



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
SECRETARÍA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**“TÍTULO DE TESIS”**

VARIANTES ALÉLICAS EN GENES DE CYP450 ASOCIADAS A RESPUESTA A  
TRATAMIENTO EN PACIENTES CON TUMORES SÓLIDOS TRATADOS CON  
IFOSFAMIDA

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**ESPECIALISTA EN PEDIATRÍA**

PRESENTA:

**DR. CÉSAR ALEJANDRO GALVÁN DÍAZ**

TUTOR:

**DR. MARTÍN PÉREZ GARCÍA**

COTUTOR:

**DRA. LUZ MARÍA TORRES ESPÍNDOLA**



MÉXICO, D.F.

2016



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.

**VARIANTES ALÉLICAS EN GENES DE CYP450 ASOCIADAS A RESPUESTA  
A TRATAMIENTO EN PACIENTES CON TUMORES SÓLIDOS TRATADOS  
CON IFOSFAMIDA**



Dr. Alejandro Serrano Sierra  
Profesor titular del curso de  
Especialidad de Pediatría



Dra. Rosaura Rosas Vargas  
Directora de Enseñanza



Dr. Manuel Enrique Flores Landero  
Jefe del Departamento de Pre y Posgrado



Dr. Martín Pérez García  
Tutor de Tesis



Dra. Luz María Torres Espindola  
Cotutor de Tesis

***A mi familia y amigos:***

Por brindarme su apoyo y cariño en todo momento, y por hacer de esta etapa una de las mejores, por todo gracias.

## Tabla de contenido

<b>TÍTULO DE LA TESIS</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>2</b>
<b>ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS</b>	<b>2</b>
<b>TUMORES SÓLIDOS EN PEDIATRÍA</b>	<b>2</b>
TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	2
SARCOMAS DE TEJIDOS BLANDOS	3
RETINOBLASTOMA	3
TUMORES RENALES	4
OSTEOSARCOMA	4
<b>TRATAMIENTO DE LOS TUMORES SÓLIDOS</b>	<b>4</b>
<b>LA IFOSFAMIDA EN ONCOLOGÍA</b>	<b>5</b>
MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ALQUILANTES	5
FARMACOCINÉTICA DE LA IFOSFAMIDA	5
FARMACOGENÉTICA DE LA IFOSFAMIDA EN RELACIÓN A LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO	6
<b>RESPUESTA AL TRATAMIENTO</b>	<b>6</b>
<b>EFFECTOS DE LOS POLIMORFISMOS EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.</b>	<b>7</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>7</b>
<b>DISEÑO DE ESTUDIO</b>	<b>7</b>
<b>SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN</b>	<b>8</b>
<b>CRITERIOS DE INCLUSIÓN</b>	<b>8</b>
<b>CRITERIOS DE EXCLUSIÓN</b>	<b>8</b>
<b>CRITERIOS DE ELIMINACIÓN</b>	<b>9</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>9</b>
TOMA DE LA MUESTRA	9
EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA.	9
GENOTIPIFICACIÓN MEDIANTE EL ENSAYO DE DISCRIMINACIÓN ALÉLICAS POR SONDAS TAQMAN®	9
EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A TRATAMIENTO	10
MONITOREO DE NIVELES DE IFOSFAMIDA EN GOTAS DE SANGRE SECA	10
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>11</b>
<b>ASPECTOS ÉTICOS</b>	<b>11</b>
<b>RESULTADOS.</b>	<b>12</b>
<b>FRECUENCIAS ALÉLICAS EN GENES DE METABOLISMO DE LA IFOSFAMIDA.</b>	<b>13</b>
FRECUENCIA DEL RS8192709 EN EL GEN <i>CYP2B6</i> .	13
FRECUENCIA DEL RS3211371 EN EL GEN <i>CYP2B6</i> .	14
FRECUENCIA DEL RS3745274 EN EL GEN <i>CYP2B6</i> .	14
FRECUENCIA DEL RS776746 EN EL GEN <i>CYP3A5</i>	14

FRECUENCIA DEL RS1799853 EN EL GEN <i>CYP2C9</i> .	14
<b>FACTORES PRONÓSTICO PARA SOBREVIDA Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO</b>	<b>16</b>
<b>NIVELES DE IFOSFAMIDA EN GOTTA DE SANGRE SECA</b>	<b>20</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>25</b>
<b>CONCLUSIÓN.</b>	<b>27</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>28</b>

## Título de la tesis

“Variantes alélicas en genes de *CYP450* asociadas a respuesta a tratamiento en pacientes con tumores sólidos tratados con ifosfamida”

**Autor:** Dr. César Alejandro Galván Díaz

**Tutor:** Dr. Martín Pérez García

**Cotutor:** Dra. Luz María Torres Espíndola

## Introducción

El cáncer en los niños representa la segunda causa de muerte después de los accidentes vehiculares, dentro de los cánceres las leucemias y los linfomas ocupan la primera y segunda causa de cáncer infantil seguido de los tumores sólidos con más del 40% de incidencia para el total de cáncer infantil

1

El tratamiento que se utiliza en la terapia oncológica incluye a la ifosfamida que a pesar de ser muy eficaz en el tratamiento también ocasiona serios eventos adversos como la toxicidad<sup>2</sup> que son diferentes en cada individuo y esto es gracias entre otros factores a las enzimas metabolizadoras. Se han descrito polimorfismos genéticos de enzimas metabolizadoras de fármacos antineoplásicos que incluyen a varios citocromos P450 (*CYP450*).<sup>3</sup> Por lo que el conocimiento sobre la asociación entre las variantes genéticas de los *CYP450* y la respuesta al tratamiento con ifosfamida, permitirá identificar y definir si existe asociación entre estos factores.

Es importante estudiar estas variaciones en nuestra población debido a la heterogeneidad genética que se presenta en nuestro país aunado a la importancia de la respuesta al tratamiento como base y objetivo final de la terapéutica de estas patologías.

Con los posibles hallazgos se podrá determinar si existe una relación entre los pacientes que tengan polimorfismos en *CYP450* y su respuesta al tratamiento con ifosfamida y como consecuencia generar una mayor y mejor calidad de vida de los pacientes a quienes se les proporcionaría un tratamiento alternativo. Esta tesis busca fortalecer la necesidad de la existencia de los esquemas individualizados de quimioterapia.

## Antecedentes

### Aspectos epidemiológicos

En la actualidad el cáncer en la población pediátrica representa un problema de salud pública, ya que la tasa de incidencia y mortalidad se ha disparado en forma desproporcional. De Enero del 2005 hasta diciembre del 2012 se registraron en México 14,178 pacientes con cáncer, el más común correspondió a leucemia (49.8%), seguido de linfomas (9.9%), con un importante porcentaje para los tumores sólidos (40.3%).<sup>1</sup> En nuestro país la base de datos del Sistema Nacional en Salud reporta a los tumores sólidos como una de las principales causas de morbilidad en nuestro país (7069 egresos hospitalarios del 2009 al 2011).<sup>4</sup> La tasa de prevalencia en México del 2012 de los principales tumores de este grupo se presentan en la tabla 1.

