

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES IZTACALA**

**“ASOCIACIÓN DE DOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES
CBR3 Y GSTP1 CON LA TOXICIDAD RELACIONADA A
DOXORUBICINA EN NIÑOS MEXICANOS CON CÁNCER”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOLOGA

P R E S E N T A

MALINALI PAOLA ROMERO RENDÓN

Director:

Dr. Óscar Alberto Pérez González

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 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.

Nuestra lealtad es para las especies y el planeta,
Nuestra obligación de sobrevivir no es solo para



nosotros mismos sino también para ese cosmos,
antiguo y vasto, del cual derivamos.

Carl Sagan

DEDICATORIA

A mi mamá, un gran ejemplo de mujer y gran amiga, quien como cabeza de familia nos há dado valores y buenos ejemplos, manteniendo una familia unida. Por enseñarnos que apesar de los momentos difíciles hay que vivir realistas y seguir adelante, siempre juntos apoyandonos.

A mis hermanos Ada y Aaron y a mi sobrina Valentina, porque gracias a su fuerza, comprensión, motivación y cariño he llegado hasta este momento. Porque aunque el termino de mi licenciatura representa esfuerzos, nunca podra compararse con todo lo maravilloso que han hecho por mi a lo largo de toda mi vida.

A la memoria de mi papá que há sido mi motivación y su recuerdo me da fuerza para seguir luchando por alcanzar mis ideales.

A ellos les debo y agradezco la guía y motivación de tener sueños a combertirlos en metas y sobre todo a luchar por realizarlos.

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

A Noemi, Miriam y Liz que además de ser un gran equipo de trabajo en la escuela, son grandes personas y me dieron la fortuna de contar con su amistad incondicional. Gracias por hacer de la universidad algo inolvidable.

A quien a sido indiscutiblemente parte importante en mi vida, Alonso Hernandez, compartiendo momentos gratos y difíciles, brindandome su amistad y apoyo incondicional.

Agradesco al Doctor Oscar por permitirme ser parte del laboratorio para la realización de este trabajo, por compartir sus conocimientos y experiencias, por su comprensión y consejos. A todos los que forman o formaron parte del laboratorio de Oncología Experimental (Rocio, Javier, Nora, Vane, Sergio, Hugo, Ariel, Migue e Isra), por el ejemplo de un buen trabajo interdisciplinario, gracias por la paciència, amistad y conocimientos.

A los residentes del servicio de Oncología Clínica del INP por el apoyo en el acercamiento a los pacientes y en la recopilación de muestras.

Agradesco a todos los pequeños que aceptaron ser parte de este proyecto, soportando un piquete más, porque el conocerlos deja grandes enseñanzas, algunas veces con un nudo en la garganta por la dura batalla que implica su enfermedad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México en especial a la FES-IZ por permitirme ser parte de sus aulas, donde se reafirma y crece la pasión por el estudio de la Biología, con las mejores enseñanzas de grandes profesores, a los cuales agradezco ser parte de mi formación.

A la memoria de mis abuelitos Felix y Concepción por la gran familia de la que soy parte, por tener abiertas las puertas de su casa siempre que lo necesitamos, por las anécdotas y todos los momentos inolvidables.

INDICE

Introducción	4
Justificación	16
Objetivos	17
Hipótesis	17
Materiales y Método	18
Población de Estudio	18
Criterios de Selección	18
Descripción Operativa del Estudio	19
<i>Evaluación de toxicidad</i>	19
<i>Obtención de la muestra</i>	20
<i>Almacenamiento de la muestra y extracción de DNA</i>	20
<i>Cuantificación del DNA</i>	20
<i>Prueba de integridad del DNA</i>	20
<i>Análisis de los polimorfismos</i>	20
Análisis estadístico e interpretación de datos	22
Estimación del Tamaño Muestral	22
Consideraciones Éticas	24
Consideraciones de Bioseguridad	24
Resultados	24
Discusión	37
Conclusión	42
Perspectivas	43
Literatura Citada	44
Anexos	
Anexo 1	47
<i>Carta de Consentimiento y Asentimiento Informado</i>	

INTRODUCCIÓN

El Cáncer, uno de los principales problemas de salud y una de las prioridades mejor definidas en el campo de la salud pública, debido a su elevada morbilidad y mortalidad (Franco, 2011), es un factor por el cual en la actualidad mueren casi 7 millones de personas al año con este diagnóstico en Estados Unidos. En los países desarrollados, es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y cada año se diagnostican más de 160,000 casos de cáncer en niños (González-Rivera, 2007; Franco, 2011).

En México, desde 1990 los tumores malignos representan la segunda causa de muerte en la población general, englobando a la edad pediátrica, en el grupo de 5 a 14 años de edad. A nivel nacional se convierte en un factor cada vez más importante en la carga de morbilidad, sin embargo no se conoce su frecuencia por la falta de un registro con base poblacional (González-Rivera, 2007). De acuerdo a lo reportado por Fikrat en el 2000, respecto a todas las neoplasias malignas, la tasa de mortalidad entre los niños mexicanos menores de 15 años de edad, aumentaron en un 20.3%, en las últimas décadas, pasando de 46.8 / 1,000,000 de niños en 1980 a 56.3 / 1,000,000 niños en 1995. La Tabla 1 muestra los mismos datos para los grupos de 1-4, de 5-9, y de 10-14 años de edad, de 1980-1995. La tasa de mortalidad por cáncer entre los niños 1 a 15 años de edad tiene una tendencia a aumentar, mientras que una cierta disminución en los casos de muerte se observó en niños menores de 1 año de edad.

Tabla 1. Tasas de muertes por cáncer ocurridas en niños Mexicanos menores de 15 años de edad (1980-1995).

Edad (Años)	1980	1995	% de diferencia por periodo de tiempo.
<1	61.6	42.7	-30.7
1-4	51.8	65.8	+27.1
5-9	41.5	49.8	+19.9
10-14	40.5	48.0	+18.5

Tasa de mortalidad por cada 1, 000, 000 habitantes menores de 15 años de edad. Modificado de Fikrat (2000)

Para comprender plenamente los riesgos de salud ocasionados por el tratamiento del cáncer infantil, es importante medir tres tipos de resultados a largo plazo: estado de salud, la mortalidad y la morbilidad (Kevin, 2006), ya que los efectos adversos originados por la administración de quimioterapia pueden limitar la prescripción de fármacos efectivos y la posibilidad de curación, además de afectar la calidad de vida de los pacientes en tratamiento y el porcentaje de sobrevivientes (Cárdenas, 2009).

Se debe tener en cuenta que las reacciones adversas a medicamentos se encuentran como una de las diez principales causas de muerte y enfermedad en el mundo desarrollado (Ross, 2011). En la actualidad, en la terapia del cáncer, la curación es una meta alcanzada para la mayor parte de los pacientes, por lo que uno de los objetivos del tratamiento debe ser la disminución de efectos adversos y de secuelas del tratamiento (Cárdenas, 2009). Ya que de los que sobreviven, 80% de acuerdo a lo reportado por Franco en el 2011, aproximadamente el 40% presenta secuelas a largo plazo o tiene la posibilidad de presentar alguna incapacidad grave y permanente. Las reacciones adversas a medicamentos son a menudo más frecuentes y más graves en los niños y pueden ser catastróficas (Ross, 2011).

Dentro de los primeros 30 años después del diagnóstico, el 75% de la niñez sobreviviente de cáncer sufre de enfermedades crónicas como las cardiovasculares, siendo una de las principales enfermedades de acuerdo a lo estimado en los últimos cinco años. Los sobrevivientes son 8 veces más propensos que la población general a morir por enfermedades cardiovasculares y en comparación con los controles hermanos, presentan 15 veces más probabilidades de sufrir insuficiencia cardíaca (IC), más de 10 veces a tener enfermedad arterial coronaria, y 9 veces más probabilidades de haber tenido un accidente cerebrovascular. Por eso, es evidente la importancia de monitorización continua mucho después del término de su tratamiento (Franco, 2011).

Las Antraciclinas, como la doxorubicina, se encuentran entre las principales causas de estos eventos cardiovasculares (Franco, 2011). Sin embargo, son la piedra angular en muchos esquemas de quimioterapia para el tratamiento de niños y adultos (Cárdenas, 2009; Minotti, 2004), por lo que se han incorporado en más del 50% de los tratamientos, contribuyendo a que las tasas de supervivencia sean alrededor del 75% (Smith, 2010). Se utilizan comúnmente para tratar enfermedades hematológicas infantiles, linfomas, así como diversos tumores sólidos como osteosarcomas, tumor de

Wilms, y hepatoblastomas. Aproximadamente 60% del total de pacientes infantiles con cáncer reciben antraciclinas (Ross, 2011).

La Doxorubicina, un antibiótico natural producido por *Streptomyces peucetius*, variedad *caesius* (Lal, 2010) fue una de las primeras antraciclinas aisladas a principios de la década de 1960 (Minotti, 2004). Las antraciclinas son glucósidos (cuerpos químicos formados de azúcar que se une a otro grupo de diferente naturaleza). La molécula básica está formada por un anillo tetracíclico (el núcleo aglicona, no azúcar, de la molécula) unido al azúcar daunosamina. El anillo C tiene un grupo carbonilo. En el anillo A se ancla la cadena lateral que termina en un oxidrilo en el caso de la Doxorubicina (Figura 1) (Meaney, 2009).

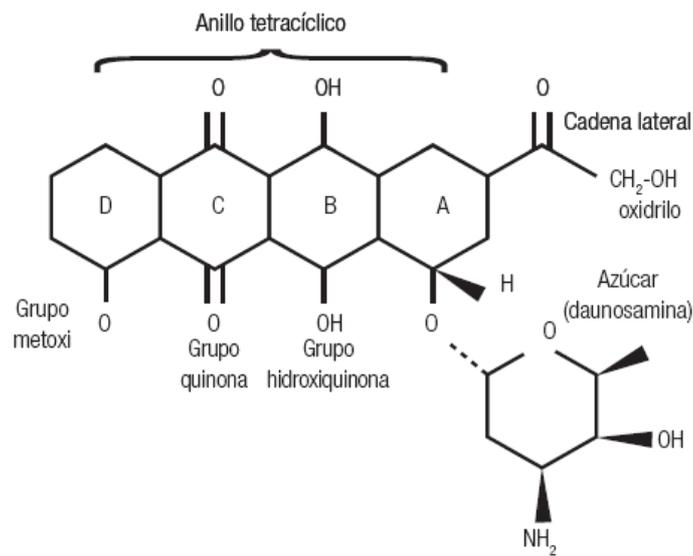


Figura 1. Estructura Química de las antraciclinas. Meaney (2009)

A pesar de la utilización clínica extensa, los mecanismos de acción de las antraciclinas en las células cancerosas siguen siendo motivo de controversia (Minotti, 2004), sin embargo se consideran los siguientes mecanismos de acción (Figura 2):

- 1) Intercalación en el ADN, lo que inhibe la síntesis de macromoléculas;
- 2) Generación de radicales libres, lo que lleva al daño del ADN y peroxidación lipídica;
- 3) Unión al ADN y alquilación;
- 4) Entrecruzamiento de ADN;
- 5) Interferencia en la actividad de la helicasa;
- 6) Efectos directos sobre la membrana;
- 7) El inicio del daño del ADN mediante la inhibición de la topoisomerasa II;
- 8) La inducción de la apoptosis en respuesta a la inhibición de la topoisomerasa II (Minotti, 2004. Smith, 2010).

