportó efectos indeseables con el medicamento. El plasma fue separado y almacenado a -20°C hasta el momento de su análisis. Las concentraciones séricas de omeprazol y 5-hidroxiomeprazol fueron cuantificadas, por HPLC mediante un método previamente descrito (28) con ligeras modificaciones (figura 1). Se utilizó un HPLC System 2000 Plus marca JASCO equipado con una bomba de gradiente cuaternario, automuestreador, horno para columnas, detector de arreglo de diodos MD 2015 controlado por EZChrom Elite ver 3,16. Se utilizó una columna analítica Ultraaqueous RP-18 Restek (100 mm largo x 3,2 mm diámetro interno x 2 µm tamaño de partícula) con precolumna del mismo material. El sistema de elusión fue isocrático con una mezcla de buffer fosfato 0,05 M, pH 7,2, acetonitrilo en proporción 70:30 a 0,5 mL/min. El

Figura 1. Cromatogramas de (A) un voluntario EM (extensive metabolizer), (B) un voluntario PM (poor metabolizer).



detector se programó en el rango 240-330 nm y la cuantificación se realizó a 298 nm. La preparación de los estándares se realizó adicionando omeprazole (Sigma) e hidroximeprazole (SynFine Research) a plasma humano para obtener concentraciones de 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 3,0 y 5,0 µg/mL. Los estándares y las muestras se extrajeron en fase sólida en cartuchos RP-18, 500 mg (Merck), previamente activados con acetonitrilo (3 mL) seguido de bufer fosfato 0,05 M, pH 7,2 (3 mL x 3). Se aplicaron 2 mL de cada estándar o muestra más 1 mL de buffer y se secó por succión. El lavado se realizó con tres porciones de 0,5 mL de Buffer, secando entre lavados. Se hizo un lavado final con 0,5 mL de mezcla Buffer-Acetonitrilo (80:20) secando por succión. La elusión se realizó con dos porciones de 0,25 mL de mezcla Buffer-Acetonitrilo (10:90). Se inyectaron 25 µL de cada estándar y muestras preparadas. El omeprazole eluyó a 9,80 min y el hidroximeprazole a 3,67 min. Los individuos con tasa metabólica (MR) $[\log(\text{omeprazol}/\text{hidroximeprazol})] \geq 0.7$ (antimoda) se fenotipificaron como PM para omeprazol (21, 28, 29).

Manejo estadístico. Las frecuencias alélicas fueron calculadas a partir del número observado de cada alelo y del número de cromosomas examinados. El equilibrio de Hardy-Weinberg se estableció mediante la prueba Chi cuadrado. Para la comparación genotipo-fenotipo los individuos fueron clasificados de acuerdo con sus valores del HI y del genotipo, así: a los homocigotos para el alelo nativo se les asignó el fenotipo EM, mientras a los portadores de uno o dos alelos mutados se les asignó el fenotipo IM o PM, respectivamente. Los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS 10.0 para Window, se utilizaron intervalos de confianza del 95% y se consideraron significativos valores de $p < 0,05$.

Resultados

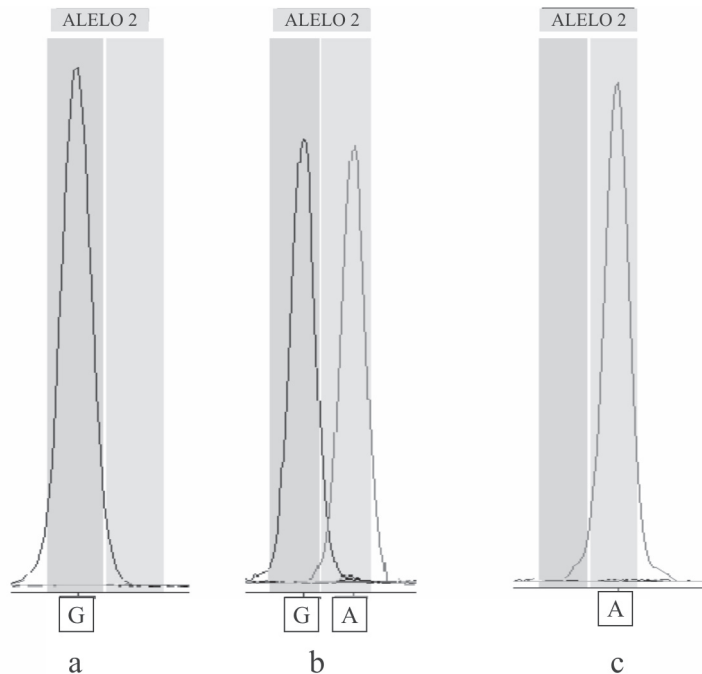
La tabla 2 muestra las distribuciones alélicas y genotípicas de los 189 mestizos estudiados (52% hombres; rango de edad: 18-56 años). El alelo nativo CYP2C19*1 es el más común (91,3%); las frecuencias