Tumor	Prevalencia
Neoplasias intracraneales	10.3
Tumores de células germinales	5.6
Sarcoma de partes blandas	4.1
Retinoblastoma	3.7
Tumores renales	3.2
Osteosarcoma	2.8

**Tabla 1:** Tasa de prevalencia en niños con cáncer del Seguro Popular 2012 <sup>1</sup>

### Tumores sólidos en pediatría

La mayoría de los tumores sólidos en edad pediátrica son de origen embrionario y son el producto de mutaciones genéticas en genes predisponentes, oncogenes o supresores de tumor se heredan o son esporádicos. Se ha documentado que el factor ambiental influye poco en su desarrollo, lo contrario sucede en el cáncer en el adulto. Su comportamiento es agresivo y son de crecimiento rápido. La respuesta que presentan estos tumores a los tratamientos de quimioterapia es mejor comparado a los tumores en los adultos pero al mismo tiempo presentan un mayor índice de aparición de eventos secundarios adversos en órganos y tejidos a corto o a largo plazo, e incluso segundas neoplasias debidas a los tratamientos utilizados para curar el tumor primario.<sup>5</sup>

### Tumores del sistema nervioso central

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) se dividen por su localización en supratentoriales que representan del 30 al 50% y son más frecuentes en adultos,

tumores de línea media entre el 10 y 15% y los más frecuentes en niños, los infratentoriales que cuentan alrededor del 50 al 60% de estos tumores. Existen síndromes que aumentan el riesgo de desarrollar un tumor cerebral, estos síndromes son: S. de Cowden, S. de Li-Fraumeni, Neurofibromatosis I y II, S. del Nevus Basocelular, Esclerosis Tuberosa, S. de Turcot y S. de von Hippel-Lindau, sin embargo solo el 10% de los niños con un tumor cerebral tienen un síndrome hereditario que les coloca en una situación de riesgo aumentado para el desarrollo de este tipo de tumores.<sup>6</sup>

### Sarcomas de tejidos blandos

Los sarcomas de tejidos blandos (STB) se originan del mesénquima primitivo, incluye a las neoplasias del músculo (estriado y liso), tejido conectivo (fibroso, adiposo), tejidos de soporte (sinovial, fascia) y tejido vascular (vasos sanguíneos y linfáticos). Aunque es un tumor derivado del mesénquima primitivo y se cree que su origen es en las células musculares primitivas, se puede presentar en cualquier parte del cuerpo con excepción del hueso. Los sitios más frecuentes se describen en la Tabla 2.<sup>7</sup>

Localización	Porcentaje
Cabeza y cuello	28%
Extremidades	24%
Aparato Genitourinario	18%
Tronco	11%
Órbita	7%
Retroperitoneo	6%

**Tabla 2:** Localización de los sarcomas de tejidos blandos.<sup>7</sup>

### Retinoblastoma

El retinoblastoma es el tumor intraocular más frecuente en la infancia, aunque es relativamente infrecuente pues representa aproximadamente 3% de todos los cánceres presentes en niños menores de 15 años.<sup>8</sup> Es iniciado por la mutación o delección del gen RB1 el cual fue el primer gen supresor de tumores localizado en el cromosoma 13, así como también puede condicionar incremento en el riesgo de segundas neoplasias como de pulmón, hueso, vejiga y tejidos blandos especialmente en niños que recibieron tratamiento con radiación.<sup>9</sup>

El 60% de los casos se presenta de forma esporádica y 40% germinal (25% con historia familiar positiva). Unilateral, bilateral e incluso trilateral, generalmente aparece antes de los 2 años de edad y 95% de los casos se diagnostican antes de los 5 años. Aproximadamente 60 a 70% de los casos son unilaterales y unifocales, mientras que 30 a 45% presenta una enfermedad bilateral multifocal.

El pronóstico está directamente relacionado con la edad al momento del diagnóstico, razón por la cual se recomiendan diferentes pruebas de tamizaje en todo niño recién nacido hasta los 5 años de edad como la pérdida del reflejo de ojo rojo. Los hallazgos más frecuentes son la leucocoria (50-60%), el estrabismo y los signos inflamatorios. El tratamiento depende de la lateralidad, localización intraocular y extensión del tumor.<sup>10</sup>

## Tumores renales

Los tumores renales se dividen en tumor de Wilms y tumores renales no Wilms. El tumor de Wilms es uno de los tumores abdominales más comunes de la infancia y el más frecuente en riñones, esta asociado con ciertos defectos congénitos como malformaciones en el aparato urinario, aniridia y hemihipertrofia.<sup>11</sup> Por su parte los tumores renales diferentes al tumor de Wilms tienen un comportamiento clínico y un pronóstico distintos, y son menos frecuentes. Después del tumor de Wilms, el sarcoma de células claras de riñones es el segundo tumor renal más común. Desde 1978 se describió como una entidad diferente, al igual que el tumor rabdoide del riñón; este último es más usual en lactantes menores de dos años de edad.<sup>12</sup>

## Osteosarcoma

El osteosarcoma es el tumor primario maligno de hueso más frecuente, representa el 56% de este grupo, se caracteriza por la producción de matriz osteoide por las células malignas, ocurre típicamente en huesos y rara vez en tejidos blandos. Tiene una distribución por edad bimodal, con un primer pico en la segunda década de la vida, es raro antes de los cinco años<sup>13</sup>, el segundo pico es por arriba de los 60 años y en este grupo frecuentemente se relaciona a enfermedad de Paget o radiación previa. Algunos estudios sugieren que la disregulación del gen p53 (proteína supresora de tumores) y el gen Rb, que son esenciales para el desarrollo de Osteosarcoma en humanos.<sup>14</sup> Los hombres se ven afectados con mayor frecuencia, con una relación hombre: mujer de 1.6:1.5 Usualmente surge en las metáfisis de los huesos largos de las extremidades, siendo más común alrededor de la rodilla, la afección del esqueleto axial y huesos cráneo-faciales es más común en adultos. Los datos clínicos son dolor y aumento de volumen (rodilla u hombro), se refiere clásicamente que el dolor aumenta por la noche y se presenta 4 meses antes.<sup>13</sup>

Histológicamente se clasifica como clásico con las variantes osteoblástica (50%), fibroblástica (25%), condroblástica (20%) y telangiectásica (5%).<sup>15</sup>

El tratamiento curativo del Osteosarcoma consiste de cirugía y quimioterapia, con una sobrevida libre de enfermedad (SLE) de más del 60% en enfermedad no metastásica.<sup>13</sup>

## Tratamiento de los tumores sólidos

Además del tratamiento quirúrgico en algunos tumores la poliquimioterapia (sistémica, regional o mixta) son la base del tratamiento de los tumores sólidos

susceptibles a tratamiento, entre las principales esquemas se encuentra el esquema **ICE** (Ifosfamida con una dosis de 1.8gr/m<sup>2</sup>, Carboplatino y Etoposido por 5 días)<sup>9</sup>, radioterapia con placas, fotocoagulación, crioterapia y en casos particulares como para el tratamiento del Retinoblastoma termoterapia transpupilar así como la implementación de terapias conjugadas y multidisciplinarias para incrementar la tasa de curación y en los caso que aplique la conservación de la funcionalidad del órgano afectado (preservación del globo ocular y la visión o de la función renal según sea el órgano afectado).<sup>10</sup>

## La ifosfamida en Oncología

La ifosfamida es un fármaco alquilante y como agente alquilante no es fase específico, por lo que puede actuar en cualquier fase del ciclo celular por lo que mata a la célula maligna pero también daña seriamente tejido sano. Es muy usado en la quimioterapia con éxito terapéutico para tumores sólidos como sarcomas y para neoplasias hematológicas como leucemia linfocítica aguda y linfoma no Hodgkin.<sup>16</sup>

### Mecanismo de acción de los fármacos alquilantes

El resultado de la alquilación directa del ADN de células blanco provoca degradación del DNA y RNA e inhibición de la síntesis de las proteínas y finalmente la apoptosis de las células no resistentes. También aumenta la eficacia de la respuesta inmunitaria contra el tumor y actúa en una capacidad antiangiogénica destruyendo las células progenitoras endoteliales circulantes.<sup>16</sup>

En la actualidad existe controversia en cuanto a la eficacia antitumoral debido a que la mayoría de los fármacos son creados en base a las necesidades de la población caucásica y los resultados son extrapolados a otras poblaciones como la nuestra.<sup>17</sup>