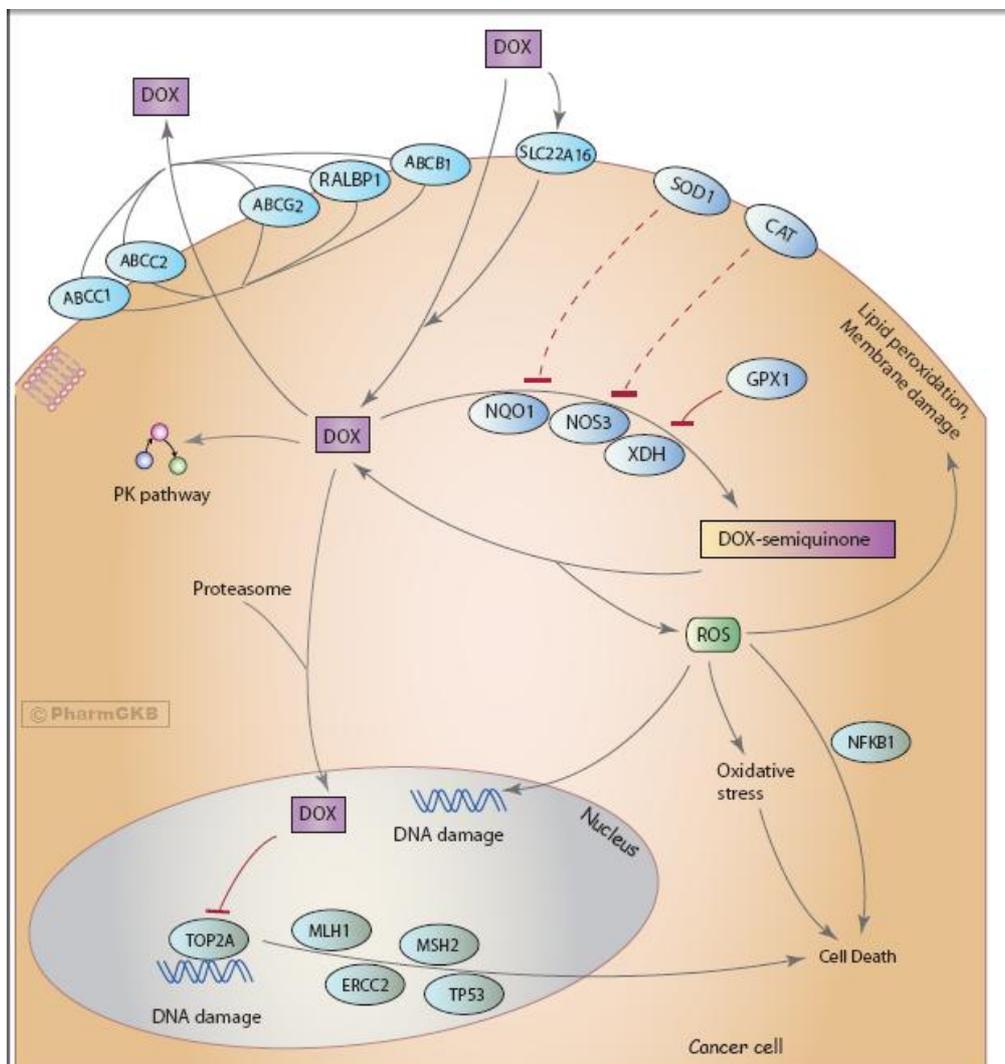
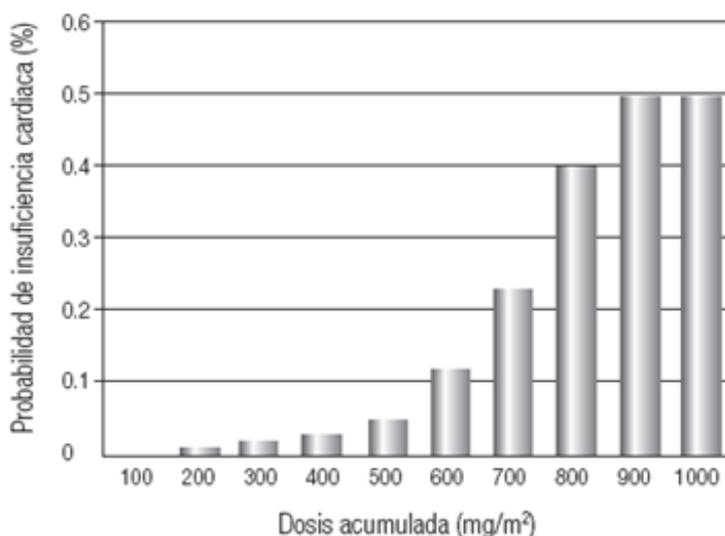


Figura 2. Mecanismo de acción de Doxorubicina, donde ésta actúa como molécula señal (DOX) iniciando la respuesta al fármaco en células cancerosas (Thorn, 2010).

El principal efecto limitante de estos fármacos es la dosis para no originar cardiotoxicidad, que suele ser dependiente de la dosis acumulada. El riesgo con una dosis acumulada de 300 mg/m² se ha estimado, aproximadamente, en 5% y puede presentarse hasta 15 años después del tratamiento (Cárdenas, 2009, Franco, 2011).



Grafica 1. Dosis acumula de doxorubicina e Insuficiencia Cardíaca. Meaney (2009)

La naturaleza cardiotóxica de estos medicamentos, junto con su uso generalizado, pueden explicar el gran impacto que han tenido en la morbilidad y mortalidad de los sobrevivientes, ya que se encuentran en un aumento significativo de riesgo de insuficiencia cardíaca. Treinta años después del diagnóstico, más del 7.5% ha experimentado fallas cardíacas (Franco, 2011), además de ser motivo de trasplante de corazón en adultos jóvenes, así como alteraciones en los resultados clínicos, de evaluaciones cardíacas detalladas, demostrando que más de la mitad de sobrevivientes de cáncer infantil expuestos a antraciclinas presentan anomalías cardíacas subclínicas, incluyendo disminución en masa y grosor de la pared, aumento de la poscarga y disminución de la contractilidad del ventrículo izquierdo (Franco, 2011).

De acuerdo a lo reportado por Steven y colaboradores en el 2005, la cardiotoxicidad se presenta de dos formas distintas: depresión de la contractilidad y aumento de la poscarga, asociadas con mayor dosis acumulada de doxorubicina y el sexo femenino; resultando en la disminución de la masa ventricular. Aunque muchos de los efectos cardiotóxicos de la terapia con doxorubicina para la leucemia aguda linfoblástica

infantil mejoró inicialmente después de la terapia, su estudio longitudinal demostró que anomalías cardíacas son frecuentes, persistentes y para muchos pacientes progresivas. Las anomalías pueden presagiar problemas importantes en el futuro para los sobrevivientes tratados con antraciclinas (Steven, 2005).

La gravedad de los efectos cardiotóxicos de las antraciclinas varía y se clasifica por tiempo de aparición: Aguda, que ocurre durante o inmediatamente después del tratamiento, Temprana, dentro de 1 año de exposición, y Tardía, que se produce un año o más después de la exposición inicial (TABLA 2). La Cardiotoxicidad severa, durante o poco después del tratamiento, se asocia fuertemente con insuficiencia cardíaca tardía, a pesar de un Intervalo asintomático inicial (Franco, 2011).

Tabla 2. Características y curso de cardiotoxicidad inducida por antraciclinas.

Características	CT Aguda	Inicio Temprano, CCP	Inicio Tardío, CCP
Inicio	En la primera semana del tratamiento con antraciclinas	<1 año, después de la finalización del tratamiento con Antraciclinas.	≤ 1 año después de completar el tratamiento con Antraciclinas
Dependencia del factor de riesgo	Desconocido	Si	Si
Características clínicas en adultos	Depresión transitoria de la contractilidad miocárdica	Cardiomiopatía Dilatada	Cardiomiopatía Dilatada
Características Clínicas en niños	Depresión transitoria de la contractilidad miocárdica	Cardiomiopatía restrictiva y/o Cardiomiopatía dilatada	Cardiomiopatía restrictiva y/o Cardiomiopatía dilatada
Curso	Normalmente reversibles con la suspensión de Antraciclinas	Puede ser progresiva	Puede ser progresiva

*CT= Cardiotoxicidad, CCP= Cardiotoxicidad Crónica Progresiva,

Modificado de Franco, (2011)

La forma crónica se manifiesta como depresión miocárdica y ocurre después del año de haber acabado el tratamiento con antracíclicos. 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 (Cárdenas,2009). Provocando miocardiopatía dilatada, exceso de poscarga, y la reducción de la presión arterial sistólica y diastólica. Anteriormente se encontró en 8 años de seguimiento, que los sobrevivientes de cáncer infantil quienes recibieron una dosis acumulada de doxorubicina menor de 300 mg/m² presentaban una fracción de acortamiento y

dimensión normal del ventrículo izquierdo. Desafortunadamente, los datos actuales revelan que incluso los pacientes que recibieron menor dosis acumulada, incluso tan bajos como 45 mg/m^2 , a la larga experimentan anomalías cardíacas, incluyendo reducción significativa de la masa y dimensión ventricular izquierda (Steven, 2005).

Es importante considerar que la distinción entre toxicidad cardíaca aguda y crónica puede ser artificial, 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 (Cárdenas, 2009).

Diversos estudios sugieren que la apoptosis de miocitos se relaciona con un aumento de estrés oxidativo, causado por estos procesos, sin embargo, se debe tener en cuenta que los miocitos cardíacos no aumentan en cifras globales después de el período postnatal, debido a su capacidad muy limitada, cualquier pérdida adicional se traduciría en una reducción permanente de su número, una mayor dependencia de los mecanismos de adaptación y el aumento de la vulnerabilidad en la pérdida normal de células (Smith, 2010).

Una explicación es el daño al miocardio por la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), secundario al ataque óxido-reducción de diversas oxidasas que reducen, a la antraciclina en su porción quinona (el anillo C del grupo tetracíclico), tal como se observa en la figura 3. Diversos sistemas de óxido-reducción ceden un electrón al grupo quinona, convirtiéndolo en radical libre semiquinona. Para regenerar la molécula original se reduce el oxígeno molecular para tomar otro electrón que reconstituya la quinona, dejando al oxígeno en forma de superóxido; es decir, un átomo de oxígeno cuyo último orbital contiene un electrón no apareado. La conversión en semiquinona le confiere a la molécula de antraciclina capacidades oxidantes, formando a su vez cuerpos reactivos que oxidan diversas biomoléculas de las estructuras celulares aledañas, especialmente las membranas (lipoperoxidación). La producción de aniones superóxido activa la cascada nitro-oxidativa, en la que un anión oxida al óxido nítrico para formar peroxinitrito (ONOO^-), agente biológico potente que es utilizado por animales inferiores como bactericida, el cual genera ácido peroxinitroso (HONOO^-) que, por un lado forma radicales oxidrilo (OH^\cdot) y, por otro, crea compuestos nitrogenados como el dióxido de nitrógeno (NO_2) que ataca las

proteínas (nitrosación), afectando de ese modo todas las estructuras celulares. Sin embargo, el organismo posee mecanismos de defensa contra la generación excesiva de ERO. Una primera línea de enzimas antioxidantes, la dismutasa del superóxido (SOD) convierte al superóxido en peróxido de hidrógeno, que ya no es radical libre, pero sigue siendo un compuesto oxidante. Por tanto, una segunda línea de enzimas antioxidantes, la catalasa (producida fundamentalmente en los peroxisomas) y peroxidasa del glutatión reducida (GSH), convierte finalmente el peróxido en agua y oxígeno molecular. Esta peroxidasa es inhibida por la acción de antraciclinas, y como el miocardio es particularmente pobre en catalasas, la defensa contra el estrés nitro-oxidativo es menos efectiva, lo que explica que el daño tóxico de fármacos se manifieste, sobre todo, en el miocardio y no en otros órganos (Meaney, 2009).

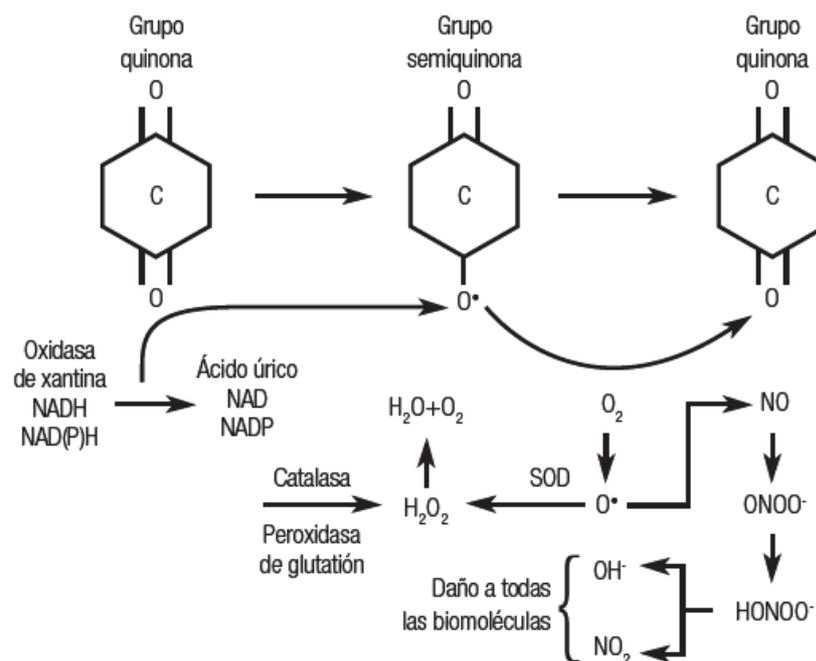


Figura 3. Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) con antraciclinas. NADH, deshidrogenasa del nucleótido de nicotinamina y adenina; NADP(H), forma fosfatada de la anterior; SOD, dismutasa del superóxido; ONOO⁻, peroxinitrito; HONOO⁻, ácido peroxinitritoso; OH⁻, radical oxidrilo; NO₂, dióxido de nitrógeno. Modificado de Meaney (2009).

Una de las mayores dificultades del tratamiento en la práctica clínica es la respuesta individual a las drogas, ya que mientras que en algunos individuos son seguras, en otros pueden ocasionar efectos adversos de diferente magnitud (Sookoian, 2004).

Es bien sabido que tanto el tipo, como la intensidad de la terapia y la edad del paciente en tratamiento son factores importantes, en la supervivencia global, como en la frecuencia de los efectos tardíos de la terapia (Mertens, 2001), sin embargo la farmacogenómica tiene el potencial para mejorar la seguridad de fármacos, como las antraciclinas (Ross, 2011), ya que la resistencia a la quimioterapia y la toxicidad de los agentes específicos son determinados en gran medida por los sistemas enzimáticos (vía metabólica del fármaco administrado), a pesar de los muchos factores clínicos (por ejemplo la edad, la función del órgano, la biología del tumor, medicación concomitante, etc.), las diferencias genéticas en el transporte de fármacos contribuyen a la diferencia de los resultados del tratamiento (Zhang, 2011).

Los factores genéticos representan a menudo una parte importante de respuesta a los fármacos. En muchos casos, una de las principales determinantes de la toxicidad de los medicamentos es la concentración de un agente en el sitio de destino de fármacos o en el plasma. La concentración efectiva de un medicamento depende de su absorción, distribución, metabolismo y eliminación. Las variaciones genéticas en el metabolismo del medicamento, las enzimas y los sistemas de transporte de fármacos pueden dar lugar a grandes diferencias en la exposición al fármaco entre los individuos, teniendo como resultado toxicidad o un tratamiento farmacológico eficaz en un número significativo de pacientes (Ross, 2011).