Tabla 2. Frecuencias de los alelos y genotipos CYP2C19 en mestizos colombianos (n=189).

Alelos CYP2C19	n	Frecuencia (IC 95%) ¹
*1	345	0,913 (0,89-0,94)
*2	33	0,087 (0,06-0,12)
*3	0	0,0
*4	0	0,0
*5	0	0,0
*6	0	0,0
*8	0	0,0
Genotipos CYP2C19		
*1/*1	158	0,836 (0,78-0,89)
*1/*2	29	0,153 (0,10-0,20)
*2/*2	2	0,011 (0,00-0,03)

¹: IC 95% = intervalo de confianza del 95%.

Figura 2. Electroferogramas correspondientes a los genotipos *1/*1 (a), *1/*2 (b) y *2/*2 (c) de voluntarios colombianos mestizos.



de los alelos no funcionales son: *2 = 8,7%, *3 = 0,0%, *4 = 0,0%, *5 = 0,0%, *6 = 0,0%, *8 = 0,0%. El genotipo con ambos alelos funcionales (*1/*1) fue el más prevalente, con una frecuencia del 83,6%, seguido por el genotipo heterocigoto con un alelo funcional (*1/*2=15,3%) y, por último, el genotipo no funcional correspondiente a *2/*2 (1,1%) (figura 2). A partir de esta distribución genotípica se infiere que el 83,6% de los voluntarios son metabolizadores rápidos (EM), el 15,3% son metabolizadores intermedios (IM) y el 1,1% son metabolizadores lentos (PM). Los genotipos están en equilibrio de Hardy-Weinberg (Chi=0,26; df=2; p=0,88).

Aunque los promedios de los MR de los tres genotipos son estadísticamente diferentes (tabla 3), gráficamente existe cierta superposición entre los subgrupos de individuos EM e IM (figura 3). Para los individuos previamente genotipificados como EM/IM (n=42), los MR estuvieron en el rango de -0,38 a 0,34, en tanto que los genotipificados como PM (n=2) estuvieron en el rango de 0,74 a 1,24, lo que nos permite afirmar que hubo completa concordancia entre genotipo y fenotipo entre los subgrupos EM/IM y PM.

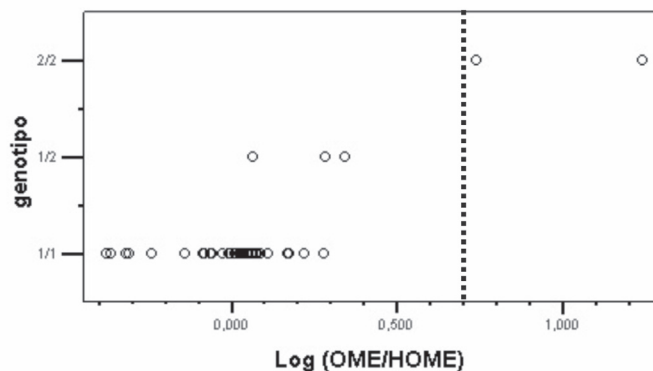
Tabla 3. Relación de los MR de 44 mestizos colombianos fenotipificados para la enzima CYP2C19.

