

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO "FEDERICO GÓMEZ"

POLIMORFISMO V244M DEL GEN CBR3 Y SU ASOCIACION CON CARDIOTOXICIDAD POR  
ANTRACICLINAS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON NEOPLASIAS MALIGNAS

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALIDAD:

ONCOLOGÍA PEDIATRICA

PRESENTA

DRA. GABRIELA HERNÁNDEZ PLIEGO

TUTOR DE TESIS: DRA AURORA MEDINA SANSON



MEXICO D.F

FEBRERO 2013



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**  
**HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO "FEDERICO GÓMEZ"**  
**DEPARTAMENTO DE HEMATO-ONCOLOGÍA**

**POLIMORFISMO V244M DEL GEN CBR3 Y SU ASOCIACION  
CON CARDIOTOXICIDAD POR ANTRACICLINAS EN PACIENTES  
PEDIÁTRICOS CON NEOPLASIAS MALIGNAS.**

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALIDAD:

**ONCOLOGÍA PEDIATRICA**

PRESENTA:

DRA. GABRIELA HERNÁNDEZ PLIEGO

TUTOR DE TESIS:

DRA AURORA MEDINA SANSON

ASESORES EN BIOLOGÍA MOLECULAR:

ARTURO RAMÍREZ PACHECO M. EN C.

SILVIA SELENE MORENO GUERRERO M. EN C.



MEXICO D.F FEBRERO 2013

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres por ser mi inspiración para superarme, por siempre motivarme, gracias por su tiempo, comprensión, paciencia, su amor infinito, por esforzarse para darme las herramientas, construirme una vida mejor y hacer posible mis sueños.

A mi tía Victoria y abuelo Ricardo por ser mis protectores, enseñarme amar el trabajo, por estimular el ser responsable y el respeto a mis padres.

A Karina mi hermana por ser mi consejera, amiga, una inspiración, por cuidarme y preocuparse por mi bienestar.

A Pablo por ser mi mejor amigo y esforzarse por que siempre me supere.

A Gloria, Malena, Amelia y Mitzuo por su cariño y apoyo incondicional a mi familia.

A la Dra. Aurora Medina Sansón, por permitirme entrar al camino de la Oncología Pediátrica y la Investigación, por la confianza depositada en mí, por su paciencia en cada momento, por darme la oportunidad de convertirme en una mejor estudiante, por su visión, por ser mi maestra y guía.

A mis Maestros de Oncología Pediátrica y amigos por exigirme ser mejor médico, por transmitirme sus conocimientos, experiencias, por sus consejos, por motivarme a ser mejor persona, por transmitirme el amor a esta carrera, por depositar su confianza en mí en situaciones importantes, por ayudarme a ser mejor, por compartir los momentos más intensos de mi vida y por su amistad.

Al equipo de enfermería, laboratorio de Oncología, Inmunofenotipo, biología molecular, gracias por sus enseñanzas, su compromiso con su trabajo, ayuda, consejos, paciencia y amistad.

A Arturo y Selene por abrirme un nuevo panorama a la Investigación, por su dedicación y compromiso con su trabajo, por haber sido parte de este trabajo, muchas gracias.

A todos los médicos y personal del Hospital Infantil de México que han participado en mi formación profesional, de quienes aprendí a valorar el trabajo de cada área, a trabajar en equipo, a mirar los problemas de diferentes ópticas para dar la mejor solución para mayor beneficio de los niños.

Al Hospital Infantil de México por abrirme sus puertas, por convertirse en mi casa en estos dos años de vida profesional, por permitirme ser parte de su historia y sentirme orgullosa de portar su escudo.

A todos los niños y mamás del servicio de Oncología por ser mis maestros, mi inspiración para continuar preparándome y ser una mejor Oncóloga Pediatra, por las sonrisas y tiempo que me regalaron, por haberme hecho una mejor persona, por tenerme paciencia y confianza, les estaré eternamente agradecida.

## Contenido

Índice de Tablas:.....	II
Índice de Anexos:.....	II
ANTECEDENTES .....	1
EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER INFANTIL .....	1
SUPERVIVENCIA Y MORTALIDAD.....	2
MARCO TEÓRICO .....	3
PRINCIPIOS DEL TRATAMIENTO .....	3
QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA.....	3
Clasificación de los Agentes Antineoplásicos y Mecanismos de Acción .....	4
ANTRACICLINAS.....	6
Mecanismo de acción. ....	8
Toxicidad por antraciclinas .....	9
Cardiotoxicidad por Antraciclinas.....	9
CARBONIL REDUCTASA (CBR) .....	15
Carbonil Reductasa 1 (CBR1).....	17
Carbonil Reductasa (CBR3).....	19
JUSTIFICACIÓN .....	21
OBJETIVOS.....	21
HIPÓTESIS.....	22
MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	23
Extracción de ADN:.....	23
Genotipificación del gen CBR .....	23
Reacción en cadena de la polimerasa PCR para el gen CBR3.....	24
Análisis RFLP ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i> ) .....	24
UNIVERSO DE ESTUDIO.....	24
CRITERIOS .....	25
Criterios de Inclusión.....	25
VARIABLES.....	26
PLAN DE ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	26
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	34

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
---------------------------------	----

**Índice de Figuras:**

Figura 1: Estructura química de Antraciclinas .....	7
Figura 2: Estructura de Carbonil Reductasa 3.....	20
Figura 3: Amplificación del Gen CBR3 en donde se observa el producto de 780 pares de bases.....	29
Figura 4: Digestión del producto de PCR del gen CBR3 con la enzima de restricción HypCH4III.....	29

**Índice de Tablas:**

Tabla 1: Mecanismos de Acción y Cardiotoxicidad en Antineoplásicos Toxicidad a Quimioterapia Antineoplásica.....	5
Tabla 2: Condiciones de amplificación estandarizadas.....	28

**Índice de Anexos:**

Anexo 1: .....	40
Anexo 2: .....	42
Anexo 3 .....	44

## POLIMORFISMO V244M DEL GEN CBR3 Y SU ASOCIACION CON CARDIOTOXICIDAD POR ANTRACICLINAS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON NEOPLASIAS MALIGNAS

**RESUMEN: Antecedentes.** La Doxorubicina (DOXO) y Daunorrubicina (DNR) son antraciclina, agentes antineoplásicos de amplio espectro para el tratamiento de diversas neoplasias malignas pediátricas. La cardiotoxicidad es el efecto adverso más importante, presentado con DA mayores a 300 mg/m<sup>2</sup>. La Carbonil Reductasa (CBR) enzima fundamental en su metabolismo, la variación de su actividad es causal de la toxicidad y de la respuesta al tratamiento; sus isoformas son: CBR1 y CBR3, se han identificado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) probablemente relacionados al desarrollo de efectos adversos. El polimorfismo V88I del gen CBR1 analizado *in vitro*, se encontró que el alelo V88 tiene mayor actividad catalítica y altos niveles de metabolitos cardiotóxicos que el alelo CBR1 I88, este depende de la etnicidad de la población analizada. Las variantes alélicas del polimorfismo V244M de la CBR3 se asocian a la reducción de la actividad enzimática *in vitro* a antraciclina que los alelos silvestres. En experimentos de cinética la CBR3 M244 tiene mayor velocidad de reacción que el alelo V244.

**Justificación.** Los polimorfismos V88I de CBR1 y V244M de CBR3, codifican diversas formas de CBR, asociadas con alteraciones de la actividad enzimática y desarrollo de cardiotoxicidad; su identificación podría reducir el riesgo individual de cardiotoxicidad, siendo marcadores genéticos, mejorando la seguridad del tratamiento.

**Objetivo.** Obtener las frecuencias del polimorfismo V244M del gen CBR3 en pacientes pediátricos con cáncer del Hospital Infantil de México "Federico Gómez".

**Hipótesis.** Los polimorfismos V88I de CBR1 y V244M de CBR3 están asociados a cardiotoxicidad por antraciclina, encontraremos un genotipo de riesgo o protección en pacientes pediátricos con cáncer tratados con antraciclina.

**Material y Métodos.** Estudio de casos y controles, de pacientes pediátricos con tumores sólidos o leucemias agudas que recibieron antraciclina. Los casos fueron pacientes con cardiotoxicidad y los controles no la desarrollaron, independientemente de la DA. De una muestra de sangre periférica se extrajo el DNA por el método de columna. Estandarizando la técnica PCR para cada gen y la genotipificación de genes CBR3 amplificando cada uno con sus nucleótidos específicos, analizando el polimorfismo de cada gen. La evaluación cardiológica determinó el daño miocárdico y el grado de cardiotoxicidad, por clínica y ecocardiograma. Se contrastaron los datos de genotipos con el desarrollo de cardiotoxicidad.

**Plan de Análisis.** Estadística descriptiva e inferencial de los datos obtenidos. Se buscó la asociación del polimorfismo del gen CBR3 en cada paciente con la respuesta al tratamiento de acuerdo al grado de cardiotoxicidad.

**Resultados.** El reporte incluye avances del estudio hasta enero de 2013. La temperatura óptima de alineamiento fue de 64.5°C. El total de pacientes fueron 42, masculinos (52 %) y femeninos (48%). Siendo LLA (45.2%), LMA (33.3%), tumores hepáticos (7.1%), tumores neuroectodérmicos primitivos periféricos 2 (4.7%), linfomas (4.7%), un rhabdomyosarcoma y un osteosarcoma (2.3% para cada uno). Edad al diagnóstico fue de 3 meses-15 años (mediana 27.8 meses). La dosis acumulada de antraciclina (DA) fueron de 60-1040mg/m<sup>2</sup> (promedio de 185mg/m<sup>2</sup>). Se realizó evaluación cardiológica a 30 pacientes, resultando 19 controles y 11 casos. Los 15 controles recibieron DA menores a 300 mg/m<sup>2</sup>(rango 60-250 mg/m<sup>2</sup>) y 4 con más de 300mg/m<sup>2</sup>(rango 300-660 mg/m<sup>2</sup>). En 11 casos, un paciente con DA menor a 300 mg/m<sup>2</sup>, 10 casos con DA de 300-1040 mg/m<sup>2</sup>; disfunción leve en 10 casos y un paciente con LLA AR con DA de 330 mg/m<sup>2</sup> sin cardioprotector con defunción relacionada a toxicidad por antraciclina. El genotipo del gen CBR3 (SNP V244M), se determinó en 21 pacientes, homocigoto silvestre (GG) en el 42.85%, heterocigoto variante (GA) en el 9.52% y homocigoto variante (AA) 47.61%, las frecuencias fueron alelo silvestre 47.6% y alelo variante 52.4%. Los 21 pacientes genotipificados, 4 fueron casos y 10 controles

**Conclusiones:** Alta frecuencia de genotipos variante, puede ser protector contra cardiotoxicidad por antraciclina, correlacionándose con baja frecuencia de cardiotoxicidad reportada en series mexicanas. Estos resultados son parciales y aun es necesario completar la muestra de este estudio de casos y controles que buscará también los polimorfismos del Gen CBR1.

---

ABREVIATURAS: Leucemia linfoblástica Aguda (LLA), Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Leucemia linfoblástica Aguda de alto riesgo (LLA AR), Leucemia linfoblástica Aguda de bajo riesgo (LLA RH), Doxorubicina (DOXO), Daunorrubicina (DNR), Carbonil Reductasa (CBR), Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), Linfoma de Hodgkin (LH), Linfoma No Hodgkin (LNH), Dosis Acumulada de antraciclina (DA).

---

## ANTECEDENTES

### EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER INFANTIL

El cáncer pediátrico es relativamente infrecuente, en los EUA se estima una tasa media de incidencia anual de 18.8 casos por 100,000 individuos por año, para todos los cánceres infantiles en menores de 20 años. La probabilidad de que un joven alcance la edad adulta después de haber sido diagnosticado con cáncer en su infancia es de aproximadamente 1 en 300 para hombres y 1 a 333 en mujeres.

En la mayor parte del mundo, el cáncer representa la segunda causa de mortalidad en los niños de 5 a 14 años de edad, sólo superada por los accidentes. En el año 2006 se registraron en los Estados Unidos alrededor de 1,300 muertes relacionadas con cáncer en niños menores de 15 años. Se estima que en individuos de 15 a 19 años la contribución relativa del cáncer a la mortalidad global es inferior a la de los niños más pequeños y en 2006 se produjeron alrededor de 700 muertes por cáncer en este grupo de edad.<sup>(1)</sup>

En México, el cáncer en niños pasó del decimotercer lugar como causa de muerte en 1971, al segundo lugar entre la población de 1 a 14 años a partir del año 2001.