La farmacogenética estudia de qué manera el perfil genético de un individuo afecta la respuesta a las drogas y pretende ajustar las dosis y predecir, a través de la asociación entre la respuesta farmacológica y las variantes genéticas, cuáles pacientes serán beneficiados y cuáles no, con el uso de un fármaco, ya que las diferencias genéticas condicionan la farmacodinamia y la farmacocinética de los mismos (Sookoian, 2004). El objetivo de la Farmacogenómica es evitar las reacciones adversas a los fármacos y maximizar la eficacia de éstos para los pacientes individualmente (Ross, 2011). En este punto vale la pena aclarar que la diferencia entre Farmacogenética y Farmacogenómica es, simplemente, la incorporación de técnicas, como los microarreglos, chips o matrices de ADN, que permiten evaluar un gran número de variantes genéticas simultáneamente (Sookoian, 2004).

Centrándose en la definición de las diferencias individuales en respuesta a un tratamiento farmacológico (Checa, 2007), es posible relacionar la presencia de variaciones en el ADN humano, entre las que se encuentran los polimorfismos de nucleótido único (SNP, del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*) (Sookoian, 2004), que presentan sustitución de una base por otra y son considerados como tal cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es superior al 1%, dando variación alélica entre individuos.

En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo “silvestre” y alelo mutante, clasificación basada en la frecuencia observada en las poblaciones. Debido a que los humanos son diploides, un individuo puede tener uno de tres genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto, u homocigoto para el alelo menos frecuente. Los polimorfismos genéticos pueden ser usados como marcadores para ayudar a esclarecer ciertos patrones y/o procesos biológicos (Checa, 2007).

Debido a que existen varios pasos que son influidos por factores genéticos, por ejemplo, polimorfismos en las enzimas que metabolizan tanto el fármaco como sus productos (Sookoian, 2004), el metabolismo de xenobioticos a través de vías enzimáticas, incluyendo la activación en compuestos electrofílicos por reacciones de fase I, seguido de conjugación en la fase II y la preparación de compuestos para su excreción (Voso, 2008). Desde 1950 se conoce la existencia de “metabolizadores rápidos” y “metabolizadores lentos” en respuesta a un fármaco, causando respectivamente que el fármaco sea ineficaz o resultar en una exagerada acumulación del mismo en el organismo. Es así como los genes que codifican para las enzimas que metabolizan las drogas pueden afectar la reacción individual de los pacientes (Sookoian, 2004).

Existen varios genes candidatos en la vía de metabolismo de Doxorubicina (Figura 4) entre ellos Carbonil Reductasa 3 (CBR3) y Glutation S-Transferasa (GSTP1).

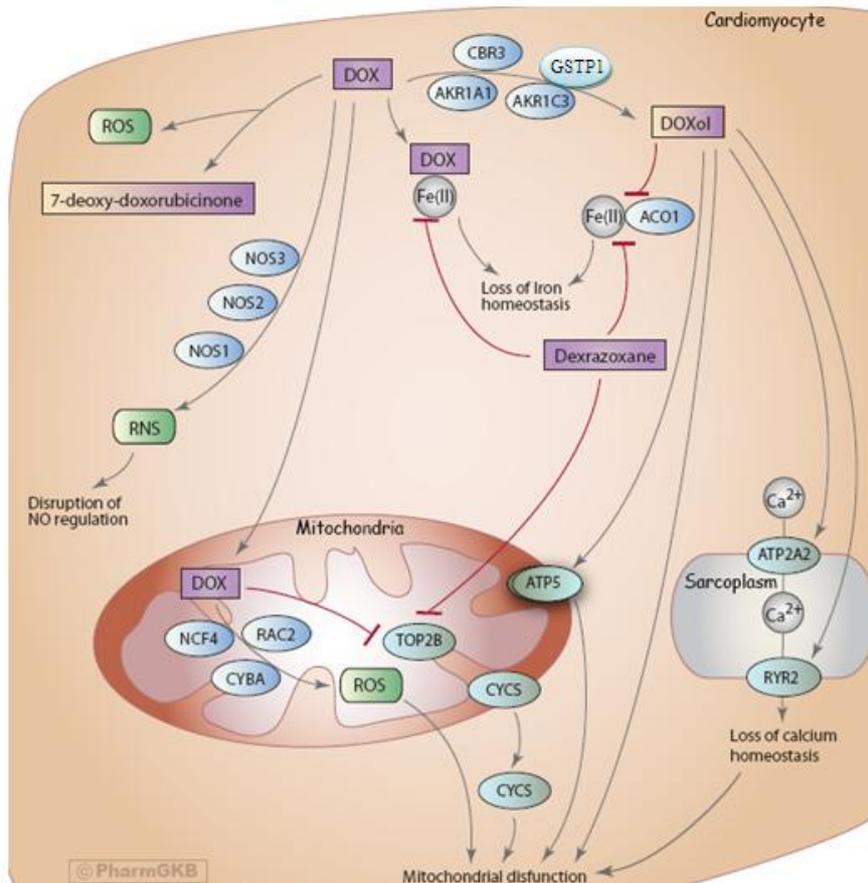


Figura 4. Genes candidatos en la vía de metabolismo de Doxorubicina (Thorn, 2010)

Glutación S-transferasa (GST), es una superfamilia de enzimas diméricas metabólicas en fase II, que juegan un papel importante en el sistema de defensa celular (Zhang, 2011). Funcionan como enzimas, que catalizan la conjugación de glutatión que resulta en la desintoxicación de medicamentos contra el cáncer y protección de la célula contra el estrés, peroxidación de lípidos y ácidos nucleicos (Voso, 2008; Kanai, 2006, Zhang, 2011). Las isoenzimas GST, pueden acelerar la desintoxicación o aumentar la resistencia a medicamentos. Por otro lado, la reducción de la actividad enzimática no sólo puede determinar la desintoxicación eficiente y una mayor actividad de los fármacos, además del daño prolongado a células madre, dando lugar a tumorigénesis secundaria (Voso, 2008).

En eucariotas, hay tres grupos principales de GST: GST citosólica, GSTs mitocondrial, y GST microsomal. El GST citosólica son el grupo más grande y se han estudiado más intensamente. Son subunidades homo o hetero-diméricas de alrededor de 25 kDa y constituyen una superfamilia multigénica y se dividen en varias clases: Alpha, Delta, Epsilon, Zeta, Theta, Mu, Pi, Sigma, Tau y Omega, designadas principalmente por su estructura primaria (Kanai, 2006).

Glutathión S-transferasa P1 (GSTP1) es un miembro de esta superfamilia citosólica. Estas enzimas catalizan, en la fase II, la conjugación del glutathión de una variedad de xenobióticos electrófilos, incluyendo sustratos que van desde toxinas ambientales y agentes cancerígenos, a los fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer. GSTP1 puede metabolizar y desactivar una serie de medicamentos antineoplásicos. Se ha demostrado que tiene la función no sólo como enzima metabolizadora de fármacos, sino también como un regulador de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). En concreto GSTP1 es un inhibidor de JNK y TRAF2, dando lugar a alteraciones en procesos posteriores en la cascada de señalización, tales como el control del ciclo celular y la apoptosis (Moyer, 2008; Voso, 2008).

GSTP1 se expresa ampliamente en tejidos epiteliales normales humanos. Los cambios genéticos de GSTP1 puede alterar la función de la enzima, ya que la eliminación o mutación de GSTP1, puede estar asociada con menor desintoxicación, en comparación con la enzima codificada por el tipo silvestre (Zhang, 2011).

GSTP1 presenta un polimorfismo de un solo nucleótido con resultado no sinónimo (SNPs) 105Ile>Val, dando lugar a alteraciones en la secuencia codificada de aminoácidos. Este SNP se ha asociado con la variación en el riesgo de cáncer y en la respuesta clínica a la farmacoterapia con antineoplásicos (Moyer, 2008).

Las enzimas Carbonil Reductasas (CBR) son miembros de la familia deshidrogenasas/reductasas. En los seres humanos, hay dos de estos monómeros, Carbonil Reductasa 1 (CBR1) y Carbonil Reductasa 3 (CBR3), que son codificadas por genes diferentes ubicados a 62 kilobases de distancia en el cromosoma 21 (CBR1 y CBR3). CBR metabolizan una amplia gama de compuestos de carbonilo endógenos y xenobióticos, como las prostaglandinas, esteroides y diversos agentes farmacológicos. A pesar del importante papel de CBR en el metabolismo mediador de los fármacos, no ha habido informes sobre las propiedades catalizadoras de CBR3

desde la identificación del gen en 1998. Varios estudios han descrito una amplia gama de la variabilidad interindividual en el metabolismo de los fármacos que son sustratos de CBR. Esta variabilidad en la actividad puede contribuir a la impredecible farmacocinética y farmacodinámica de las antraciclinas en el cáncer de adultos y pacientes pediátricos. Así, se ha identificado un nuevo polimorfismo de un solo nucleótido en CBR3 que codifica para una proteína con cambio de 244V>M es decir presenta un cambio no sinónimo (González, 2006).

De este modo, los polimorfismos en los genes CBR3 y GSTP1, que codifican para estas enzimas, pueden condicionar su habilidad para metabolizar ciertas drogas, causando formas menos activas o inactivas, que impiden eliminar eficientemente los fármacos, en este caso Doxorubicina (Sookoian, 2004).

JUSTIFICACIÓN

La paradoja del desarrollo de medicamentos modernos es que los ensayos clínicos proporcionan pruebas sobre la eficacia y seguridad en el estándar preliminar de las dosis en poblaciones grandes, mientras que los médicos tratan pacientes individuales que a menudo difieren en su respuesta a tratamientos farmacológicos. Algunos pacientes desarrollan alguna reacción severa, poniendo en peligro su vida o bien el efecto se ve disminuido, a pesar de que el medicamento es administrado en una dosis normal recomendada. Las consecuencias debilitantes y mortales de los efectos adversos a los medicamentos son un problema importante en la medicina moderna (Ross, 2011). Por lo anterior, el conocimiento de los SNPs, así como la comprensión de sus implicaciones funcionales, pueden contribuir a los estudios epidemiológicos, de la mecánica y de la participación de los diferentes genes, en la variación de la carcinogénesis, así como respuestas individuales en la terapia con medicamentos antineoplásicos (Moyer, 2008).

Los efectos cardíacos causados por el tratamiento del cáncer suelen producirse demasiado tarde para permitir el ajuste de la dosis entre los ciclos de quimioterapia, pero sí la sensibilidad individual de los pacientes se pudiera definir antes del tratamiento, la modificación de las dosis futuras podrían hacerse no sólo para reducir la exposición a antraciclina en individuos de alto riesgo, sino también para permitir con seguridad una mayor exposición en los individuos con bajo riesgo de toxicidad (Smith,2010). Hasta el momento no existe ningún estudio en nuestro medio que haya

evaluado marcadores genéticos asociados a la toxicidad relacionada a doxorubicina, entre ellas destaca la toxicidad cardíaca como la de mayor importancia por su frecuencia e intensidad.

OBJETIVOS

General

Determinar la asociación entre los polimorfismos de los genes CBR3/GSTP1 y la toxicidad relacionada a doxorubicina en niños mexicanos con cáncer.

Primario

Determinar la asociación entre los polimorfismos 13444G>A y 313G>A, de los genes CBR3 y GSTP1 respectivamente, con el grado de cardiotoxicidad aguda relacionada a doxorubicina en niños mexicanos con cáncer.

Secundario

Determinar la asociación entre los polimorfismos 13444G>A y 313G>A, de los genes CBR3 y GSTP1 respectivamente, con el grado de mielotoxicidad y mucositis relacionadas a doxorubicina en niños mexicanos con cáncer.

HIPOTESIS

1. Si las variantes alélicas A de los polimorfismos de interés se asocian con cardiotoxicidad entonces los niños mexicanos con cáncer con estas variantes que reciben doxorubicina presentaran mayor grado de cardiotoxicidad.
- 2.- Si las variantes alélicas A de los polimorfismos de interés se asocian con mielotoxicidad entonces los niños mexicanos con cáncer con estas variantes que reciben doxorubicina presentaran mayor mielotoxicidad.

MATERIALES Y METODOS

Población de Estudio

Población objetivo

Niños mexicanos con cáncer que reciben tratamiento con doxorubicina.

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. Cualquier género
3. Diagnóstico de cáncer
4. Atendidos por el servicio de Oncología del INP
5. Pacientes que vayan a recibir tratamiento antineoplásico con doxorubicina
6. 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 (mayores de 12 años)

Criterios de exclusión

1. Haber recibido tratamiento antineoplásico previo a este estudio con antracíclicos, ifosfamida o ciclofosfamida (estos últimos a dosis mayores a un gramo por metro cuadrado de superficie corporal por curso);
2. Pacientes con diagnóstico de insuficiencia cardíaca previo al inicio del tratamiento con doxorubicina;
3. Pacientes con enfermedades que puedan desarrollar insuficiencia cardíaca como hipertensión arterial sistémica o hipertensión arterial pulmonar;
4. Pacientes que hayan recibido radioterapia en mediastino.