GENOTIPO	n	MR ¹ (x±DE)	P ²
*1/*1	39	-0,01 ± 0,15	
*1/*2	3	0,23 ± 0,15	
*2/*2	2	0,99 ± 0,35	0,00

¹ MR:metabolic ratio = log [omeprazol/hidroxiomeprazol]

² ANOVA

Figura 3. Correlación entre genotipo y fenotipo CYP2C19 en 44 mestizos colombianos. La antimoda (línea punteada) separa los individuos EM/IM (genotipos *1/*1 y *1/*2) de los PM (genotipo *2/*2). Log (OME/HOME): tasa metabólica para omeprazol/hidroxiomeprazol.



Discusión

El polimorfismo de los genes que codifican enzimas metabolizadoras de fármacos es la causa principal de la variabilidad interindividual e interétnica de la respuesta a los medicamentos (30). El control genético de la actividad de la enzima CYP2C19 explica que en cualquier población los individuos se pueden categorizar como metabolizadores rápidos, intermedios o lentos de los fármacos que son sustratos de dicha enzima.

Este es el primer estudio de fenotipificación de la enzima CYP2C19 y de genotipificación de siete alelos del correspondiente gen, en el grupo étnico mestizo colombiano. El perfil genético CYP2C19 hallado en este grupo, con el alelo *2 como responsable de la mayoría de los individuos metabolizadores deficientes y la ausencia de las variantes *3, *4, *5, *6 y *8, es similar al de los mexicano-americanos (31), pero la frecuencia de PM es menor (1,1% vs 3,2%). Igualmente, la frecuencia de PM en los individuos de nuestro estudio es menor que la reportada en caucásicos (5%) (32) y en negros (5,4%) (10), con quienes también el mestizo está emparentado genéticamente (5, 6). Ya que el amerindio también hace parte del ancestro del mestizo americano, es interesante mencionar que en un estudio hecho en 96 indígenas Cuna de Panamá no se encontraron personas con fenotipo PM para la enzima CYP2C19 (33), mientras entre mestizos bolivianos (mezclas de amerindio y blanco) la prevalencia de individuos PM es de 1% (34).

Para eliminar muchas de las incertidumbres de la actual estrategia de prescripción basada en el “ensayo

y error”, la tipificación farmacogenética se vislumbra como una de las opciones terapéuticas más costo-efectiva (35), al resultar útil no solamente para prevenir efectos indeseables sino también para mejorar la eficacia, en particular de medicamentos con estrecho margen terapéutico. La concordancia genotipo-fenotipo, hallada en este estudio, nos permite afirmar que la simple genotipificación del alelo *2 tendría un alto valor predictivo del fenotipo entre mestizos. Ya que la caracterización farmacogenética permite la aplicación de una farmacoterapia más personalizada, ajustada al perfil genético del individuo, los resultados de este estudio serán útiles en la adopción de regímenes de dosificación en mestizos colombianos.

Finalmente, destacamos el hecho que para la identificación de los genotipos hemos aplicado la técnica de minisequenciación Multiplex SNaPshot (25), la cual no había sido usada en estudios del gen CYP2C19, y que dicha estrategia puede resultar más segura y costo-efectiva que las técnicas convencionales basadas en PCR alelo-específica o en RFLP (restriction fragment length polymorphism).

Agradecimientos

Esta investigación fue apoyada por COLCIENCIAS, el Centro de Investigaciones y Extensión de la Universidad Tecnológica de Pereira y el Laboratorio de Calidad de Productos Naturales de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Referencias bibliográficas

1. Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37:269-96.
2. Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41(12):913-58.
3. Yamazaki H, Inque K, Shaw PM, Checovich WJ, Guengerich FP, Shimada T. Different contributions of cytochrome P450 2C19 and 3A4 in the oxidation of omeprazole by human liver microsomes: effects of contents of these two forms in individual human samples. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283(2):434-42.
4. Brøsen K, de Morais SMF, Meyer UA, Goldstein JA. A multifamily study on the relationship between *CYP2C19* genotype and S-mephenytoin oxidation phenotype. *Pharmacogenetics* 1995; 5:312-7.
5. Garcia-Barceló M, Chow LY, Chiu HFK, Wing YK, Lee DTS, Lam KL, Waye MMY. Frequencies of defective *CYP2C19* alleles in a Hong Kong Chinese population: detection of the rare allele *CYP2C19*4*. *Clin Chem* 1999; 45(12):2273-4.
6. Ibeanu GC, Blaisdell J, Ferguson RJ, Ghanayem BI, Brosen K, Benhamou S, et al. A novel transversion in the intron 5 donor splice junction of *CYP2C19* and a sequence polymorphism in exon 3 contribute to the poor metabolizer phenotype for the anticonvulsant drug S-mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290:635-40.
7. Ferguson RJ, de Morais S, Benhamou S, Bouchardy C, Blaisdell J, Ibeanu G, Wilkinson GR, et al. A new genetic defect in human *CYP2C19*: mutation of the initiation codon is responsible for poor metabolism of S-mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284:356-61.
8. Ibeanu GC, Goldstein JA, Meyer URS, Benhamou S, Bouchardy C, Dayer P, et al. Identification of new human *CYP2C19* alleles (*CYP2C19*6* and *CYP2C19*2B*) in a Caucasian poor metabolizer of mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 288:1490-5.
9. Xiao ZS, Goldstein JA, Xie HG, Blaisdell J, Wang W, Jiang CH, et al. Differences in the incidence of the *CYP2C19* polymorphism affecting the S-mephenytoin phenotype in Chinese Han and Bai populations and identification of a new rare *CYP2C19* mutant allele. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281:604-9.
10. Xie HG, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR, Wood AJ. Genetic polymorphism of (S)-mephenytoin 4'-hydroxylation in populations of African descent. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 48(3):402-8.
11. Blaisdell J, Mohrenweiser H, Jackson J, Ferguson S, Coulter S, Chanas B, Xi T, Ghanayem B, Goldstein JA. Identification and functional characterization of new potentially defective alleles of human *CYP2C19*. *Pharmacogenetics* 2002; 12(9):703-11.
12. Furuta T, Shirai N, Xiao F, Ohashi K, Ishizaki T. Effect of high-dose lansoprazole on intragastric pH in subjects who are homozygous extensive metabolizers of cytochrome P450 2C19. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70(5):484-92.
13. Kita T, Sakaeda T, Aoyama N, Sakai T, Kawahara Y, Kasuga M, Okumura K. Optimal dose of omeprazole for *CYP2C19* extensive metabolizers in anti-*Helicobacter pylori* therapy: pharmacokinetic considerations. *Biol Pharm Bull* 2002; 25(7):923-7.
14. Sapone A, Vaira D, Trespidi S, Perna F, Gatta L, Tampieri A, Ricci C, Cantelli-Forti G, Miglioli M, Biagi GL, Paolini M. The clinical role of cytochrome p450 genotypes in *Helicobacter pylori* management. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(5):1010-5.
15. Kawamura M, Ohara S, Koike T, Iijima K, Suzuki J, Kayaba S, Noguchi K, Hamada S, Noguchi M, Shimosegawa T; Study Group of GERD. The effects of lansoprazole on erosive reflux esophagitis are influenced by *CYP2C19* polymorphism. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17(7):965-73.
16. Kawabata H, Habu Y, Tomioka H, Kutsumi H, Kobayashi M, Oyasu K, Hayakumo T, Mizuno S, Kiyota K, Nakajima M, Kimoto K, Inokuchi H, Kawai K. Effect of different proton pump inhibitors, differences in *CYP2C19* genotype and antibiotic resistance on the eradication rate of *Helicobacter pylori* infection by a 1-week regimen of proton pump inhibitor, amoxicillin and clarithromycin. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17(2):259-64.
17. Klotz U. Clinical impact of *CYP2C19*