La neoplasia maligna más común en niños de 0 a 14 años, es la leucemia linfoblástica aguda (LLA), que representa el 25.4% de todos los diagnósticos de cáncer. La leucemia mieloide aguda (LMA) es el segundo tipo de leucemia más frecuente, con una proporción de un caso de LMA por cada 4 casos de LLA. Los tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) representan el 20.6% de los diagnósticos de cáncer y junto con LLA y LMA constituyen la mitad de los diagnósticos de cáncer en menores de 15 años. Dentro de los tumores sólidos extracraneales, los más frecuentes en el grupo de 0 a 14 años son el Neuroblastoma (7.0%), seguido por el tumor de Wilms (5.4%) y el linfoma no Hodgkin (LNH) (5.9%). Otros diagnósticos que individualmente representan un 2% a 4% de las neoplasias malignas de la edad pediátrica son la enfermedad de Hodgkin, el Rbdomiosarcoma, los sarcomas de partes blandas no Rbdomiosarcoma, los tumores de células germinales, el Retinoblastoma y el Osteosarcoma<sup>(1)</sup>. La distribución de los diagnósticos de cáncer en pacientes de 15 a 19 años de edad es significativamente diferente, la enfermedad de Hodgkin (16.2%) y los tumores de células germinales (12.5%) son los cánceres más frecuentemente diagnosticados, seguidos por los linfomas no Hodgkin (7.9%), melanoma (7.4%), cáncer de tiroides (8.0%), sarcoma de tejidos blandos no

Rabdomiosarcoma (6.0%), Osteosarcoma (4.2%), y el sarcoma de Ewing (2.2%). Aunque los tumores del SNC ocuparon el tercer lugar en frecuencia, con un 9.8% de todos los diagnósticos de cáncer, su incidencia fue menor en los pacientes de 15 a 19 años de edad en comparación con el grupo de 0 a 14 años. Algunos tipos de cáncer que son más comunes en los niños pequeños (por ejemplo, los cánceres del sistema nervioso central, neuroblastoma, retinoblastoma, hepatoblastoma, y tumor de Wilms) se produjeron tasas muy bajas de entre 15 y 19 años de edad<sup>(1)</sup>.

El Hospital Infantil de México recibe un promedio de 250 casos nuevos de cáncer por año, de los cuales, las leucemias agudas linfoblástica representan el 34%, seguidas de los Tumores del SNC y linfomas.<sup>(2)</sup>

## SUPERVIVENCIA Y MORTALIDAD

Las tasas de supervivencia de los pacientes pediátricos con cáncer han mejorado dramáticamente desde la década de 1960<sup>(3)</sup>, en que la supervivencia a 5 años era del 28%. Para el año 2000, en los Estados Unidos estas tasas ya eran superiores al 80% a 5 años.<sup>(1)</sup>

Este incremento en la supervivencia fue más dramático para la leucemia linfoblástica aguda y linfoma no Hodgkin, enfermedades casi incurables en la década de los 60's y que entre 1989 y 1996 alcanzaron tasas de más del 80%. Las tasas de supervivencia a cinco años son iguales o superiores a 90% para el Linfoma de Hodgkin. En el caso del tumor de Wilms la supervivencia se incrementó de 33 - 92% durante el mismo periodo. Mientras que en la Leucemia Mieloide Aguda la supervivencia a 5 años no ha podido superar el 50%.<sup>(1)</sup>

De igual manera, han disminuido las tasas de mortalidad por neoplasias en individuos de 0 a 19 años de edad. En la década de 1950, la tasa de mortalidad por cáncer infantil era de aproximadamente 80 por millón. Esta tasa comenzó a declinar en 1960, y para 1995 se había reducido a 30 por millón.

## **MARCO TEÓRICO**

### **PRINCIPIOS DEL TRATAMIENTO**

El tratamiento de las neoplasias malignas de la edad pediátrica es multimodal, siendo la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia los pilares fundamentales.

En general, la terapia moderna se basa en la aplicación de tratamientos cuya intensidad varía en función de las características propias de cada caso (subtipo histológico, etapa, grupo de riesgo, marcadores moleculares, etc.).

La Cirugía es el tratamiento de elección en la mayoría de los tumores sólidos, es de utilidad para establecer el diagnóstico, para estadificación y para obtener control local. En algunos casos, la resección completa puede ser el único tratamiento requerido, mientras que en otros la resección no es necesaria (linfomas) o podría incluso estar contraindicada (gliomas de tallo).

La radioterapia es componente esencial del tratamiento de diversas neoplasias, permite el control local de algunos tumores, puede emplearse como parte de la terapia de consolidación en tumores completamente resecados, también forma parte de algunos regímenes de consolidación para trasplante de células progenitoras hematopoyéticas e incluso puede estar indicada en el manejo de algunas urgencias oncológicas. En los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas de radioterapia que permiten reducir las secuelas a largo plazo.

La quimioterapia puede utilizarse como único tratamiento, como en el caso de las leucemias y algunos linfomas o administrarse en combinación con cirugía o radioterapia. Puede aplicarse antes de un tratamiento local-regional, como en el caso de tumores irresecables al diagnóstico, con el fin de reducir su tamaño y conseguir la exéresis completa (quimioterapia neo-adyuvante), o bien después del control local (quimioterapia adyuvante).

### **QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA**

Los fármacos antineoplásicos impiden el crecimiento y proliferación de las células malignas, se utilizan para el tratamiento del cáncer (curativo o paliativo). Estas sustancias pueden ser de origen natural, sintético o semisintético.

Desde la introducción de la quimioterapia para el tratamiento de la leucemia infantil hace casi 60 años, el pronóstico de los pacientes pediátricos con cáncer ha mejorado notablemente.

La era moderna de la quimioterapia contra el cáncer comenzó después de la segunda guerra mundial, con la introducción de las mostazas nitrogenadas y posteriormente la aminopterina, un antagonista del ácido fólico. Estos compuestos produjeron remisiones en pacientes con linfoma y en niños con leucemia linfoblástica aguda, aunque no se obtuvieron curaciones debido a que en el tratamiento de las neoplasias malignas no existían los conceptos poliquimioterapia, terapia combinada, tratamiento de consolidación y mantenimiento. Los tratamientos cortos con monoterapia no erradicaban las neoplasias y favorecían el rápido desarrollo de resistencia a los fármacos antineoplásicos, un problema que se presenta en la práctica clínica y que constituye una causa importante de falla al tratamiento<sup>(3),(4)</sup>.

El papel de la quimioterapia en el tratamiento de una neoplasia está determinado por la sensibilidad de las células tumorales al agente citotóxico. Hay neoplasias altamente quimiosensibles, como algunas leucemias y linfomas; mientras que existen otras que se caracterizan por su poca respuesta a los agentes citotóxicos, tal es el caso del melanoma, algunos tumores del sistema nervioso central y algunos carcinomas. Diversos factores influyen en la respuesta de una neoplasia a la quimioterapia y éstos pueden ser propios del paciente (farmacocinéticos y farmacogenéticos), o de las células maligna<sup>(3)</sup>.

Actualmente se sabe que salvo raras excepciones, para la erradicación de una neoplasia maligna se requiere terapia con multiagentes y muchas veces el empleo de diversas modalidades de tratamiento. Lo anterior ha permitido incrementar la supervivencia, pero también se ha acompañado de secuelas a largo plazo.

### Clasificación de los Agentes Antineoplásicos y Mecanismos de Acción

En función de sus mecanismos de acción, los agentes antineoplásicos se clasifican en diversos grupos: 1) fármacos que se unen covalentemente al DNA (alquilantes, metilantes y platinantes), 2) antimetabolitos, 3) antibióticos antitumorales, 4) alcaloides naturales y 5) misceláneos<sup>(3)</sup>. En la Tabla 1 muestra la clasificación y sus principales mecanismos de acción

**Tabla 1: Mecanismos de Acción y Cardiotoxicidad en Antineoplásicos**

FÁRMACO O RADIACIÓN	MECANISMOS DE ACCION Y EFECTOS ADVERSOS CARDIOVASCULARES
<b>Agentes antibióticos:</b>	
<b>Bleomicina</b>	Generación de especies de radicales libres de oxígeno activado que causan rupturas de DNA. Al asociarse a otros fármacos antitumorales se han informado casos raros de cardiopatía isquémica, evento vascular cerebral, microangiopatía trombótica y fenómeno de Reynaud
<b>Mitomicina</b>	Produce enlaces cruzados con el ADN de manera semejante a un alquilante.
<b>Actinomicina D</b>	Se intercala en el ADN y se une a los pares de bases citidina-guanina inhibiendo la síntesis de ADN.
<b>Agentes inhibidores de la topoisomerasa II</b>	
<b>Etoposido</b>	Hipotensión en 2% de los casos durante la administración IV rápida. Se han documentado casos raros de insuficiencia cardíaca e infartos del miocardio.
<b>Antraciclinas (Doxorrubicina, Daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina)</b>	26%-36% de insuficiencia cardíaca con dosis acumulativas mayores
<b>Mitoxantrono</b>	13% de riesgo de disfunción ventricular izquierda y 2.6% de insuficiencia cardíaca grave
<b>Agentes que actúan sobre los microtúbulos</b>	
<b>Alcaloides de la vinca</b>	Riesgo tardío aumentado de infarto del miocardio, sobre todo con la asociación vincristina más radiación supra diafragmática
<b>Taxanos (placitaxel, docetaxel)</b>	Aumenta el riesgo de insuficiencia cardíaca cuando se asocia placitaxel (pero no docetaxel) a antraciclinas. El vehículo de placitaxel, cremofor, puede causar arritmias e hipertensión arterial
<b>Agentes alquilantes</b>	
<b>Ciclofosfamida</b>	Disfunción sistólica e insuficiencia cardíaca en pacientes trasplantados de médula ósea que recibieron la droga a altas dosis
<b>Ifosfamida</b>	Arritmias supraventriculares reversibles
<b>Cisplatino</b>	Arritmias en relación a la hipomagnesemia
<b>Busulfán</b>	Se han informado de casos de fibrosis subendocárdica
<b>Agentes antimetabolitos</b>	
<b>Fluoruracil</b>	Manifestaciones cardiotoxícas entre el 0.5 y el 8% de los pacientes expuestos. Se han documentado casos de vasoespasmio coronario
<b>Metotrexate</b>	Algunas manifestaciones cardiovasculares no frecuentes incluyen arritmias, cardiopatía isquémica, pericarditis, aumento de la rigidez vascular, flebitis
<b>Fludarabina</b>	Insuficiencia cardíaca, sobre todo cuando se asocia a melfalan
<b>Citarabine</b>	Angina más pericarditis
<b>Otros agentes farmacológicos</b>	
<b>Celecoxib</b>	Insuficiencia renal, edema, hipertensión arterial
<b>Radioterapia</b>	
<b>Radiación supra diafragmática</b>	Pericarditis aguda, pericarditis constrictiva, aumento del riesgo de cardiopatía isquémica

## Toxicidad a Quimioterapia Antineoplásica

El efecto citotóxico no es selectivo y ocurre tanto en células neoplásicas como en células normales, de manera que la toxicidad es el factor que limita la dosis de quimioterapia.

Los tratamientos oncológicos actuales tienden a ser cada vez más eficaces y como consecuencia, los resultados terapéuticos son más satisfactorios, con una supervivencia general que continua en ascenso. En las últimas décadas hemos presenciado la aparición de nuevos agentes antineoplásicos, desarrollados con la finalidad de mejorar el pronóstico de los pacientes con cáncer, pero el incremento en la supervivencia, se ha acompañado de una amplia gama de efectos adversos a estos agentes.

Este trabajo está enfocado en la cardiotoxicidad por antraciclinas, que hasta la fecha ha sido uno de los efectos adversos de más difícil manejo y es una de las complicaciones más preocupantes en la terapia con estos fármacos, tanto por su gravedad como por sus implicaciones clínicas.

### ANTRACICLINAS

Las antraciclinas son los antibióticos antitumorales más utilizados. Constituyen un grupo de fármacos de amplio espectro en el tratamiento del cáncer infantil.

Son sustancias naturales de origen bacteriano, producidas por diversas cepas de *Streptomyces*. Estructuralmente están formadas por una antraquinona tricíclica planar, de carácter cromóforo, unido por un enlace glucosídico a un amino azúcar (daunosamina) (Figura 1).<sup>(3)</sup>

Dentro del grupo de las antraciclinas se encuentran la Daunorrubicina, Doxorrubicina, Epirubicina, Idarrubicina, Pirarrubicina, Aclarubicina y Mitoxantrona. Si bien estos antibióticos presentan actividad antibacteriana, en la práctica clínica no se emplean con esta finalidad, sino por su efecto citotóxico transitorio que las convierte en una herramienta antineoplásica. Los fármacos más utilizados son la Daunorrubicina y la Doxorrubicina. Aunque hay marcadas diferencias en el uso clínico de ambas, su estructura química difiere sólo en un grupo hidroxilo en el carbono C14.<sup>(5)</sup>

## Daunorrubicina

El clorhidrato de Daunorrubicina, elaborado por el *Streptomyces peuceticus* o *coeruleorubidus*, es utilizado principalmente en leucemias agudas linfoblástica y mieloblásticas, y en algunos esquemas para tumores sólidos, como el neuroblastoma y el sarcoma de Ewing. Generalmente no se administra como único fármaco, sino en combinación con otros agentes. Es potencialmente teratogénica, mutagénica y carcinogénica<sup>(3)</sup>, <sup>(5)</sup>.