### Farmacocinética de la ifosfamida

La ifosfamida entra a la célula hepática mediante un transportador desconocido, en el interior de la célula el fármaco se metaboliza mediante la acción de las enzimas de la familia del citocromo p450 (CYP) isoformas CYP3A4, CYP3A5, también participan las isoformas CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9. La ifosfamida se descompone en los metabolitos 2-dicloro etil ifosfamida, 3-dicloro etil ifosfamida y cloroacetaldehído (neurotóxico) mediante las enzimas CYP3A4, CYP2B6, CYP3A5 así como en los metabolitos 4 hidroxifosfamida y Aldo ifosfamida mediante las enzimas CYP3A5, 3A4, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9. Estos metabolitos difunden de manera pasiva fuera de las células hepáticas, circulan y entran pasivamente a otras células. La vida media de la ifosfamida es terminal a dosis baja (1800 mg/m<sup>2</sup>) de 4 a 7 horas, a dosis alta (3800 a 5000 mg/m<sup>2</sup>) de 11 a 15 horas, se elimina del 60 al 80% de una dosis en la orina como fármaco sin modificar y metabolitos, los parámetros de vigilancia son: Biometría hemática

completa con diferencial y plaquetas, diuresis, análisis de orina, pruebas de función hepática y renal; electrolitos séricos.<sup>18</sup>

### Farmacogenética de la ifosfamida en relación a la respuesta al tratamiento

Cada individuo reacciona de manera diferente a los agentes quimioterapéuticos y puede ocurrir que un paciente reaccione favorablemente a la quimioterapia “respondedor” o que no presente respuesta al tratamiento “no respondedor”, que no experimenten ningún efecto adverso o que estos efectos varíen de intensidad a lo largo de todo el tratamiento todo esto es gracias a diversos factores tanto genéticos como no genéticos. Estos factores pueden afectar la absorción, y distribución del fármaco, su interacción con el sustrato (receptor y/o enzima), su metabolismo (función hepática) y su excreción (función renal). La ifosfamida es metabolizada por CYP2B6, CYP3A4, CYP3A5, del 60-80 % de los fármacos de mayor uso son metabolizados por genes que pertenecen a la familia del citocromo P450 (CYP450) los genes CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4/5.<sup>18</sup> Los genes CYP pertenecen a una superfamilia de genes citocromoP450 (CYT 450) está integrada por más de 200 genes que han evolucionado para protegernos de tóxicos del medio ambiente, así como de sustancias de otra naturaleza como por ejemplo algunos alimentos potencialmente peligrosos para la salud. Estos genes originan enzimas encargadas de biotransformar sustancias químicas que entran al organismo convirtiéndolas en metabolitos algunos terapéuticos, otros inocuos y otros tóxicos que finalmente se excretan por orina, heces o bilis.

Las personas que cuentan con una secuencia normal de los genes CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4/5 estarán en condiciones adecuadas de metabolizar fármacos en el hígado o en los tejidos donde se expresan las enzimas codificadas en el locus específico de cada gen. Aquellas personas que tienen variantes en estas secuencias de DNA en alguno de estos 4 genes tendrán diferencias en el población a personas con diferente metabolismo a fármacos.<sup>18</sup>

### Respuesta al tratamiento

La Organización Mundial de la Salud define criterios para estadificar la respuesta para lesión blanco y divide esta en 4 apartados:

- Respuesta completa: Desaparición de todas las lesiones blanco
- Respuesta parcial: Disminución de al menos, el 30% de la sumatorio de los diámetros mayores de las lesiones blanco, considerando como referencia el estudio base.
- Enfermedad estable: No cumple criterios para respuesta parcial ni para progresión de la enfermedad.
- Enfermedad en progresión: Incremento del 20% de la sumatoria de los diámetros de las lesiones blanco.

Para considerar estos criterios se compara el estudio inicial al diagnóstico con el mismo estudio realizado al momento de la valoración de la respuesta.<sup>19</sup>

## Efectos de los polimorfismos en la respuesta al tratamiento.

Existen estudios que han buscado la relación de la concentración subterapéutica con el éxito o fracaso en el tratamiento. Por ejemplo el polimorfismo 516 TT se ha asociado a falla a tratamiento en pacientes con VIH.<sup>20</sup> Su frecuencia es de 0.267, para nuestra población se observó en una muestra de individuos residentes en los Ángeles con ascendencia mexicana una frecuencia de 0.29.

Para el gen *CYP2B6*\*4 el polimorfismo 785A>G ubicado en el exón 5 (Lys 262Arg) está asociado a metabolismo lento de Efavirenz, además en portadores del alelo G se ha asociado a mala respuesta al tratamiento con doxorubicina y ciclofosfamida en pacientes con cáncer de seno.<sup>21</sup> La frecuencia de este polimorfismo en población europea es de 0.38 y se observó en una muestra de individuos residentes en Los Ángeles (USA) con ascendencia mexicana una frecuencia de 0.24.

En el gen *CYP2B6*\*5 el polimorfismo 1459 C>T en el exón 9 (Arg487Cys), se ha observado que homocigotos para el alelo T presentan altas dosis acumuladas de ciclofosfamida y doxorubicina.<sup>22</sup> En una cohorte de pacientes que recibieron Tiotepa (fármaco para tratar tumores sólidos) se observó que pacientes homocigotos para el genotipo TT presentaron menos exposición a sustratos de *CYP2B6* lo que indica que presentaron fenotipo metabolizadores rápidos.<sup>23</sup>

## Hipótesis

Existen variantes alélicas en los genes *CYP2B6*, *CYP2C9* y *CYP3A5* que se asocian con respuesta desfavorable a tratamiento.

## Objetivo general

Determinar si existen variantes alélicas en los genes *CYP2B6*, *CYP2C9*, y *CYP3A5* que se asocien con la respuesta a tratamiento en pacientes con tumores sólidos tratados con ifosfamida.

## Diseño de estudio

Es un estudio observacional, comparativo, prospectivo y transversal.

El reclutamiento de la cohorte inició a partir del inicio del tratamiento con ifosfamida y se les dio seguimiento durante los 6 ciclos de la quimioterapia.

La exposición estuvo definida como presencia vs ausencia de cada una de las variantes polimórficas estudiadas en *CYP2B6*, *CYP2C9*, y *CYP3A5*. El diseño permitió evaluar clínicamente a los pacientes al final de tratamiento y clasificarlos de acuerdo a su estatus de respuesta a tratamiento (respondió vs no respondió).

## Selección de la población

Se captaron pacientes con tumores sólidos embrionarios y sarcomas de alto riesgo, en primer ciclo de terapia ICE (Ifosfamida, Carboplatino y Etoposido) o de protocolo nacional para Sarcoma de Ewing (Vincristina, Doxorrubicina, Ciclofosfamida, Ifosfamida y Etoposido).

Reclutamiento: Se llevó a cabo a partir de la preconsulta del paciente el cual se envió a consulta externa de primera vez con diagnóstico presuntivo de cáncer. El Oncólogo de Consulta Externa inicia protocolo de diagnóstico incluyendo los siguientes estudios paraclínicos: De laboratorio: BH, QS, EGO, Electrolitos Séricos; De Gabinete: Estudio histopatológico e inmunohistoquímica, ultrasonido, tomografía computada. De intervención para diagnóstico: Biopsia (La muestra se envió a patología quien emite el reporte histopatológico). Habiendo diagnosticado el cáncer con su estirpe celular y su estadio, el paciente posteriormente es referido al Oncólogo. El médico Oncólogo eligió a los pacientes por medio de los criterios de inclusión. A los pacientes que cubrieron dichos requisitos se les explicó el objetivo del estudio y se les invitó a participar mediante firma del consentimiento informado, enviándolos a la unidad de AQUA para posteriormente recibir el tratamiento que corresponda de acuerdo con la estadificación clínica que se haya realizado al momento del diagnóstico. El resultado del estudio no modificó el plan terapéutico que el equipo de oncólogos determinó, de acuerdo con su plan establecido según los protocolos nacionales o internacionales. Al término del tratamiento se realizaron estudios de gabinete y radiografías para valorar la respuesta al tratamiento.