- polymorphism on the action of proton pump inhibitors: a review of a special problem. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2006; 44(7):297-302.
18. Furuta T, Shirai N, Sugimoto M, Ohashi K, Ishizaki T. Pharmacogenomics of proton pump inhibitors. *Pharmacogenomics* 2004; 5(2):181-202.
 19. Take S, Mizuno M, Ishiki K, Nagahara Y, Yoshida T, Inaba T, Yamamoto K, Okada H, Yokota K, Oguma K, Shiratori Y. Interleukin-1beta genetic polymorphism influences the effect of cytochrome P2C19 genotype on the cure rate of 1-week triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(11):2403-8.
 20. Miki I, Aoyama N, Sakai T, Shirasaka D, Wambura CM, Maekawa S, *et al.* Impact of clarithromycin resistance and *CYP2C19* genetic polymorphism on treatment efficacy of *Helicobacter pylori* infection with lansoprazole- or rabeprazole-based triple therapy in Japan. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15:27-33.
 21. Kimura M, Ieiri I, Wada Y, Mamiya K, Urae A, Imori E, *et al.* Reliability of the omeprazole hydroxylation index for *CYP2C19* phenotyping: possible effect of age, liver disease and length of therapy. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 47(1):115-9.
 22. Gonzalez HM, Romero EM, Peregrina AA, de J Chavez T, Escobar-Islas E, Lozano F, Hoyo-Vadillo C. *CYP2C19*- and *CYP3A4*-dependent omeprazole metabolism in West Mexicans. *J Clin Pharmacol* 2003; 43(11):1211-5.
 23. Chong E, Ensom MHH. Pharmacogenetics of the proton pump inhibitors: a systematic review. *Pharmacotherapy* 2003; 23(4):460-71.
 24. Tamminga WJ, Wemer J, Oosterhuis B, Brakenhoff JP, Gerrits MG, de Zeeuw RA, *et al.* An optimized methodology for combined phenotyping and genotyping on *CYP2D6* and *CYP2C19*. *Eur J Clin Pharmacol* 2001; 57(2):143-6.
 25. Bender K. SNApshot for pharmacogenetics by minisequencing. *Methods Mol Biol* 2005; 297:243-52.
 26. Tanigawara Y, Kita T, Hirono M, Sakaeda T, Komada F, Okumura K. Identification of N-acetyltransferase 2 and *CYP2C19* genotypes for hair, buccal cell swabs, or fingernails compared with blood. *Ther Drug Monit* 2001; 23(4):341-6.
 27. Morita J, Kobayashi K, Wanibuchi A, Kimura M, Irie S, Ishizaki T, Chiba K. A novel single nucleotide polymorphism (SNP) of the *CYP2C19* gene in a Japanese subject with lowered capacity of mephobarbital 4'-hydroxylation. *Drug Metab Pharmacokinet* 2004; 19(3):236-8.
 28. Gonzalez HM, Romero EM, Chavez T de J, Peregrina AA, Quezada V, Hoyo-Vadillo C. Phenotype of *CYP2C19* and *CYP3A4* by determination of omeprazole and its two main metabolites in plasma using liquid chromatography with liquid-liquid extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 780(2):459-65.
 29. Kortunay S, Basci NE, Bozkurt A, Isimer A, Sayal A, Kayaalp SO. The hydroxylation of omeprazole correlates with S-mephenytoin and proguanil metabolism. *Eur J Clin Pharmacol* 1997; 53:261-4.
 30. Relling MV, Giacomini KM. Pharmacogenetics. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (editors). *Goodman and Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics*; 11 ed; McGraw Hill; 2006.
 31. Luo HR, Poland RE, Lin KM, Wan YJ. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C19 in Mexican Americans: a cross-ethnic comparative study. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80(1):33-40.
 32. Xie HG, Stein CM, Kim RB, Wilkinson GR, Flockhart DA, Word AJ, *et al.* Allelic, genotypic and phenotypic distributions of S-mephenytoin 4'-hydroxylase (*CYP2C19*) in helaty Caucasian populations of European descent throughout the world. *Pharmacogenetics* 1999; 9(5):39-49.
 33. Inaba T, Jorge LF, Arias TD. Mephenytoin hydroxylation in the Cuna Amerindians of Panama. *Br J Clin Pharmacol* 1988; 25(1):75-9.
 34. Bravo-Villalta HV, Yamamoto K, Nakamura K, Bayá A, Okada Y, Horiuchi R. Genetic polymorphism of *CYP2C9* and *CYP2C19* in a Bolivian population: an investigative and comparative study. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 61:179-84.
 35. Lehmann DF, Medicis JJ, Franklin PD. Polymorphisms and the pocketbook: the cost-effectiveness of cytochrome P450 2C19 genotyping in the eradication of *Helicobacter pylori* infection associated with duodenal ulcer. *J Clin Pharmacol* 2003; 43(12):1316-23.