## Doxorrubicina

El clorhidrato de Doxorrubicina o Adriamicina es un compuesto producido por el *Streptomyces peucetius varcaesiu*. En pediatría se utiliza en leucemias linfoblástica y mieloblásticas agudas, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin y en tumores sólidos, como el neuroblastoma, tumor de Wilms, sarcomas óseos y de partes blandas, entre otros. Es una de las drogas de mayor espectro y de empleo creciente, algunos esquemas la administran en dosis altas con el fin de optimizar los resultados<sup>(5)</sup>.

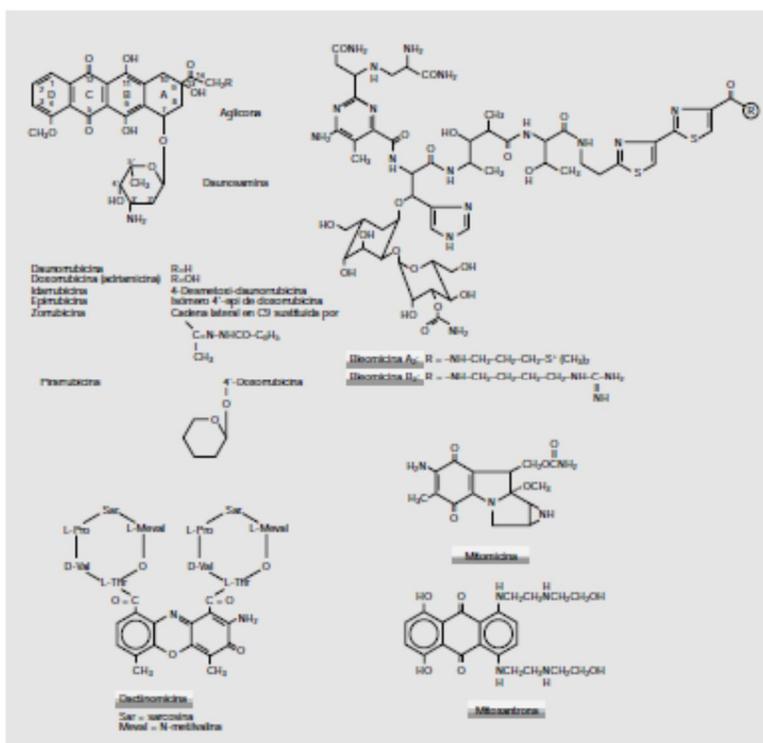


Figura 1: Estructura química de Antraciclinas

Mecanismo de acción.

Las antraciclinas ejercen su efecto citotóxico a través de varios mecanismos, de los cuales los más importantes son los siguientes:

- Debido a su estructura planar, se intercalan entre las hebras del ADN, interfiriendo con su replicación. La inserción en la cadena del ADN es debida a la afinidad del grupo amino de estos fármacos por los fosfatos del ADN, lo que ocasiona inestabilidad de este complejo e impide la replicación de la molécula de ADN y la transcripción del ARN, alterando así la división celular y causando la muerte de la célula tumoral.
- Pueden producir ruptura de una o ambas cadenas; ocasionando intercambio de cromátides hermanas. Por lo tanto las antraciclinas son mutagénicas y carcinogénicas. La ruptura del ADN tal vez está relacionada con la formación de radicales libres.
- Estos citotóxicos pueden impedir la separación de la doble hélice al inhibir a la topoisomerasa II, interfiriendo con el proceso de replicación.
- Por intermediación de enzimas como la reductasa, en presencia de NADPH forman radicales semiquinonas intermedios, que a su vez pueden reaccionar con oxígeno y producir especies reactivas como los radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo, dañan macromoléculas y son altamente destructivos para las células.
- Es probable, además, que las antraciclinas alteren la actividad normal de la bomba de Na-K y el proceso de transporte de electrones de la mitocondria, alterando la homeostásis celular.

Farmacocinética

La absorción de las antraciclinas por la mucosa intestinal es baja y su uso por vía intramuscular o subcutánea está contraindicado debido a su acción vesicante, por lo cual la única vía endovenosa es la única vía de administración recomendada. En el torrente circulatorio, el 75% del fármaco se une a proteínas plasmáticas y el fármaco libre se distribuye en diversos tejidos, particularmente hígado, pulmón, riñón y miocardio. Estos compuestos prácticamente no atraviesan la barrera hematoencefálica. La excreción se realiza por orina, bilis y heces, por lo que es necesario reducir la dosis en casos de insuficiencia hepática y renal y cuando existe obstrucción de la vía biliar <sup>(3)</sup>, <sup>(5)</sup>. Las antraciclinas son rápidamente metabolizadas a compuestos activos e inactivos. Mediante enzimas reductasas como la Carbonil Reductasa, las antraciclinas son transformadas en alcoholes activos (Daunorrubicinol y Doxorrubicinol) <sup>(3)</sup>, <sup>(5)</sup>.

## Toxicidad por antraciclinas

Como ocurre con otros agentes citotóxicos, el efecto de las antraciclinas no se limita a las células malignas. Además de las lesiones graves que estos compuestos pueden ocasionar a los tejidos por extravasación, los efectos indeseables se presentan de manera más aparente en los tejidos mitóticamente activos, como los del tracto digestivo (estomatitis y mucositis, náusea-emesis, dolor abdominal, diarrea, etc.), médula ósea (mielosupresión), piel y mucosas (mucositis, alopecia, dermatitis, etc.)<sup>(3), (4)</sup>. También pueden ocasionar daño celular directo, aun en células que no se dividen, como en el caso de las células miocárdicas.

El efecto adverso limitante de la dosis de antraciclinas es la cardiotoxicidad y se ha encontrado que la Daunorrubicina tiene mayor toxicidad miocítica en comparación con la Doxorrubicina<sup>(5)</sup>.

## Cardiotoxicidad por Antraciclinas

Casi el 60% de los niños con diagnóstico de cáncer reciben antraciclinas<sup>(6)</sup> y por ello la cardiotoxicidad es un problema que ha adquirido importancia en los últimos años.

El incremento en la supervivencia de los pacientes con cáncer pediátrico y la falta hasta hace unos años de estrategias eficaces para su prevención han determinado un aumento en el número de los casos de pacientes que desarrollan cardiotoxicidad.

El riesgo de muerte por enfermedad cardíaca en los supervivientes que reciben antraciclinas debido es hasta 8 veces superior al esperado para la población general<sup>(7)</sup>.

El daño cardíaco puede manifestarse clínicamente o ser asintomático y detectarse sólo mediante estudios especiales, y puede aparecer en poco tiempo o manifestarse varios años después de terminado el tratamiento.

Las consecuencias tóxicas de las antraciclinas sobre el miocardio pueden presentarse de manera aguda o crónica y los mecanismos fisiopatológicos difieren entre ambas.

No se conoce con exactitud el mecanismo por el cual las antraciclinas ocasionan cardiotoxicidad, pero parece estar relacionado con la producción de radicales libres por parte de los compuestos hierro-antraciclina, y el miocardio es muy susceptible al estrés oxidativo. La lesión miocárdica causa apoptosis de los miocitos y fibrosis. Otra posible explicación es la presencia de alteraciones en el transporte del calcio y la aparición de una reacción inmunológica facilitada por el estrés oxidativo.

### Toxicidad Aguda y Subaguda

La cardiotoxicidad aguda va de simples trastornos en el ritmo, con alteraciones electrocardiográficas transitorias a cuadros más complejos que pueden ocasionar muerte súbita, aunque esto último es poco frecuente <sup>(3), (4)</sup>.

Se presenta con la infusión o durante las horas posteriores; normalmente es transitoria y cursa con cambios inespecíficos electrocardiográficos.

La forma subaguda ocurre días a semanas después del tratamiento, se han descrito algunos casos de pericarditis, miocarditis e insuficiencia cardíaca aguda.

Ambas formas afectan a menos del 1% de los pacientes tratados con estos fármacos.

### Toxicidad Crónica

El daño miocárdico suele ser de inicio precoz y presentarse durante el primer año después de concluido el tratamiento. Consiste en la aparición de miocardiopatía que clínicamente se manifiesta como insuficiencia cardíaca y afecta 1.6 a 2.1% de los pacientes tratados.

La toxicidad crónicamente progresiva de inicio tardío también se debe al desarrollo de miocardiopatía y se ha observado hasta 20 años después del tratamiento. Cursa con insuficiencia cardíaca, arritmias y disfunción ventricular <sup>(8)</sup>.

En diversos estudios se ha observado que existe cierta variabilidad en la incidencia de cardiotoxicidad a largo plazo, lo cual se puede explicar por la presencia de otros factores de riesgo para la aparición de cardiotoxicidad y por las diferencias en los períodos de seguimiento de los distintos estudios. En un estudio retrospectivo, Van Dalen y col. describen que el riesgo de insuficiencia cardíaca en pacientes tratados con antraciclinas durante la infancia aumenta con el tiempo y es de 2% a los 2 años y de 5.5% a los 20 años de seguimiento <sup>(10)</sup>. En los

pacientes tratados con dosis superiores a 300 mg/m<sup>2</sup> la cardiotoxicidad era de casi 10%. Este aumento en la incidencia de cardiotoxicidad con el tiempo de seguimiento también se ha descrito en otros estudios con diseño similar <sup>(11)(12)</sup>.

En una revisión sistemática, se describe que la incidencia de disfunción cardíaca asintomática a largo plazo, varía mucho en los distintos estudios, en parte debido a la utilización de diferentes técnicas para detectarla y puede llegar a ser del 57% a los 6.4 años de seguimiento <sup>(13)</sup>.

Sin embargo, gran parte de estos estudios que describen la presencia de miocardiopatía a largo plazo, presentan algunas limitaciones, como son su diseño retrospectivo, sesgos de selección y un número reducido de pacientes. Por este motivo, algunos autores consideran que la clasificación de los tipos de cardiotoxicidad por antraciclinas es arbitraria y que en realidad el daño cardíaco empieza con las primeras dosis de antraciclinas y va progresando con el paso del tiempo y la miocardiotoxicidad crónica tardía, puede ser una lesión previa no diagnosticada de manera temprana <sup>(8)</sup>. Los resultados del estudio de Steinherz y otros estudios con diseño prospectivo, apoyan la posibilidad de que las alteraciones cardíacas por antraciclinas puedan iniciar de forma tardía, aunque en una baja proporción de pacientes. En el primero, con un diseño prospectivo y en parte retrospectivo, el 12% de los pacientes con ecocardiografía normal al año del tratamiento, presentó alteraciones a los 7 años de seguimiento con un intervalo de 4 a 20 años y 4 pacientes presentaron insuficiencia cardíaca de forma tardía <sup>(14)</sup>. El estudio de Creutzig y cols <sup>(10)</sup> de diseño longitudinal, presenta datos de dos ensayos clínicos en niños con leucemia mieloide aguda, la incidencia acumulada de miocardiopatía a los 11 años de seguimiento, fue del 57.1%, sintomática en un 2.5 % y de inicio más allá de los 5 años en la mayoría <sup>(15)</sup>. Finalmente, en el estudio de Lipshultz y cols, longitudinal con resultados seriados de 499 ecocardiografías en 115 niños supervivientes de leucemia aguda linfoblástica tratada con Doxorubicina, se describe alteración persistente y progresiva de la función del ventrículo izquierdo, más marcada con dosis acumuladas superiores a 300mg/m<sup>2</sup>, pero también posible con dosis inferiores. En este estudio describe la correlación entre las alteraciones al final del tratamiento y las observadas casi 12 años después <sup>(16)</sup>.

## Factores de riesgo

Se han observado factores de riesgo que elevan la probabilidad del daño asociado al tratamiento con antraciclinas. La dosis es el factor determinante en la aparición del síndrome de insuficiencia cardíaca en pacientes expuestos a antraciclinas.

Los niños son más sensibles al efecto tóxico de antraciclina, la quimioterapia y radioterapia u otros medicamentos oncológicos elevan el riesgo de cardiotoxicidad. La combinación de antraciclina con taxanos o con el anticuerpo anti-HER2, elevando el riesgo de insuficiencia cardíaca.

En algunos casos se eleva el riesgo al presentar alteraciones genéticas como en la trisomía 21, así como los que presentan polimorfismos en la estructura molecular de las Carbonil Reductasas 1 y 3 metabolizan muchos productos tóxicos, como las quinonas, que forman parte de la estructura de las antraciclina. Los polimorfismos hacen menos eficaz este sistema de óxido-reducción. La raza negra tiene un polimorfismo del CBR1 que explica su tendencia a la cardiotoxicidad por antraciclina. El presentar cualquier enfermedad cardiovascular congénita o adquirida, favorece la instauración de la cardiotoxicidad. Al ampliar el tiempo de seguimiento habrá más oportunidad de detectar complicaciones cardíacas tardías.