## Criterios de inclusión

Se incluyeron pacientes con tumores sólidos embrionarios y sarcomas de alto riesgo, en primer ciclo de terapia ICE, o de protocolo nacional para Sarcoma de Ewing, menores de 1 año y hasta los 17 años, cualquier género. Todos los pacientes que se incluyeron firmaron una carta de consentimiento Informado por parte de los padres y/o tutores, en el caso de pacientes mayores a 12 años firmaron carta de asentimiento.

Todos los pacientes captados fueron “mestizo mexicanos”, que se definen como individuo que nació en México, así como sus dos generaciones anteriores (padres y abuelos) y se evaluó mediante un cuestionario.

## Criterios de exclusión

Pacientes con transfusión sanguínea con paquete eritrocitario no desleucocitado, desnutrición de grado III y/o cualquier alteración que afecte la determinación de los niveles del fármaco, pacientes que no estén en el primer ciclo con Ifosfamida, pacientes con daño renal o hepático, pacientes que no sean “mestizo mexicanos”.

## Criterios de eliminación

Pacientes a quienes se les retiró el fármaco de la quimioterapia, que no acudieron regularmente a su tratamiento (No apego al tratamiento: determinado por un porcentaje menor al 5% de administraciones efectivas), que retiraron voluntariamente su consentimiento y/o asentimiento para participar en el estudio y aquellos pacientes en los que no se obtuvo un DNA de buena calidad para la genotipificación y/o cuantificación del fármaco. Pacientes en quienes no se completaron las 3 muestras al final del estudio, pacientes que no completaron la valoración de respuesta al tratamiento.

## Metodología

### Toma de la muestra

Se tomaron 3 muestras de sangre a los pacientes; una muestra de sangre periférica de 3 mL para el análisis de su material genético y las otras dos muestras en gota de sangre por punción capilar (5 gotas) en tarjetas Guthrie 903 para cuantificación de ifosfamida se tomaron a las 12 y 24 hrs después de terminar la última dosis por infusión con ifosfamida.

Para la punción capilar, se utilizó una lanceta automática y retráctil Contact-Activated de la marca BD Microtainer® en un dedo de cualquier mano, la cual se realizó en un solo disparo una perforación de 2mm de profundidad x 1.5mm de diámetro. Una vez que se obtuvo el goteo de sangre se eliminó la primera gota obtenida, y las subsecuentes serán colocaron en una tarjeta Guthrie 903 y se dejó secar por 3 horas a temperatura ambiente y protegida de la luz solar en posición horizontal. Posteriormente las muestras se colocaron en bolsas de plástico de baja permeabilidad a los gases con desecante añadido para reducir la humedad y se almacenaron a temperatura ambiente hasta el análisis de las muestras.

### Extracción de ADN a partir de sangre periférica.

A partir de 1 mL de sangre se extrajo el DNA mediante QIAmp DNA Mini kit, las muestras de DNA se cuantificaron por espectrofotometría (Nanodrop) y se conservaron a 4°C hasta su análisis.

### Genotipificación mediante el ensayo de discriminación alélicas por sondas TaqMan®

El análisis de los genotipos se llevó a cabo por medio del ensayo de discriminación alélica utilizando sondas TaqMan. Para cada ensayo de discriminación alélica se obtuvieron sondas específicas marcadas con fluoróforos diferentes en el extremo 5', VIC para el alelo 1 y FAM para el alelo 2 de Applied Biosystems, ambas sondas se caracterizan por poseer en el extremo 3' un "quencher" (TAMRA) el cual mientras la sonda permanece intacta, inhibe la emisión de fluorescencia. Durante la reacción de PCR los primers hibridan con

una secuencia específica del templado de DNA. Si éste contiene la secuencia polimórfica, la sonda TaqMan también hibrida con su secuencia homóloga. Durante la PCR, la AmpliTaq Gold, que tiene actividad tanto de DNA polimerasa como de exonucleasa 5'-3', es capaz de digerir la sonda marcada durante la amplificación y liberar el colorante fluorescente de la acción del “quencher”, de tal manera que dadas las condiciones de astringencia utilizada durante la reacción, sólo la sonda específica para el polimorfismo presente será capaz de hibridar. Por lo tanto es posible diferenciar un alelo del otro con base en el tipo de fluorescencia emitida. Se cuantificó la fluorescencia de cada muestra en un equipo Step One, utilizando el software SDS 2.2.1 para discriminación alélica (Applied Biosystems Foster City, CA, USA).

Las sondas que se emplearon son las siguientes:

Gen	rs
CYP2B6*2	8192709
CYP2B6*5	3211371
CYP2B6*6	3745274
CYP3A5*3	776746
CYP2C9*3	1799853

**Tabla 3:** Sondas empleadas para el estudio.

### Evaluación de la respuesta a tratamiento

Al término del tratamiento se repitió el estudio de gabinete (TC de alta resolución, REM o PET) para valorar la respuesta tumoral según criterios establecidos para determinar cuatro niveles de respuesta al tratamiento en base a la reducción de los diámetros de las lesiones tumorales acumuladas y presencia de datos radiológicos sugestivos de necrosis, siendo esta dividida: **1.Respuesta completa:** 90% o más de reducción de las lesiones, **2.Respuesta parcial:** Reducción del tamaño tumoral entre 50 y 89% en el tamaño acumulado de las lesiones, **3.Respuesta estable:** Reducción del tamaño tumoral presente pero menor al 50% del tamaño en el estudio Inicial o **4.Progresión de la enfermedad.** En base al tipo de tumor se consideró respuesta al tratamiento una respuesta tipo 1, 2 y 3 en aquellos tumores donde la indicación de quimioterapia era como Tratamiento Neoadyuvante y 4 como sin respuesta al tratamiento; o 1 y 2 como respuesta y por su parte respuesta tipo 3 y 4 como sin respuesta al tratamiento cuando la intención del tratamiento no es la Neoadyuvancia sino la medida terapéutica principal.

### Monitoreo de niveles de Ifosfamida en gota de sangre seca

Se monitorearon los niveles de ifosfamida a las 12 y 24 horas de término de la última dosis de Ifosfamida en muestras de gota de sangre seca, las gotas de sangre se recogieron en Tarjetas de papel Whatman903 y se dejaron secar por 3

horas protegidas de la luz. Se perforaron cinco discos de 3 mm de cada gota de sangre seca.

Se monitoreo la concentración de ifosfamida por el método UPLC-MS / MS. Se utilizó acetonitrilo y acetato de etilo para la extracción del fármaco. La separación cromatografía se llevó a cabo en un equipo Acquity UPLC con una columna BEH-C18, 2,1 x 100 mm, 1,7 mm (Waters).

### **Análisis estadístico**

Se realizó análisis univariado por medio de medidas de frecuencia y proporciones para las variables clínicas y epidemiológicas y se obtuvieron frecuencias alélicas y genóticas de los genes *CYP2B6*, *CYP2C9* Y *CYP3A5*.

En el análisis bivariado, se compararon las medianas de niveles de ifosfamida entre los pacientes de acuerdo a genotipo, mediante prueba de Kruskal Wallis.

