



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**“FRECUENCIAS ALÉLICAS DE DOS
POLIMORFISMOS EN LOS GENES CBR3 Y GSTP1
EN NIÑOS TRATADOS CON DOXORUBICINA EN
EL INP”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ONCOLOGÍA MÉDICA PEDIÁTRICA

PRESENTA

DRA. MARÍA DEL PILAR CUBRÍA JUÁREZ

TUTOR: DR. OSCAR ALBERTO PÉREZ GONZÁLEZ



MEXICO D.F. OCTUBRE DEL 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

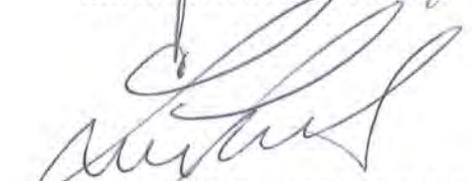
ONCOLOGIA PEDIATRICA

"FRECUENCIAS ALÉLICAS DE DOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES CBR3 Y GSTP1 EN

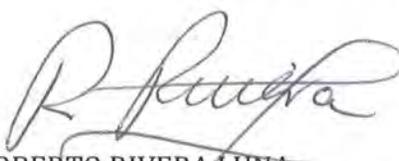
NIÑOS TRATADOS CON DOXORUBICINA EN EL INP"



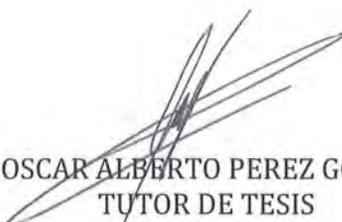
DRA. ROSAURA ROSAS VARGAS
DIRECTORA DE ENSEÑANZA



DR. LUIS MARTIN GARRIDO GARCIA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



DR. ROBERTO RIVERA LUNA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ONCOLOGIA PEDIATRICA



DR. OSCAR ALBERTO PEREZ GONZALEZ
TUTOR DE TESIS



DRA. ROCIO CARDENAS CARDOS
CO-TUTOR DE TESIS

INDICE

Resumen	5	Resultados	18
Marco de Referencia	6	Discusiones	25
<i>Bases del tratamiento antineoplásico</i>	6	Conclusión	31
<i>Antraciclinas</i>	7	Perspectivas	32
<i>Vía metabólica de doxorubicina y genes candidatos</i>	9	Bibliografía	33
Planteamiento del Problema	11	Anexos	36
Pregunta de Investigación	11	<i>Carta de Consentimiento y Asentimiento Informado</i>	36
Justificación	12		
Objetivos	12		
Clasificación de la investigación	12		
Materiales y Método	13		
Población de Estudio	13		
Criterios de Selección	13		
Descripción Operativa del Estudio	13		
<i>Reclutamiento de pacientes</i>	13		
<i>Análisis de los polimorfismos</i>	14		
Análisis estadístico e interpretación de datos	15		
Descripción de las Variables	15		
Consideraciones éticas	16		
Consideraciones de Bioseguridad	17		
Limitantes del Estudio	17		

Resumen

INTRODUCCIÓN. En el Instituto Nacional de Pediatría, diversos esquemas de tratamiento para los pacientes pediátricos con padecimientos oncológicos utilizan doxorubicina. La mayoría de las Antraciclinas entre ellas la doxorubicina, son antibióticos naturales, producto de la bacteria *Streptomyces peucetius*. La actividad antineoplásica de la doxorubicina es debida a diferentes mecanismos como la separación de las cadenas con actividad de helicasas, inhibición de la topoisomerasa II y estimulación de apoptosis. Los fármacos antineoplásicos comúnmente alcanzan más rápidamente el umbral tóxico que el efectivo, por lo que son considerados como altamente tóxicos. Los efectos secundarios derivados de los tratamientos prolongados con doxorubicina son la aparición de mielosupresión, mucositis, alopecia, náuseas, vómitos, el incremento de la pigmentación de la piel y la cardiotoxicidad, siendo este último el efecto adverso más grave. La incidencia de la cardiotoxicidad depende de la dosis acumulada de la droga, se han descrito dos distintos tipos de cardiotoxicidad inducida por doxorubicina, la aguda y la crónica. Los efectos cardiotóxicos de la doxorubicina derivan del metabolismo de estas moléculas en la formación de radicales libres en reacciones mediadas por enzimas como la carbonil reductasa (CBR3) y la glutatión s- transferasa pi (GSTP1). La producción de radicales libres no contribuye significativamente en la citotoxicidad de las Antraciclinas en las células tumorales pero sí de las células cardíacas, células que son metabólicamente muy activas. **OBJETIVO.** Describir la frecuencia alélica de dos polimorfismos en los genes CBR3 y GSTP1 en niños tratados con doxorubicina en el INP. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Se incluirán en este estudio pacientes atendidos en el servicio de oncología pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría que cumplan con los criterios de inclusión, a los cuales después se tomará una muestra de sangre de la cual se extraerá DNA y se analizará mediante PCR-RFLP los polimorfismos en los genes CBR y GSTP1 de interés por tener potencial asociación con cardiotoxicidad.

Marco de Referencia

Bases del tratamiento antineoplásico

Los padecimientos oncológicos en la edad pediátrica constituyen la segunda causa de mortalidad en los países industrializados ^(1,2). En la República Mexicana se estima que la incidencia del cáncer infantil (0 a 18 años de edad) es de 120 nuevos casos por millón de habitantes por año ⁽²⁾.

Los protocolos actuales de tratamiento antineoplásico contemplan la administración de fármacos en dosis estándares y continuas durante el curso del mismo. Estas dosis estándar son prescritas sin considerar los factores del paciente que pudieran condicionar la variabilidad individual en farmacocinética y farmacodinamia de los medicamentos utilizados ⁽²⁾. Los fármacos antineoplásicos comúnmente alcanzan más rápidamente el umbral tóxico que el efectivo, por lo que son considerados como de alta toxicidad. La elección de un fármaco se ha basado casi siempre en la medición de los efectos tóxicos y en los estudios de farmacología clínica que comprenden los efectos sobre los tejidos, metabolismo y tasa de eliminación del fármaco, así como de la evaluación del grado de respuesta biológica. Cada acción constituye una indicación de la actividad del fármaco en el tejido afectado y por tanto se define como una actividad farmacodinámica. A este nivel por lo regular la relación entre la farmacodinamia y la utilización del medicamento se expresa como la relación entre toxicidad y dosis del medicamento proporcionado. La toxicidad asociada a un fármaco puede ser: inmediata que se presenta durante la ministración del medicamento; temprana, presentándose en horas a días; retrasada, en semanas a meses; y tardía, cuyas repercusiones son evidentes años después de haberse administrado. Entonces la toxicidad asociada a un fármaco puede ocasionar desde efectos mínimos en el huésped hasta disfunciones graves ^(3,4).

La mayor parte de los fármacos sufre un proceso de biotransformación, más frecuentemente en los hepatocitos. De forma clásica, el proceso consta de una o dos etapas, donde ciertas enzimas transforman las moléculas lipófilas del fármaco en un metabolito hidrosoluble, que habitualmente representa la forma activa del fármaco. Estos metabolitos activos posteriormente se inactivan para ser eliminados del organismo.

Se ha descrito tres fenotipos diferentes de respuesta a los fármacos⁽⁴⁾

- Metabolizadores rápidos, que representan la población 'normal';
- Metabolizadores lentos, que muestran poca o nula capacidad de metabolización de un fármaco;
- Metabolizadores ultrarrápidos, que metabolizan un fármaco mucho más deprisa que la población 'normal'.

Tanto los metabolizadores lentos como los ultrarrápidos muestran concentraciones plasmáticas anormales del fármaco y sus metabolitos. Los que no son capaces de metabolizarlos pueden acumular el fármaco o sus metabolitos activos en concentraciones elevadamente tóxicas. Los metabolizadores ultrarrápidos no suelen mostrar respuesta clínica en absoluto debido a su tendencia a eliminar los fármacos del organismo antes de que puedan hacer efecto. Los análisis bioquímicos permiten examinar el fenotipo del paciente. Pero estas pruebas, que determinan la tasa de metabolismo de un fármaco, son complicadas y con frecuencia no se puede determinar contundentemente el riesgo de presentar reacciones adversas asociadas al fármaco ⁽⁵⁾.

La actividad propia de las enzimas involucradas en rutas metabólicas específicas está determinada por su conformación estructural, la cual depende de la secuencia genética que la codifique. Pequeñas variantes o mutaciones en la secuencia del gen pueden producir modificaciones en la estructura y actividad de estas enzimas. Las variables más frecuentes se han denominado polimorfismos de un solo nucleótido (del inglés, Single Nucleotide Polymorphisms) ⁽⁶⁾.

Antraciclinas

Las antraciclinas constituyen uno de los grupos de fármacos antineoplásicos con mayor espectro de actividad en cánceres humanos, al cual pertenece la doxorubicina ^(7,8).

La doxorubicina es un antibiótico natural, producto de la fermentación de la bacteria *Streptomyces peucetius*, aunque existen otras antraciclinas que son productos semisintéticos que se obtienen modificando partes de la molécula después de la síntesis microbiana ^(9,10). En la quimioterapia actual para el cáncer, la más utilizada es la doxorubicina ⁽¹⁰⁾.

La actividad antitumoral de las antraciclinas es debida a diferentes mecanismos: 1) por interacción con el DNA, inhibe la transcripción, la acción de las helicasas y produce uniones cruzadas entre las cadenas; 2) generación de radicales libres que producen daño del DNA y peroxidación de lípidos; 3) inhibe la topoisomerasa II induciendo apoptosis ^(8,11,12). Se han descrito otros mecanismos de acción, independientes de la unión directa de las Antraciclinas al DNA. Estos compuestos parecen estar implicados en la formación de radicales libres, peroxidación lipídica y efectos directos sobre la membrana plasmática, mecanismos que pudieran ser responsables, en parte, de los efectos secundarios derivados de tratamientos extensos con antraciclinas ^(9,11).

El principal mecanismo de daño tisular es la producción excesiva de radicales libres. Además de ser inespecífico, produce daño celular a través de la peroxidación de los lípidos de la membrana y las mitocondrias ^(8,9,10). El miocardio es particularmente vulnerable al daño producido por los radicales libres debido a los niveles bajos de antioxidantes como catalasa y superóxido dismutasa que tiene el miocito en comparación con otros tejidos. Las antraciclinas contienen una quinona, la cual es transformada por una reacción de oxido-reducción a una semiquinona, que es un radical libre durante el metabolismo celular ^(8,9,13).

Como efecto del daño miocárdico producido por radicales libres de oxígeno se presentan distintos fenotipos de alteración miocárdica, como miocardiopatía dilatada y miocarditis aguda, que conllevan a insuficiencia cardiaca congestiva. La temporalidad de presentación de la insuficiencia cardiaca es muy variable, siendo en algunos casos durante el tratamiento, es decir antes de completar la dosis acumulada máxima, o inclusive años más tarde ⁽¹³⁾. Los daños miocárdicos encontrados en la cardiomiopatía inducida por antraciclinas incluyen pérdida de miofibrillas, dilatación del retículo sarcoplásmico, vacuolización del citoplasma, inflamación de las mitocondrias e incremento en el número de los lisosomas, lo anterior es evidencia postmortem en la mayor parte de los casos. La severidad de los daños morfológicos es la cardiomiopatía y la insuficiencia cardiaca congestiva inducida por doxorubicina han probado ser dosis dependiente y su incidencia aumenta significativamente cuando se excede la

dosis acumulada de 500mg por metro cuadrado de superficie corporal. Se ha reportado una incidencia de insuficiencia cardiaca congestiva en 4% con dosis acumulada ente 500-550mg por metro cuadrado de superficie corporal, que aumenta significativamente al 34% con dosis acumulada de 600mg por metro cuadrado de superficie corporal (10,13)

Además de la dosis acumulada mayor a 500mg por metro cuadrado de superficie corporal, se han reportado otros factores asociados a un incremento en el riesgo para desarrollar insuficiencia cardiaca congestiva en pacientes tratados con doxorubicina, entre ellos se reporta el uso de radioterapia mediastinal concomitante y en la literatura se menciona la edad menor de 5 años (14) sin tener un peso estadístico significativo.