La susceptibilidad de los pacientes varía en función de la presencia de diversos factores de riesgo, como son el sexo femenino, edades extremas de la vida (menores de 15 años y mayores de 65 años), cardiopatía previa, enfermedad hepática y el uso concomitante de irradiación mediastínica o de otros fármacos cardiotoxicos, como la ciclofosfamida o el trastuzumab <sup>(8)</sup>.

Existe variabilidad entre pacientes, tanto a la respuesta a antraciclina y al desarrollo de toxicidad, posiblemente debido a las variaciones en el metabolismo de estos fármacos, esto influye en el riesgo de toxicidad o en la respuesta al tratamiento; estas diferencias individuales pueden ser ocasionadas por variaciones en la actividad de enzimas que participan en su metabolismo lo cual está estrechamente relacionado con el componente genético de cada paciente <sup>(18)</sup>.

El factor de riesgo principal es la dosis total acumulada del antracíclico, esta varía según el fármaco. El nivel tóxico de la Doxorubicina se ubica con una dosis igual o superior a 300 mg/m<sup>2</sup> en los niños y en adultos 550mg/m<sup>2</sup>, se ha observado variabilidad interindividual y se han descrito casos de cardiotoxicidad con dosis acumuladas inferiores y dosis superiores sin presentar cardiotoxicidad. <sup>(9)</sup>.

## Tratamiento

En general, el tratamiento de la miocardiopatía por antraciclinas es similar al de las otras causas de insuficiencia cardíaca, y en los casos más graves se puede llegar a requerir un trasplante cardíaco.

## Prevención de la Cardiotoxicidad por Antraciclinas

En la cardiotoxicidad a antracíclicos es de suma importancia la prevención, el diagnóstico y el tratamiento precoz, interrumpiendo la administración de estos fármacos en los pacientes con detección por ecocardiograma que sugieran daño miocárdico o al alcanzar la dosis máxima recomendada sin haber iniciado cardioprotector. En caso contrario, las consecuencias son peores que las de la enfermedad de base.

Además de limitar la dosis total acumulada, se han evaluado otras intervenciones para reducir el riesgo de cardiotoxicidad inducida por antraciclinas, como el uso de análogos menos cardiotóxicos como son las antraciclinas liposomales, el uso de diferentes esquemas de dosificación y el uso de agentes cardioprotectores.

La velocidad de infusión es importante, debido al alto pico de concentración sérica se relaciona con mayor probabilidad de daño miocárdico, se recomienda administrar en infusión lenta durante varios días. En pacientes pediátricos hay pocos datos, la mayoría de protocolos de administración eligen, como en el adulto, perfusión lenta.

Las formas liposomales y pegiladas permiten que el fármaco llegue más al tejido tumoral que al miocardio reduciendo de esta manera la cardiotoxicidad.

No obstante, los datos de eficacia de estas estrategias proceden de estudios con cortos períodos de seguimiento y en indicaciones y subgrupos de pacientes concretos.

En un estudio realizado en el Hospital Infantil de México, se evaluó de manera prospectiva el papel cardioprotector del dexrazoxano en 50 pacientes pediátricos con LMA, empleando el cardioprotector dexrazoxano antes de cualquier dosis de antraciclinas. La función cardíaca era evaluada al momento del diagnóstico, antes de cada ciclo de quimioterapia, y cada 6 meses después del final de la quimioterapia. La dosis media acumulada de antraciclinas fue de 424 mg/m<sup>2</sup> (rango de 150 a 850 mg/m<sup>2</sup>) 48 pacientes (96%) recibieron una dosis mayor de 300 mg/m<sup>2</sup>. El 28% desarrolló algún grado de cardiotoxicidad: 24% grado 1 y 4% de grado 2. No se observó cardiotoxicidad de grados 3 ó 4. La dosis acumulada de

antraciclina no se asoció con cardiotoxicidad ( $P = 0,815$ ). Se concluye que el uso de dexrazoxano puede ser un método eficaz para prevenir cardiotoxicidad, que además permite el empleo de dosis más altas de antraciclina, sin embargo es necesaria la realización de un estudio aleatorio y más tiempo de seguimiento para consolidar esta aseveración<sup>(17)</sup>.

Se recomienda que antes del inicio del tratamiento se determine el riesgo de cardiotoxicidad y se establezca si el paciente está en condiciones de recibir estos fármacos.

La implementación de diversos procedimientos encaminados a detectar en forma precoz las complicaciones cardíacas, permite su identificación mucho antes de que se manifiesten clínicamente.

Para el seguimiento de los pacientes a largo plazo se recomienda controlar la fracción de eyección mediante ecografías anuales. Algunos autores, incluso recomiendan un control de la función cardíaca de por vida<sup>(5)</sup>.

## Ecocardiografía

Esta técnica se ha usado en la evaluación clínica y en el seguimiento de estos pacientes, sin embargo, su mayor dependencia del operador y mayor variabilidad en las mediciones de parámetros de función ventricular han dificultado su uso, especialmente, en el estudio de evolución seriada. El cálculo de fracción de eyección ventricular izquierda tiene una correlación aceptable con los estudios radioisotópicos y angiográficos. Entre sus ventajas, puede mencionarse una mayor disponibilidad y menor costo y que no emplea radiación ionizante. Su principal desventaja es su dependencia del operador y la posible presencia de mala ventana acústica, alteraciones anatómicas, particularmente en sujetos obesos o con deformidad músculo-esquelética de la caja torácica. Debido a que no emplea radiación ionizante, se ha preferido su uso en población pediátrica.

## Monitorización de Cardiotoxicidad

Las recomendaciones para el seguimiento de la función miocárdica incluyen lo siguiente:

- 1) Determinación basal de función sistólica de ventrículo izquierdo con ecografía
- 2) Repetir estudio al alcanzar  $300 \text{ mg/m}^2$  y antes del siguiente ciclo
- 3) Repetir estudio antes de cada nuevo ciclo al superar  $300 \text{ mg/m}^2$

- 4) Si se efectúa radioterapia simultánea sobre 1000 cGy, complementar con estudio radioisotópico
  - 5) Sobre 400 mg/m<sup>2</sup> de dosis alcanzada efectuar ecografía y ventriculografía radiosiotópica antes de cada nuevo ciclo
  - 6) Control posterior al fin de la quimioterapia
- Ecografía a los 3, 6 y 12 meses. Ventriculografía opcional a los 12 meses  
Si la función ventricular es normal, controlar cada 2 años  
Si la función ventricular es anormal, control según evolución  
Electrocardiografía continua de 24 hrs. cada 5 años  
Se considera presencia de cardiotoxicidad si se observa disminución de la fracción de acortamiento determinada por ecocardiografía:
- Disminución en 10% absoluto
  - Valor menor a 29% Pacientes de alto riesgo se pueden complementar con estudio radioisotópico

## CARBONIL REDUCTASA (CBR)

Las Carbonil Reductasas son enzimas monoméricas citosólicas, que forman parte de la familia de deshidrogenasas de cadena corta, dependientes de NADPH. Las CBR's catalizan la reducción de diversos sustratos químicos tanto endógenos como exógenos, que contienen el grupo carbonil, tales como prostaglandinas, esteroides, aldehídos, cetonas, quinonas, agentes farmacológicos y otros xenobióticos <sup>(19)</sup>. Además del metabolismo de compuestos endógenos y detoxificación de fármacos. También se reporta que las enzimas CBR participan en procesos celulares como la transducción de señales, apoptosis, mutagénesis, carcinogénesis y resistencia a los medicamentos <sup>(20)</sup>. La patogénesis de la cardiotoxicidad por antraciclinas es compleja y parece estar mediada por una combinación de estrés oxidativo y el metabolismo intracardiaco de alteraciones inducidas por los metabolitos alcohólicos C13 de antraciclinas <sup>(5)</sup>. En el miocardio humano, las enzimas Carbonil Reductasas (CBR) y las aldo/cetoreductasas catalizan la reducción de dos electrones de la cadena lateral de la antraciclina para formar el grupo carbonilo de los metabolitos alcohólicos cardiotóxicos. La actividad de la CBR es la principal fuente de desintoxicación quinona en los seres humanos, y estudios bioquímicos mostraron que las enzimas aldo/cetoreductasas tienen de 7 a 18 veces menor eficiencia catalítica para la reducción de sustratos como las antraciclinas que las CBR2. La enzima Carbonil Reductasa presenta 4 isoformas la CBR1, CBR2, CBR3 y CBR4. Las CBR1, CBR3 y CBR4 han sido encontradas en humanos, a diferencia de la isoforma CBR2 que no se ha identificado en tejidos humanos. Las propiedades enzimáticas y de distribución en los tejidos de la CBR4 aún se desconocen y aparentemente no es de gran importancia en el metabolismo de las antraciclinas <sup>(21) (22)</sup>. Las dos isoformas de

esta enzima, que juegan un papel primordial en el metabolismo de las antraciclinas incluyen a la Carbonil Reductasa 1 (CBR1) y la Carbonil Reductasa 3 (CBR3), en las cuales se han identificado algunos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que pueden estar relacionados con el desarrollo de efectos adversos a antraciclinas.

Varios estudios han descrito un amplio rango de variabilidad interindividual en el metabolismo de fármacos que son sustratos de las enzimas CBR, como es el caso de las antraciclinas Doxorubicina y Daunorrubicina, que son ampliamente reducidas por las Carbonil Reductasas a sus respectivos metabolitos alcohólicos doxorubicinol y daunorrubicinol, tanto en los tejidos normales como en tumores. La variación en la actividad de la enzima CBR puede contribuir a la variación farmacocinética y farmacodinámica de las antraciclinas en pacientes adultos y pediátricos con cáncer. Esta actividad enzimática variable puede deberse a polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los genes CBR <sup>(23)</sup> <sup>(24)</sup> <sup>(26)</sup>.

### **Localización en los tejidos**

La CBR Humana puede ser detectada en los tejidos por tinción inmunohistoquímica. Prácticamente todos los órganos expresan esta enzima, pero la expresión varía ampliamente. La expresión es alta en las células del parénquima del hígado, epitelio del estómago e intestino delgado, en los túbulos proximales renales, células neuronales, células gliales, en el lóbulo anterior de la hipófisis, en las fibras de músculo liso, endotelio de vasos sanguíneos y en el músculo cardíaco. Esta expresión es baja en el tejido conectivo y en la sustancia blanca del sistema nervioso central. Se expresa débilmente o está ausente en las células granulares del cerebelo, las capas superficiales del epitelio de la cavidad oral y del esófago; del epitelio en el epidídimo, epitelio conductos deferentes, epitelio de la vesícula seminal, epitelio de la glándula prostática, cápsula glomerular, asa de Henle, túbulos distales y colectores, intersticio medular del riñón, glándula tiroides, islotes de Langerhans, ovario (lútea) y en las fibras del músculo esquelético. <sup>(22)</sup>

Las Carbonil Reductasas se distribuye ampliamente en los tejidos humanos. En otros animales pueden mostrar CBRs con expresión más localizada, por ejemplo en las ratas se localiza en ovario, se limita a las gónadas y aunque también se encuentra en las glándulas suprarrenales. <sup>(21)</sup>

## Variaciones en las enzimas

Múltiples formas de CBRs humanas se han observado, sugieren diferencias en el tamaño y en la carga de las proteínas. Las diferentes formas fueron generadas por interacciones con el cofactor de la enzima y por modificación de aminoácidos. Una modificación de lisina con una masa de 72 Da se observó primero en la posición 239, lo que sugiere una explicación para las diferencias de carga. Krook et al., identificaron la modificación de lisina como N6-(1-carboxietil) lisina y mostró que podía estar formada por una interacción de lisina y piruvato a través de una base de Schiff con reducción para estabilizar el producto.<sup>(21)</sup>

## Localización cromosómica

La CBR Humana fue mapeada en el cromosoma 21 y después se demostró que se ubica en el *locus* 21q22.12. Recientemente, un segundo gen, CBR humana (CBR3), se encontró en la banda 21q22.2, a 62 kilobases del gen descubierto originalmente.