Finalmente se realizaron las curvas de Kaplan Meier para evaluar factores predictores de respuesta a tratamiento y sobrevida en pacientes con tumores sólidos tratados con ifosfamida. Para la comparación de las curvas se utilizó la prueba de log rank test. Un valor de p menor de 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

### **Aspectos éticos**

De acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Título II (de los aspectos éticos de la investigación en seres humanos), capítulo I, Art 13 (respeto, dignidad y protección al paciente), Art 14 (se ajusta al principio científico y se realizará al tener la aprobación del Comité de Ética), Art 16 (Artículo 17, Sección III (investigación con riesgo mayor al mínimo), se anexa hoja de consentimiento informado, Art 18

Se tomarán en cuenta las disposiciones de Buenas Prácticas Clínicas. Los resultados de este estudio se presentarán de manera agrupada por lo que se mantendrá la confidencialidad de la información de los participantes del estudio. Todo participante después del estudio será referido para su atención médica y/o hospitalización de manera oportuna. El presente estudio no interferirá y/o modificara de alguna manera el régimen de quimioterapia implementado por el oncólogo. Este protocolo ya ha sido aprobado por los comités de investigación y ética del instituto registro 068/2013.

## Resultados.

Se incluyeron 24 pacientes, de los cuales 16 fueron hombres (66.6%), 8 mujeres (33.33%), se incluyeron pacientes entre 0 y 17 años de edad, con edad promedio de 7 años, la edad más frecuente fue menor a una año (4 pacientes para 16.66%), se incluyeron pacientes con 10 tipos de tumores sólidos diferentes, en orden de frecuencia: Retinoblastoma (7 pacientes 29.16%), Tumor Germinal (4 pacientes 16.6%), Sarcoma de Ewing (4 pacientes), Meduloblastoma (3 pacientes 12.5%) y 1 paciente con cada uno de estos diagnósticos: Tumor de Wilms, Glioblastoma, Neuroepitelioma, Tumor Rabdoide, Neuroblastoma y Pinealoblastoma.

Diagnóstico	Frecuencia	Porcentaje
Meduloblastoma	3	12.5
Retinoblastoma	7	29.2
Tumor Germinal	4	16.7
Tumor de Wilms	1	4.2
Sarcoma de Ewing	4	16.7
Glioblastoma	1	4.2
Neuroepitelioma	1	4.2
Tumor Rabdoide	1	4.2
Neuroblastoma	1	4.2
Pinealoblastoma	1	4.2
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>100.0</b>

**Tabla 4:** Frecuencia de diagnosticos encontrados en el estudio.

Se incluyeron pacientes con dos esquemas de tratamiento distinto, ambos incluyen a la Ifosfamida, un total de 21 pacientes con esquema ICE que incluye Ifosfamida (IFM), Carboplatino (CBP) y Etopósido (VP16), y 3 pacientes que recibieron Ifosfamida como parte del protocolo nacional para sarcoma de Ewing que incluye inicialmente esquema con Vincristina (VCR), Ciclofosfamida (CFM) y Doxorubicina (DOXO), seguido de IFM y VP16. Durante estos protocolos los pacientes completaron entre 2 (1 paciente) y 6 ciclos (16 pacientes) con Ifosfamida.

De los 24 pacientes 21 presentaron respuesta al tratamiento, se describe el tipo de respuesta en la tabla 5.

Tipo de respuesta	Frecuencia	Porcentaje
Reducción tumoral > 90%	9	37.5
Reducción tumoral 50-90%	10	41.7
Reducción tumoral < 50%	2	8.3
Progresión de la enfermedad	3	12.5
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>100.0</b>

**Tabla 5:** Frecuencias de respuestas encontradas en el momento de la valoración de la respuesta al tratamiento.

Se presentaron 4 defunciones durante el seguimiento en el tratamiento de los 24 pacientes, que representa una tasa de mortalidad global de los casos presentados del 16.7%.

### Frecuencias alélicas en genes de metabolismo de la ifosfamida.

Se estudiaron 3 polimorfismos del gen *CYP2B6*: Para rs8192709 y rs3745274 se estudiaron 23 pacientes y para el polimorfismo rs3211371 con 24 pacientes analizados; 1 polimorfismo para *CYP3A5* (rs776746) y 1 para *CYP2C9* (rs1799853) ambos con 24 pacientes para su estudio.

Se determinaron frecuencias genotípicas y alélicas para cada polimorfismo, se detallan resultados individuales en las siguientes secciones.

#### Frecuencia del rs8192709 en el gen *CYP2B6*.

Se analizó el rs8192709 en 23 pacientes para lo que se encontraron 0 pacientes con el polimorfismo, 1 paciente con genotipo heterocigoto y 22 pacientes con genotipo normal.

<b>Genotipo Normal</b>	96%
<b>Genotipo heterocigoto</b>	4%
<b>Genotipo polimorfico</b>	0%
<b>Frecuencia alélica C</b>	98%
<b>Frecuencia alélica T</b>	2%

**Tabla 6:** Frecuencias genotípicas y alélicas para el rs8192709 en el grupo estudiado de 23 pacientes.

#### Frecuencia del rs3211371 en el gen CYP2B6.

Se analizó el rs3211371 en 24 pacientes para lo que se encontró 1 paciente con la variante polimórfica, 0 pacientes con genotipo heterocigoto y 23 pacientes con genotipo normal tabla 7.

<b>Genotipo normal</b>	96%
<b>Genotipo heterocigoto</b>	0%
<b>Genotipo polimórfico</b>	4%
<b>Frecuencias alélicas C</b>	96%
<b>Frecuencias alélicas T</b>	4%

**Tabla 7:** Frecuencias genotípicas y alélicas para el rs3211371.

#### Frecuencia del rs3745274 en el gen CYP2B6.

Se analizó el rs3745274 en 23 pacientes para lo que se encontraron 3 pacientes con genotipo homocigoto para el alelo polimórfico, 13 pacientes con genotipo heterocigoto y 7 pacientes con genotipo normal tabla 8.

<b>Genotipo normal</b>	30%
<b>Genotipo heterocigoto</b>	57%
<b>Genotipo polimórfico</b>	13%
<b>Frecuencias alélicas G</b>	59%
<b>Frecuencias alélicas T</b>	41%

**Tabla 8:** Frecuencias genotípicas y alélicas para el rs3745274.

#### Frecuencia del rs776746 en el gen CYP3A5

Se analizó el rs776746 en 24 pacientes, encontrando 15 pacientes con el polimorfismo, 8 pacientes heterocigotos y 1 paciente con la variante normal tabla 9.

<b>Genotipo normal</b>	63%
<b>Genotipo heterocigoto</b>	33%
<b>Genotipo polimórfico</b>	4%
<b>Frecuencias alélicas T</b>	20%
<b>Frecuencias alélicas C</b>	80%

**Tabla 9:** Frecuencias genotípicas y alélicas para el rs776746.

#### Frecuencia del rs1799853 en el gen CYP2C9.

Se analizó el polimorfismo rs1799853 en 24 pacientes encontrando únicamente 1 paciente heterocigoto y 23 pacientes sin el polimorfismo tabla 10.