Criterios de eliminación

1. Solicitud de alta voluntaria por parte del padre o tutor responsable o del paciente;
2. Fallecimiento del paciente antes de la evaluación cardiológica;
3. Cambio de protocolo de tratamiento. Los pacientes eliminados por este criterio serán incluidos en el análisis de intención a tratar.

Descripción Operativa del Estudio

Diagnóstico y asignación del tratamiento

Con base en los protocolos de diagnóstico y tratamiento del Servicio de Oncología del INP, los pacientes que ingresaron con diagnóstico presuntivo de cáncer al servicio de oncología para las pruebas confirmatorias fueron candidatos a la invitación para participar en el protocolo. Toda vez confirmado el diagnóstico y planteado el protocolo de tratamiento que requiere el paciente, se formalizó la invitación con la firma de un consentimiento informado expreso para el estudio a los pacientes que recibieron doxorubicina. La asignación del tratamiento fue bajo el seguimiento de los esquemas de tratamiento protocolizados por el Servicio de Oncología, designados para cada neoplasia en particular, después del diagnóstico definitivo. Se consideraron aquellos pacientes que recibieron doxorubicina como parte del esquema antineoplásico.

Evaluación de la toxicidad

Se realizó una base de datos, con información que permitirá la evaluación de la sintomatología clínica del paciente, a lo largo de su tratamiento, en la cual se incluyeron: nombre del paciente, número de expediente clínico, sexo, edad al diagnóstico (meses), tipo de neoplasia, número de ciclos de Doxorubicina, dosis total de Doxorubicina, genotipo, fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), reporte de electrocardiograma (de interés son los datos compatibles con insuficiencia cardíaca), grado de cardiotoxicidad, tiempo para el desarrollo de cardiotoxicidad desde el diagnóstico, mielotoxicidad (de interés son la cuenta de plaquetas, hemoglobina, leucocitos, neutrófilos y linfocitos), grado de mucositis y otros efectos secundarios potencialmente relacionados con Doxorubicina.

Obtención y almacenamiento de la muestra.

Las muestras que se obtuvieron para el estudio fueron de sangre periférica, las cuales se tomaron del catéter del paciente o por punción directa de vena periférica, con técnica y material estériles. Se colocó la muestra en un tubo vacutainer que contenía ácido etilen-diaminotetra-acético (EDTA) como anticoagulante, bajo condiciones asépticas; la cantidad de muestra requerida fue de 3ml en cada paciente. El Buffy coat de la muestra se obtuvo mediante gradiente de densidad por centrifugación y se almacenó en refrigeración a -20°C hasta que se realizó la purificación del DNA.

Purificación del DNA

Se purificó el DNA por medio de un kit de extracción y purificación de ácidos nucleicos, kit QIAamp DNA Blood Midi (Qiagen, Valencia, CA) utilizando columnas con membranas de afinidad, conforme al protocolo recomendado por la casa comercial.

Cuantificación del DNA

Se utilizó un 1µl de muestra del DNA para ser cuantificada por espectrofotometría Nano Drop ND-1000 (Technologies, Inc), con lectura de 260-280nm con una alta reproducibilidad y eficacia, no fue necesario hacer diluciones ya que puede medir muestras de altas concentraciones.

Medición de la integridad del DNA

Se comprobó 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, esperando una banda de 3000kb.

Análisis de polimorfismos

Para la identificación de polimorfismos se realizó una técnica de amplificación PCR-RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*), donde se utilizaron primers diseñados para cada polimorfismo (primer reverse y primer forward).

La base nucleotídica en la cual se produce el cambio se marca en negrita dentro de las siguientes secuencias:

Para el polimorfismo 13444G>A del gen CBR3. (*refSNP ID:rs1056892*) se utilizó la siguiente secuencia para el diseño de los primers: GGAAAGACAGCATCAGGACT**ATGGAGGAGGGGGCTGAGACCCCTGTCTACT**, cada mezcla de reacción de 25µL contenía 50ng de DNA, agua libre de nucleasas, 50pmol de cada primer, 5U de AmpliTaq DNA polimerasa, 250µM de cada deoxinucleotido-5´trifosfato. Las condiciones para la amplificación consistieron en la desnaturalización a 92°C por 5 minutos, 40 ciclos de 92°C por 30 segundos, 50°C por 40 segundos y 70°C por 50 segundos, con una extensión final de 70°C por 10 minutos (se buscaron las condiciones más adecuadas para la reacción). El producto de amplificación que corresponde a 161pb se analizó en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. Para la Restricción se utilizó la enzima Taa-L y se analizaron sus productos (banda de 115 y 46pb) en un gel de Agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio.

Para el polimorfismo 313G>A del gen GSTP1 (*refSNP ID: rs41462048*) se utilizó la siguiente secuencia para el diseño de los primers: GAGGACCTCCGCTGCAAATAC**ATCTCCCTCATCTACACCAACTATGTGAGCA**, la mezcla de reacción de 25µL contenía 50ng de ADN, agua libre de nucleasas, 50pmol de cada primer, 5U de AmpliTaq ADN polimerasa, 250µM de cada deoxinucleotido-5´trifosfato. Las condiciones para la amplificación consistieron en la desnaturalización a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 70°C por 10 minutos y 2 ciclos de 94 °C por 1min. 55°C por 30seg y 72°C por 10min (se buscaron las condiciones más adecuadas para la reacción). El producto de amplificación que corresponde a 177pb se analizó en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. Para la Restricción se utilizó la enzima Tai-L, y se analizaron sus productos (bandas de 139 y 38pb), en un gel de Agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio.

Se visualizaron también por medio de un sistema de electroforesis nanocapilar utilizando el Bioanalizador, Agilent Technologies, para corroborar los resultados de las digestiones.

Análisis Estadístico e Interpretación de Datos

Se utilizó estadística descriptiva, con medidas de tendencia central y dispersión, para enlistar las características de la población en estudio y definir el tipo de distribución de los datos analizados con pruebas de normalidad. Para el caso de variables que no presentaron una distribución normal se realizaron pruebas de normalización. Se describieron las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de interés en la población estudiada. Utilizamos pruebas de X^2 para determinar la asociación genotipo – fenotipo.

Estimación del Tamaño Muestral

Para estimar el tamaño muestral se utilizaron las frecuencias genotípicas descritas en la literatura. Para el caso de la variante en el gen CBR3 se describe las frecuencias genotípicas para la población mexicana en el reporte de Sukhwinder et al. (Tabla 3), utilizando la fórmula para el cálculo con proporciones el tamaño muestral calculado fue de 30. Por otro lado, Rocha et al. reporta las frecuencias genotípicas para la variante 313G>A del gen GSTP1 en población norteamericana, que incluía población hispana. Utilizamos el mismo abordaje para la estimación del tamaño muestral, asumiendo una distribución semejante de dichas frecuencias en nuestra población, con un valor alfa de 0.01, un valor beta de 0.80, a una cola, el resultado fue de 70 casos. Por lo tanto, el tamaño muestral mínimo a considerar resultó en 80 casos, en números cerrados. En un contexto más apegado a la realidad y al diseño metodológico propuesto, el tamaño muestral resultó de la selección de casos potenciales y la inclusión sólo de aquellos que contaron con la información requerida, por lo que se limitó a 27. Reconociendo una limitante importante del diseño, que se describe como "análisis de supervivientes", lo cual implica la potencial pérdida de los casos más graves para la variable de insuficiencia cardíaca.

Tabla 3. Distribución de genotipos CBR3 244V>M en DNA humano por poblaciones.

Grupo Étnico	n	G/G	G/A	A/A	G	A
Africanos Norte del Sahara	7	1(14.3)	4(57.1)	2(28.6)	0.43	0.57
Africanos 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)	0.55	0.45
Islas del Pacífico	7	6(85.7)	1(14.3)	0(0.0)	0.93	0.07
Sur-Americanos Andes	10	6(60.0)	3(30.0)	1(10.0)	0.75	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

Descripción operativa de las variables

- La dosis de doxorrubicina 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 G/A, 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.
- La toxicidad por mucositis se describe como una variable no numérica categórica con escala de medición de Grado I, Grado II, Grado III, Grado IV.
- La mielosupresión se describe como una variable no numérica categórica con escala de medición de grado I, grado II, grado III, grado IV.

Consideraciones Éticas

Se utilizaron cartas de consentimiento y asentimiento informados con apego a la Ley General de Salud, la Conferencia Internacional de Armonización y las Buenas Prácticas Clínicas, para contar con el permiso del paciente y/o su tutor para el análisis de las muestras requeridas.

Aseguramos 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 fue sometido y aprobado 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 el apartado de Anexos.

Consideraciones de Bioseguridad

El desarrollo del experimento se apegó a los estatutos de la Ley Federal de Salud en materia de Bioseguridad. Para la toma de muestras se utilizó material estéril y desechable, con contenedores adecuados al tipo y cantidad de muestra requerida. Durante los experimentos se consideró 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 utilizó. Así mismo el desecho de los residuos tóxico-biológicos y del material punzocortante se realizó en contenedores específicos para cada tipo de residuos.

RESULTADOS

Se incluyeron 44 pacientes con cáncer que fueron atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría. Previo consentimiento informado, se obtuvieron muestras de sangre periférica que fueron procesadas para obtener DNA. Los resultados del proceso de purificación se muestran en la tabla 4. En resumen, obtuvimos una concentración media de 58.20ng/μL, con una relación 260/280 promedio de 1.85, determinados en el espectrofotómetro NanoDrop 1000. Utilizamos 27 muestras (61.3%), debido a que descartamos aquellas que, tras la revisión del expediente clínico, no contenían los datos necesarios para el análisis acorde con los criterios de inclusión, sin embargo, esas muestras servirán para el acervo del Banco de Tejidos Neoplásicos del Laboratorio de Oncología Experimental, para futuros proyectos.

Tabla 4. Concentración de DNA y relación 260/280, obtenido a partir de muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer.

Muestra	ng/μL	260/280
1	18.1	1.66
2	267.1	1.65
3	91.9	1.92
4	38.1	1.85
5	49.5	1.86
6	62.7	1.88
7	22.9	1.81
8	26.1	1.93
9	28.1	1.95
10	51	1.92
11	81.3	1.84
12	154.2	1.89
13	76.8	1.92
14	36.2	1.87
15	95.6	1.87
16	19.8	2.46
17	58.9	1.83
18	15.7	1.62
19	128.7	1.89
20	27	1.78
21	44.2	1.87
22	19.9	1.77
23	58	1.86
24	15	1.75
25	34.2	1.8
26	26.6	1.89
27	24	1.67

Las características clínicas de la población de estudio se describen en la Tabla 5. Del total de los pacientes, 17 (62%) fueron del género masculino y 10 (37%) género femenino, la edad promedio al diagnóstico fue de 89 meses. Los tipos de neoplasias encontradas fueron: Rabdomyosarcoma 5 (18%), Leucemia Aguda Linfoblástica 4 (14%), Osteosarcoma 4 (14%), Linfoma de Hodgkin 3 (11%), Linfoma de Burkitt 2 (7%), Nefroblastoma 2 (7%), Carcinoma tímico 1 (3%), Hepatoblastoma 1 (3%), Hepatocarcinoma 1 (3%), Linfoma cutáneo 1 (3%), Pancretoblastoma 1 (3%), Sarcoma de Ewing 1 (3%) y Sarcoma no Rabdo 1 (3%). El número de ciclos en promedio por quimioterapia fue de 4.14 (Min 2, Max 12). La dosis promedio de Doxorubicina fue de 143.14mg/ m², con un intervalo de 30mg/m² a 300mg/m². Los datos de Insuficiencia Cardíaca (IC) determinados por el ecocardiograma fueron: 3 (11%) pacientes presentaron datos de FEVI menor al 50%, mientras que 24 (88%) no presentaron ninguna alteración en el ecocardiograma. Los datos de Mielotoxicidad (MT) corresponden a 7 (25%) pacientes con grado I (GI), 6 (22%) con grado II y 14 (51%) con grado III. Observamos mucositis en 6 (22%) pacientes presentaron grado I (GI), 1 (3%) paciente grado II (GII), 8 (29%) grado III (GIII) y 2 (7%) grado 4 (GIV), en 10 (37%) pacientes fue ausente (G0). En 24 (88%) pacientes se reportó el ingreso a Urgencias por presentar taquicardias, síntoma potencialmente relacionado con el tratamiento quimioterapéutico, algunos casos asociados a fiebre.

Tabla 5. Características clínicas de la población en estudio.