## Carbonil Reductasa 1 (CBR1)

El gen CBR1 codifica para una de las principales enzimas Carbonil Reductasas que cataliza la reducción de dos electrones de sustratos endógenos, como los esteroides, las prostaglandinas y sustratos farmacológicamente relevantes como las antraciclinas. Se expresa ampliamente en diferentes tejidos humanos tales como hígado, corazón, estómago, riñón, intestino delgado, cerebelo y fibras de músculo liso. Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 21q22.12, tiene 3 exones que abarcan 3.3 kb y codifica para una proteína monomérica de 30 kDa que comprende 277 aminoácidos<sup>(26) (27) (21)</sup>. Varios estudios del desarrollo de cardiotoxicidad relacionada a antraciclinas en algunos pacientes, indican que los metabolitos alcohólicos C-13 de las antraciclinas (doxorubicinol y daunorrubicinol), son clave en la patogénesis de cardiotoxicidad relacionada con estos fármacos. En humanos la síntesis de doxorubicinol y daunorrubicinol (metabolitos cardiotóxicos) es catalizada por la enzima Carbonil Reductasa 1. Los metabolitos alcohólicos C-13 de las antraciclinas circulan en plasma, tienen una vida media similar a la de sus compuestos de origen y carecen de actividad antineoplásica<sup>(23)</sup>. El papel clave de la CBR1 en el desarrollo de cardiotoxicidad relacionada a antraciclinas, ha sido establecido en estudios bioquímicos y en experimentos con modelos murinos. Existen pocos estudios clínicos de su

actividad cardiotoxica, y éstos presentan inconsistencias entre sí<sup>(21)</sup>. La sobreexpresión de CBR1 humana en el corazón de ratones mostró elevados niveles de doxorubicinol y un incremento de los signos de daño miocárdico después de la administración de Doxorubicina<sup>(28)</sup>. En un estudio de pacientes con síndrome de Down y cáncer, se determinó que el incremento en la expresión de CBR1 en tejido cardiaco puede contribuir al riesgo de cardiotoxicidad relacionada con antraciclina<sup>(28)</sup>. La reducción de Doxorubicina fue también investigada en un panel de 10 tejidos humanos, en donde el hígado alcanzó las concentraciones más altas de Doxorubicina con respecto al resto de órganos humanos estudiados hasta el momento, y datos preliminares sugieren que este es el órgano principal de metabolismo enzimático de Doxorubicina. Se ha identificado a la CBR1 como la enzima predominante en la reducción hepática de Doxorubicina y se han encontrado variantes importantes en dicha actividad. Esta variabilidad puede reflejar el impacto de las variantes del gen CBR1, lo que puede contribuir en las diferencias farmacocinéticas de reducción de Doxorubicina a Doxorubicinol<sup>(30)</sup>. Por el contrario, ratones sin alelo Cbr1 (Cbr1+/Cbr1-) tratados con doxorubicina mostraron bajos niveles plasmáticos de doxorubicinol y una incidencia significativamente más baja de cardiotoxicidad relacionada a antraciclina, comparados con animales portadores de ambos alelos Cbr1 activos (Cbr1+/Cbr1+)<sup>(31)</sup>.

González Covarrubias y cols., identificaron el polimorfismo de un solo nucleótido V88I del gen CBR1, el cual resulta en una sustitución de valina por isoleucina en la posición 88; investigaron y caracterizaron las propiedades funcionales de este polimorfismo, encontrando dos isoformas de la proteína la CBR V88 y CBR1 I88. Análisis cinéticos con sustratos típicos de la CBR como las prostaglandinas y daunorubicina junto con datos de análisis colorimétricos, demostraron que las isoformas CBR1 V88 y CBR1 I88 tienen distintas propiedades funcionales<sup>(21)</sup>. Varios estudios demostraron que la actividad de reducción de Antraciclina por la CBR1 V88 y CBR1 I88 son diferencialmente inhibidas por el cardioprotector monoHER<sup>(32)</sup>. El polimorfismo V88I del gen CBR1 fue analizado en estudios in vitro reportando que individuos homocigotos para el genotipo CBR1 88I pueden presentar una baja tasa de síntesis de metabolitos alcohólicos C-13, lo que puede estar asociado con una reducción del riesgo de cardiotoxicidad por antraciclina. Además se encontró que el alelo V88 presenta una mayor actividad catalítica y altos niveles de metabolitos cardiotoxicos en comparación con el alelo CBR1 I88, pero este resultado puede variar dependiendo de la etnicidad de la población analizada. En población asiática se ha encontrado asociación significativa entre el CBR1 y tolerancia a altas dosis doxorubicina<sup>(21)</sup>.

## Carbonil Reductasa (CBR3)

La CBR3 es otra de las principales enzimas Carbonil Reductasas que catalizan la reducción de dos electrones de sustratos endógenos y exógenos como las antraciclinas Daunorrubicina y Doxorubicina. Aunque es también ampliamente expresada, su expresión relativa es menor que la CBR1 en la mayoría de los tejidos analizados. El gen CBR3 que codifica para esta enzima se encuentra localizado a 62 kb del gen CBR1, tiene 3 exones que abarcan una región de 11.2 kb, Su secuencia tiene el 72% de similitud con el gen CBR1 y codifica para una proteína monomérica con 79% de similitud en su secuencia de aminoácidos a la proteína CBR1 (Figura2).<sup>(33)</sup> <sup>(21)</sup> Lakhman y cols. identificaron en el gen CBR3 el polimorfismo V244M el cual resulta en una sustitución de valina por metionina en la posición 244, y está localizado en una región crítica para las interacciones con el cofactor NADPH, presentándose en una alta frecuencia en africanos comparado con la población caucásica<sup>(34)</sup>. En el caso de la CBR3, las variantes alélicas del polimorfismo V244M se encontraron asociadas con una reducción significativa en la actividad enzimática *in vitro* a antraciclinas en comparación con los alelos silvestres. Sin embargo en experimentos cinéticos con isoformas recombinantes de la proteína CBR3 utilizando los sustratos típicos de la enzima CBR como la quinona, se encontró que el alelo CBR3 M244 tenía una velocidad de reacción ( $V_{max}$ ) significativamente mayor que el alelo V244 y por lo tanto mayor actividad<sup>(35)</sup>. En un estudio realizado en pacientes asiáticas con cáncer de mama no se encontraron asociaciones significativas entre los polimorfismos de CBR3 y la farmacocinética de antraciclinas<sup>(21)</sup>.

Un estudio que examinó *in vitro* el efecto de polimorfismo V244M del gen CBR3, en el metabolismo de antraciclinas a sus correspondientes metabolitos alcohólicos doxorubicinol y daunorrubicinol, encontró que la variante V244M reduce significativamente la velocidad de reacción máxima para ambas antraciclinas, comparado con la enzima silvestre, además la variante V244M presentó un incremento significativo en la afinidad al sustrato daunorrubicina y el valor de la eficiencia catalítica para la variante V244M fue significativamente más baja que la de la enzima silvestre para daunorrubicina y doxorubicina. Estos hallazgos sugieren que el polimorfismo V244M del gen CBR3 humano, altera significativamente el metabolismo *in vitro* de doxorubicina y daunorrubicina<sup>(36)</sup>. Se ha demostrado que el polimorfismo CBR3 V244M codifica para isoformas de CBR3 con distintas propiedades enzimáticas, estos datos apoyan la investigación para determinar el rol del polimorfismo CBR3 en el metabolismo variable de fármacos como las antraciclinas, que son sustratos de la enzima CBR3. Blanco y cols. reportaron que el polimorfismo V244M del gen CBR3 puede tener un impacto

en el riesgo de cardiotoxicidad asociada a antraciclinas en niños sobrevivientes de cáncer, debido a su modulación en la formación intracardiaca de metabolitos alcohólicos de antraciclinas <sup>(37)</sup>. Debido a la inconsistencia en los datos reportados por diversas investigaciones, no ha sido bien establecido el papel de las variantes genéticas del gen CBR, sin embargo está claro que dichos polimorfismos en el gen CBR1 y CBR3 pueden tener consecuencias funcionales en el desarrollo de cardiotoxicidad asociada a antraciclinas, pero son necesarias mas investigaciones y estudios clínicos, para poder establecer claramente dicha asociación.

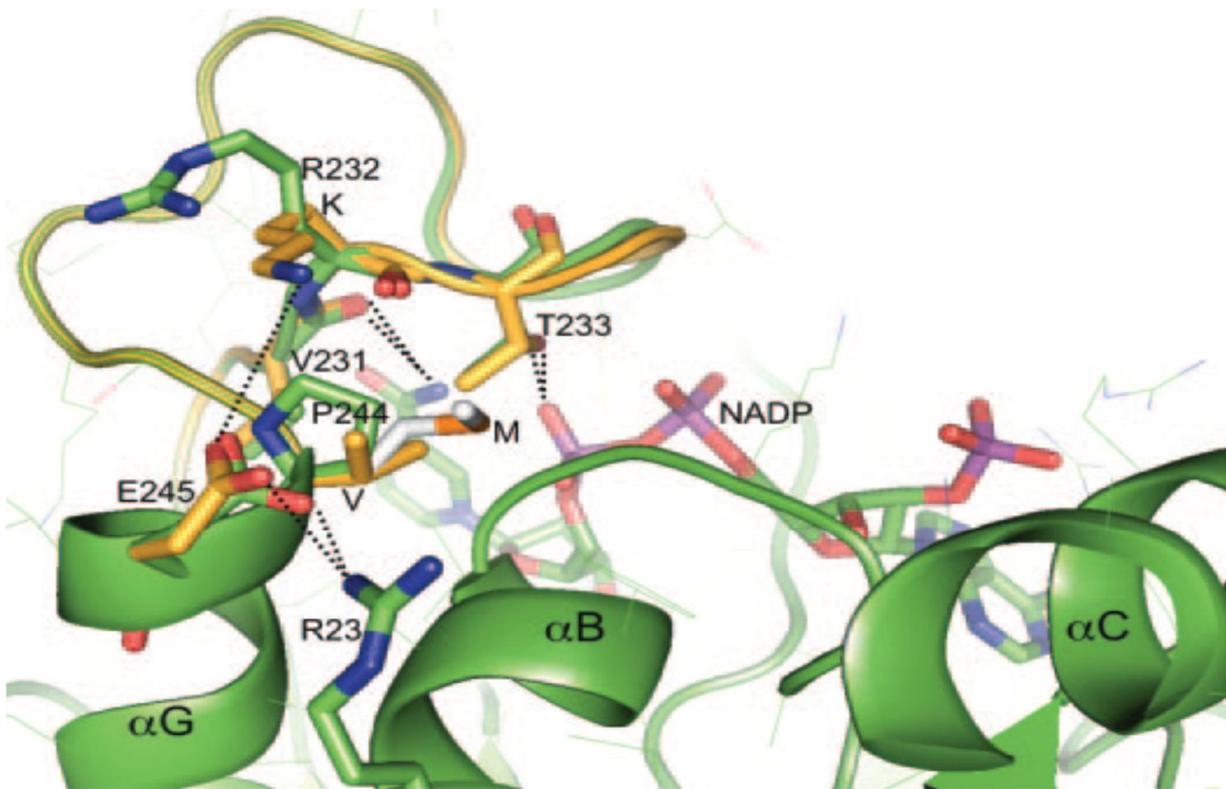


Figura 2: Estructura de Carbonil Reductasa 3

La estructura tridimensional de la Carbonil Reductasa porcina testicular (PTCR) en verde, CBR3 humano en amarillo, que se muestra en el sitio de sustitución V244M. V244 es una prolina (P) en PTCR. La cadena lateral M244 se muestra con un carbono gris y en naranja los átomos de azufre. Otros átomos de la cadena lateral son también de color: carbono (verde o amarillo), el oxígeno (rojo) , nitrógeno ( azul) y fósforo ( púrpura).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **JUSTIFICACIÓN**

Hasta el momento no se ha evaluado suficientemente el papel de los polimorfismos en el desarrollo de cardiotoxicidad por antraciclinas. El análisis de los polimorfismos V244M del gen CBR3, que codifican para diversas formas de la enzima Carbonil Reductasa, puede ser de gran relevancia, ya que estos polimorfismos se asocian con alteraciones en la actividad enzimática y desarrollo de cardiotoxicidad. La identificación de polimorfismos genéticos puede ser de utilidad para reducir el riesgo individual de cardiotoxicidad severa en pacientes tratados con antraciclinas al utilizarlos como marcadores genéticos de susceptibilidad individual en cada paciente, lo que podría mejorar la seguridad del tratamiento con estos fármacos y reducir el riesgo de muerte por cardiomiopatía.

Los resultados obtenidos serán la base para determinar biomarcadores genéticos de riesgo de cardiotoxicidad al tratamiento con antraciclinas. Al conocer esta información y validar la técnica, podremos introducirla como parte de la evaluación diagnóstica inicial de pacientes que recibirán tratamiento con antraciclinas y así ser el primer centro de Oncología Pediátrica en México que la utilice, permitiendo al Oncólogo Pediatra ofrecer una terapia individualizada a los niños y adolescentes tratados con antraciclinas, con el fin de modificar de forma favorable la morbilidad y la supervivencia de estos pacientes en nuestra institución.

### **OBJETIVOS**

#### **Objetivo general**

- Determinar si existe algún polimorfismo relacionado con mayor riesgo de cardiotoxicidad en pacientes pediátricos con cáncer, tratados con antraciclinas.