Se ha descrito dos distintos tipos de cardiotoxicidad inducida por antraciclinas (CIA). La CIA aguda que ocurre durante el tratamiento, frecuentemente inmediatamente después de la primera dosis y se manifiesta predominantemente en la forma de arritmias y raramente también como pericarditis-miocarditis o falla ventricular izquierda aguda (15). La CIA crónica se presenta con 1 año después de la administración de antraciclinas como falla cardiaca congestiva. Además, recientes estudios postularon un distinto comienzo tardío de cardiotoxicidad, los cuales desarrollaron muchos años después (15,16).

Además de la cardiotoxicidad, se han reportado distintos tipos de efectos adversos relacionados a antraciclinas, entre ellos destacan como los más frecuentes mielosupresión, náuseas y vómitos (16,17)

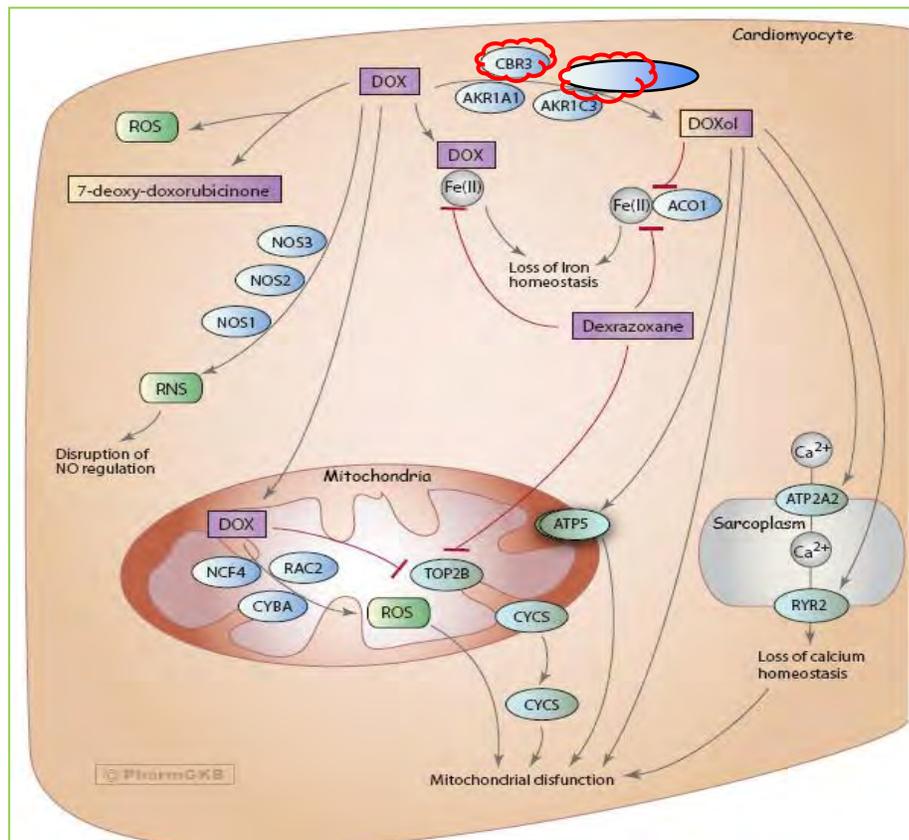
Tabla 1. Tipos de toxicidad relacionada a doxorubicina.

Toxicidad	Doxorubicina
>10%:	
Cardiovascular	Anormalidades en electrocardiograma (Taquicardia supraventricular, cambios del segmento S-T, extrasistole ventricular o arterial). Falla cardiaca congestiva
Gastrointestinal	Nauseas, vómito, estomatitis, ulceración GI, anorexia, diarrea. Mielosupresión, leucopenia (75%), trombocitopenia y anemia
Hematológica	
<1%	
Cardiovascular	Pericarditis, miocarditis, infección miocárdica
Dermatológico	Rash en piel, pigmentación en uñas, urticaria.
Endocrino y metabólico	Infertilidad, esterilidad
Hepático	Elevación de bilirrubinas y transaminasas, hepatitis.

Vía metabólica de doxorubicina y genes candidatos

Los efectos cardiotoxicos de la doxorubicina derivan del metabolismo de esta molécula. El anillo C de la quinona tiene un alto potencial reactivo ^(9,18) puede actuar como aceptor de uno o dos electrones en reacciones mediadas por las enzimas citocromo p450 reductasa, nicotinamida adenina dinucleotido (NADH) deshidrogenasa y xantina oxidasa, además de reducirse para formar el radical libre semiquinona o deoxiglicona. La semiquinona puede interactuar con moléculas de oxígeno y participar en procesos de transferencia de electrones, contribuyendo así con la formación de nuevos radicales libres como radicales superóxido, radicales hidroxilo o radicales peróxido ^(9,18). Los procesos de formación de radicales libres pueden inhibirse por acción de las enzimas celulares superóxido dismutasa (SOD), catalasa, o glutatión peroxidasa (GSH PX)⁽¹¹⁾. Los radicales libres que se generan durante el metabolismo de las Antraciclinas provocan lesiones en el DNA, inhiben la fosforilación oxidativa e inducen peroxidación lipídica en las membranas plasmáticas de las células ^(8,9). La producción de radicales libres no contribuye significativamente en la citotoxicidad de la doxorubicina en las células tumorales pero sí de las células cardiacas, que son metabólicamente muy activas ^(8,9,18).

Figura 1. Genes candidatos en la vía de metabolismo de la doxorubicina.



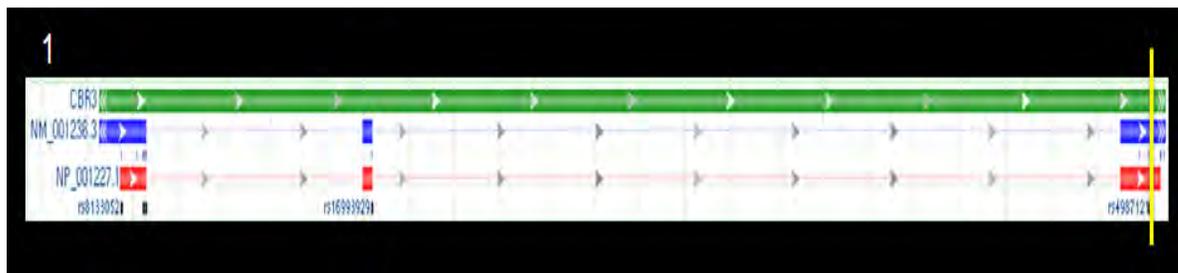
Thorn, 2010.

Una de las principales enzimas que juegan un papel importante en el metabolismo de la doxorubicina es la Carbonil Reductasa 3 (CBR3 o NADP). El gen que codifica para esta proteína está localizado en el cromosoma 21q22.2 y contiene 3 exones que abarcan 11.2 kilobases ⁽¹⁹⁾. La enzima es clasificada como un monómero oxidoreductasa dependiente de Nicotinamida-Adenina Dinucleotido fosfato (NADPH) ⁽²⁰⁾.

Recientemente, se ha reportado un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, del inglés *Single Nucleotide Polimorphism*) en el gen CBR3 ⁽²¹⁾, localizado en el exon 3. Este SNP cambia una Guanina por una Adenina en la posición 13444. Este SNP tiene un efecto no sinónimo, es decir que condiciona un cambio en secuencia de la proteína en la Valina (V) de la porción 244 por una Metionina (M). La variante alélica A, considerada como el alelo mutado, se ha asociado con un riesgo mayor para presentar cardiotoxicidad después del tratamiento con doxorubicina. Para el genotipo AA se reporta un riesgo de 9.2 veces más que el genotipo GG ($p=0.06$) y 3 veces más que el genotipo GA ⁽²¹⁾.

Se han realizado estudios con bases en resultados poblacionales de la diversidad del genoma humano, para las poblaciones incluidas en el proyecto Hap-Map el genotipo A es de 8 a 31% y del alelo A de 30 a 50% ⁽²²⁾. En esta misma referencia se reporta una frecuencia en población Hispana de genotipo A del 8% y del alelo A 23%, del cual no se describen las características específicas de la población solo se menciona que son individuos de herencia Hispánica ⁽²²⁾.

Figura 2. Esquema del gen CBR3



Otra enzima que participa importantemente en la vía metabólica de la doxorubicina es la Glutathion S-Tranferasa p1 (GSTP1), miembro pi de la familia de Glutathion S-Transferasas (GST's) ⁽²³⁾. Las enzimas GST's solubles son categorizadas en 4 clases principales: alfa, mu, pi y theta ⁽²³⁾. El gen GSTP1 se localiza en el cromosoma 11q13, está constituido por 7 exones y 6 intrones, que abarcan aproximadamente 2.8 kilobases ⁽²⁴⁾.

Recientemente, se ha reportado un SNP en el gen GSTP1 ^(21,25,26), localizado en el exon 5. Este SNP cambia una Adenina (A) en la posición 313 por una Guanina (G). Este SNP tiene un efecto no sinónimo, es decir que condiciona un cambio en secuencia de la proteína en la Valina (V) de la porción 105 por una Leucina (L). La variante alélica A, considerada como el alelo mutado, se ha asociado con un riesgo mayor para presentar cardiotoxicidad después del tratamiento con doxorubicina. Para el genotipo AA se reporta un riesgo de 32 veces más que el genotipo GG ($p=0.19$) y 4 veces más que el genotipo AG ⁽²¹⁾.

Se han realizado estudios con bases en resultados poblacionales de la diversidad del genoma humano, para las poblaciones Hap-Map el genotipo A es de 33 a 41% y del alelo A de 60 a 90% (27). En esta misma referencia se reporta una frecuencia en población Hispana del genotipo A 52% y del alelo A 69%, del cual no se describen las características específicas de la población solo se menciona que son individuos de herencia Hispánica (27).

Figura 3. Esquema del gen GSTP1



Planteamiento del Problema

Millones de pacientes experimentan efectos adversos relacionados a fármacos, lo que condiciona aumento en la morbimortalidad relacionada a este evento. Los elevados costos derivados de la atención de los efectos tóxicos o secundarios relacionados al uso de medicamentos han sido reportados en Estados Unidos hasta en 4 billones de dólares por año (28,29). Desafortunadamente, en nuestro país no contamos con estadísticas tan precisas al respecto.

A pesar de que la doxorubicina es considerada como un agente antineoplásico eficaz para el tratamiento de diversas neoplasias malignas, se ha relacionado a diversos efectos secundarios con distinta intensidad y frecuencia. Uno de estos efectos secundarios relacionados es la cardiotoxicidad, que constituye la causa mas frecuente de falla cardiaca congestiva en oncología. Hasta el momento no existe ningún estudio que describa la frecuencia alélica de dos polimorfismos potencialmente haya evaluado marcadores genéticos potencialmente asociados a la toxicidad relacionada con doxorubicina en pacientes pediátricos.

Pregunta de investigación

¿Cuál es la frecuencia de presentación de dos polimorfismos de los genes CBR3 y GSTP1 en niños tratados con doxorubicina en el INP?

Justificación

La doxorubicina es utilizada frecuentemente como parte integral del tratamiento en pacientes pediátricos con diagnóstico oncológico. Desafortunadamente, el tratamiento de quimioterapia con doxorubicina es la causa mas frecuente de falla cardiaca congestiva en la clínica oncológica. Por lo cual se requieren estudios a nivel molecular para poder identificar a los individuos que son más susceptibles a presentar toxicidad cardiaca relacionada a doxorubicina con lo cual se podría modificar el tratamiento mediante el ajuste en las dosis requeridas o justificar el reemplazo de la doxorubicina por otro agente quimioterapéutico menos tóxico. En este sentido, el presente proyecto de investigación pretende sentar las bases para un futuro estudio prospectivo de asociación fenotipo-genotipo de los SNP's de interés y el desarrollo de cardiotoxicidad en los pacientes del INP que reciben doxorubicina como parte de su tratamiento antineoplásico.