<b>Genotipo Normal</b>	96%
<b>Genotipo Heterocigoto</b>	4%
<b>Genotipo polimórfico</b>	0%
<b>Frecuencias alélicas C</b>	98%
<b>Frecuencias alélicas T</b>	2%

**Tabla 10:** Frecuencias genotípicas y alélicas para el *rs1799853*.

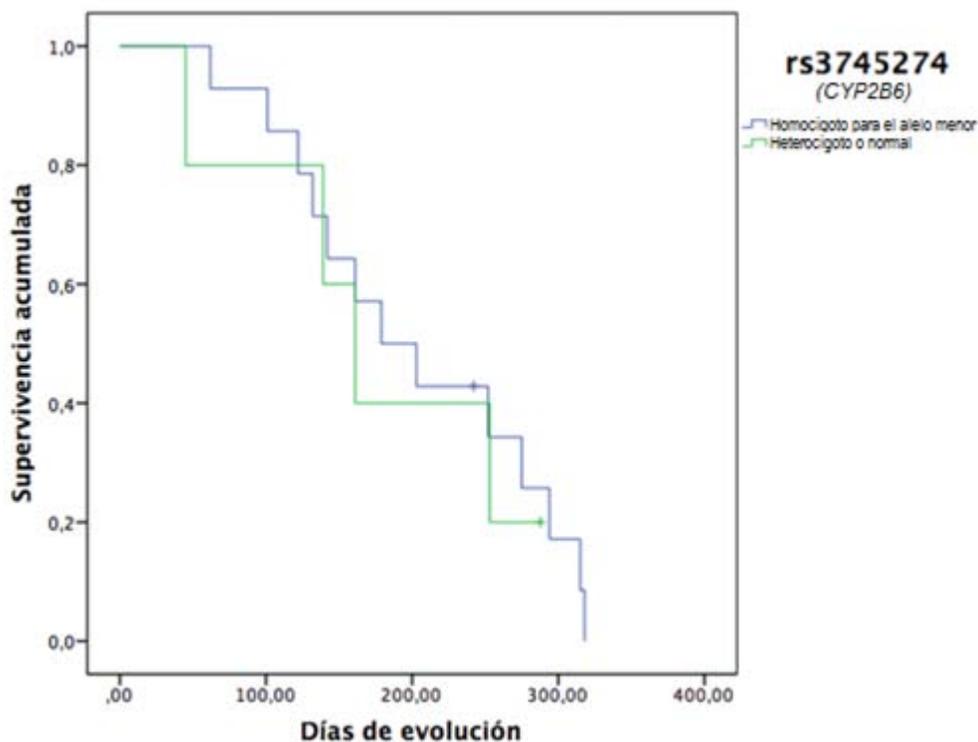
En la tabla 11 se describen todos los polimorfismos estudiados y su frecuencia de presentación, de los 5 polimorfismos estudiados, se encontró a *rs3745274* y a *rs77646* con presentación polimórfica en más del 10% de los caso analizados, contando con 13% y 63%, por lo que se tomaron como base para las siguientes comparaciones.

<b>Gen/Polimorfismo</b>	<b>Frecuencia genotípica</b>				<b>Frecuencia alélica</b>		
	<b>N</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>	<b>N</b>	<b>C</b>	<b>T</b>
<b>CYP2B6</b>							
<i>rs8192709</i>	23	22	1	0	46	44	1
	%	96%	4%	0%	%	98%	2%
<i>rs3211371</i>	24	22	0	1	48	45	3
	%	96%	0%	4%	%	96%	4%
	<b>N</b>	<b>GG</b>	<b>GT</b>	<b>TT</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>T</b>
<i>rs3745274</i>	23	7	13	3	46	27	19
	%	30%	57%	13%	%	60%	40%
<b>CYP3A5</b>	<b>N</b>	<b>TT</b>	<b>TC</b>	<b>CC</b>	<b>N</b>	<b>T</b>	<b>C</b>
<i>rs776746</i>	24	1	8	15	48	10	38
	%	4%	33%	63%	%	20%	80%
<b>CYP2C9</b>	<b>N</b>	<b>CC</b>	<b>TC</b>	<b>TT</b>	<b>N</b>	<b>C</b>	<b>T</b>
<i>rs1057910</i>	24	23	1	0	48	47	1
	%	96%	4%	0%	%	98%	2%

**Tabla 11:** Frecuencias genotípicas y alélicas en los genes *CYP2B6*, *CYP3A5* y *CYP2C9*.

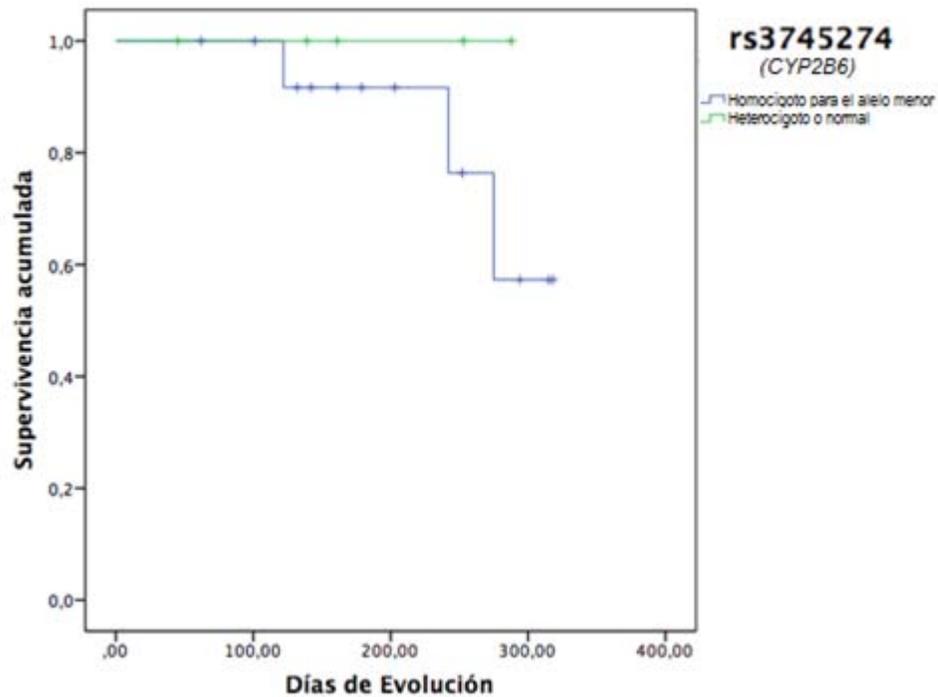
## Factores pronóstico para sobrevida y respuesta al tratamiento

En el gráfico 1 se muestra la comparación de la presencia (genotipo heterocigoto u homocigoto para el alelo menor) o ausencia (genotipo normal) de la variante rs3745274 en CYP2B6 durante el periodo de seguimiento desde el diagnóstico hasta el último ciclo de quimioterapia con Ifosfamida en relación con la supervivencia, no se observan diferencias significativas ( $p=0.75$ ).



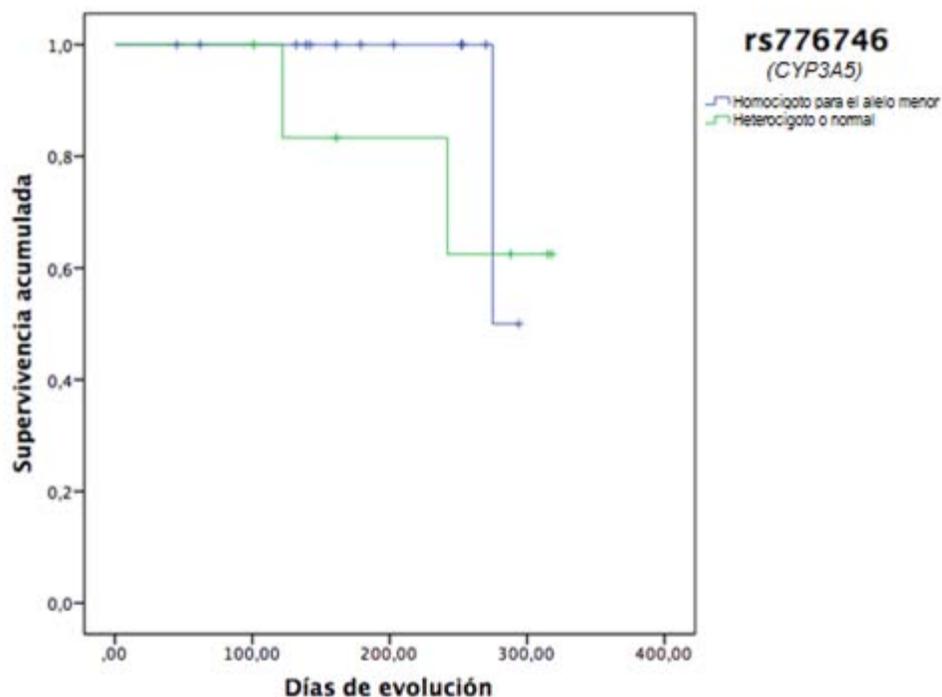
**Gráfico 1.** Genotipo como factor pronóstico para sobrevida, comparación del genotipo normal vs heterocigotos + homocigotos para el alelo menor en el caso del polimorfismo rs3745274 en CYP2B6.