#### **Objetivos particulares**

- Implementar las condiciones metodológicas óptimas para el análisis y genotipificación de las variantes del gen CBR3.
- Identificar y analizar los polimorfismos del gen CBR3 presentes en pacientes pediátricos.

- Obtener las frecuencias de las variantes del gen CBR3 en población pediátrica mexicana.
- Determinar si existe asociación entre las variantes genéticas de CBR3 y la respuesta al tratamiento de pacientes con leucemias agudas y tumores sólidos.
- Identificar si alguna de las variantes del gen CBR3 estudiadas se asocia a mayor frecuencia de cardiotoxicidad.
- Establecer un posible modelo de riesgo de cardiotoxicidad para los pacientes pediátricos.
- Identificar un posible biomarcador de cardiotoxicidad en pacientes pediátricos.

## **HIPÓTESIS**

Si el polimorfismo V244M del gen CBR3 está asociado al desarrollo de cardiotoxicidad relacionado a antraciclinas, encontraremos un genotipo de riesgo o protección a cardiotoxicidad en pacientes pediátricos con cáncer tratados con antraciclinas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

El presente es un estudio de casos y controles con relación 1:2, donde se analizarán pacientes pediátricos con diagnóstico de tumores sólidos o leucemias agudas.

Definición de Caso: Pacientes tratados con antraciclinas (Doxorrubicina o Daunorrubicina) con desarrollo de cualquier grado de cardiotoxicidad.

Definición de Control: Pacientes tratados con antraciclinas (Doxorrubicina o Daunorrubicina) sin desarrollo de cardiotoxicidad.

### **Evaluación de la Cardiotoxicidad.**

En colaboración con el Departamento de Cardiología, los pacientes fueron sometidos a estudio cardiológico que incluyó evaluación clínica y ecocardiograma en sus diferentes modalidades, con medición de las fracciones de eyección y acortamiento. En los casos en que se detectó cardiotoxicidad, se consideró de manera individual y dependiendo del grado de toxicidad, la realización de estudios complementarios como Resonancia Magnética de corazón o estudio de SPECT (Single Emission Positron Tomography) para la evaluación con mayor precisión de

la función miocárdica. Los datos obtenidos se analizaron para comparar los datos de genotipos de con el desarrollo de cardiotoxicidad.

### **Logística.**

A cada paciente que aceptó participar, previa firma de consentimiento informado (Anexo 1), se le trató de forma habitual de acuerdo protocolo vigente en el Departamento de Hemato-Oncología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”. Se extrajeron 2 ml de sangre periférica para la determinación del genotipo. Esta toma no alteró el tratamiento.

## **METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

### **Extracción de ADN:**

El ADN se obtuvo a partir de sangre periférica colectada en tubos con EDTA, la sangre se liso con cloruro de amonio 1X, y se centrifugo a 2500 rpm 15 min, después se realizaron lavados con PBS 1X, se centrifugo a 2500 rpm 15 min, el botón celular obtenido se utilizó para la extracción de ADN por el método de columna de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial (Qiagen, QIAamp DNA blood, midi kit). En resumen, el botón celular se le adiciono la solución de lisis, y proteinasa K (200ug/uL) incubándolas 10 min a 70°C. Posteriormente se adiciono etanol absoluto, volumen a volumen, se homogeneizo y se pasó a través de la columna, se realizaron dos lavados con las soluciones “AW1” y “AW2”. Finalmente se adiciono la solución de elusión en la columna y por centrifugación se obtiene el DNA, el cual es almacenado a -20°C.

### Genotipificación del gen CBR

En este trabajo se analizó el polimorfismo V244M del gen CBR3. Para la identificación de este polimorfismo se implementó la técnica de PCR-RFLP, analizando el gen CBR3 mediante el programa (NEBcutterCustomDigest) para identificar una enzima endonucleasa que tuviera como sitio de restricción la porción del gen en donde se encuentra el polimorfismo a estudiar, de esta forma se identificó la enzima de restricción HypCH4III como la enzima con el sitio de restricción correspondiente al polimorfismo V244M y el patrón de bandas que se esperaba obtener.

## Reacción en cadena de la polimerasa PCR para el gen CBR3

En este análisis se utilizaron pares de iniciadores que incluyen secuencias intrónicas y exónicas para asegurar la amplificación del gen CBR3 y no de un pseudogen Tabla 1. Se estandarizaron las condiciones óptimas de amplificación realizando curvas de concentración del iónMg<sup>2+</sup>, Taq polimerasa y temperatura de alineación. Tabla 1: Secuencias de los iniciadores empleados para la amplificación de gen CBR3.

El DNA genómico se amplificó con 20 pm de los oligonucleótidos específicos para el gen CBR3, dNTP's, regulador 1X (20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>), y 0.5 U Taq ADN polimerasa (New EnglandBioLabs). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial de 92°C por 5 min, posteriormente 35 ciclos a 92°C 30 s, 64.5°C por 40 s, 72°C 50 s, y extensión final de 72°C por 10 min. Se obtuvo un producto de PCR de 780 pb que se visualizó en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

### Análisis RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*)

Después de la amplificación 10 µl del producto de PCR fueron digeridos con 10 U de la enzima de restricción HypCH4III (New EnglandBioLabs) a 37°C por 5 horas. En presencia del polimorfismo se generan 2 sitios de restricción dando origen a 3 fragmentos de 503pb, 197pb, y 80pb. Si no existe el polimorfismo, la enzima genera 3 sitios de restricción que dan origen a 4 fragmentos de 380pb, 197pb, 123pb y 80pb. La restricción enzimática fue visualizada mediante luz UV en un gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio.

## **UNIVERSO DE ESTUDIO**

Existen sólo un estudio publicado acerca de la relación entre las variantes genéticas del gen CBR y el desarrollo de cardiotoxicidad. Sin embargo en la literatura se reportan frecuencias genéticas del gen CBR en diferentes poblaciones presentando variantes importantes entre sí. Utilizando los datos reportados del genotipo CBR3 para el polimorfismo V244M, para una población mexicana caucásica se obtuvo un tamaño de muestra mínimo con base en la fórmula para el cálculo de tamaño de muestra para estudios de casos y controles la cual es la siguiente: 35 Donde: Frecuencia de expresión entre los casos (p1) = 0.07

Frecuencia de expresión entre los controles ( $p_2$ ) = 0.15 OR = 8 Nivel de confianza o seguridad= 0.9 Potencia = 0.8  $Z_{1-\alpha/2}$  = 1.96

## **CRITERIOS**

### Criterios de Inclusión

#### **Casos:**

- Pacientes pediátricos con diagnóstico de tumores sólidos y leucemias agudas, tratados en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.
- Que hayan recibido antracilinas como parte del protocolo de tratamiento para su enfermedad.
- Con desarrollo de cardiotoxicidad.
- Que estén en posibilidades de ser sometidos a valoración cardiológica que incluya ecocardiografía.
- Los pacientes que fallezcan o abandonen pueden ser incluidos siempre y cuando cuenten con una valoración cardiológica realizada en nuestro hospital que incluya ecocardiograma y se haya tomado la muestra antes del fallecimiento o abandono.
- Con una dosis acumulada de Doxorubicina mayor o menor de 300 mg/m<sup>2</sup>, con y sin cardioprotector.
- Que acepten participar en el estudio y firmen consentimiento informado.

#### **Controles**

- Pacientes pediátricos con diagnóstico de tumores sólidos y leucemias agudas, tratados en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.
- Que hayan recibido antracilinas como parte del protocolo de tratamiento para su enfermedad.
- Sin desarrollo de cardiotoxicidad.
- Con una dosis acumulada de Doxorubicina mayor o menor de 300 mg/m<sup>2</sup>, con y sin cardioprotector.
- Que estén en posibilidades de ser sometidos a valoración cardiológica que incluya ecocardiografía.
- Los pacientes que fallezcan o abandonen pueden ser incluidos siempre y cuando cuenten con una valoración cardiológica realizada en nuestro hospital que incluya ecocardiograma y se haya tomado la muestra antes del fallecimiento o abandono.
- Que acepten participar en el estudio y firmen consentimiento informado.

### **Criterios de exclusión:**

- Muestra insuficiente (cuando la cantidad de DNA extraída no permita la realización de todas las pruebas necesarias para el estudio).

### **VARIABLES**

#### Variables independientes

- Genotipo encontrado del gen CBR3

#### Variables dependientes

- Grado de Cardiotoxicidad

#### Variables de confusión

- Uso de cardioprotector
- Tipo de cáncer
- Edad
- Sexo
- Empleo de otros fármacos cardiotoxicos
- Empleo de radioterapia a mediastino

### **PLAN DE ANÁLISIS DE LOS DATOS**

Durante 24 meses se reclutarán 21 casos de pacientes con diagnóstico de tumores sólidos y leucemias agudas. En estos pacientes se obtuvieron los datos de la respuesta clínica y por el laboratorio al tratamiento durante y después del diagnóstico. Se determinó el genotipo de la enzima CBR y se buscó el genotipo en cada caso. Se realizó estadística descriptiva e inferencial de los datos obtenidos. Se buscaron las medidas del grado de asociación del polimorfismo genotipo del gen CBR3 identificado en cada paciente, por la estimación de razón de momios (RM), usando regresión logística condicional para investigar el efecto simultáneo de varias variables. Realizaremos un análisis multivariado para conocer la

significancia estadística del polimorfismo del gen CBR3 con las variables confusorias.

### **Consideraciones éticas**

Este estudio fue realizado de conformidad con los principios que establece la 18ª Asamblea Médica Mundial (Helsinki, 1964) y todas las modificaciones aplicables establecidas por las Asambleas Médicas Mundiales y los lineamientos ICH para la Buena Práctica Clínica (GCP). Es un estudio con riesgo mínimo debido a que en una sola ocasión se tomarán 2 ml de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de tumores sólidos y leucemias agudas de rango de edad de 0 a 18 años. Esta toma no altera el tratamiento. Además las Antraciclinas son medicamentos que se administran a los pacientes con tumores sólidos y leucemias agudas como parte del protocolo clínico de tratamiento para estas neoplasias vigente en el HIM, de tal forma que no se alteró su tratamiento.

Cada uno de los pacientes que se incluyó en el estudio cuenta con la carta de consentimiento informado, firmado previamente por padre o tutor, y además la carta de asentimiento en aquellos pacientes que así lo requieran (Ver anexo 1).

En caso de que los resultados generados de la investigación, indiquen un genotipo de riesgo a cardiotoxicidad a antraciclinas el padre o tutor y el paciente si es mayor de 8 años serán informados acerca de dichos resultados. Así como también se le proporcionarán a su médico para que este utilice la información y la aplique de acuerdo al conocimiento médico.

### **Consideraciones de bioseguridad**

En el presente estudio, la toma de muestra se realizó en el área de hospitalización oncológica y procesada en el laboratorio de oncología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”. Los desechos biológicos y CRETl fueron tratados y eliminados de acuerdo al manual de procedimientos del laboratorio. Los desechos fueron eliminados en los contenedores específicos de acuerdo al tipo de desecho, y recolectados por el área de control de medio ambiente del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

### **Grupo de trabajo**

La presente investigación fue realizada por un grupo interdisciplinario de investigadores que incluyen médicos clínicos, oncólogos y biólogos moleculares, todos ellos expertos en su área, con lo que se aseguró la factibilidad, desarrollo y buen término de la presente investigación.

## RESULTADOS

Este reporte incluye únicamente los avances del estudio hasta el mes de enero de 2013.

### Estandarización de la Técnica

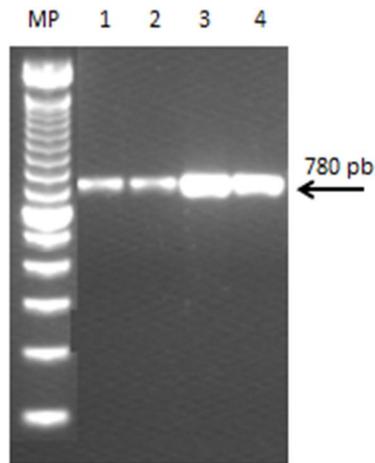
Se hicieron curvas de temperatura de alineamiento y las condiciones obtenidas son:

Curvas de temperatura de alineamiento, tomando en cuenta la temperatura medio de los iniciadores, se probaron las siguientes temperaturas 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 64.5°C y 65°C. La temperatura optima de alineamiento fue de 64.5°C en donde se obtuvo un producto amplificación sin bandas inespecíficas (Tabla 2).