Objetivos

General

Describir la frecuencia alélica de dos polimorfismos en los genes CBR3 y GSTP1 en niños tratados con doxorubicina en el INP.

Específicos

Primarios

1. Describir la frecuencia alélica de los polimorfismos 13444G>A y 313A>G, de los genes CBR3 y GSTP1 respectivamente, en niños tratados con doxorubicina
2. Describir la frecuencia de cardiotoxicidad y mielotoxicidad relacionados al tratamiento con doxorubicina, en niños tratados en el INP.
3. Ajustar la descripción de las frecuencias alélicas en los grupos de efectos secundarios relacionados a doxorubicina en niños tratados en el INP.

Clasificación de la Investigación

Se plantea un estudio con los siguientes ejes de investigación: descriptivo, ambispectivo, observacional y longitudinal.

Materiales y Método

Población de Estudio

Población objetivo

Niños tratados en con doxorubicina el INP.

Población elegible

Pacientes atendidos en el servicio de oncología pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría.

Criterios de Selección

Criterios de inclusión

1. Pacientes mexicanos menores de 18 años
2. Con seguimiento en la consulta externa de oncología
3. Cualquier género
4. Pacientes que hayan a recibido doxorubicina como tratamiento antineoplásico
5. Firma de la carta de consentimiento informado por el padre o tutor responsable y/o firma de la carta de asentimiento del paciente en los casos pertinentes

Criterios de exclusión

1. Pacientes con diagnóstico de insuficiencia cardíaca u otra alteración que pudiera evolucionar a insuficiencia cardíaca (como hipertensión arterial sistémica, hipertensión arterial pulmonar, etc.) antes de haber iniciado el tratamiento con doxorubicina;
2. Pacientes que hayan recibido radioterapia en mediastino.

Descripción Operativa del Estudio

Reclutamiento de pacientes

Con base en los protocolos de diagnóstico y tratamiento del Servicio de Oncología del INP, serán invitados a participar en el estudio aquellos pacientes que se encuentren en seguimiento ambulatorio y que hayan recibido doxorubicina como parte del esquema antineoplásico. Desconocemos el total de la población en esta condición debido a que serán consideradas diversas neoplasias.

A todos aquellos pacientes que acepten participar en el estudio, bajo autorización firmada de las cartas de Consentimiento y Asentimiento Informados, se solicitará la toma de 3mL de sangre periférica considerando las tomas de muestras para estudios de seguimiento en caso de que el protocolo de seguimiento las considere o para

el caso contrario por punción venosa periférica expreso para el estudio. Las muestras serán recolectadas en tubos vacutainer con ácido etilen-diaminotetra-acético (EDTA) como anticoagulante, bajo condiciones asépticas y con instrumental estéril y desechable. Se solicitará a las Comisiones de Bioética e Investigación la aprobación para almacenar la muestra y sus productos en el Banco de Tejidos Neoplásicos, como se considera en el Programa del Banco de Tejidos Neoplásicos.

Se revisará el expediente clínico de cada paciente que acepta colaborar en el estudio y en una base de datos quedaran registrados datos demográficos (edad y sexo), el tipo de neoplasia, número de ciclos y dosis total de doxorubicina recibida, reporte del ecocardiograma con fracción de eyección, datos compatibles con insuficiencia cardíaca en el reporte del electrocardiograma, datos compatibles con insuficiencia cardíaca reporte de la radiografía anteroposterior de tórax, tiempo desde el inicio del tratamiento hasta el desarrollo de alteraciones cardíacas relacionadas a doxorubicina, hospitalizaciones no relacionadas a la ministración de quimioterapia antineoplásica.

Análisis de polimorfismos

Se obtendrá el botón de leucocitos de la muestra de sangre mediante gradiente de densidad por centrifugación con Ficoll-Hypaque y se almacenará en refrigeración a -20°C . Se obtendrá DNA por medio de un kit QIAamp DNA Blood Midi (Qiagen, Valencia, CA) para extracción y purificación de DNA que utiliza columnas de afinidad. El procedimiento se realizará de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial. Se utilizará un $1\mu\text{l}$ de muestra del DNA para ser cuantificada por espectrofotometría en el equipo Nano Drop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc), en el espectro de lectura de 220-640nm. Se comprobará la integridad del DNA por corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1%, a 80volts durante aproximadamente 30 minutos, tiñendo con bromuro de etidio y observando en un transiluminador.

El DNA genómico una vez aislado de la muestra será amplificado por PCR para cada polimorfismo; la genotipificación se determinará por la técnica de polimorfismos de longitud por fragmentos de restricción (PCR-RFLP, del inglés Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment-Length Polymorphism), por triplicado para cada reacción.

Para el polimorfismo 13444G>A del gen CBR3 (*refSNP ID:rs1056892*) se utilizarán los primers: Forward 5'-GGACCAGTGAAGACAGACAT-3'; y Reverse 5'- CATTATTCCACCAACATTT-3', diseñados con la paquetería en línea *Primer3* (Whitehead Institute for Biomedical Research). La preparación de la reacción de PCR se consideran primers, amortiguador de PCR 10X, MgCl_2 1.5 mM, DNA Taq polimerasa 0.5U, y dNTP 0.2 mM de cada uno. Se agregará agua grado PCR para tener un volumen final de 20 μL . La amplificación de PCR consistirá en: a) desnaturalización a 94°C por 90 seg.; b) alineamiento a 54°C por 60 seg.; y c) extensión a 72°C por 90seg, en 30 ciclos. Se incluirá un control negativo en cada experimento (muestras sin DNA). El producto de amplificado del PCR (161pb) será cortado con 5U de la enzima de restricción Taa-L (HpyCH4III, Fermentas, Inc.), incubando a 65°C por 1h, generando dos productos de 46pb y 115pb, los cuales serán separados por electroforesis microcapilar en el sistema Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Para el polimorfismo 313A>G del gen *Gstp1* (*refSNP ID: rs41462048*) se utilizarán los primers: Forward 5'-GTGACTGTGTGTTGATCAGG-3'; y Reverse 5'-TGCAGATGCTCACATAGTTG-3', diseñados con la paquetería en línea *Primer3* (Whitehead Institute for Biomedical Research). La preparación de la reacción de PCR se consideran primers, amortiguador de PCR 10X, MgCl₂ 1.5 mM, DNA Taq polimerasa 0.5U, y dNTP 0.2 mM de cada uno. Se agregará agua grado PCR para tener un volumen final de 20uL. La amplificación de PCR consistirá en: a) desnaturalización a 94°C por 90 seg.; b) alineamiento a 54°C por 60 seg.; y c) extensión a 72°C por 90seg, en 30 ciclos. Se incluirá un control negativo en cada experimento (muestras sin DNA). El producto de amplificado del PCR (177pb) será cortado con 5U de la enzima de restricción Tai-L (HpyCH4IV o Mae II, Fermentas, Inc.), incubando a 65°C por 1h, generando dos productos de 38pb y 139pb, los cuales serán separados por electroforesis microcapilar en el sistema Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Para validar los resultados, se realizará la secuenciación de los fragmentos de interés en una institución externa. Para este análisis se considerará el 10% de las muestras, las cuales serán elegidas al azar al finalizar la genotipificación.

Análisis Estadístico e Interpretación de Datos

Se utilizará estadística descriptiva, con medidas de tendencia central y dispersión, para enlistar las variables de interés en la población de estudio. Se describirán las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de interés en la población estudiada. Se realizará la prueba de desequilibrio de ligamiento de Hardy-Wimberg. Se ajustará la descripción de las frecuencias alélicas a los subgrupos de efectos secundarios y dosis de doxorubicina.

Descripción operativa de las variables

- La edad se describe como una variable numérica continua con una escala de medición en meses hasta el inicio del tratamiento con doxorubicina;
- El sexo se describe como una variable no numérica binominal;
- El tipo de neoplasia se describe como una variable no numérica multinominal;
- El número de ciclos de doxorubicina recibida se describe como una variable numérica continua;
- La dosis de doxorubicina recibida se describe como una variable numérica continua con una escala de medición de dosis acumulada en mg/m²;
- La variante genotípica se describe como una variable no numérica binominal, la escala de medición será para CBR3 G/A y para GSTP1 A/G, siendo en ambos el alelo silvestre G;
- Las variantes alélicas son consideradas como variable no numérica categórica con escala de medición para la variante alélica del gen CBR3 homocigoto A/A, homocigoto G/G y heterocigoto A/G; y para la variante alélica del gen GSP1, homocigoto A/A, heterocigoto A/G y homocigoto G/G;
- Fracción de eyección del ventrículo izquierdo se describe como una variable numérica continua con una escala en porcentaje, medida por ecocardiograma que refleja la relación entre el volumen de llenado del ventrículo izquierdo y el volumen residual a la contracción ventricular;

- Reporte de electrocardiograma en el que se mencionen datos compatibles con insuficiencia cardíaca congestiva se describe como una variable no numérica binomial;
- Reporte de la radiografía anteroposterior de tórax en el que se mencionen datos compatibles con insuficiencia cardíaca congestiva se describe como una variable no numérica binomial;
- Cardiotoxicidad se describe como una variable no numérica categórica con escala de medición de y refleja la función del ventrículo izquierdo: Grado 0 (Ausente), Grado I (Asintomático, disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo del 10 al 20% respecto a la basal, con alteraciones electrocardiográficas sin sintomatología), Grado II (Asintomático, disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo mayor del 20% respecto a la basal, con alteraciones electrocardiográficas sintomáticas que no requieren tratamiento), Grado III (Insuficiencia cardíaca congestiva con respuesta al tratamiento, con alteraciones electrocardiográficas sintomáticas que si requieren tratamiento), Grado IV (Insuficiencia cardíaca congestiva refractaria al tratamiento o que requiere intubación, con alteraciones electrocardiográficas potencialmente letales);
- Tiempo para el desarrollo de cardiotoxicidad se describe como una variable numérica continua con una escala de medición en meses desde el inicio del tratamiento con doxorubicina hasta el desarrollo de alteraciones cardíacas relacionadas a doxorubicina;
- Mielotoxicidad se describe como una variable no numérica categórica con escala de medición de Grado 0 (Neutrófilos totales mayor a 2000/ul), Grado I (Neutrófilos totales de 2000 a 1501), Grado II (Neutrófilos totales de 1500 a 1001/ul), Grado III (Neutrófilos totales de 1000 a 501/ul), Grado IV (Neutrófilos totales menores a 500/ul);
- Mucositis se describe como una variable no numérica categórica con escala de medición de Grado 0 (Ausente), Grado I (Mucosa eritematosa), Grado II (Reacción pseudomembranosa o esfacelación de la mucosa en parches), Grado III (Reacción pseudomembranosa o esfacelación de la mucosa confluyente), Grado IV (Necrosis o ulceración de la mucosa);
- Número de hospitalizaciones por efectos secundarios potencialmente relacionados con doxorubicina se describe como una variable numérica continua;
- Tipo de hospitalizaciones por efectos secundarios potencialmente relacionados con doxorubicina se describe como una variable no numérica multinomial

Consideraciones Éticas

Será necesario incluir cartas de consentimiento y asentimiento informados que se apeguen a la Ley General de Salud, a la Conferencia Internacional de Armonización y a las Buenas Prácticas Clínicas, para contar con el permiso del paciente y/o su tutor para la toma, preservación en el Banco de Tejidos Neoplásicos y análisis de las muestras de sangre requeridas.

Aseguraremos el apego del estudio a los señalamientos de la UNESCO a través de la “Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos”.