En el gráfico 2 se muestra la comparación de la presencia (homocigoto para el alelo menor) o ausencia (genotipo normal ó genotipo heterocigoto) de la rs3745274 en CYP2B6 durante el periodo de seguimiento desde el diagnóstico hasta el último ciclo de quimioterapia con Ifosfamida en relación con la supervivencia, no se observan diferencias significativas ( $p=0.34$ )



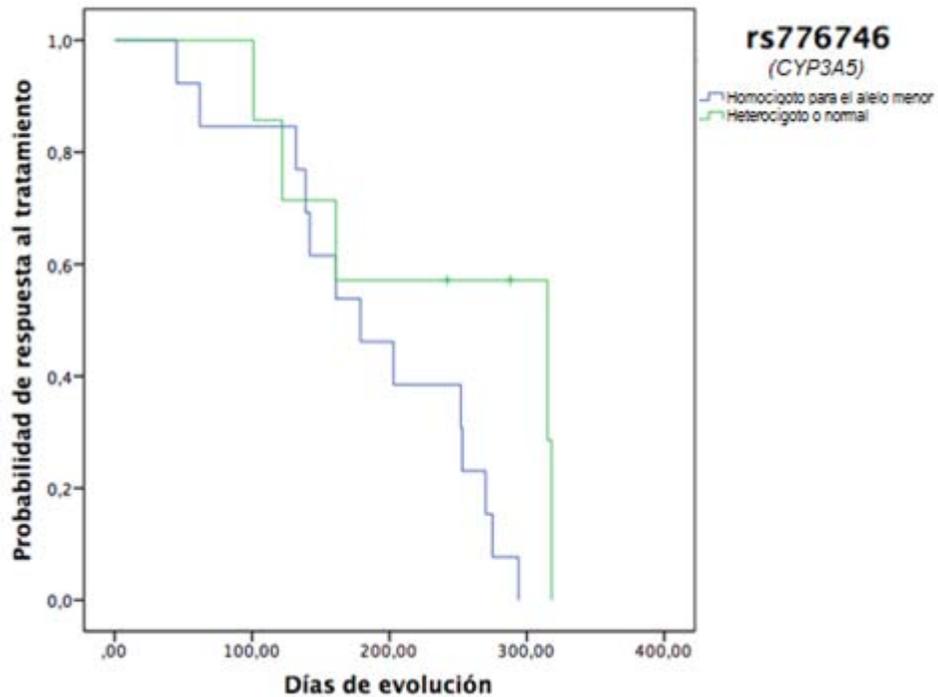
**Gráfico 2.** Genotipo como factor pronóstico para sobrevida, comparación de la presencia (homocigoto para el alelo menor) o ausencia (genotipo normal ó genotipo heterocigoto) de la variante rs3745274 del gen CYP2B6.

En el gráfico 3 se muestra la comparación de la presencia (genotipo homocigoto para el alelo menor) vs ausencia (normal + heterocigoto) durante el periodo de seguimiento desde el diagnóstico hasta el último ciclo de quimioterapia con Ifosfamida en relación con la supervivencia, no se observan diferencias significativas ( $p=0.48$ ).



**Gráfico 3.** Genotipo como factor pronóstico para supervivencia, comparación de la presencia (homocigoto para el alelo menor) vs ausencia (normal + heterocigoto) para el polimorfismo rs776746 en el gen CYP3A5.

En el grafico 4 se muestra la comparación de la presencia (homocigoto para el alelo menor) vs ausencia (normal + heterocigoto) del polimorfismo rs776746 del gen CYP3A5 durante el periodo de seguimiento desde el diagnóstico hasta el último ciclo de quimioterapia con Ifosfamida en relación con la probabilidad de respuesta a tratamiento, no se observan diferencias significativas ( $p=0.068$ ).



**Grafico 4:** Genotipo como factor pronóstico para respuesta a tratamiento, comparación de la presencia (homocigoto para el alelo menor) vs ausencia (normal + heterocigoto) del polimorfismo rs776746 del gen CYP3A5.

## Niveles de Ifosfamida en gota de sangre seca

Para el estudio de niveles en sangre de Ifosfamida se consideraron 20 de los 24 pacientes, por cumplir los requisitos para la obtención de muestra y subsecuente determinación de niveles de Ifosfamida en sangre, se detallan los resultados individuales en la tabla 12.

	Sexo	Edad	Diagnóstico	12h IFOS ( $\mu\text{mol/L}$ )	24h IFOS ( $\mu\text{mol/L}$ )
1	Masculino	6	Meduloblastoma	9.37	0.7
2	Masculino	1	Retinoblastoma	5.25	3.86
3	Masculino	16	Tumor germinal	21.5	4.87
4	Masculino	3	Tumor germinal	3.43	0.4
5	Masculino	5	Retinoblastoma	12.94	0.93
6	Masculino	17	Tumor germinal	8.7	0.16
7	Masculino	1	Neuroblastoma	3.07	0.28
8	Femenino	2	Retinoblastoma	3.85	0.38
9	Femenino	1	Retinoblastoma	3.14	0.67
10	Masculino	10	Sarcoma Ewing	16.1	1.5
11	Masculino	6	Tumor de Wilms	4.27	0.69
12	Masculino	12	Meduloblastoma	38.6	2.8
13	Femenino	2	Retinoblastoma	4.87	0.3
14	Femenino	13	Neuroepitelioma	74.37	5.4
15	Masculino	2	Tumor rabdoide	13.05	0.061
16	Masculino	0	Retinoblastoma	3.27	1.85
17	Masculino	3	Retinoblastoma	19.11	0.22
18	Femenino	15	Sarcoma de Ewing	16.5	2.25
19	Femenino	8	Pinealoblastoma	14.08	3.12
20	Femenino	11	Sarcoma de Ewing	19.54	2.9