---

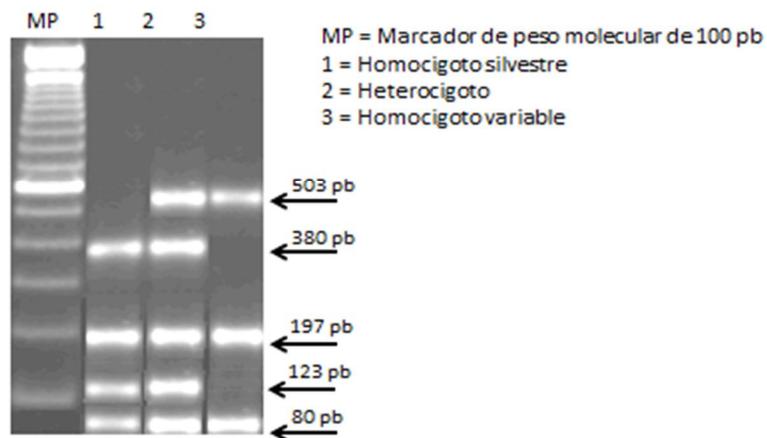
<b>Desnaturalización inicial</b>	92oC	5 min
<b>35 ciclos</b>	92oC	30 seg
	64.5oC	40 seg
	72oC	50 seg
<b>Extensión final</b>	72oC	10 min
<b>Producto de PCR</b>	780 pb	

**Tabla 2: Condiciones de amplificación estandarizadas.**



MP= Marcador de peso molecular de 100 pb.  
 1,2,3,4 = producto de PCR del gen CBR3 de 780 pb de pacientes con cáncer.

**Figura 3:** Amplificación del Gen CBR3 en donde se observa el producto de 780 pares de bases.



**Figura 4:** Digestión del producto de PCR del gen CBR3 con la enzima de restricción HypCH4III.

### *Población Estudiada*

Entre marzo de 2011 y enero del 2013 se reclutaron un total de 42 pacientes, de los cuales 22 fueron masculinos (52 %) y 20 fueron femeninos (48%).

Los diagnósticos incluyeron 19 casos (45.2%) de Leucemia Linfoblástica aguda, 14 casos (33.3%) de Leucemia Mieloide aguda, tres pacientes (7.1%) con tumores hepáticos (un hepatoblastoma, un sarcoma hepático y un hepatocarcinoma), 2 (4.7%) tumores neuroectodérmicos primitivos periféricos, 2 (4.7%) linfomas (un LH y un LNH) un rhabdomiosarcoma y un osteosarcoma (2.3% para cada uno)

El rango de edad al diagnóstico fue de 3 meses a 15 años un mes con una mediana 27.8 meses

Las dosis acumuladas de antraciclicos variaron de  $60\text{mg/m}^2$  a  $1040\text{mg/m}^2$ , con un promedio de  $185\text{mg/m}^2$ , dosis que varió de acuerdo al esquema de tratamiento.

El protocolo para leucemia aguda linfoblástica fue el esquema vigente en el Hospital Infantil de México, que consiste en la administración de multiagentes de manera rotacional, con una dosis total de daunorrubicina de  $330\text{ mg/m}^2$  para alto riesgo (17 casos) y de  $180\text{ mg/m}^2$  para riesgo habitual (2 casos). Dos de los pacientes presentaron recaídas uno de alto riesgo y uno de riesgo habitual y recibieron dosis adicionales de daunorrubicina, alcanzando dosis acumuladas de  $660\text{ mg/m}^2$  y  $420\text{ mg/m}^2$  respectivamente; y un caso tuvo falla a la inducción, por lo que la dosis total de daunorrubicina fue de  $540\text{ mg/m}^2$ .

Los 14 pacientes con leucemias mieloides agudas los pacientes recibieron el protocolo NOPHO AML-93, que combina citarabina, doxorubicina, etopósido, mitoxantrona y 6-Mercaptopurina. Las dosis acumuladas de doxorubicina son de  $150\text{ mg/mg}$ , con 30 a  $60\text{ mg/m}^2$  totales de mitoxantrona.

En el grupo de los tumores hepáticos, los pacientes con hepatoblastoma y hepatocarcinoma recibieron el esquema PLADO, con dosis acumuladas de  $512\text{ mg/m}^2$  para el hepatoblastoma y de  $580\text{ mg/m}^2$  para el hepatocarcinoma. El paciente con sarcoma hepático recibió esquema VAC-ADR alternado con etopósido y ciclofosfamida y la dosis acumulada fue de  $385\text{ mg/m}^2$ .

Al paciente con Linfoma no Hodgkin se le administró esquema COPADM, en el que la dosis acumulada de doxorubicina fue de  $480\text{ mg/m}^2$ ; y al caso de Linfoma

Hodgkin se le dio esquema ABVD, con los correspondientes 300 mg/m<sup>2</sup> de doxorubicina.

El paciente con Rbdomiosarcoma recibió esquema VAC-ADR y la dosis total alcanzada fue de 180 mg/m<sup>2</sup>.

En el caso de Osteosarcoma se administró un esquema basado en Cisplatino, Doxorubicina, con Etopósido e Ifosfamida en la fase neoadyuvante. Hubo progresión de la neoplasia, por lo que se administraron fármacos de segunda línea (no Doxorubicina) y la dosis acumulada del antracíclico fue de 450 mg/m<sup>2</sup>.

### *Evaluación cardiológica*

De los 42 pacientes hasta ahora registrados, 30 cuentan con evaluación de la función cardíaca por ecocardiografía.

Hasta el momento se han detectado 19 controles (sin cardiopatía) y 11 casos (con algún grado de cardiopatía).

### *Cardiotoxicidad y dosis acumulada del antracíclico*

Dentro de los 19 controles, 15 habían recibido menos de 300 mg/m<sup>2</sup> de antraciclina, con rango de 60 a 250 mg/m<sup>2</sup> y 4 recibieron una dosis superior a 300 mg/m<sup>2</sup>, con rango de 300 a 660 mg/m<sup>2</sup>

Dentro de los 11 casos, sólo uno había recibido menos de 300 mg/m<sup>2</sup> de antraciclina, en los demás pacientes la dosis era superior a esta cifra, con rango de 300 a 1040 mg/m<sup>2</sup>

De los 11 pacientes en que se detectó disfunción miocárdica (casos), la disfunción fue leve en 10 casos y severa en uno. Esta última paciente tenía el diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica de alto riesgo y había recibido 330 mg/m<sup>2</sup> de dosis acumulada de daunorrubicina (sin cardioprotector) y la insuficiencia cardíaca ocasionó la muerte de esta paciente y hasta el momento esta es la única defunción registrada en relación a toxicidad por antraciclina.

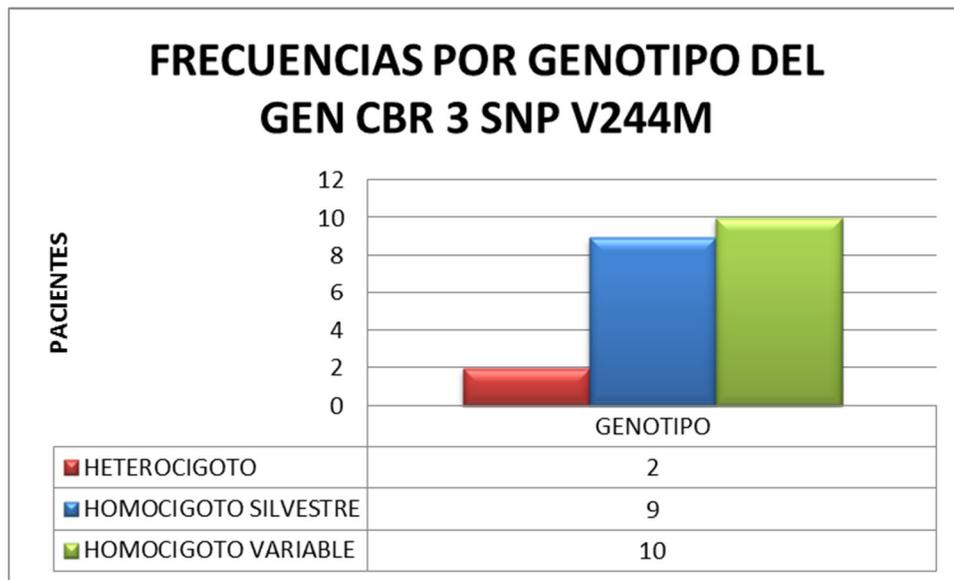
### *Genotipificación de los pacientes*

El genotipo del gen CBR3 (SNP V244M), hasta el momento ha sido determinado en 21 de los 42 pacientes (Figura 3 y 4).

Nueve pacientes (42.85%) tuvieron genotipo homocigoto silvestre (GG), en 2 el genotipo fue heterocigoto variante (GA) (9.52%) y 10 en pacientes (47.61%) se encontró un genotipo homocigoto variante (AA) (figura 5 y Tabla 2).

Las frecuencias alélicas fueron 20 (47.6%) para el alelo silvestre y 22 (52.4%) para el alelo variante.

De estos 21 pacientes genotipificados, hasta el momento se ha realizado evaluación cardiológica en 14, de los cuales 4 corresponden a casos (con cardiopatía) y 10 a controles (sin cardiopatía).



**Figura 5:** Distribución de genotipos

Frecuencias por genotipo del gen CBR3 SNP V244M		
Genotipo	Frecuencia n= 21 (%)	
	Casos (con cardiotoxicidad)	Controles (sin cardiotoxicidad)
Homocigoto silvestre	2	4
Heterocigoto	0	2
Homocigoto variable	2	4

**Tabla 2:** Distribución de genotipos de acuerdo a la presencia o ausencia de cardiotoxicidad

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La cardiotoxicidad es una de las complicaciones más graves y potencialmente mortales de las antraciclinas, este tipo de toxicidad se correlaciona con la dosis acumulada y por ello los esquemas de tratamiento actuales para neoplasias pediátricas limitan las dosis acumuladas de este fármaco a menos de 300 mg/m<sup>2</sup>. En algunos casos la necesidad de dosis mayores de antracíclico ha sido posible gracias al uso de dexrazoxano, un cardioprotector que interfiere con la acción de radicales libres al actuar como quelante de hierro.

Es de resaltar que algunos pacientes desarrollan cardiotoxicidad con dosis menores de antraciclinas, mientras que otros no la presentan a pesar del uso de altas dosis de estos fármacos. Lo anterior presupone que algunos pacientes pueden tener predisposición genética para el desarrollo de esta complicación y de esta idea deriva el presente estudio, ya que el papel potencial de los factores genéticos aún no está definido.

El gen de la enzima Carbonil Reductasa 3 (CBR3) es uno de los candidatos a evaluar como posible factor de riesgo genético para el desarrollo de cardiotoxicidad, ya que constituye un elemento importante en la detoxificación de las quinonas. En los humanos Carbonil Reductasa (CBR) tiene una importante actividad para el metabolismo de xenobióticos y compuestos carbonilo endógenos. Es posible que los polimorfismos genéticos en CBR1 y CBR3 son la clave para la amplia variabilidad interindividual en la disposición de CBR a sustratos de fármacos.

Recientemente se ha demostrado que su polimorfismo V244M resulta en una enzima con distinta actividad catalítica que determina una síntesis 2.6 veces mayor de doxorubicinol, que es el metabolito activo, lo que a su vez se ha asociado con un riesgo 8 veces mayor de falla cardíaca congestiva en los pacientes que portan el genotipo homocigoto silvestre (GG), con respecto a los que son homocigos variantes (AA)<sup>(39)</sup>. Esta información correlaciona con nuestros resultados, ya que la única paciente que desarrollo falla cardíaca grave portaba el genotipo GG.

De los datos obtenidos en la distribución de genotipos ahora obtenidos, llama la atención la alta frecuencia de genotipos variante, lo cual podría resultar en un elemento protector contra la cardiotoxicidad por antraciclinas y esto se correlaciona con la baja frecuencia de cardiotoxicidad reportada en series mexicanas.<sup>(17)</sup>

Estos resultados son parciales y aun es necesario completar la muestra de este estudio de casos y controles que buscará también los polimorfismos del Gen CBR1.