El proyecto será sometido a revisión y aprobación por los comités de investigación y ética del Instituto Nacional de Pediatría. El formato de las cartas de consentimiento y asentimiento informados se incluyen en Anexo.

Consideraciones de Bioseguridad

El desarrollo del experimento se apegará a los estatutos de la Ley Federal de Salud en materia de Bioseguridad. Para la toma de muestras se utilizará material estéril y desechable, con contenedores adecuados al tipo y cantidad de muestra requerida. Durante los experimentos se considera el empleo de material y equipo de protección, tales como: guantes de látex, anteojos protectores y bata de laboratorio para evitar el contacto directo con el material tóxico-biológico que se utilice. Así mismo el desecho de los residuos tóxico-biológicos y del material punzocortante se realizará en contenedores específicos para cada tipo de residuos.

Limitantes del Estudio

Debido al diseño del estudio, consideramos que presenta dos limitantes importantes, la primera relacionada con el análisis de pacientes sobrevivientes de manera exclusiva que constituye un sesgo importante que impacta negativamente en la posibilidad de encontrar las variantes genotípicas de interés en menor grado, dada la potencial asociación que se reporta en la literatura con cardiotoxicidad. La segunda limitante son los reportes de ecocardiograma, electrocardiograma y radiografía de tórax que fueron realizados por diversos operadores no estandarizados para el estudio. Lo anterior es limitante propia del diseño, más la descripción de las frecuencias genotípicas de interés debe considerarse necesario para la planeación d un futuro estudio porspectivo cuyo diseño permita evitar estos sesgos.

Resultados

Tabla 2. Características demográficas y clínicas de acuerdo al grado de cardiotoxicidad, de la población en estudio.

GRADOS DE CARDIOTOXICIDAD		Grado 0 n (%)	Grado I n (%)	Grado II n (%)	Grado III n (%)	Grado IV n (%)	Total n(%)
Genero	masculino	16 (59)	18(4)				17(63)
	femenino	8(30)				2(7)	10(37)
Edad	0 - 5 años	11(41)					11(41)
	06 - 10 años	7(26)	1(4)				8(30)
	11 - 15 años	3(11)				2(7)	5(18)
	mayores de 16	3(11)					3(11)
Tipo de cáncer	LAL*	3(11)	1(4)				4(15)
	LH**	2(7)					2(7)
	LNH***	4(15)					4(15)
	Nefroblastoma	2(7)					2(7)
	Hepatoblastoma	2(7)					2(7)
	Pancreatoblastoma	1(4)					1(4)
	Rabdomiosarcoma	5(18)					5(18)
	Osteosarcoma	3(11)				2(7)	5(18)
	Sarcoma no RMS	1(4)					1(4)
	Carinoma Timico	1(4)					1(4)
Quimioterapia	solo DOX	14(52)				2(7)	16(59)
	DOX - DOX peg	5(18)					5(18)
	DOX+DAUNO	3(11)	1(4)				4(15)
	DOX+CFM	2(7)					2(7)
Mielotoxicidad	Grado 0	6(22)					6(22)
	Grado I	1(4)					1(4)
	Grado II	1(4)					1(4)
	Grado III	6(22)					6(22)
	Grado IV	10(37)	1(4)			2(7)	13(48)
Mucositis	Grado 0	12(44)					12(44)
	Grado I	6(22)				1(4)	7(26)
	Grado II	0	1(4)				1(4)
	Grado III	5(18)					5(18)
	Grado IV	1(4)				1(4)	2(7)
No. De Hospitalizaciones por toxicidad	0	4(15)					4(15)
	1	6(22)				1(4)	7(26)
	2	8(29)	1(4)				9(33)
	3	5(18)					5(18)
	4	1(3.5)				1(3.5)	2(7)

Tipo de hospitalización URG/UTIP***	7(26)			2(7)	9(33)	
Sala hospitalización	13(48)	1(4)			14(52)	
No hospitalización	4(15)				4(15)	
GRADOS DE CARDIOTOXICIDAD						
	Grado 0 Promedios (rangos)	Grado I Promedios (rangos)	Grado II Promedios (rangos)	Grado III Promedios (rangos)	Grado IV Promedios (rangos)	Total Promedios (rangos)
Núm. De ciclos de doxorubicina	3.5 (2.6)	7 (7-7)			3 (2-4)	3.6 (2-7)
Dosis Acumulada						
<100 mg/dl	64.2 (30-100)				60 (60-60)	58 (30-100)
101-200	150 (120-200)	195 (195-195)			190 (190-190)	150 (120-200)
>201	281 (225-300)					281 (225-300)
Tiempo de la administración de la 1er al DX						
<12m					7.5 (3-12m)	
13 -24m						
25- 36m						
<36m		36m (36-36)				

*Leucemia Aguda Linfoblástica,**Linfoma de Hodgkin, ***Linfoma no Hodgkin,****Sala de Urgencias/Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica

La población estudiada fue de 27 paciente en total, el 63% (n=17) correspondieron al género masculino y el 37% (n=10) al femenino, con una relación H:M 1.7:1 . Un paciente de género masculino presentó cardiotoxicidad Grado I y dos mujeres G IV, representando solo el 11% de la población total.

Por grupo de edad; el grupo menor de 5 años presento la mayoría 41% (n=11), 11% (n=3) en el grupo mayor de 16 años, el resto se encontró en los grupos de 6 a 10 años representado 30% y 18% entre 11 y 15 años, el mayor número de casos de cardiotoxicidad se presentó en el grupo de 11 a 15 años que represento 4% (n=2) y un solo caso en el grupo de 6 a 10 años (4%).

Del total de los pacientes el 18 % (n=5) padecen Rabdomiosarcoma u Osteosarcoma, siguiendo Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL) y Linfoma no Hodgkin (LNH) con 15%(n=4), Nefroblastoma y Hepatoblastoma, continuaron con 7% (n=2) y por último Carcinoma Tímico, Pancreatoblastoma y Sarcoma no rabdo con solo un caso respectivamente. Dos pacientes con cardiotoxicidad GIV pertenecieron al grupo de Osteosarcoma (7%) y un paciente a LAL (4%).

Los paciente que solo recibieron Doxorubicina como parte del esquema de quimioterapia para el padecimiento fueron el mayor porcentaje con 59% (n=16), a este grupo pertenecieron 2 pacientes (7%) con grado cardiotoxicidad GIV. Aquellos que recibieron doxorubicina convencional mas doxorubicina pegilada representaron un 18.5% (n=5) y dos paciente (7%) doxorubicina mas ciclofosfamida, en los cuales no se encontró ningún grado de cardiotoxicidad. Un paciente que recibió doxorubicina más daunorrubicina presentó cardiotoxicidad grado I, de 4 pacientes en total que recibieron este esquema.

Más de la mitad de los pacientes (n=21) presentó mielotoxicidad, siendo la más frecuente la mielotoxicidad grado IV con 13 pacientes (48%) de los cuales 2 presentaron cardiotoxicidad Grado IV y uno cardiotoxicidad Grado I, 6 pacientes no presentaron ningún grado de mielotoxicidad

Doce pacientes (44%) no presentaron ningún grado de mucositis, el grado I se presentó en 16% (N=7) , el grado II en 4% (N=1), el grado III en 18% (N=5) y el grado IV en 7% (N=2), el paciente con cardiotoxicidad Grado I presentó mucositis grado II, los pacientes con cardiotoxicidad Grado IV también presentaron mucositis grados II y IV.

Veintitrés (85%) de los 27 pacientes estuvieron hospitalizados a causa de toxicidad atribuible a la doxorubicina, el 33% (n=9) lo estuvo en 2 ocasiones. En este grupo se encontró al paciente que presentó cardiotoxicidad Grado I. El 7% (n=2) estuvo 4 veces hospitalizado, uno de estos pacientes presentó cardiotoxicidad grado IV, mientras que 7 pacientes (26%) estuvieron solo en una ocasión hospitalizados, 1 de estos pacientes desarrolló cardiotoxicidad grado IV, tan solo 4 (15%) pacientes no registraron ninguna hospitalización relacionada con toxicidad del tratamiento.

De los veintitrés pacientes que se hospitalizaron debido a la toxicidad, 14 pacientes (52%) requirieron exclusivamente de monitorización y medidas de soporte vital básicas, los 9 restantes (33%) necesitaron tratamiento en la sala de terapia intensiva pediátrica o de urgencias con soporte vital avanzado. Los dos pacientes que presentaron cardiotoxicidad grado IV requirieron hospitalización en una sala de cuidado intensivo, pero el paciente con cardiotoxicidad Grado I solo monitorización y medidas conservadoras.

De los pacientes que no presentaron datos de cardiotoxicidad en promedio recibieron 3.5 ciclos con doxorubicina con un rango 2-6 ciclos, un paciente con cardiotoxicidad grado I recibió 7 ciclos de doxorubicina y dos paciente con datos de cardiotoxicidad grado IV recibieron un promedio de 3 con un rango 2-4 ciclos.

En relación a la dosis acumulada de doxorubicina, un paciente que presentó cardiotoxicidad Grado IV y otro Grado I pertenecieron al grupo de 101 a 200mg/m² (promedio 192mg/m² con un rango 190 a 195mg/m²), pero un paciente con cardiotoxicidad grado IV perteneció al grupo de menos de 100mg/m², con una dosis total acumulada de 60mg/m². Los pacientes con una dosis acumulada mayor de 201 mg/m² (promedio de 281mg/m², con un rango 225 a 300mg/m²) no presentaron datos de cardiotoxicidad al momento del estudio.

De los tres pacientes que desarrollaron cardiotoxicidad, un paciente, con grado I, presentó la disminución de la FEVI por ecocardiograma en un tiempo transcurrido de 3 años desde el inicio del tratamiento con doxorubicina. Dos pacientes que desarrollaron cardiotoxicidad grado IV lo hicieron de 3 a 12 meses después de haber iniciado el tratamiento con doxorubicina.

Tabla 3. Frecuencias genotípicas relacionadas con toxicidad por Doxorubicina

GRADOS DE TOXICIDAD		Grado 0 n (%)	Grado I n (%)	Grado II n (%)	Grado III n (%)	Grado IV n (%)
EKG	SI (c/datos de cardiotoxicidad)					2(7)
	si (sin datos)	9(33)	1(4)			
	no tiene	15(57)				
Radiografía	SI (c/datos de cardiotoxicidad)	0				1(4)
	si (sin datos)	25(92)	1(4)			
	No tiene	0				
Ecocardiograma	Si	16(59)	1(4)			2(7)
	no	8(30)				
FEVI*	<50%	42 (42-42)				43(43-43)
	51-60%	56.7(52-59)				60(60-60)
	61-70%	65.2(62-70)				
	>71%	75(73-78)	72 (72-72)			

*Fracción de Eyección de Ventrículo Izquierdo

De los 27 pacientes, el 56% (n=15) no contaba con un electrocardiograma registrado en su expediente, en 10 pacientes (37%) el electrocardiograma no mostró alteraciones relacionadas con cardiotoxicidad por doxorubicina, fueron solo 2 pacientes (4%) los que mostraron alteraciones electrocardiográficas potencialmente compatibles.

Con respecto a la radiografía de tórax, los 27 paciente contaban con ella, pero el 96% (n=26) no presentaban datos de cardiotoxicidad, solo 1 paciente tenía datos compatibles con cardiotoxicidad.

Diecinueve pacientes (70%) contaban con ecocardiograma y 8 pacientes no (30%). Los pacientes con cardiotoxicidad grado IV presentaron una FEVI de 43% y 42%, respectivamente. Éste último mostró además una imagen intracavitaria compatible con un trombo tumoral.