Característica	Total	% / min-max
Género	M 17	62%
	F 10	37%
Tipo de Neoplasia		
Carcinoma tímico	1	3%
Hepatoblastoma	1	3%
Hepatocarcinoma	1	3%
Leucemia Aguda Linfoblástica	4	14%
Linfoma cutáneo	1	3%
Linfoma de Burkitt	2	7%
Linfoma de Hotking	3	11%
Nefroblastoma	2	7%
Osteosarcoma	4	14%
Pancreatoblastoma	1	3%
Rabdomiosarcoma	5	18%
Sarcoma de Ewing	1	3%
Sarcoma no Rabdo	1	3%
Anormalidades en el Electrocardiograma*	No 16	59%
	Si 11	40%
IC. por Ecocardiograma	No 24	88%
	Si 3	11%
Mielotoxicidad	GI 7	25%
	GII 6	22%
	GIII 14	51%
Mucositis	G0 10	37%
	GI 6	22%
	GII 1	3%
	GIII 8	29%
	GIV 2	7%
Edad (meses)	Prom.89	Min 9 Max 209
Dosis	Prom. 143.14	Min 30 Max 300
No. de Ciclos	Prom. 4.14	Min 2 Max 12

*Con datos de Hipertrofia Ventricular Derecha

Se realizó el análisis de integridad de DNA (Imagen 1), posteriormente se realizó la estandarización del protocolo para identificar los SNP's de interés en GSTP1 y CBR3. Se muestra la banda esperada como resultado del amplificado de PCR, correspondiente a 177pb (Imágenes 2, 3 y 4) para el gen GSTP1, además de una clara separación de bandas, acorde con los pesos moleculares esperados como resultado de PCR-RFLP, observando una banda de 177pb para el genotipo homocigoto silvestre G/G, dos bandas una de 139pb y 38pb para el genotipo homocigoto mutante A/A y tres bandas de 177pb, 138pb y 39pb para el genotipo heterocigoto G/A (Imágenes 5 y 6). La banda esperada como resultado de PCR, para el gen CBR3 corresponde a 161pb (Imágenes 7 y 8) y los productos de PCR-RFLP con una clara separación de bandas para el genotipo homocigoto silvestre G/G de 161pb, dos bandas de 115pb y 46pb para el genotipo homocigoto mutante A/A, y tres bandas 161pb, 115pb y 46pb para el genotipo heterocigoto G/A (Imágenes 9 y 10), en todos los casos se incluyó un control negativo. Para corroborar las bandas observadas en los geles de agarosa, se eligieron varias muestras y se observaron en un Bioanalizador, y al compararlas no se presentó ninguna diferencia con las observaciones iniciales (Imágenes 11-15).

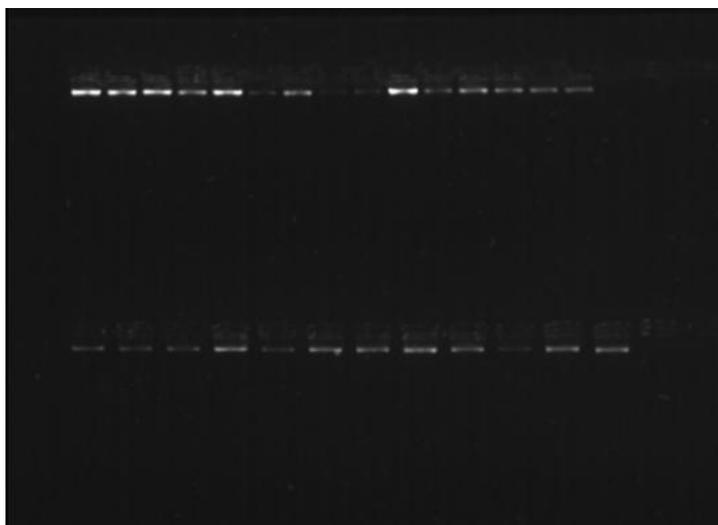


Imagen 1. Análisis de integridad de DNA, en 27 muestras de sangre periférica. Las bandas observadas corresponden a DNA genómico sin evidencia de degradación.

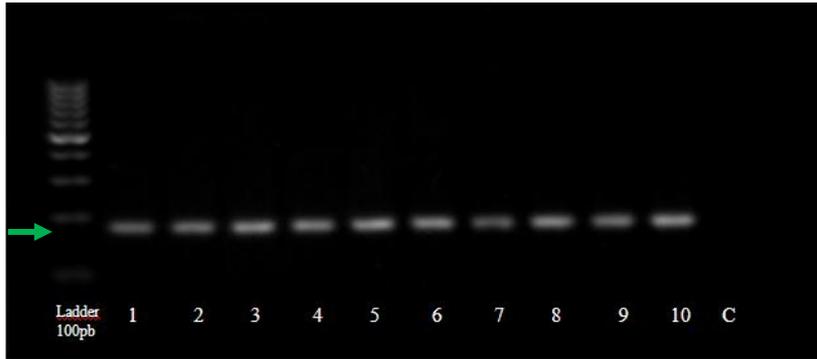


Imagen 2. PCR para la amplificación del gen GSTP1, con un producto de 177pb (flecha verde). Carriles 1 a 10 corresponden a muestras de pacientes y C al control negativo.

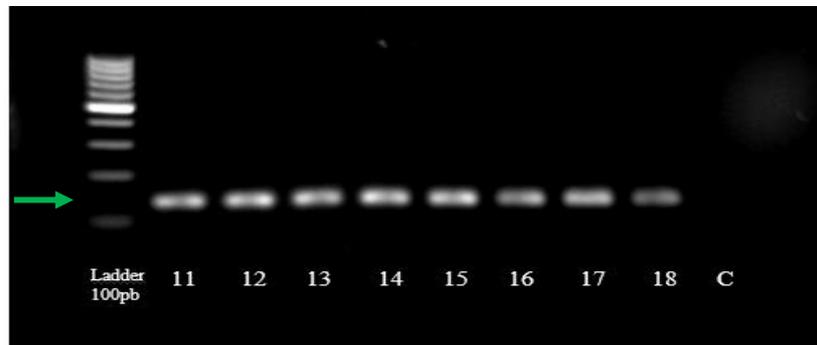


Imagen 3. PCR para la amplificación del gen GSTP1, (banda de 177pb, flecha verde). Carriles 11 a 18 corresponden a muestras de pacientes y C al control negativo.

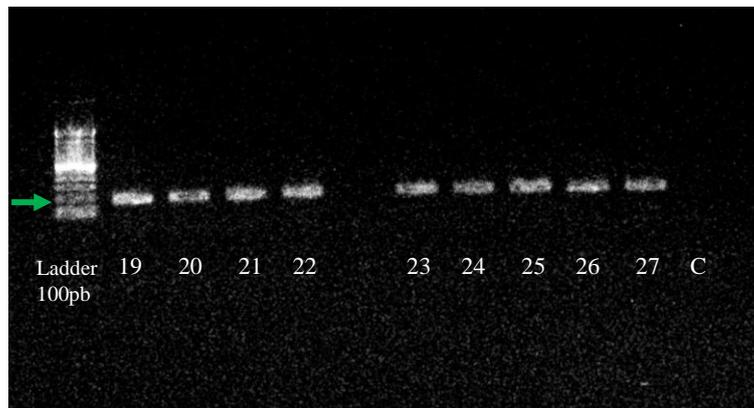


Imagen 4. PCR para la amplificación del gen GSTP1 (banda de 177pb, flecha color verde). Carriles 19 a 27 corresponden a muestras de pacientes y C al control negativo.

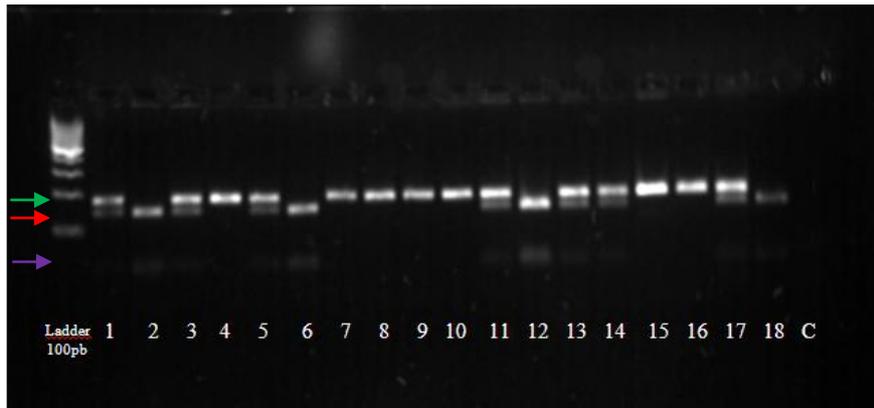


Imagen 5. PCR-RFLP, productos de la restricción del amplicón de 177pb, flecha color verde, en el gen GSTP1 con la enzima Tai-L (banda de 139 flecha color rojo y 38pb flecha color morado). Carriles 1 a 18 corresponden a muestras de pacientes y C al control negativo.

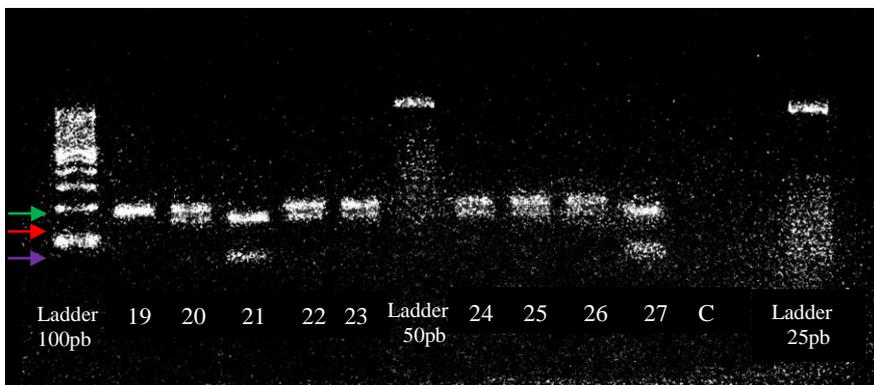


Imagen 6. PCR-RFLP, productos de la restricción del amplicón de 177pb, flecha color verde, en el gen GSTP1 con la enzima Tai-L (banda de 139, flecha color rojo, y 38pb, flecha color morado). Carriles 19 a 27 corresponden a muestras de pacientes y C al control negativo.

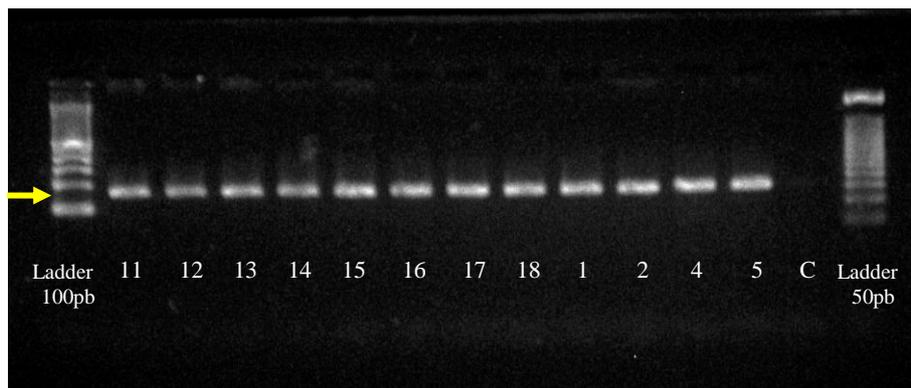


Imagen 7.- PCR para la amplificación del gen CBR3, (banda de 161pb, flecha color amarillo). Carriles 11 a 23 corresponden a muestras de pacientes y C al control negativo.

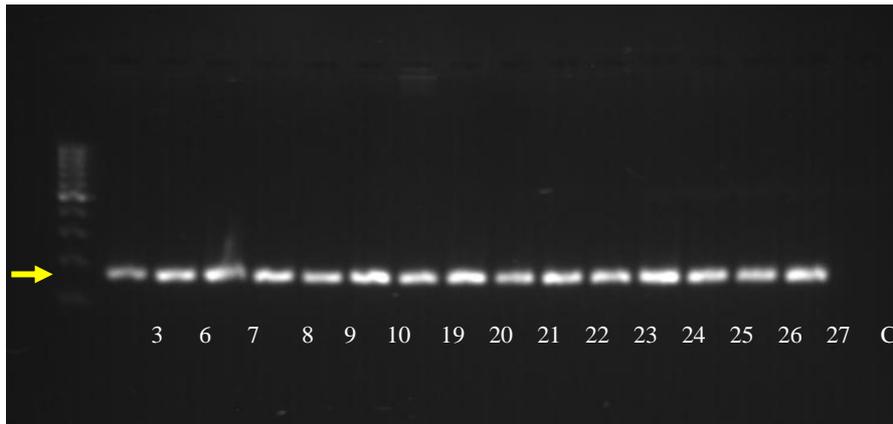


Imagen 8.- PCR para la amplificación del gen CBR3, banda de 161pb (flecha color amarillo). Carriles 3 a 27 corresponden a muestras de pacientes y C al control negativo.

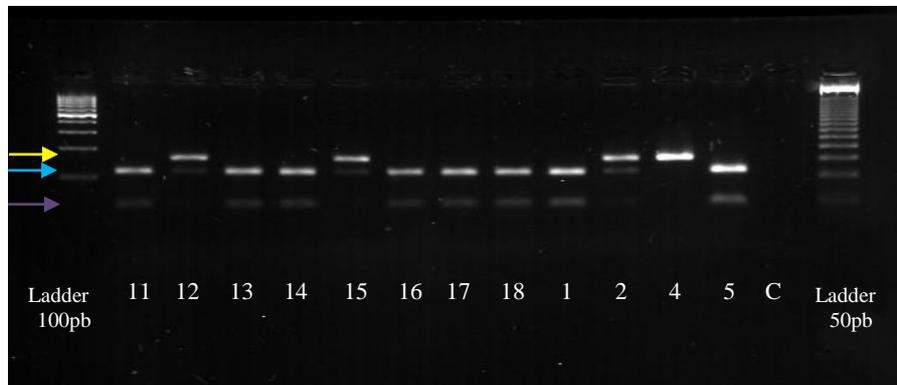


Imagen 9.- PCR-RFLP para la restricción del amplicon de 161pb (flecha color amarillo), de la enzima Taa-L, con productos de 115 (flecha color azul) y 46pb (flecha color morado). Carriles 11 a 23 corresponden a muestras de pacientes y C al control negativo.