### **Limitaciones del estudio**

El tiempo de seguimiento para muchos de los pacientes que se incluyeron en el estudio fue corto tomando en cuenta que algunas de las manifestaciones de toxicidad cardiaca aparecen después de 10 años.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Pizzo, Philip A.** Principles and Practice of Pediatric Oncology. 4th. s.l. : Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
2. **Medina-Sanson A, Martinez-Avalos A, Gallegos Castorena S** et al. Pediatric Oncology at Hospital Infantil de Mexico: fifty years of accomplishment..Pediatr Hem Oncol, 2002;19: 383-7.
3. **Perry, Michael C.** The Chemotherapy source book. [aut. libro] Michael C Perry. The Chemotherapy source book. s.l. : Lippincott Williams and Wilkins, 2001, págs. 231-235.
4. **Chu, Edward.** Manual de quimioterapia antineoplásica para el Médico 2002. s.l. : Jones and Barlett Publishers 2002, 2002, págs. 123-128.
5. **Minotti G and Menna, Pier A.** Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. Pharmacological Reviews 2004; 2:185-229.
6. **Van Dalen, E C y Caron, H N.** Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity in children: The evidence. Eur J Cancer 2007; 43: 1134-1140.
7. **Mertens, A C y Yasui, Y.** Late mortality experience in five-years survivors of childhood and adolescent cancer: The Childhood Cancer Survivor Study. J Clin Oncol, 2001; 19: 3163-3172.
8. **Ruggiero A and Ridola V.** Anthracycline cardiotoxicity in childhood. 2008, Pediatr Hematol Oncol, Vol. 25, págs. 261-281.
9. **Perez C and Agusti MA.** Late-onset anthracycline-induced cardiotoxicity.. 8, Med Clin ,2009, Vol. 133, págs. 311-312.
10. **Van Dale EC and Van der Pal H J.** Clinical Heart failure in a cohort of children treated with anthracyclines: A long-term follow-up study. Eur J Cancer , 2006; 42: 3191-3198.
11. **Green D N and Grigoriev YA.** Congestive heart failure after treatment for Wilm's tumor: A report from the national Wilm's tumor study group. J Clin Oncol, 2001: 1926-1934.
12. **Pein F and Sakiroglu O.** Cardiac abnormalities 15 years and more after adriamycin therapy in 229 childhood survivors of a solid tumor at the Institut Gustave Roussy. Br J Cancer, 2004; 91: 37-44.

13. **Kremer L C and Vander Pal H J.** Frequency and risk factors of subclinical cardiotoxicity after anthracycline therapy in children: A systematic review. *Ann Oncol*, 2002; 13: 819-829.
14. **Steinherz L I and Steinhertz PG.** Cardiac Toxicity 4 to 20 years after completing antracycline therapy. *JAMA*, 1991; 266: 1672-1677.
15. **Creutzling U and Diekamp S.** Longitudinal evaluation of early and late anthracycline cardiotoxicity in children with AML. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48: 651-662.
16. **LipshultzS E and Lipstz S R.**Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastica leukemia. *J Clinic Oncol*,2005; 23:2629-2639.
17. **Sanchez Medina J and Gonzalez Remella O.**The effect of dexrazoxane for clinical and subclinical cardiotoxicity in children with acute myeloid leukemia. *Pediatric Hematology Oncology*, 2010; 32: 294-297.
18. **Shiwei Deng y Leszek Wojnwski.** Genotyping the risk of anthracycline induced cardiotoxicity. *Cardiovascular Toxicology*, 2007; 7: 129-134.
19. **Forrest G L and Gonzalez B.** Carbonyl Reductase. *Chem Biol Interact*, 2000; 129: 21-40.
20. **Lal S and Sandanaraj E.** CBR1 y CBR3 pharmacogenetics and their influence on doxorubicin dispotion in asian breast cancer patients. *Cancer Sci*, 2008; 99: 2045-2044.
21. **Covarrubias V G and Lakhman SS.** Higher activity of polymorphic NADPH : quinone oxidoreductase in liver cytosols from blacks compared to whites. *Toxicol Lett*,2006; 164: 249-258.
22. **Onkar B and Morgan K.** Naturally occurring variants of human CBR3 alter anthracycline in vitro metabolism. *Jof Pharmacol Exper Therap* 2010; 332: 755-763.
23. **Forrest GL and Alkman S.** Induction of a human carbonyl reductase gene located on chromosome 21. *Biochim Biophys Acta*, 1990; 1048:149-155.
24. **Frost B M and Eksborg S.**Pharmacokinetics of doxorubicin in children with acute lymphoblastic leukemia: multi-institutional collaborativa study. *Med Pediatr Oncol*,2002; 38: 329-337.

25. **Singal PK and Iliskovic N.** Doxorubicin induced cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 1998; 339: 900-905.
26. **Sukhwinder S and Ghosh D.** Functional significance of a natural allelic variant of human carbonyl reductase 3 (CBR3) . *Drug Metabolism and Disposition*, 2006; 33: 254-257.
27. **Forrest GL and Gonzalez B.** Carbonyl Reductase. *Chem Biol Interact*, 2000; 129: 21-40.
28. **Covarrubias, V and Ghosh, D.** A functional genetic polymorphism on human carbonyl reductase 1 (CBR1 V88I) impacts on catalytic activity and NADPH binding affinity. *Drug Metab Dispos.* 2007;35: 973-980.
29. **Forrest G L and Gonzalez B.** Human Carbonyl reductase overexpression in the heart advances development of doxorubicin induced cardiotoxicity in transgenic mice. *Cancer Research*, 2000; 60: 5158-5164.
30. **Kalabus, James L and Sanborn, Carrie C.** Expression of the anthracycline metabolizing enzyme carbonyl reductase 1 (CBR1) in hearts from donors with Down Syndrome. *American Society for Pharmacology and experimental therapeutics*, 2010; 10: 1-18.
31. **Kassner N and Huse KI.** Carbonyl reductase 1 is a predominant Doxorubicin reductase in the human liver. *Drug Metabolism and Disposition*, 2008; 36: 2113-2120.
32. **Olson L E and Bedja D.** Protection from doxorubicin induced cardiac toxicity in mice with a null allele of carbonyl reductase 1. *Cancer Research*, 2003; 63:6602-6606.
33. **Gonzalez Covarrubias, Vanessa y Kalabus, James L.** Inhibition of polymorphic human carbonyl reductase 1 (CBR1) by the cardioprotectant flavonoid 7-mono-hydroxyethyl rutoside (monoHER). *Pharm Res*, 2008; 25:1730-1734.
34. **Lakshman SS and Ghosh, D.** Functional significance of a natural allelic variant of human carbonyl reductase 3(CBR3). *Drug Metab Dispos.* 2005;33:254-257.
35. **Blanco G J and Leisenring, Wendy.** Genetic polymorphisms in the carbonyl reductase 3 gene CBR3 and the NADPH: quinone oxidoreductase 1 gene NQO1 in patients who developed anthracycline-related congestive heart failure after childhood cancer. *Cancer*. 2008;112.
36. **Fernandez, Pita, et al.** Calculo de tamaño muestra en estudios de casos y controles. *Cat Aten Primaria*. 2002; 9:148-150.

## Glosario

*Poliqumioterapia:* Es la asociación de varios citotóxicos que actúan con diferentes mecanismos de acción, sinérgicamente, con el fin de disminuir la dosis de cada fármaco individual y aumentar la potencia terapéutica de todas las sustancias juntas. Esta asociación de quimioterápicos suele estar definida según el tipo de fármacos que forman la asociación, dosis y tiempo en el que se administra, formando un esquema de quimioterapia.

*Quimioterapia adyuvante:* se administra después de un tratamiento principal como es la cirugía, para disminuir la incidencia de diseminación a distancia del cáncer.

*Quimioterapia neoadyuvante o de inducción:* Inicia antes de cualquier tratamiento definitivo (quirúrgico o de radioterapia) con la finalidad de evaluar la efectividad in vivo del tratamiento. La quimioterapia neoadyuvante disminuye el estadio tumoral pudiendo mejorar los resultados de la cirugía y de la radioterapia y en algunas ocasiones la respuesta obtenida al llegar a la cirugía, es factor pronóstico.

*Radioquimioterapia concomitante:* También llamada quimioradioterapia, que se administra de forma concurrente o a la vez con la radioterapia con el fin de potenciar el efecto de la radiación o de actuar espacialmente con ella, es decir potenciar el efecto local de la radiación y actuar de forma sistémica con la quimioterapia.

**Anexo 1:**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO VOLUNTARIO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN**

**Polimorfismos del gen Carbonil Reductasa (CBR) y su asociación con la cardiotoxicidad por antraciclinas en pacientes pediátricos mexicanos con neoplasias malignas.**

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

Nombre del tutor \_\_\_\_\_

Se le hace una cordial invitación para que su hijo(a) participe en un estudio de investigación el cual tiene como objetivo evaluar la asociación entre los genes de su hijo (ADN) que se obtendrán de sus células sanguíneas con la toxicidad a antraciclinas, que es medicamento que su hijo recibe como parte del tratamiento para su enfermedad. Al aceptar por escrito la participación de su hijo(a), queda en el entendido que:

- La participación de su hijo(a) es completamente voluntaria.
- No se altera en ninguna forma el tratamiento de su hijo(a).
- Existe riesgo mínimo, ya que al momento de la obtención de la muestra de sangre de su hijo(a), se realizará un piquete en el brazo de su hijo(a) y puede sentir un poco de dolor al introducir la aguja y surgir o no, un moretón en el brazo de su hijo(a).
- No tendrá ningún costo.
- Se tomarán 2ml de sangre (1 cucharadita) de los ya utilizados para sus pruebas rutinarias.
- Se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su persona.
- Su hijo(a) puede tener o no un beneficio directo y ayudar más adelante a los niños que tengan esta enfermedad.
- Dado que la información generada puede ser de importancia para su hijo(a) los datos se proporcionarán directamente a su médico, para que este utilice la información y la aplique de acuerdo al conocimiento médico.
- Usted tendrá acceso a la información o resultados que se obtengan sobre su hijo(a) como parte del estudio principal y esta información será proporcionada por el investigador.
- En cualquier momento puedo retirar a mi hijo(a) del estudio y solicitar la eliminación del ADN de mi hijo(a), sin que esto afecte su tratamiento

- En caso de que usted tenga alguna duda relacionada al estudio, usted puede preguntarla a los investigadores.
- Los resultados obtenidos de este estudio podrán ser publicados a nivel nacional e internacional, manteniendo siempre la confidencialidad del paciente.

Ante dos testigos y el investigador principal, firmo o imprimo mi huella dactilar como constancia de mi aceptación voluntaria en la participación de mi hijo(a) en este estudio, el día \_\_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_; 20\_\_ en la Cd de México.

\_\_\_\_\_

Firma o huella dactilar del padre o tutor

Testigo 1

NOMBRE	FIRMA
_____	

DIRECCIÓN	PARENTESCO
_____	

Testigo 2

NOMBRE	FIRMA
_____	

DIRECCIÓN	PARENTESCO
_____	

<u>Investigador Principal</u>	<u>Investigador suplente</u>
Dra. Aurora Medina Sansón M en C.	Arturo Ramírez Pacheco
Jefa del departamento de Hemato-Oncología	Técnico Laboratorista A

## Anexo 2:

### **CARTA DE ASENTIMIENTO VOLUNTARIO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACION.**

Polimorfismos del gen Carbonil Reductasa (CBR) y su asociación con la cardiotoxicidad por antraciclinas en pacientes pediátricos mexicanos con neoplasias malignas.

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

Se te hace una cordial invitación para que participes en un estudio de investigación el cual tiene como objetivo evaluar la asociación entre la información de tus genes (ADN) que se obtendrá de las células de tu sangre con la toxicidad a antraciclinas, que es medicamento que recibes como parte del tratamiento para tu enfermedad. Al aceptar por escrito tu participación, queda en el entendido que:

- Tu participación es completamente voluntaria
- No se altera en ninguna forma tu tratamiento
- Existe riesgo mínimo, ya que al momento de la obtención de la muestra de sangre, se te realizará un piquete y puedes sentir un poco de dolor al introducir la aguja y puede surgir o no, un moretón en tu brazo.
- No tendrá ningún costo.
- Se te tomaran 2ml de sangre (1 cucharadita) de los ya utilizados para tus pruebas rutinarias.
- Se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con tu persona.
- Puedes tener o no un beneficio directo y ayudar más adelante a los niños que tengan esta enfermedad.
- Dado que la información generada puede ser de importancia para ti los datos se proporcionarán directamente a tu médico, para que este utilice la información y la aplique de acuerdo al conocimiento médico.
- Los investigadores te proporcionarán la información o resultados que se obtengan como parte del estudio principal.
- En cualquier momento puedes retirarte del estudio y solicitar la eliminación de tu ADN, sin que esto afecte tu tratamiento.
- En caso de que tú tengas alguna duda relacionada al estudio, puedes preguntarla a los investigadores.

- Los resultados obtenidos de este estudio podrán ser publicados a nivel nacional e internacional, manteniendo siempre en secreto tus registros.

Si tu firmas este asentimiento, tus padres o representantes legales también deberán firmar el Formato de Consentimiento Informado para poder así hacerlo válido. Una vez que este documento haya sido firmado, tú recibirás una copia. Ante dos testigos y el investigador principal, firmo o imprimo mi huella dactilar como constancia de mi aceptación voluntaria en la participación en este estudio, el día \_\_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_; 20\_\_ en la Cd de México.

Asentimiento del participante

_____	_____	_____
Firma o huella dactilar	Fecha	Hora
_____	_____	_____
Persona que solicita el asentimiento	Fecha	Hora
_____	_____	_____
Padre o tutor	Fecha	Hora
_____	_____	_____

Investigador Principal

Dra. Aurora Medina Sansón M en C.

Investigador suplente

Arturo Ramírez Pacheco

## Anexo 3

### Cronograma de Actividades