Un paciente con cardiotoxicidad grado IV presentó una FEVI de 60%. Cuatro pacientes que no presentaron cardiotoxicidad registraron una FEVI promedio de 56.7% (rango 52 a 59%). Un paciente con FEVI de 72% presentó cardiotoxicidad grado I, determinada por la definición operacional (disminución del 10% de FEVI con respecto al basal, asintomático). Tres pacientes, con FEVI promedio de 75% (rango 73-78%), pertenecieron a la categoría de una FEVI mayor 71%. La mayoría de los pacientes perteneció a la categoría de una FEVI entre 61 y 70%, con un total de 8 pacientes (30%) que no presentaron ningún dato de cardiotoxicidad. Es importante enfatizar la ausencia de estudios en 37 % para electrocardiogramas y 30 % ecocardiograma.

En la población estudiada (n=27) para el SNP 13444>A del gen GSTP1, 8 pacientes (30%) presentaron el genotipo homocigoto silvestres G/G, 13(48%) el genotipo heterocigoto G/A, 6 (22%) el genotipo homocigoto mutante A/A. Con base en las frecuencias genotípicas antes mencionadas, se calcularon las respectivas frecuencias alélicas, así :54% para el alelo silvestre G y 46% para el alelo mutante A.

Para el SNP 313>A del gen CBR3, 1 paciente (4%) presento el genotipo homocigoto silvestre G/G, 10 (37%) el genotipo heterocigoto G/A, y 16 (59%) el genotipo homocigoto mutante A/A. Las respectivas frecuencias alélicas fueron : 37% para el alelo silvestre G y 63% para el alelo mutantes A.

Tabla 4. Frecuencias Genotípicas y grados de cardiotoxicidad de los Genes CBR3 y GSTP1

GRADOS DE CARDIOTOXICIDAD		Grado 0 n (%)	Grado I n (%)	Grado II n (%)	Grado III n (%)	Grado IV n (%)	Total n(%)
CBR3							
	A/A	13(48)	1 (4)			2 (7)	16 (59)
	G/A	10(37)					10(37)
	G/G	1(4)					1(4)
GSTP1							
	A/A	6(22)					6(22)
	G/A	11(40)	1(4)			1(4)	13(48)
	G/G	7(26)				1(4)	8(30)

Para el análisis de relación genotipo – fenotipo utilizamos X^2 . Se tomaron en cuenta los siguientes datos: para el genotipo homocigoto la variante mutante A/A del gen CBR3, donde 3 (11%) casos se presentaron con datos de cardiotoxicidad, uno con grado I y 2 con grado IV, mientras que 13 (48%) pacientes no presentaron datos de cardiotoxicidad. Para los genotipos heterocigoto G/A y homocigoto silvestres G/G no presentaron grados de cardiotoxicidad. De acuerdo con los datos obtenidos por el análisis de X^2 , no existe diferencia significativa entre los tres genotipos para el gen CBR3, con respecto a presentar algún grado de cardiotoxicidad ($X^2= 0.1687$, $p=0.9191$)

El análisis de la relación genotipo – fenotipo del gen GSTP1, se contaron con los siguientes datos: para el genotipo homocigoto mutante A/A ningún paciente presento cardiotoxicidad. Para el genotipo heterocigoto G/A, 2(7%) pacientes de 13, presentaron cardiotoxicidad, uno grado I y el otro grado IV. Para el genotipo homocigoto silvestres G/G, un paciente presento cardiotoxicidad Grado IV, y 7(26%) pacientes no. De acuerdo con los datos obtenidos por el análisis de X^2 , no existe diferencia significativa entre los tres genotipos para el gen GSTP1, con respecto a presentar algún grado de cardiotoxicidad ($X^2= 1.4279$, $p=0.4897$)

Tabla 5. Frecuencias Genotípicas y grados de Mielotoxicidad de los Genes CBR3 y GSTP

GRADOS DE MIELOTOXICIDAD						
	Grado 0 n (%)	Grado I n (%)	Grado II n (%)	Grado III n (%)	Grado IV n (%)	Total n(%)
CBR3						
A/A	4(15)	1 (4)	---	3(11)	8(30)	16 (59)
G/A	2(7)	---	1(4)	3(11)	4(15)	10(37)
G/G	1(4)	---	---	---	---	1(4)
GSTP1						
A/A	2(7)	---	---	1(4)	3(11)	6(22)
G/A	3(11)	---	1(4)	4(15)	5(18)	13(48)
G/G	1(4)	1(4)	---	1(4)	5(18)	8(30)

Para analizar la asociación de estos mismo genotipos del gen CBR3 con los grados de mielotoxicidad se tomaron los siguientes resultados: 16 (59%) pacientes con el genotipo homocigoto mutante A/A, un paciente con mielotoxicidad grado I, 3 (11%) presentaron grado III y 8(30%) presentaron grado IV. 10 (37%) con el genotipo heterocigoto G/A, un paciente presento grado I, 3(11%) grado III, y 4(15%) presentaron Grado IV. Para el genotipo homocigoto silvestre G/G solo un paciente, el cual no presento ningún datos de mielotoxicidad. Aun cuando para el genotipo A/A representan 59%, no existe diferencia significativa entre los tres genotipos al presentar diferentes grados de mielotoxicidad.

Para determinar la relación de los genotipos del gen GSTP1 con mielotoxicidad, se realizo el mismo análisis considerando en los resultados del genotipo homocigoto mutante A/A el registro de 4(15%) pacientes, que se distribuyeron de la siguientes manera, Grado I y II ningún paciente, Grado III un paciente, Grado IV tres pacientes. En el grupo del pacientes con genotipo G/A, encontramos 13%, de los cuales 3(11%) pacientes fueron grado 0(sin mielotoxicidad), 1(4%) paciente grado II, 4(15%) pacientes Grado III y 5(18%) pacientes grado IV. De los pacientes con genotipo G/G, un paciente con grado I, un paciente con Grado III y 5 pacientes con grado IV y solo un paciente no presento mielotoxicidad. Aunque los heterocigotos predominan en los casos de mielotoxicidad, el análisis estratificado no mostro diferencias significativas entre los tres genotipos en asociación con los diferentes grados de mielotoxicidad ($\chi^2 3.4512$, $p=0.4853$)

Tabla 6. Frecuencias Genotípicas y grados de Mucositis de los Genes CBR3 y GSTP1

GRADOS DE MUCOSITIS		Grado 0	Grado I	Grado II	Grado III	Grado IV	Total
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n(%)
CBR3							
	A/A	5(18)	5(18)	1(4)	4(15)	1 (4)	16 (59)
	G/A	6(22)	2(7)		1(4)	1(4)	10(37)
	G/G	1(4)					1(4)
GSTP1							
	A/A	3 (11)	1(4)		2(7)		6(22)
	G/A	4(15)	5(18)	1(4)	3(11)		13(48)
	G/G	5(18)	1(4)			2(7)	8(30)

Para analizar la asociación de estos genotipos del gen CBR3, con mucositis encontramos los siguientes resultados, para el genotipo homocigoto mutante A/A: 5 (18%) pacientes sin datos de mucositis, 5(18%) pacientes con Grado I, un paciente con Grado II, 4(15%) pacientes con grado III y un paciente con grado IV .Para el genotipo heterocigoto G/A 6(22%) paciente no presentaron datos de mucositis, siendo la mayoría. Parel genotipo homocigoto silvestres G/G un solo paciente sin datos de mucositis (grado 0). $X^2= 4.3762$, $p=0.8217$), por lo que no existe diferencia significativa entre los genotipos en asociación con el grado de mucositis.

Al analizar la relación de los genotipos del gen GSTP1 con los grados de mucositis se observo lo siguiente: para el genotipo A/A solo tres pacientes con mucositis, uno grado I y dos grado III. Para el genotipo heterocigoto G/A, 5 (18%) pacientes con grado I, uno con Grado II y 3 con grado III. Para el genotipo G/G, uno con grado I y dos con grado IV. 12 pacientes no presentaron datos clínicos de mucositis, 3 de ellos con genotipo A/A, 4 pacientes con genotipo G/A y 5 pacientes con genotipo G/G. Con estos datos el análisis se determina que no hay diferencia significativa entre los genotipos y la asociación con la presencia de mucositis.

Discusión

Actualmente los tratamientos aplicados a niños con enfermedades hemato - oncológicas malignas han logrado tasas de curación del 80%. Al aumentar la expectativa de curación y de una vida prolongada libre de enfermedad, se incrementa la necesidad de disminuir las secuelas relacionadas con el tratamiento para no limitar la calidad de vida de los sobrevivientes. (Neglia 2001)⁽³⁰⁾

Las antraciclinas son un grupo de fármacos antitumorales que han mostrado su eficacia en distintas neoplasias; sin embargo, su utilización se limita por sus efectos tóxicos asociados, principalmente la cardiotoxicidad, el presente estudio se enfoca a este efecto adverso y conocer la frecuencia alélica de dos polimorfismos y evaluar si existe una asociación entre estos marcadores genético y la cardiotoxicidad aguda relacionada con la doxorubicina en pacientes pediátricos tratados en INP.

En el estudio encontramos una heterogeneidad en los padecimientos ya que la doxorubicina como se menciona es ampliamente utilizada, el 36% de los paciente padecen sarcomas (osteosarcoma y rhabdomyosarcoma).

El riesgo de mortalidad relacionada con eventos cardiacos es ocho veces mayor para sobrevivientes a largo plazo que para la población normal. (Kremer 2004)⁽³¹⁾

Existe varias clasificaciones de la cardiotoxicidad asociada a antraciclinas, históricamente se han dividido en aguda y crónica, la primera se presenta durante el primer año y durante el tratamiento, frecuentemente no se asocia a la dosis acumulada y la crónica se presenta 1 año después de la administración de antraciclinas y se asocia más a la dosis acumulada refiere en publicación Lubomir en 2006⁽¹⁶⁾. Para Adams y Lipshultz en 2005⁽³²⁾, la clasificación incluye tres categorías: aguda, de inicio temprano y de inicio tardío; estas dos últimas son progresivas, se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Características y curso de cardiotoxicidad inducida por antraciclinas.

Características	CT aguda	CT de inicio temprano, CCP	CT de inicio tardío, CCP
Inicio	En la primera semana del tratamiento	<1 años después de finalizado tratamiento	>1 años después de finalizado tratamiento
Depende de factores de riesgo	desconoce	si	si
Características clínicas en niños	Depresión transitoria de la contractilidad miocárdica; necrosis miocárdica (elevación de la cTnT), arritmia	Miocardopatía dilatada o restrictiva, arritmias	Miocardopatía dilatada o restrictiva, arritmias
Curso	Usualmente reversible, al suspender las antraciclinas	Progresiva	Progresiva

CT= cardiotoxicidad. CCP= Cardiotoxicidad crónica progresiva.

Adams y Lipshultz en 2005⁽³²⁾

La incidencia de la forma aguda es menor a 1% y ha disminuido en forma significativa gracias a las medidas de prevención de cardiotoxicidad (Kremer 2001)⁽³³⁾. La cardiotoxicidad de inicio temprana crónica progresiva se presenta en 1.6% a 2.1% de los niños tratados con antraciclinas. La forma inicio tardío crónica progresiva está fuertemente asociada a la dosis acumulada, después de seis años, cerca de 65% de los niños tratados con dosis total acumulada entre 228 a 558 mg/m² tienen anomalías funcionales y estructurales en el músculo cardíaco. Esto puede ser progresivo y depende de la dosis acumulada. (Steven 2005)⁽³⁴⁾. Es importante considerar que la distinción entre toxicidad cardíaca aguda y crónica puede ser artificial comenta Cárdenas en 2009⁽³⁵⁾, ya que el daño ocasionado por las antraciclinas en células del miocardio comienza con la primera dosis de estos medicamentos y el desarrollo temprano o crónico depende de los factores individuales de cada paciente, aun sin haber completado dosis acumuladas superiores a las recomendadas. Debido al tiempo asignado para el presente estudio y el seguimiento considerado, el presente estudio solo contempló la evaluación de cardiotoxicidad aguda, por lo que la incidencia registrada es equiparable con lo reportado en otros estudios.