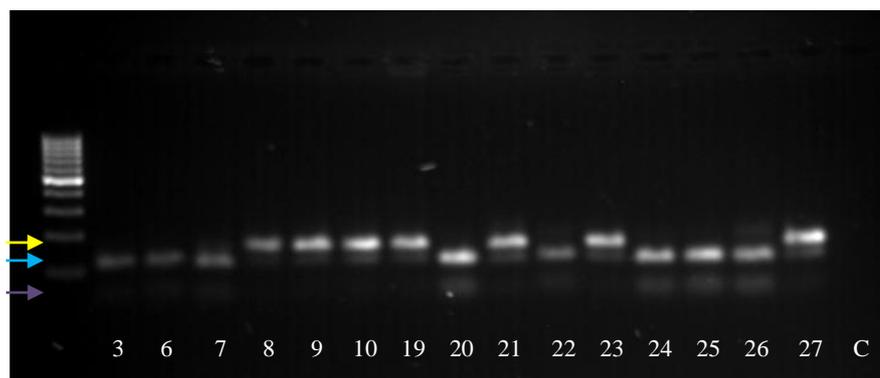


Imagen 10.- PCR-RFLP para la restricción del amplicon de 161pb (flecha amarilla) de la enzima Taa-L, con productos de 115pb (flecha azul) y 46pb (flecha color morado). Carriles 3 a 27 corresponden a muestras de pacientes y C al control negativo.

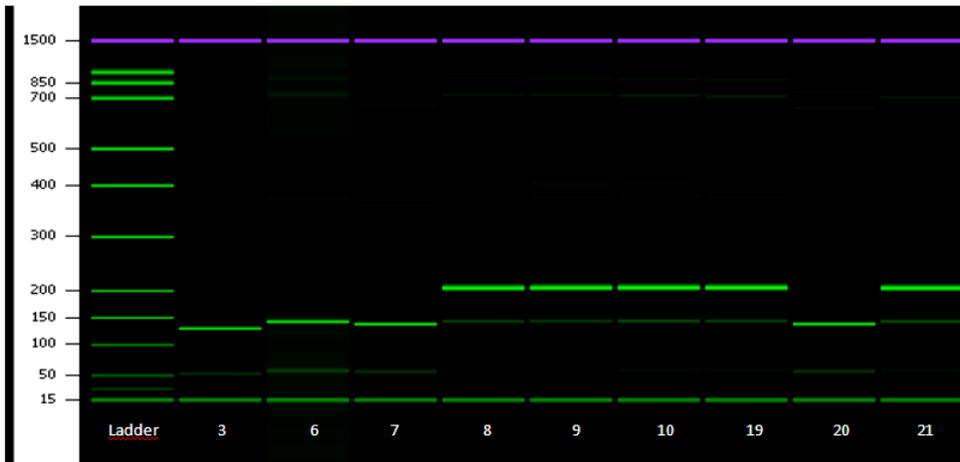


Imagen 11. Imagen de electroforesis nanocapilar en el Bioanalizador. Productos de la restricción del gen CBR3 con la enzima Taa-L. Todos los carriles 3 a 21 corresponden a muestras de pacientes.

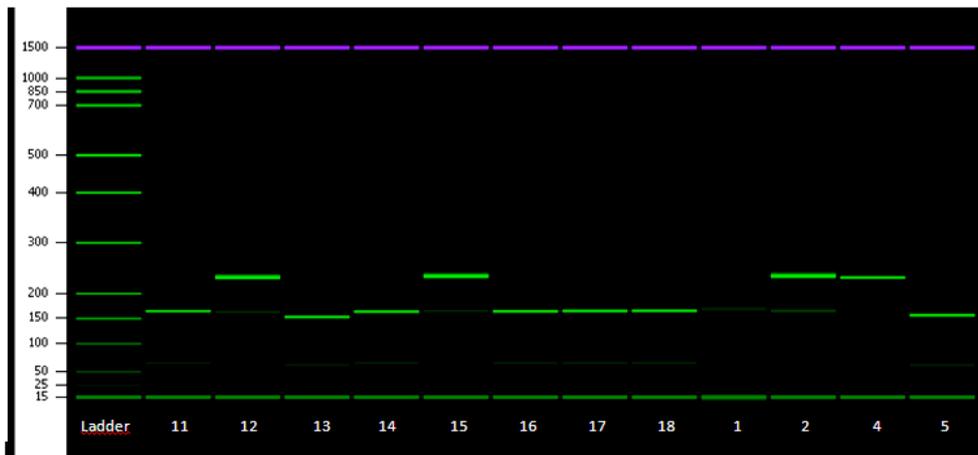


Imagen 12. Imagen de electroforesis nanocapilar en el Bioanalizador. Productos de la restricción del gen CBR3 con la enzima Taa-L. Todos los carriles 11-18, 1-5 corresponden a muestras de pacientes.

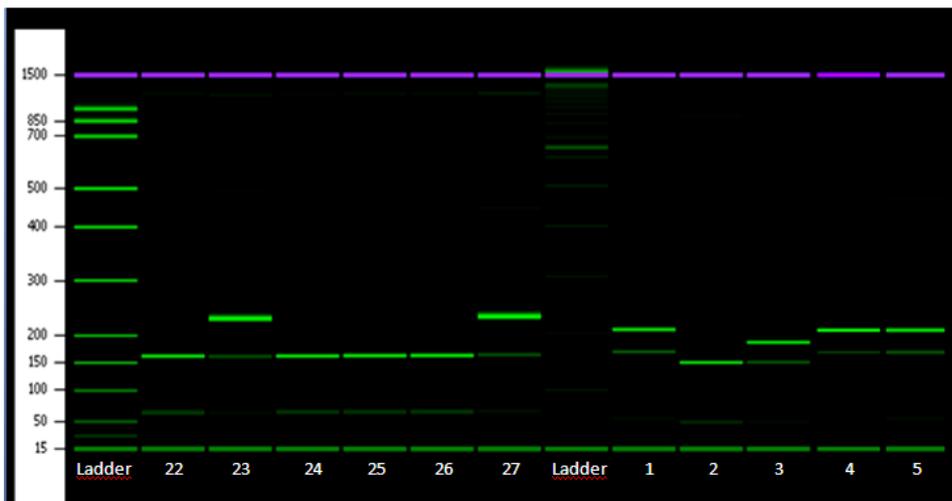


Imagen 13. Análisis por electroforesis con nanocapilares, para corroborar Restricción, en gen CBR3 con enzima Taa-L, 22-27 muestras de pacientes y para el gen GSTP1 con enzima Tai-L 1-5 muestras de pacientes.

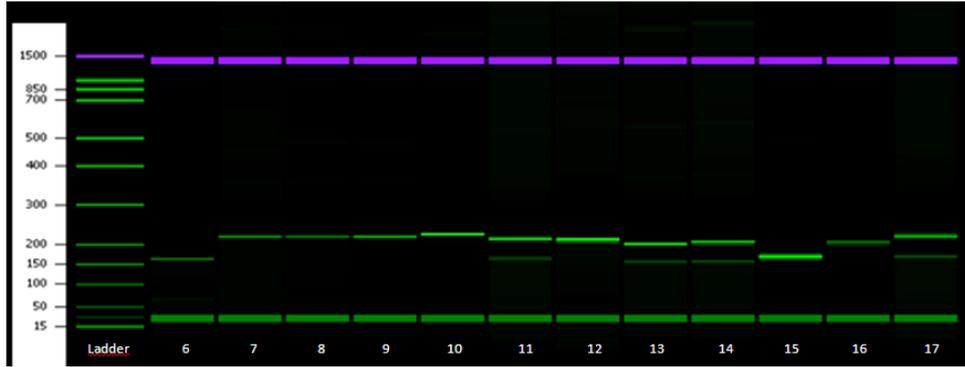


Imagen 14. Análisis para corroborar restricción en gen GSTP1 con enzima Tai-L, en 12 muestras de pacientes, por electroforesis con nanocapilares.

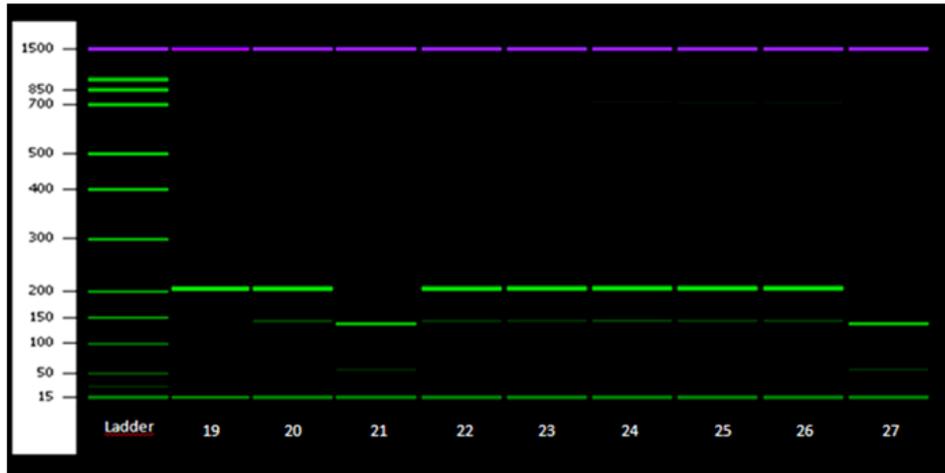


Imagen 15. Análisis para corroborar restricción en gen GSTP1 con enzima Tai-L, en 9 muestras de pacientes, por electroforesis con nanocapilares.

En la población estudiada (n=27) para el SNP 13444G>A del gen GSTP1, 8 individuos (30%) presentaron el genotipo homocigoto silvestre G/G, 13 (48%) el genotipo heterocigoto G/A, y 6 (22%) el genotipo homocigoto mutante A/A. Con base en las frecuencias genotípicas antes anotadas, se calcularon las respectivas frecuencias alélicas, así: 54% para el alelo silvestre G y 46% para el alelo mutante A (Tabla 6). Para el SNP 313G>A del gen CBR3, 1 individuo (4%) presentó 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 mutante A (Tabla 7).

Tabla 6. Frecuencias Genotípica y Alélica del gen GSTP1.

Genotipos GSTP1	GG	GA	AA	TOTAL
No. individuos	8	13	6	N=27
Frecuencias Genotípicas	30%	48%	22%	
Frecuencias Alélicas	Frecuencias del alelo G:54%			Frecuencias del alelo A :46%

Tabla 7. Frecuencias Genotípica y Alélica del gen CBR3.

Genotipos CBR3	GG	GA	AA	TOTAL
No. individuos	1	10	16	N=27
Frecuencias Genotípicas	4%	37%	59%	
Frecuencias Alélicas	Frecuencias del alelo G:37%			Frecuencias del alelo A :63%

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 2 casos presentaron IC, de acuerdo a los datos del electrocardiograma y ecocardiograma, mientras que 14 pacientes no presentaron hallazgos compatibles con IC. Para el genotipo heterocigoto G/A, 1 paciente presentó IC y 9 no. Para el genotipo G/G solo se registró un paciente que no presentó IC. 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 Insuficiencia Cardíaca ($X^2=0.1687$, $p=0.9191$).

Para determinar la relación de los genotipos de interés en el gen CBR3 con mielotoxicidad (MT), se realizó el mismo análisis de X^2 , con lo que observamos el genotipo homocigoto mutante A/A en 3 pacientes con MT grado I, en 3 pacientes con MT grado III y 10 pacientes con MT grado IV. En el grupo de pacientes con el genotipo G/A, 4 presentaron MT grado I, 2 presentaron MT grado III y 4 MT grado IV. El único caso con genotipo G/G presentó MT grado IV. Aún con estos resultados, no existe diferencia significativa entre los tres genotipos al presentar diferentes grados de MT ($X^2=2.4686$, $p=0.6503$).

Para analizar la asociación de estos mismos genotipos del gen CBR3, con mucositis se tomaron los siguientes datos: 5 pacientes con genotipo A/A no presentaron mucositis, 4 pacientes con este mismo genotipo presentaron mucositis grado I, 6 pacientes presentaron mucositis grado III y 1 paciente grado IV. En 4 pacientes con genotipo G/A no se registró mucositis, en 2 pacientes se presentó mucositis grado I, 1 paciente grado II, 2 pacientes presentaron grado III y un paciente presentó grado IV. Para el genotipo G/G, el único paciente registrado no presentó mucositis ($X^2=4.3762$, $p=0.8217$), por lo que no existe diferencia significativa entre los genotipos en relación con el grado de mucositis.

Para el análisis de relación genotipo-fenotipo del gen GSTP1, se tomaron en cuenta los siguientes datos: para el genotipo homocigoto mutante A/A, 1 paciente presentó IC, mientras que 5 pacientes no la presentaron. Para el genotipo heterocigoto G/A, 2 pacientes presentaron datos de IC y 11 no. Para el genotipo G/G se registraron 8 pacientes sin datos IC. 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 Insuficiencia Cardíaca ($X^2=1.4279$, $p=0.4897$).

Para determinar la relación de genotipos del gen GSTP1 con mielotoxicidad, se realizó el mismo análisis considerando en los resultados del genotipo homocigoto mutante A/A el registro de 1 paciente con MT grado I, 1 paciente con MT grado III y 4 pacientes con MT grado IV. En el grupo de pacientes con el genotipo G/A, encontramos 3 pacientes con MT grado I, 2 pacientes con MT grado III y 8 pacientes con MT grado IV. De los pacientes con genotipo G/G, 3 pacientes presentaron MT grado I, 3 pacientes grado III y 2 pacientes grado IV. Aunque los heterocigotos predominan en los casos de mielotoxicidad, el análisis estratificado no mostró diferencias significativas

entre los tres genotipos al presentar diferentes grados de mielotoxicidad ($X^2=3.4512$, $p=0.4853$).