Se han identificado algunos factores de riesgo para cardiotoxicidad; las edades extremas, especialmente en menores de cuatro años, y las mujeres son más vulnerables que los hombres; posiblemente por diferencias en el estrés oxidativo, una expresión diferente en el gen de resistencia a multidroga y la composición corporal. (Ruggiero 2008)⁽³⁶⁾. En nuestro estudio en contraste al edad no fue un factor de riesgo, ya que aun la mayoría de nuestros pacientes son menores de 5 años representando el 41%, es este grupo de edad no se encontró ningún paciente con cardiotoxicidad aguda. Respecto al género, 2 (7%) pacientes mujeres desarrollaron cardiotoxicidad, sin embargo no es significativo este resultado por el número total de pacientes que presentaron cardiotoxicidad

Se ha sugerido aumento de la cardiotoxicidad cuando las antraciclinas se administran con otros agentes, principalmente ciclofosfamida (Lipshultz 2005)⁽³²⁾ y en el este estudio no se observó que la asociación de doxorubicina con un alquilante aumentara la presentación de cardiotoxicidad aguda, de los 27 pacientes 2 (7%) se encontraba esta condición y ninguno presento disminución de FEVI ni sintomatología relacionada. También es bien conocido que la radioterapia a mediastino y tórax potencia el efecto de los antracíclicos; de ahí el mayor riesgo de cardiotoxicidad, de nuestra población ninguno hasta el momento había sido expuesto a radioterapia en dichas regiones, por lo que no es posible contrastar este dato.

La dosis acumulada de antraciclinas es un factor de riesgo ampliamente estudiado principalmente para la cardiotoxicidad tardía, es reconocido como factor de daño cardíaco y el mejor predictor de la eventual disfunción cardíaca, el riesgo con la dosis acumulada por encima de de 300 mg/m² es significativo para la disminución de la función cardíaca 8 años después del tratamiento comenta Lipshultz y colaboradores en 2008⁽³⁷⁾. Sin embargo, no hay dosis absolutamente segura para esta antraciclina, incluso el dosis más bajas puede causar disfunción cardíaca posterior. Desafortunadamente, estudios como el de Steven y Kremer en 2001, refiere que pacientes que reciben dosis más bajas, 45mg/m², finalmente experimentarían anomalías cardíacas, como la reducción significativa de la masa muscular y la dimensión ventricular izquierda. En nuestro estudio no encontramos correlación entre la dosis máxima que fue de 300mg/m² con la presentación clínica o/y disminución en el % de FEVI de forma significativa. Por otro lado, dos de los tres pacientes que presentaron cardiotoxicidad aguda grave recibieron dosis menores de 200mg/dl, estos reafirma el concepto de que no hay dosis absolutamente segura de este quimioterapéutico^(33,34).

Sin embargo, de con lo reportado en la literatura, los pacientes que reciben la dosis máxima de 300mg/m², tendrán un riesgo relativo 11.8 veces mayor de presentar disminución de la función cardiaca (Rahman 2007)⁽³⁸⁾, en comparación con los que están expuestos a menor dosis, por lo que la monitorización cardiológica debe de ser adaptada al riesgo de cada paciente con cáncer según los factores de riesgo y la dosis acumulada de antraciclinas.

Es necesaria la detección temprana del daño cardiaco asociado al uso de antraciclinas para poder tomar decisiones terapéuticas que limite el daño cardiaco.

A pesar de que el ecocardiograma bi-dimesional con Doppler a color, es el estudio de gabinete más utilizado por su bajo costo y accesibilidad, no logra el objetivo de la detección temprana es decir diagnosticar cardiotoxicidad aguda, que en la mayoría de los casos es asintomática. Además hay una gran heterogeneidad en el concepto de cardiotoxicidad, Rahman 2007 publica que la cardiopatía inducida por antraciclinas es una disminución FEVI más de 20%, hasta un valor de 50% o manifestaciones clínicas (signos y síntomas de insuficiencia cardiaca) independiente del valor de la FEVI.⁽³⁸⁾ Otros autores han comentado que una disminución del 10% FEVI se debe considerar como cardiotoxicidad. De los pacientes analizados solo 3 (11%) presentaron disminución de la FEVI, un paciente se detecto una disminución del 10% con respecto al ecocardiograma basal (antes de iniciar el tratamiento) sin embargo este paciente hasta el momento del estudio se muestra asintomático y sin tratamiento farmacológico. Dos pacientes presentaron una disminución de más 20% de FEVI, una por debajo de 50%, ambas presentaron síntomas de insuficiencia cardiaca que requirió tratamiento en la unidad de cuidados intensivos.

Mientras que 24 (88%) no presentaron alteraciones en el ecocardiograma, sin embargo se debe tener en cuenta la falta de detección sistematizada de miocardiopatía temprana, así como toxicidad cardiaca de inicio tardío.

La ecografía tridimensional ha sido validada como la modalidad ecográfica que aporta mayor exactitud al cálculo de la fracción de eyección

Se mencionan que la gammagrafía de anticuerpos antimiosina es muy sensible para el seguimiento de cardiotoxicidad de la antraciclina. La captación miocárdica de anticuerpos antimiosina es altamente correlacionada con la gravedad de la lesión miocárdica. De hecho a una dosis acumulativa de 240 a 300 mg/m² de doxorubicina, casi todos los pacientes presentan un resultado positivo (Valdés Olmos et al 2002) por lo que es una prueba poco práctica para ser aplicada y interpretarse de forma rutinaria

El ECG los cambios que se presentar suelen ser inespecíficos de la repolarización ventricular o arritmias no letales, la prolongación del QT puede predecir disfunción cardiaca, Kremer en 2004⁽³¹⁾. En el estudio actual 10 pacientes (37%) el electrocardiograma no presentaba alteraciones de cardiotoxicidad, y solo 2(4%) pacientes tenían alteraciones en el electrocardiograma compatibles con insuficiencia ventricular, por si solo esta herramienta no útil para el diagnostico temprano y puede ser que con un ECG normal los pacientes ya presente cardiotoxicidad. Sin embargo siempre deben estar incluidos en la valoración cardiológica de los pacientes

Por lo anterior la búsqueda de marcadores bioquímicos útiles para la detección temprana sigue en estudio, se refiere por Lipshultz en 2005⁽³²⁾, que el aumento sérico de la troponina T en niños traduce dilatación del ventrículo izquierdo y el adelgazamiento de la pared ventricular y el péptido natriurético cerebral (BNP) producido por el miocardio, como respuesta de la falla ventricular izquierda, es un excelente marcador de disfunción, convirtiéndose en un marcador para el diagnostico y monitoreo.

Es de comentar que en los niños pequeños sanos tienen concentraciones más elevadas de BNP. Por tal motivo se debe considerar la evaluación del impacto de la motorización de las troponinas y BNP en nuestros pacientes, para determinar valores de referencia que justifiquen su utilización en pediatría.

Debido a la alta variabilidad entre pacientes en el desarrollo y progresión de la toxicidad cardíaca después del uso de antraciclinas, sugiere que los factores genéticos (genotipos naturales o los cambios inducidos) pueden afectar las vías metabólicas y potenciar los efectos tóxicos de las antraciclinas.

En cuanto a las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs de los genes CBR 3 (carbonil reductasa 3) y GSTP1 (glutathion S transferasa); la mutación o eliminación de estos genes alteran la función de estas enzimas causando una menor desintoxicación celular o alteración en el metabolismo de las antraciclinas, en comparación con la enzima codificada por el tipo silvestre (Zhang 2011).⁽³⁹⁾

A nivel genético existen grandes diferencias entre las poblaciones, los resultados obtenidos en el estudio de Sukhwinder en 2006,⁽¹⁹⁾ determinaron la frecuencia de la variante en los alelos para CBR3. (Tabla 8)

Tabla 8. Distribución de genotipos CBR3 en DNA humano por poblaciones

Grupo étnico	n	G/G	G/A	A/A	G	A
Africanos del norte del Sahara	7	1 (14.3)	4(57.1)	2(28.6)	0.43	0.57
Africanos del sur del Sahara	10	5(50.0)	5(50.0)	0 (0.0)	0.75	0.25
Chinos	10	5(50.0)	5(50.0)	0 (0.0)	0.75	0.25
Indo-Pakistani	9	2 (22.2)	2(22.2)	5(55.6)	0.33	0.67
Japoneses	10	4(40.0)	5(50.0)	1(10.0)	0.65	0.35
Mexicanos	10	7(70.0)	3(30.0)	0(0.0)	0.85	0.15
Medio este	10	2(20.0)	7(70.0)	1(10.0)	0.75	0.25
Islas del Pacífico	7	6(85.7)	1(14.3)	0(0.0)	0.93	0.07
Sur de América Andes	10	6(60.0)	3(30.0)	1(10.0)	0.76	0.25
Sur Este Asia	10	5(50.0)	4(40.0)	1(10.0)	0.7	0.3

Los porcentajes correspondientes a cada categoría de genotipos están indicados en paréntesis
n= número de ejemplos de DNA para individuos no emparentados.

Modificado de Sukhwinder, 2006⁽¹⁹⁾

En comparación con los resultados obtenidos en este trabajo (tabla 9) ; Sukhwinder reporto una frecuencia del genotipo G/G en 70% mientras que nuestros resultados muestran 4%, para el genotipo G/A de 30% en comparación con nuestros resultados de 37% y para el genotipo A/A que reporta de 0% nuestros resultados encontrados 59%. Las frecuencias en nuestra población de niños mexicanos con cáncer son inversas a las reportadas en la literatura, observando con mayor frecuencia el alelo mutante, sin embargo hay circunstancias que debemos tomar en cuenta, la principal nuestra población son mexicanos con cáncer y segunda que el estudio de Sukhwinder es de mexicanos que residen en EE. UU. que podría considerarse como población abierta.

Tabla 9. Frecuencias genotípicas del gen CBR3 en mexicanos

Variante de CBR3	Nuestro estudio	Sukhwinder et. Al 2006
A/A	59%	0%
G/A	37%	30%
G/G	4%	70%

Aplanec en 2006 refiere que para el genotipo A/A un riesgo asociado a desarrollar cardiotoxicidad de 9.2 veces más que para el genotipo G/G y tres veces más que el genotipo G/A, si nuestra población el genotipo A/A es de 59% ⁽²¹⁾, supondríamos que se presentaría con mayor frecuencia cardiotoxicidad, sin embargo no se encontró asociación, posiblemente por el tamaño de la muestra y que la muestra de este estudio es solamente de los sobrevivientes, aquellos que fallecieron y por ende no pudieron incluirse en el estudio porque no se obtuvo el genotipo, posiblemente desarrollaron cardiotoxicidad relacionada a antracíclicos que impactó en el desarrollo de las complicaciones.

Tabla 10. Frecuencias genotípicas y alelicas del gen GSTP1

	SNP's 500 Cáncer	Voso, et al 2008	Nuestro estudio
Frecuencia Alélica A	69%	32%	46%
Frecuencia Alélica G	31%	68%	54%
Genotipo A/A	52%	11.8%	22%
Genotipo G/A	34%	40.7%	13%
Genotipo G/G	13%	47.8%	30%

Estudio SNP's cáncer pacientes con cáncer con herencia hispana

En contraste hay una menor frecuencia del genotipo A y del alelo A mutante, que lo reportado en el estudio SNP's 500, y considerando que las dos poblaciones hispanas y padecen cáncer, esto debería tener impacto sobre el riesgo de desarrollar cardiotoxicidad, ya que el genotipo A/A de GSTP1 reporta un riesgo de 32 veces más que el genotipo G/G y 4 veces más que el genotipo G/A, sin embargo no hubo asociación significativa, del total de paciente que presento algún grado de cardiotoxicidad asociado a antracíclicos, el genotipo más frecuente G/A.

Los genotipos de GSTP1 se han estudiado por Voso y colaboradores en pacientes con Leucemia Aguda Mieloblástica, donde se asocio a la presencia de mielotoxicidad y la gravedad de esta; se encuentro 11.8% de homocigotos para el genotipo A/A, 40.7% para G/A y 47.6% para G/G. En paciente con genotipo homocigoto mutante A/A el tiempo de recuperación de plaquetas y neutrofilos era de 12 en comparación con lo genotipos con el alelo silvestre G que fue en promedio de 15 días, pero no hubo diferencia en la frecuencia de los episodios de fiebre y neutropenia, el uso de antibióticos y anti fúngicos. Reporta también que la mortalidad asociada a fiebre y neutropenia no varió en función del genotipo GSTP1.⁽⁴⁰⁾ En comparación a lo encontrado en nuestro estudio no hubo diferencia significativa en los genotipos de GSTP1 con respecto a la presencia y severidad de la Mielotoxicidad, al parecer no confiere mayor riesgo en la morbi – mortalidad de la mielotoxicidad.

Conclusiones

En este trabajo con respecto a la características demográficas hay un predominio del sexo masculino afectado por cáncer (63%), y se observa una distribución monomodal a la edad es 0 a 10 años (71%). Sin embargo no muestra ni la edad ni el género asociación con la presencia de cardiotoxicidad.

El tipo de cáncer que presentaron los 27 pacientes del estudio son heterogéneos, se observa un ligero predominio en los sarcomas (radbomiosarcoma y osteosarcoma) representaron 36% de la población.

En cuanto a la variable quimioterapia, no fue posible eliminar a los paciente con esquemas donde se agrega doxorubicina pegilada, daunorrubicina (otro antraciclina con efecto cardiotóxico) o ciclofosfamida (alquilante con efecto cardiotoxico), ya que la muestra sería insuficiente para el análisis de los genotipos. Y estos esquema pueden modifican las presentaciones clínicas de cardiotoxicidad. Sin embargo no se presento asociación de grado de cardiotoxicidad y tipo de quimioterapia.

No se encontró asociación con las variables de presentación de mielotoxicidad y mucositis, en asociación con la presencia de grados de cardiotoxicidad. Tampoco entre el número y tipo de hospitalización, con la presencia de cardiotoxicidad en los pacientes.

En el presente trabajo para el gen CBR3 frecuencias genotípicas de 4% para el genotipo homocigoto silvestre G/G, 37% para el genotipo heterocigoto G/A, y 59% para el genotipo Homocigoto mutantes A/A. Las frecuencias alélicas para el gen CBR3 fueron 37% para el alelo silvestre G y 63% para el alelo mutante A.

Para el gen GSTP1, las frecuencias genotípicas corresponden a 30% para el genotipo homocigoto silvestre G/G, 48% el genotipo heterocigoto G/A y 22% para el homocigoto mutantes A/A. Las frecuentes alélicas para el gen GSTP1 son 54% para el alelo silvestre G y para el alelo mutantes A 46%.

No existe diferencia significativa entre los genotipos para el CBR3, con respecto a la presencia de grados de cardiotoxicidad, mielotoxicidad o mucositis. Tampoco existe diferencia significativa entre los genotipos para el gen GSTP1, con respecto a la asociación de grado de cardiotoxicidad, mielotoxicidad o mucositis.

El presente trabajo aporta datos que pueden servir de base para futuros análisis prospectivos, ya que se establecieron las técnicas adecuadas de laboratorio para determinar los genotipos implicados en las vías metabólicas de doxorubicina y que candidatos de mayor susceptibilidad de cardiotoxicidad en los pacientes tratados con este quimioterapéutico.

Sin embargo muestra la necesidad de un seguimiento mas sistematizado y estrecho para evaluar de forma precisa la presencia de cardiotoxicidad, en tiempo y magnitud en cada paciente. De tal manera será posible determinar el impacto de estos SNP's en el desarrollo de cardiotoxicidad, para ser considerados como factor pronósticos, apoyando las decisiones clínicas futuras en cada paciente y así prevenir desde el inicio del tratamiento este tipo de efectos adversos.

Es necesario sistematizar el registro de las complicaciones potencialmente relacionadas con el tratamiento de doxorubicina, y su seguimiento. Ya que realizar el análisis de los datos recolectados en el expediente clínico presentó una gran dificultad para completar la base de datos. Se debe realizar un nuevo proyecto prospectivo e involucrar al servició de Cardiología del Instituto Nacional de Pediatría.

Perspectivas

En base a los resultados obtenidos en este estudio y las limitantes que el diseño metodológico que inicialmente se contemplo para aborda la problemática de la cardiotoxicidad relacionada con la doxorrubicina y la asociación de dos polimorfismos en los genes CBR3 y GSTP1 , es necesario considerar el diseño metodológico, con una redefinición de las variables operativas, en donde se debe incluir desde la clínica, el tratamiento y seguimiento sistemático para todos los paciente , además de un adecuado registro de las variables, para llevar a cabo un adecuado análisis prospectivo que permita valorar el impacto que tiene el tratamiento de la doxorrubicina y la asociaciones con estos dos genes, a largo plazo y determinar su valor pronostico en los niños con cáncer.

Bibliografía

1. Kramer S, Meadows AT, Jarrete P, Evans AE. *Incidence of childhood cancer: experience of a decade in population – based registry*. **Natl Cancer Inst** 1983;70:49
2. Rivera Luna R. *Conceptos generales del cáncer infantil en México*. En: Oncología Pediátrica, Conceptos básicos y clínicos, Rivera LR. Instersistemas SA de CV; México 2002; pp 1-3.
3. Housman, D., Ledley, F.D., *Why Pharmacogenomics? Why Now*. **Nature Biotechnology** 1998;16:492-493.
4. Johansson, I., Lundqist, E., Bertilsson, L., Dahl, ML., Sjoqist, .F, Ingelmann-Sundberg M. *Inherited amplification of an active gene in the Cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine*. **Proc. Natl. Acad. Sci** 1993;90: 11825-11829.
5. Prows, D.R., Prows, C.A. *Optimization Drug Therapies Based on Genetic Differences: Implications for the Clinical Setting*. **Clinical Issues**,1998;9,(4):499-512
6. Iniesta R., Guinó E., Moreno V., *Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos*. **Gac Sanit** 2005;19(4):333-41
7. Weiss RB. *The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?* **Semin Oncol** 1992; 19:670–686.
8. James H. Doroshow. *Anthracyclines and Anthracenediones*. En: Quimioterapia and biotherapy, Bruce A. Chabner, Dan L Longo.,2a edición., Edit. Lippincott-Raven. Philadelphia 1996; pp 409-429.
9. Giorgio Minotti, Pierantonio Menna. *Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity*. **Pharmacological** 2004;56(2);185-29
10. Diana Larussi, Paolo Indolfi, et al. *Recent Advances in the prevention of Anthracycline Cardiotoxicity in Childhood*, **Current Medicinal Chemistry** 2001;8: 1649-1660.
11. Gewirtz DA. *A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin*. **Biochem Pharmacol** 1999; 57:727–741.
12. Guano F, Pourquier P, Tinelli S, Binaschi M, Bigioni M, Animati F, Manzini S, Zunino F, Kohlhagen G, Pommier Y, and Capranico G. *Topoisomerase poisoning activity of novel disaccharide anthracyclines*. **Mol Pharmacol** 1999;56: 77–84.
13. Zucchi R, Danesi R,. *Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines*. **Curr Med Chem Anti-Canc Agents** 2003; 3:151-171.
14. Rivera Luna Roberto. *Medicamentos antineoplásicos*. En: Hemato-Oncología Pediátrica, principios generales, Rivera LR. Editores de textos mexicanos,. México 2006; pp 145-146.

15. Leszek Wojnowski, et al. *NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with Doxorubicin-induced cardiotoxicity*. **Circulation**. 2005; 112:3754-3762.
16. Lubomir E., Hana H., Iva T., Jaroslav M. *Late anthracycline cardiotoxicity protection by dexrazoxane (ICRF-187) in pediatric patients: echocardiographic follow-up*. **Support Care Cancer** 2006; 14:128-136.
17. Dominic A. Solimando, Linda R. Bressler, Polly E. Kintzel, Mark C. Geraci. *Drug Information Handbook for Oncology*, 2^a edition, 2000-2001, Lexi -Comp, Inc. Hudson, Ohio; pag. 176-177, 200-203.
18. Booser DJ, Hortobagyi GN. *Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance*. **Drugs**, 1994 Feb;47(2):223-58.
19. Sukhwinder S. Lakhman, Debashis Ghosh, and Javier G. Blanco. *Functional significance of natural allelic variant of human carbonyl reductase 3 (CBR3)*. **Drug Metabolism and Disposition** 2006;33(2):254-257.
20. Watanabe K, Sugawara C, Ono A, Fukuzumi Y, Itakura S, Yamazaki M, Tashiro H, Osoegawa K, Soeda E, and Nomura T. *Mapping of a novel human carbonyl reductase, CBR3 and ribosomal pseudogenes to human chromosome 21q22.2*. **Genomics** 1998; 52:95-100.
21. Aplenek R. Blanco J. et al, *Polymorphisms in candidate genes in patients with congestive heart failure (CHF) alter childhood cancer: A report from the childhood cancer survivor study (CCSS)*. **J Clin Oncology** 2006; 24:2314.
22. National Center for Biotechnology information U.S National Library of medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1056892#Diversity
23. KM Kelly and JP Perentesis. *Polymorphisms of drug metabolizing enzymes and markers of genotoxicity to identify patients with Hodgkin's lymphoma at risk of treatment-related complications*. **Annals of Oncology** 2002;13:34-39.
24. [Morrow CS](#), [Cowan KH](#), [Goldsmith ME](#). *Structure of the human genomic glutathione S-transferase-pi gene*. **Gene** 1989 Jan 30;75(1):3-11
25. Jose CC Rocha, Cheng Cheng, Mary V. Relling. *Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukaemia*. **Blood** 2005;105(12):4752-4758.
26. James M. Allan, et al. *Polymorphism in glutathione s-transferase p1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukaemia*. **PNAS** 2001;98(20):11592-11597.
27. National Centre for Biotechnology information U.S National Library of medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1695

28. Classen DC, Pestonik SL, Evans RS, Lloyd JF, Burke JP. *Adverse drug events in hospitalized patients: excess length of stay, extra costs, and attributable mortality.* **JAMA.** 1997; 277:301-306.
29. Lazarou Jason, Pomeranz Bruce H, Corey Paul N. *Incidence of Adverse Drug Reactions in Hospitalized Patients: A Meta-analysis of Prospective Studies.* **JAMA.** 1998; 279:1200-1205.
30. Neglia JP, Robison LL, Stovall M, Lui Y, Packer RJ, et al, *Late mortality experience in five-year survivor of cancer in childhood and adolescent the Childhood Cancer Survivor Study,* **Journal Clinical Oncology,** 2001: Suppl 7;926-36
31. Kemer LCM, Caron HN, *Anthracycline cardiotoxicity in children.* **N Engl J Med** 2004; 35:120-1.
32. Lipshultz SE, Lipsitz SR, Sallan SE, Dalton VM, Mone SM, et al, *Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia,* **Journal Clinical Oncology,** 2005;23; 2629 -36.
33. Kremer EC, van der Pal HJ, van Deln EC, Voute PA, *Anthracycline Induced Clinical heart failure in a cohort of 607 children: long –term follow-up Study,* **J Clin Oncology** , 2001 Vol 19(1):191-6.
34. Steven SE, Lipshultz SR, Lipsitz SE, et al, *Chronic Progressive Cardiac Dysfunction Years After Doxorubicin Therapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia.* **Journal of Clinical Oncology,** 2005; Vol. 23:12
35. Cardenas CR, *Mecanismos de cardiotoxicidad de la quimioterapia,* **Gaceta Mexicana de Oncología,** Publicación Oficial de la Sociedad Mexicana de Oncología, 2009; Vol. 8 suplemento 3, pag 3-7.
36. Ruggerio A, Ridola V, Puma N, Molinari F, Coccia P, et al, *Anthracycline cardiotoxicity in childhood ,* **Pediatric hematology oncology.** 2008; 25(4): 261-81.
37. Lipshultz SE, Alvarez JA, Scully RE, *Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer.* **Clinical Pharmacology Heart,** 2008; Vol. 94:525-533.
38. Rahman AM, Yusuf SW, Ewer MS, *Anthracycline – induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect or liposomal formulation,* **International Journal of Nanomedicine** 2007:2(4) 567-83.
39. Zang B, Sun T, ZhangS, Lu N, et al, **Polymorphisms of GSTP1 is associated with differences of chemotherapy response and toxicity in breast cancer,** *Chinese Medical Journal,* 2011, Vol. 124 (2) : 199-204.
40. Voso MT, Hohaus s, Gudi F. Fabiani EDF, Groner SSD, et al, *Prognostic role of glutathione S-transferase polymorphisms in acute myeloid leukemia.* **Leukemia** 2008 Vol 22 1685-1691

Anexo 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL INGRESO AL PROTOCOLO DE ESTUDIO INTITULADO: "FRECUENCIAS ALÉLICAS DE DOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES CBR3 Y GSTP1 EN NIÑOS TRATADOS CON DOXORUBICINA EN EL INP"

I. INTRODUCCIÓN

Es importante que lea y comprenda la siguiente explicación acerca de la enfermedad de su hijo y la posibilidad de que sea incluido en el estudio arriba mencionado, aquí se describe claramente el propósito, beneficios y riesgos que condiciona el ingreso al estudio. También deberá entender que el hecho de rechazar la participación de su hijo (a) en el estudio no cambiará las decisiones médicas que se tomen con respecto al tratamiento de la enfermedad.