Para analizar la relación de estos mismos genotipos con mucositis se tomaron los siguientes datos: 1 paciente con genotipo A/A que no presentó mucositis, 3 pacientes con este mismo genotipo presentaron mucositis grado I, 1 paciente grado II y 1 paciente más grado III. En 4 pacientes con genotipo G/A no se presentó mucositis, en 3 pacientes se observó mucositis grado I, en 5 pacientes mucositis grado III y en 1 paciente grado IV. Para el genotipo G/G, en 5 pacientes no se observó mucositis, en 2 pacientes se observó mucositis grado III y en 1 paciente grado IV ($X^2 =11.0423$, $p=0.1993$), por lo que no existe diferencia significativa entre los genotipos en relación con el grado de mucositis.

DISCUSIÓN

En el presente estudio la dosis máxima registrada fue de $300\text{mg}/\text{m}^2$, por lo que estos pacientes tendrán un riesgo relativo 11.8 veces mayor de presentar posteriormente disminución de la función cardíaca según lo publicado previamente (Rahman, 2007), en comparación con los que están expuestos a dosis menores. Los síntomas principales, en este mismo grupo de pacientes que recibieron la dosis máxima, se presentarán aproximadamente 8 años después de la terapia de acuerdo a lo reportado por Lipshultz y colaboradores en 2008, sin embargo, los demás pacientes aunque recibieron dosis menores pueden presentar alteraciones también, ya que no hay dosis absolutamente seguras de antraciclinas, incluso siendo más bajas de las recomendadas, presentando posteriormente disfunción cardíaca (Lipshultz, 2008). Desafortunadamente, estudios actuales como el de Steven y colaboradores en 2005, revelan que incluso los pacientes que recibieron bajas dosis, $45\text{ mg}/\text{m}^2$, finalmente experimentaron anomalías cardíacas, como la reducción significativa de la masa muscular cardíaca y la dimensión ventricular izquierda.

De los pacientes analizados solo 3 (11%) presentaron una disminución en la FEVI con valores menores a 50%, de acuerdo a los protocolos que indican que una disminución de la FEVI en más de 10 ó 20 puntos porcentuales hasta un valor $<50\%$ o manifestaciones clínicas con signos y síntomas de insuficiencia cardíaca constituyen cardiotoxicidad (Rahman, 2007). Mientras que 24 (88%) no presentaron ninguna alteración en el ecocardiograma, sin embargo se debe tener en cuenta la falta de detección de miocardiopatía temprana progresiva, así como la aparición de casos de toxicidad cardíaca de inicio tardío. Por ello es importante la evaluación y seguimiento con análisis de ecocardiograma y electrocardiograma, ya que el ventrículo izquierdo presenta depresión de la contractilidad inmediatamente después del tratamiento con doxorubicina, pero vuelve a cifras normales durante los próximos seis años, sin embargo después de 6 a 14 años la contractilidad disminuye notablemente. De aquí la importancia de un seguimiento a largo plazo, así como proponer cardiotoxicidad tardía como una prioridad de investigación, en particular con el número de sobrevivientes de cáncer que parecen ser asintomáticos pero que más adelante durante su vida el riesgo de disfunción cardíaca aumenta (Lipshultz, 2008). Además, de acuerdo a lo reportado por Barry y colaboradores en el 2008, muchos pacientes tratados con doxorubicina durante los estudios ecocardiográficos permanecen asintomáticos, presentando miocardiopatía dilatada idiopática pero su tasa de mortalidad a los 7 años después del

tratamiento se acerca al 50%. Por lo tanto, los casos asintomáticos no deben ser considerados con un diagnóstico de benignidad, sólo con más seguimiento podremos entender completamente el curso de la cardiotoxicidad tardía y su adecuado tratamiento.

También se debe tener en cuenta que la Cardiotoxicidad aguda causada por antraciclinas a menudo se presenta durante la terapia como un episodio de disfunción miocárdica reversible. La incidencia estimada de toxicidad aguda clínicamente con síntomas es inferior al 1%. Una semana después de la dosis inicial, la cardiotoxicidad se manifiesta como transitoria encontrando síntomas clínicos de insuficiencia cardíaca, a menudo se presenta taquicardia sinusal que pueden representar inicio de disfunción, en este estudio 24 (88%) pacientes presentaron este síntoma por lo que se reportó el ingreso a Urgencias, esto se debe a que la función cardíaca comienza a deteriorarse y se asocia con la pérdida de miocitos, lo que lleva al adelgazamiento de la pared del ventrículo izquierdo presentando anomalías como disminución en su función, relacionada con poscarga elevada y reducción sistólica (Lipshultz, 2008; Barry, 2008). Esto se debe a alteraciones de la repolarización con prolongación del intervalo QT que puede ser el resultado directo de la quimioterapia inducida por el bloqueo de los canales iónicos (Hong, 2010). Lo anterior se da como consecuencia de los primeros cambios morfológicos que sufre una célula cardíaca, como vacuolización citoplasmática y pérdida miofibrilar secundarias a dilatación del retículo sarcoplásmico, que conducen a la remodelación cardíaca y finalmente la insuficiencia ventricular izquierda con aumento en la probabilidad de muerte. El mecanismo por el cual doxorubicina produce daño miocárdico no se conoce con exactitud, pero parece tratarse de producción excesiva de radicales libres que inducen peroxidación de las membranas de los miocitos y un posterior flujo de calcio intracelular. El oxígeno reactivo, resultado de la formación de doxorubicinol, daña las membranas mitocondriales que pueden conducir a una mayor permeabilidad resultando en el aumento de la sensibilidad de Ca^{2+} , lo que lleva a la disipación del potencial de membrana y la liberación de pre-acumulados de Ca^{2+} . Además, el secuestro de iones libres de calcio lleva al deterioro intracelular de los miocitos individuales alterando el metabolismo de ácidos grasos (Kremer, 2001). El volumen anormal del ventrículo izquierdo y sobrecarga de presión puede conducir a un exceso crónico de la poscarga, lo que resulta en el deterioro contráctil y mal funcionamiento del miocardio (Steven, 2005).

La falta de datos y estudios dentro de los expedientes clínicos, hacen aun más difícil conocer el estado real del paciente, así como la realización de un estudio prospectivo, ya que sin directrices basadas en evidencia para el monitoreo de la función cardíaca durante el tratamiento, los métodos varían ampliamente en protocolo y práctica clínica. Para los niños que reciben tratamiento cardiotóxico, la Asociación Americana de Cardiología recomienda un monitoreo seriado mediante ecocardiografía, incluyendo: ecocardiograma Doppler en modo M o ecocardiografía bidimensional transtorácica, al inicio del estudio y con re-evaluaciones durante el tratamiento (Lipshultz, 2008).

Los datos de mucositis en los que se encuentra representado con mayor número el grado I con 22% y grado III con 29%, se debe a que la mucosa oral está recubierta por una membrana epitelial de rápido recambio y maduración celular que la hace susceptible a los efectos adversos de los agentes citotóxicos, los cuales inevitablemente alteran la integridad de la mucosa bucal y gastrointestinal, la flora microbiana oral, la cantidad y composición de la saliva. Se ha propuesto una hipótesis acerca del mecanismo por el cual se desarrolla la mucositis, basado en cuatro fases: una fase inicial inflamatoria vascular, una fase epitelial eritematosa, una fase ulcerativa o bacteriológica y una fase curativa. Cada fase es interdependiente y es la consecuencia de una serie de acciones mediada por las citocinas, el efecto directo de la droga quimioterapéutica en el epitelio, la flora bacteriana oral y el estado de médula ósea de los pacientes. Además de las complicaciones infecciosas, los pacientes con mucositis pueden experimentar dolor significativo, dificultad para ingerir alimentos y por ende alteraciones del estado nutricional (Zambrano, 2008).

Los síntomas de mielotóxicidad se presentan debido a que los quimioterápicos no actúan exclusivamente sobre la célula tumoral, si no sobre los distintos mecanismos de la división celular, afectando también a las células sanas, especialmente a las que tiene una gran capacidad de replicación o renovación. Así, las células *hematopoyéticas* (células progenitoras de las células sanguíneas) localizadas en la médula ósea, son las más expuestas a esta destrucción, efecto que se conoce como mielosupresión. La mayoría de los quimioterápicos empleados producen la disminución de las células sanguíneas, al actuar sobre la maduración y proliferación de sus células precursoras.

El tiempo y duración de la mielosupresión depende no sólo del esquema quimioterápico (fármacos, dosis, duración, vía de administración), sino que también

del paciente (edad, estado nutricional, funcionamiento de la médula, tratamientos previos, etc.).

En cuanto a las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs de los genes *CBR3* y *GSTP1*, que codifican para estas mismas enzimas, es importante mencionar que no hay estudios que muestren datos en la población pediátrica mexicana. A pesar de que se manejan protocolos de tratamiento semejantes en otros países, no se ha dado el peso adecuado a las diferencias étnicas, considerando que los agentes antineoplásicos son prescritos en dosis similares en poblaciones de diferentes grupos étnicos, sin considerar las diferencias farmacogenéticas y farmacodinámicas entre estas (O'Donnell, 2009).

En humanos, la enzima carbonil reductasa juega un papel importante en el metabolismo de xenobióticos y compuestos endógenos y es posible que los polimorfismos genéticos en *CBR3* sean la clave para determinar la amplia variabilidad interindividual a la respuesta a fármacos. A nivel genético existe gran diferencia entre las poblaciones y se observa en los resultados obtenidos por Sukhwinder y colaboradores en el año 2006 donde determinaron la frecuencia de la variante en los alelos para *CBR3* en muestras de ADN genómico de donantes de hígado de individuos blancos y negros, además de algunas muestras de ADN que representan a los diferentes grupos étnicos (Tabla 3). En comparación con los resultados obtenidos en este trabajo (Tabla 8), Sukhwinder reporta la frecuencia del genotipo G/G en 70% mientras que nuestros resultados muestran 4%; para genotipo G/A de 30% en comparación a nuestros resultados de 37%; y para el genotipo A/A que reportan 0% nosotros encontramos 59%. Las frecuencias en nuestra población son inversas a las reportadas en la literatura, observando con mayor frecuencia al alelo mutante.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas del gen *CBR3*.

Variante de <i>CBR3</i>	Nuestro estudio	Sukhwinder, et. al., 2006
A/A	59%	0%
G/A	37%	30%
G/G	4%	70%

En el presente estudio encontramos que 8 individuos (30%) presentaron el genotipo homocigoto silvestre G/G del gen *GSTP1*, 13 (48%) el genotipo heterocigoto G/A, y 6 (22%) el genotipo homocigoto mutante A/A y las respectivas frecuencias alélicas, así:

54% para el alelo silvestre G y 46% para el alelo mutante A. Si les comparamos con lo reportado por Acosta en el 2006, donde incluye población del Sur-Occidente Colombiano, con frecuencias genotípicas de 37.8% para G/G, 54.4% para G/A y 7.8% para A/A, y las frecuencias alélicas de 65% para G y 35% para A, podemos notar diferencias más notables en el genotipo AA con una frecuencia mayor en nuestro reporte y potencialmente en nuestra población.

En el trabajo de Voso y colaboradores estudiaron a 354 pacientes con Leucemia Aguda Mieloblástica, con un seguimiento de 46 meses. Se reportó en el 30% de los caucásicos la presencia del alelo GSTP1 105Val, asociado con disminución en la actividad enzimática. En este mismo estudio se reporta 11.8% de homocigotos para el genotipo A/A, 40.7% para G/A y 47.6% para G/G. El grupo de pacientes homocigotos A/A presentó una media de recuperación en la cuenta de neutrófilos y plaquetas de doce días, mientras que los heterocigotos y homocigotos para el alelo silvestre la media fue de quince días. La frecuencia en episodios de neutropenia febril, el uso de antibiótico y antifúngico no difiere de acuerdo al genotipo de GSTP1. Reporta también que la incidencia de muerte por toxicidad no varía en función del genotipo de GSTP1.

Estos resultados se pueden comparar con el estudio realizado por Zhang en el 2011 donde reportó para 120 pacientes de China, con cáncer de mama, tratadas con Ciclofosfamida ($600\text{mg}/\text{m}^2$) y Epirubicina ($80\text{mg}/\text{m}^2$), donde las pacientes portadoras de GSTP1 con genotipo heterocigoto G/A y homocigoto G/G, presentan mejor respuesta al tratamiento y menor toxicidad a diferencia de los homocigotos A/A, concluyendo que el genotipo G/G proporciona mayor actividad enzimática.

CONCLUSIONES

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 genotipo homocigoto mutante A/A. Las frecuencias alélicas para el gen GSTP1 son 54% para el alelo silvestre G y para el alelo mutante A 46%.

Para el gen CBR3, las frecuencias genotípicas encontradas son 4% para el genotipo homocigoto silvestre G/G, 37% para el genotipo heterocigoto G/A y 59% para el genotipo homocigoto mutante A/A. Las frecuencias alélicas para el gen CBR3 fueron 37% para el alelo silvestre G y 63% para el alelo mutante A.

No existe diferencia significativa entre los genotipos para el gen CBR3, con respecto a la presencia de Insuficiencia Cardíaca, mielotoxicidad o mucositis. Tampoco existe diferencia significativa entre los genotipos para el gen GSTP1, con respecto a presentar Insuficiencia Cardíaca, mielotoxicidad o mucositis.

Este trabajo sienta las bases para un posterior análisis prospectivo, ya que se establecieron las condiciones adecuadas para el desarrollo de las técnicas de laboratorio, pero se necesita de un seguimiento clínico más estrecho y sistematizado para evaluar de forma más precisa la presencia de cardiotoxicidad en tiempo y magnitud en cada paciente. De tal forma será posible determinar el impacto de estos SNP's en el desarrollo de cardiotoxicidad, para ser considerados como marcadores pronóstico, apoyando las decisiones clínicas en futuros casos y así prevenir desde el inicio del tratamiento este tipo de efectos adversos. Además de sistematizar el registro de otras complicaciones potencialmente relacionadas al tratamiento con doxorubicina, lo que para este trabajo representó una gran dificultad para lograr recabar los datos clínicos necesarios en todos los pacientes. Por otra parte, permitió el trabajo conjunto con el servicio de Cardiología del instituto y el compromiso para desarrollar conjuntamente el diseño prospectivo-proyectivo que requiere este tipo de asociaciones genotipo-fenotipo.

PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos en este estudio y las limitantes que el diseño metodológico que inicialmente se contempló para abordar la problemática de toxicidad relacionada con doxorrubicina, es necesario considerar el diseño metodológico, con una redefinición de las variables operativas, en donde se debe incluir desde la clínica, un tratamiento y seguimiento sistemático para todos los pacientes, 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 con Doxorrubicina, a largo plazo.

LITERATURA CITADA

Acosta, A.M.; Carvajal, S.M.; Hoyos, L.S.; Sierra, C.H. Identificación del Polimorfismo Genético de la Glutathion-S Transferasa P1 en una población del Suroccidente Colombiano. *Ciencias de la Salud*. 2006. Vol. 8(1):30-35

Barry, E.V.; Lipshultz, S.E.; Sallan, S.E. Anthracycline-induced Cardiotoxicity: Natural History, Risk Factors, and Prevention. 2008 American Society of Clinical Oncology. pag 448-453

Cárdenas, C.R. Mecanismos de cardiotoxicidad de la quimioterapia. *Gaceta Mexicana de Oncología*. Publicación Oficial de la Sociedad Mexicana de Oncología. 2009. Volumen 8, Suplemento 3, pag 3-7

Checa, C.M.A. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. 2007. México. Vol. 20 .Núm. 3. pag: 213-221

Fikrat, I.A.; Rivera-Luna, R.; Roitenburd-Belacortu, V. Espinosa-Aguirre, J. Pattern of Childhood Cancer Mortality in Mexico. *Archives of Medical Research*. 2000. Vol. 31:526–531

Franco, V.I.; Henkel, J.M.; Miller, T.L.; Lipshultz, S.E. Cardiology Research and Practice. Cardiovascular Effects in Childhood Cancer Survivors Treated with Anthracyclines. 2011, pag 13

Gonzalez, C.V.; Lakhmana, S.S.; Forrest, M.V.A.; Blanco, R.J.G. Higher activity of polymorphic NAD(P)H:quinone oxidoreductase in liver cytosols from blacks compared to whites. *Toxicology Letters*. 2006. Vol. 164:249–258

González-Rivera, A.; Lucas-Reséndiz, M.E.; Domínguez-Viveros, W.; Rizo-Ríos, P.; Serrano-Sierra, A.; López-Alquicira, M.; Marín-Ojeda, R.; Lombardo-Aburto, E.; Zamora, V. Vigilancia epidemiológica del cáncer en el Instituto Nacional de Pediatría. *Acta Pediatr*ica. 2007. Mexico. Vol. 28(5):203-7

Hong, R.A.; Takeshi, L.D.; Sumida, K.N.; Eager, R.M. Cardio-Oncology/OncoCardiology. *Clinical Cardiology*. 2010.Vol. 33(12): 733–737

Kanai, T., Takahashi, K.; Inoue, H. Three Distinct-Type Glutathione S-transferases from *Escherichia coli* Important for Defense against Oxidative Stress. *Biochemistry Journal*. 2006. Vol.140:703–711

Kevin, C.; Oeffinger, M.D.; Ann, C.; Mertens, P.D.; Charles, A.; Sklar, M.D.; Toana, K. M.S.; Melissa, M.; Hudson, M.D.; Anna, T.; Meadows, M.D.; Debra, L.; Friedman, M.D.; Neyssa, M.M.D.; Wendy, H. C.P.N.P.; Nina, S.; Kadan-Lottick, M.D.; Cindy, L.; Schwartz, M.D.; Wendy, Leisenring; S.D.; Leslie, L.; Robison, P.D. Chronic Health Conditions in Adult Survivors of Childhood Cancer. *Journal of Medicine*. 2006. Vol. 355:1572-82.

Kremer, E.C.; Dalen, M.;Offringa, J.; Ottenkamp, P.A.; Voûte. Anthracycline-Induced Clinical Heart Failure in a Cohort of 607 Children: Long-Term Follow-Up Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2001. Vol 19(1):191-196

Lal, S.; Mahajan, A.; Chen, W.N.; Chowbay, B. Pharmacogenetics of Target Genes Across Doxorubicin Disposition Pathway: A Review. *Current Drug Metabolism*. 2010. Vol. 11:115-128

Lipshultz, S.E.; Alvarez, J.A.; Scully, R.E.; Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Clinical Pharmacology Heart*. 2008. Vol.94:525–533.

Meaney, E.; Meaney, A.; Ceballos, G. 2009. Medición y monitorización del daño cardíaco por antraciclinas. *Gaceta Mexicana de Oncología*. pag 68-67

Mertens, A.C.; Yasui, Y.; Neglia, J.P.; Potter, J.D.; Nesbit, M.E.; Ruccione, K.; Smithson, W.A.; Robison, L.L. Late Mortality Experience in Five-Year Survivors of Childhood and Adolescent Cancer: The Childhood Cancer Survivor Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2001. Vol 19 (13):3163-3172

Minotti, G.; Menna, P.; Salvatorelli, E.A.; Cairo, G.; Gianni, L. Anthracyclines: Molecular Advances And Pharmacologic Developments In Antitumor Activity And Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*. 2004. Vol. 56 (2):72-81

Moyer, A.M.; Salavaggione O.E.; Tse-Yu W.; Moon I.; Eckloff, B.W.; Hildebrandt M.A.T.; Schaid, D.J.; Wieben, E.D.; Weinshilboum R.M. 2008. Glutathione S-Transferase P1: Gene Sequence Variation and Functional Genomic Studies. *Cancer Research*. Vol. 68(12):4791–4801

O'Donnell P.H.; Dolan, M. E. Cancer Pharmacoethnicity: Ethnic Differences in susceptibility to the Effects of Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2009 Vol.15(15): 4806–4814

Rahman, A.M.; Yusuf, S.W.; Ewer, M.S. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *International Journal of Nanomedicine* 2007:2(4) 567–583

Ross, C.J.D.; Visscher, H.; Rassekh, S.R.; Castro-Pastrana, L.; Shereck, E.; Carleton, B.; Hayden, M.R. Pharmacogenomics of Serious Adverse Drug Reactions in Pediatric Oncology. *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology*. 2011. Vol 18 (1):134-151

Sookoian, S.; Pirola C.J. Farmacogenética/farmacogenómica en la práctica clínica. *Medicina*. 2004. Universidad de Buenos Aires. Vol. 64:563-567

Steven, E.; Lipshultz, S.R.; Lipsitz, S.E.; Sallan, V.M.; Dalton, S.M.; Mone, R.D.; Gelber, S.D. Chronic Progressive Cardiac Dysfunction Years After Doxorubicin Therapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2005. Vol. 23:12

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. Vol.33(2):254-257.

Thorn Caroline F, Oshiro Connie, Marsh Sharon, Hernandez-Boussard Tina, McLeon Howard, Klein Teri E, Altman Russ B. "Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects" *Pharmacogenetics and genomics* (2010)

Article:21048526@PubMed

<http://www.pharmgkb.org/do/serve?objId=PA165292163&objCls=Pathway>

Voso, M.T.; Hohaus, S.; Guidi, F.; Fabiani, E.D.F.; Groner, S.S.D.; Doehner G.L.; Doehner, H.S. Prognostic role of glutathione S-transferase polymorphisms in acute myeloid leukemia. *Leukemia*.2008. Vol. 22:1685–1691

Zambrano,O.; Morales, L.; Rojas D.M. Mucositis oral inducida por quimioterapia: efectividad del tratamiento con vitamina E en niños con cáncer. *Ciencia Odontológica*. 2008. Vol.5(2) pag 127-133.

Zhang, B.; Sun, T.; Zhang, B.; Zheng, S.; Lu, N.; Xu, B.; Wang, X.; Chen, G.; Yu, D.; Lin, D. Polymorphisms of GSTP1 is associated with differences of chemotherapy response and toxicity in breast cancer. *Chinese Medical Journal*. 2011. Vol.124(2):199-204

ANEXOS

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL INGRESO AL PROTOCOLO DE ESTUDIO INTITULADO: “ASOCIACION DE DOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES CBR3 Y GSTP1 CON LA TOXICIDAD RELACIONADA A DOXORUBICINA EN NIÑOS MEXICANOS CON CANCER”

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 conocer si existe asociación entre algunos marcadores genéticos y 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 conocer si existe algún marcador genético que pueda estar relacionado con efectos tóxicos principalmente del corazón que puedan estar relacionados con uno de los medicamentos (doxorubicina) del esquema de tratamiento que va a recibir mi hijo(a). Para tal efecto será necesario tomarle una muestra de sangre. 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 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 si existe asociación entre algunos marcadores genéticos y los efectos tóxicos relacionados a la quimioterapia con doxorubicina (adriamicina), ya que es utilizada frecuentemente como parte integral del tratamiento en niños con cáncer, lo cual ayudará a 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 a todos los pacientes que presentan el diagnóstico de un cáncer semejante al de mi hijo (a). Dentro de estos procedimientos se encuentran las muestras de sangre y estudios como ultrasonido, estudios de radiología simple y electrocardiograma, necesarios para el diagnóstico, tratamiento y vigilancia de mi hijo(a). 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 diagnóstico, el tratamiento y el seguimiento serán iguales 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 ni mi nombre ni el de mi hijo (a) serán mencionados en el reporte del estudio.

VIII. DISPONIBILIDAD DE LA INFORMACION

La información de las pruebas diagnósticas (ultrasonido, estudios de radiología simple y electrocardiograma) será notificada inmediatamente por el médico encargado de mi hijo al contar con el reporte del personal encargado de Imagenología del Instituto Nacional de Pediatría. 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 Instituto Nacional de Pediatría. Además permitirá que el laboratorio de oncología experimental del INP 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.

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

Nombre y Firma del Padre o Tutor

Firma del Investigador

Nombre y Firma de Testigo

Nombre y Firma de Testigo

CARTA DE ASENTIMIENTO PARA EL INGRESO AL PROTOCOLO DE ESTUDIO TITULADO: “ASOCIACION DE DOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES CBR3 Y GSTP1 CON LA TOXICIDAD RELACIONADA A DOXORUBICINA EN NIÑOS MEXICANOS CON CANCER”

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 conocer si existe asociación entre algunos marcadores genéticos y los efectos tóxicos relacionados a la quimioterapia con la doxorubicina (adriamicina), ya que es utilizada frecuentemente como parte del tratamiento en niños con cáncer

III. PROCEDIMIENTOS

Estoy informado de que la finalidad del estudio será conocer si existe algún marcador genético que pueda estar relacionado con efectos tóxicos principalmente del corazón que puedan estar relacionados con uno de los medicamentos (doxorubicina) del esquema de tratamiento que voy a recibir. Para tal efecto será necesario tomarle una muestra de sangre. He sido informado que la toma de sangre que se realizará con todas las medidas higiénicas necesarias y con equipo estéril desechable.

IV. BENEFICIOS

Estoy informado que el realizar esta investigación permitirá conocer si existe asociación entre algunos marcadores genéticos y los efectos tóxicos relacionados a la quimioterapia con doxorubicina (adriamicina), ya que es utilizada frecuentemente como parte integral del tratamiento en niños con cáncer, lo cual ayudará a identificar aquellos pacientes que pudiéramos 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 a algún riesgo agregado a los procedimientos diagnósticos y terapéuticos que de rutina se realizan a todos los pacientes que presentan el diagnóstico de un cáncer semejante al mío. Dentro de estos procedimientos se encuentran las muestras de sangre y estudios como ultrasonido, estudios de radiología simple y electrocardiograma, necesarios para el diagnóstico, tratamiento y vigilancia. Las pruebas genéticas de laboratorio que se realicen a la muestra de sangre no implican riesgos o efectos indeseables para mí.

VI. ALTERNATIVA DE RECHAZO

Si yo decido no participar en el estudio, el diagnóstico, el tratamiento y el seguimiento serán iguales 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.

VIII. DISPONIBILIDAD DE LA INFORMACION

La información de las pruebas diagnósticas de imagen será notificada inmediatamente al contar con el reporte del personal encargado del departamento de Imagenología del Instituto Nacional de Pediatría. 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.

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

Nombre y Firma

Firma del Investigador

Nombre y Firma de Testigo

Nombre y Firma de Testigo