II. OBJETIVO

Yo padre o tutor _____ con dirección en _____.

Voluntariamente acepto para que mi hijo (nombre del paciente) participe en el estudio, cuyo propósito es describir la presencia de marcadores genéticos y de los efectos tóxicos relacionados a la quimioterapia con la doxorubicina (adriamicina), ya que es utilizada frecuentemente como parte integral del tratamiento en niños con cáncer.

III. PROCEDIMIENTOS

Estoy informado de que la finalidad del estudio será describir la presencia de dos marcadores genéticos que potencialmente pudieran relacionarse los efectos tóxicos, principalmente del corazón, de la doxorubicina (adriamicina), que es parte del tratamiento antineoplásico que recibió mi hijo(a). Para tal efecto será necesario tomarle una muestra de sangre, ya sea junto con la toma de muestra para otros estudios clínicos o solo para el estudio. He sido informado que la toma de sangre que se realizará con todas las medidas higiénicas necesarias y con equipo estéril desechable.

IV. BENEFICIOS

Conozco que no existe beneficio directo para mi hijo en particular derivado de este estudio. Sin embargo estoy informado que el realizar esta investigación a nivel molecular (con el material genético) permitirá conocer la frecuencia de presentación de algunos marcadores genéticos que potencialmente pudieran relacionarse con efectos tóxicos de la doxorubicina (adriamicina), medicamento que es utilizado frecuentemente como parte integral del tratamiento en niños con cáncer. Lo anterior ayudará a continuar proyectos de investigación que tengan por objetivo identificar aquellos pacientes que pudieran ser mas susceptibles para presentar efectos tóxicos, especialmente del corazón, con lo cual se podría modificar el tratamiento mediante un ajuste en las dosis requeridas o sustituyendo el medicamento por otro agente quimioterapéutico menos tóxico.

V. RIESGOS

Mi hijo(a) no será sometido a algún riesgo agregado a los procedimientos diagnósticos y terapéuticos que de rutina se realizan durante el seguimiento de todos los pacientes que presentan el diagnostico de un cáncer semejante al de mi hijo (a). Salvo en el caso de que se solicite la toma de muestra de sangre por punción, la cual es de riesgo mínimo y solo implica dolor transitorio durante el piquete y momentos después. Las pruebas genéticas de laboratorio que se realicen a la muestra de sangre no implican riesgos o efectos indeseables en mi hijo(a).

VI. ALTERNATIVA DE RECHAZO

Si yo o mi hijo decidimos no participar en el estudio, el seguimiento será igual que en otros pacientes tratados en este Instituto Nacional de Pediatría.

VII. CONFIDENCIALIDAD

Entiendo que cualquier información que se obtenga en este estudio será confidencial y que ni mi nombre ni el de mi hijo(a) serán mencionados en el reporte del estudio. La preservación de las muestras se codificará de tal forma que sea posible ligarla a datos clínicos que, de igual manera, serán preservados en completa confidencialidad.

VIII. DISPONIBILIDAD DE LA INFORMACION

La información particular no será divulgada a ningún paciente, sin embargo, los resultados completos derivados del proyecto de investigación serán publicados en revistas científicas para su divulgación a la comunidad científica nacional e internacional.

IX. CESION DE DERECHOS

La decisión de ingresar al estudio implica que la muestra, particularmente del material genético de la misma, se resguarde en el Banco de Tejidos Neoplásicos del Instituto Nacional de Pediatría si así lo autorizo libremente. De la misma manera, permitirá que el Instituto pueda realizar posteriormente otras pruebas sin necesidad de solicitar mi consentimiento.

X. DERECHO A DESERTAR

Soy libre de excluir del estudio a mi hijo (a) en cualquier momento. En el caso de que tome esta decisión, el tratamiento y seguimiento no cambiarán.

XI. CONSENTIMIENTO

Yo (padre o tutor) _____ con

dirección en _____,

voluntariamente acepto que mi hijo (nombre del paciente) _____

_____ participe y done una muestra de sangre para el estudio " *FRECUENCIAS ALÉLICAS DE DOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES CBR3 Y GSTP1 EN NIÑOS TRATADOS CON DOXORUBICINA EN EL INP* ".

Será necesario mi consentimiento para cada estudio en el que se pretenda utilizar la muestra:

SI

NO

México, D.F., a _____ de _____ de 200__.

“

Nombre y Firma del Padre, Madre o Tutor
responsable del paciente

Firma del Investigador

Nombre y Firma de Testigo

Nombre y Firma de Testigo

Investigador Responsable: Dr. Oscar Alberto Pérez González, Laboratorio de Oncología Experimental, Torre de Investigación 6to Piso, Instituto Nacional de Pediatría. Tel. 10840900, ext. 1474.

****Para el protocolo, cada carta de Asentimiento Informado será elaborada y firmada por duplicado y con folio para entregar una al paciente y la otra para el archivo del Laboratorio de Oncología Experimental.**

“

CARTA DE ASENTIMIENTO PARA EL INGRESO AL PROTOCOLO DE ESTUDIO TITULADO: “FRECUENCIAS ALÉLICAS DE DOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES CBR3 Y GSTP1 EN NIÑOS TRATADOS CON DOXORUBICINA EN EL INP”

I. INTRODUCCIÓN

Es importante que leas y comprendas la siguiente explicación acerca de tu enfermedad y la posibilidad de que seas incluido en el estudio arriba mencionado, aquí se describe claramente el propósito, beneficios y riesgos que condiciona el ingreso al estudio. También deberás entender que el hecho de rechazar tu participación en el estudio no cambiará las decisiones médicas que se tomen con respecto al tratamiento de tu enfermedad.

II. OBJETIVO

Yo _____ con _____ dirección _____ en _____

voluntariamente acepto para participar en el estudio, cuyo propósito es describir la presencia de marcadores genéticos y de los efectos tóxicos relacionados a la quimioterapia con la doxorubicina (adriamicina), ya que es utilizada frecuentemente como parte integral del tratamiento en niños con cáncer.

III. PROCEDIMIENTOS

Estoy informado de que la finalidad del estudio será describir la presencia de dos marcadores genéticos que potencialmente pudieran relacionarse los efectos tóxicos, principalmente del corazón, de la doxorubicina (adriamicina), que es parte del tratamiento antineoplásico que recibió mi hijo(a). Para tal efecto será necesario tomarme una muestra de sangre, ya sea junto con la toma de muestra para otros estudios clínicos o solo para el estudio. He sido informado que la toma de sangre que se realizará con todas las medidas higiénicas necesarias y con equipo estéril desechable.

IV. BENEFICIOS

Conozco que no existe beneficio directo para mi en particular derivado de este estudio. Sin embargo estoy informado que el realizar esta investigación a nivel molecular (con el material genético) permitirá conocer la frecuencia de presentación de algunos marcadores genéticos que potencialmente pudieran relacionarse con efectos tóxicos de la doxorubicina (adriamicina), medicamento que es utilizado frecuentemente como parte integral del tratamiento en niños con cáncer. Lo anterior ayudará a continuar proyectos de investigación que tengan por objetivo identificar aquellos pacientes que pudieran ser mas susceptibles para presentar efectos tóxicos, especialmente del corazón, con lo cual se podría modificar el tratamiento mediante un ajuste en las dosis requeridas o sustituyendo el medicamento por otro agente quimioterapéutico menos tóxico.

V. RIESGOS

No seré sometido riesgos agregado a los procedimientos diagnósticos y terapéuticos que de rutina se realizan durante el seguimiento de todos los pacientes que presentan el diagnostico de un cáncer semejante al mío. Salvo en el caso de que me soliciten la toma de muestra de sangre por punción, la cual es de riesgo mínimo y solo implica dolor transitorio durante el piquete y momentos después. Las pruebas genéticas de laboratorio que se realicen a la muestra de sangre no implican riesgos o efectos indeseables en mi.

VI. ALTERNATIVA DE RECHAZO

Si yo decido no participar en el estudio, el seguimiento será igual que en otros pacientes tratados en este Instituto Nacional de Pediatría por tumores semejantes.

VII. CONFIDENCIALIDAD

Entiendo que cualquier información que se obtenga en este estudio será confidencial y que mi nombre no será mencionado en el reporte del estudio. La preservación de las muestras se codificará de tal forma que sea posible ligarla a datos clínicos que, de igual manera, serán preservados en completa confidencialidad.

VIII. DISPONIBILIDAD DE LA INFORMACION

La información particular no será divulgada a ningún paciente, sin embargo, los resultados completos derivados del proyecto de investigación serán publicados en revistas científicas para su divulgación a la comunidad científica nacional e internacional.

IX. CESION DE DERECHOS

La decisión de ingresar al estudio implica que la muestra, particularmente del material genético de la misma, se resguardada en el Instituto Nacional de Pediatría en un banco de tejidos y de DNA. Además implica que este instituto pueda realizar otras pruebas posteriormente sin necesidad de que sea informado de ello.

X. DERECHO A DESERTAR

Soy libre de excluirme del estudio en cualquier momento. En el caso de que tome esta decisión, el tratamiento y seguimiento no cambiarán. De igual manera, entiendo que no podré utilizar el material genético cuando lo solicite, ya que quedará disponible para efectos de investigación exclusivamente.

XI. ASENTIMIENTO

Yo (paciente) _____ con
dirección en _____,
voluntariamente acepto participar y donar una muestra de sangre para el estudio "*FRECUENCIAS ALÉLICAS DE DOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES CBR3 Y GSTP1 EN NIÑOS TRATADOS CON DOXORUBICINA EN EL INP*".

Será necesario mi consentimiento para cada estudio en el que se pretenda utilizar la muestra:

SI

NO

México, D.F., a _____ de _____ de 20____.

Nombre y Firma del Padre, Madre o Tutor
responsable del paciente

Firma del Investigador

“

Nombre y Firma de Testigo

Nombre y Firma de Testigo

Investigador Responsable: Dr. Oscar Alberto Pérez González, Laboratorio de Oncología Experimental, Torre de Investigación 6to Piso, Instituto Nacional de Pediatría. Tel. 10840900, ext. 1474.

****Para el protocolo, cada carta de Asentimiento Informado será elaborada y firmada por duplicado y con folio para entregar una al paciente y la otra para el archivo del Laboratorio de Oncología Experimental.**