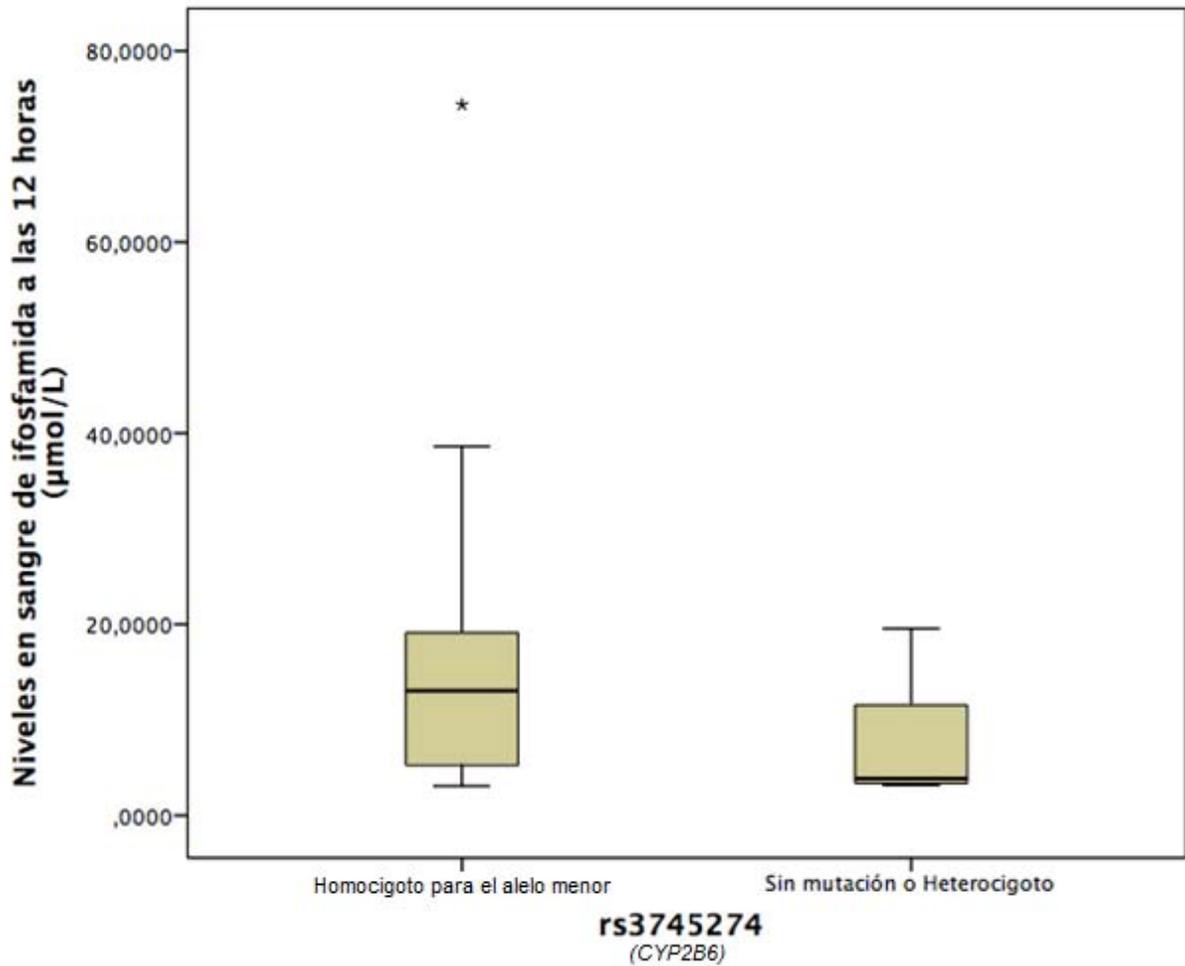
**Tabla 12:** Resultados individuales: Se muestra Sexo, edad de captación para el estudio, diagnóstico, niveles en sangre de Ifosfamida (12h IFOS y 24h IFOS corresponden a niveles de Ifosfamida en sangre expresados en  $\mu\text{mol/L}$  a las 12 y 24 horas respectivamente del inicio de la administración del bolo de Ifosfamida correspondiente).

En base a estos pacientes se determinaron los percentiles descritos en la tabla 13.

	5	10	25	50	75	90	95
12H $\mu\text{mol/L}$	3,0735	3,1530	3,9550	10,9700	18,4575	36,8900	72,5815
24H $\mu\text{mol/L}$	,065950	,1660	,3200	,8150	2,8750	4,7690	5,3735

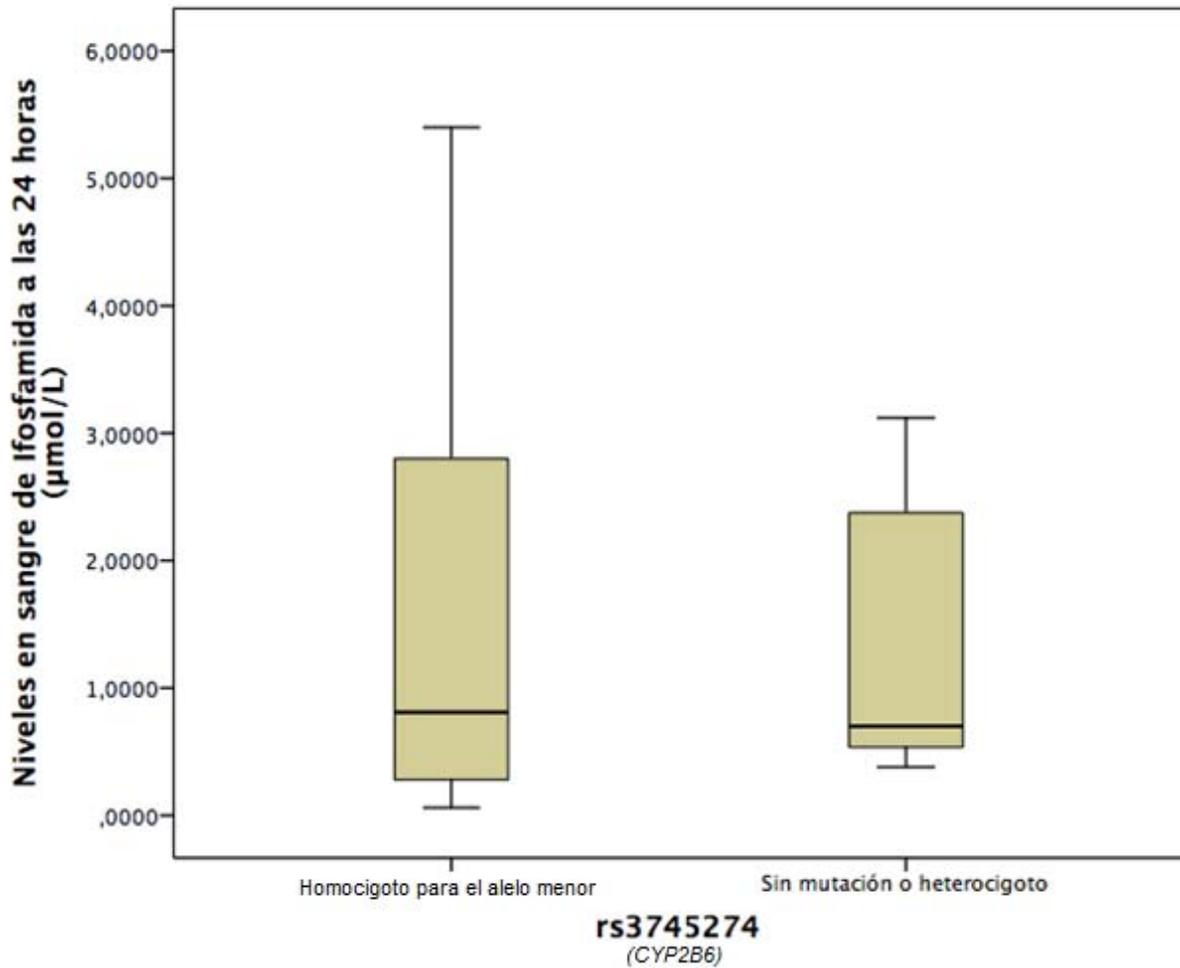
**Tabla 13:** Niveles en sangre de Ifosfamida a las 12 y 24 horas;  $10.97Q_{50}$  ( $3.95Q_{25}$  –  $18.45Q_{75}$ ) para las 12 horas y  $0.81Q_{50}$  ( $0.32Q_{25}$  –  $2.87Q_{75}$ ) para las 24 horas.

Posteriormente se determinó su relación con los 2 polimorfismos encontrados en el estudio de manera individual rs3745274 y rs776746.



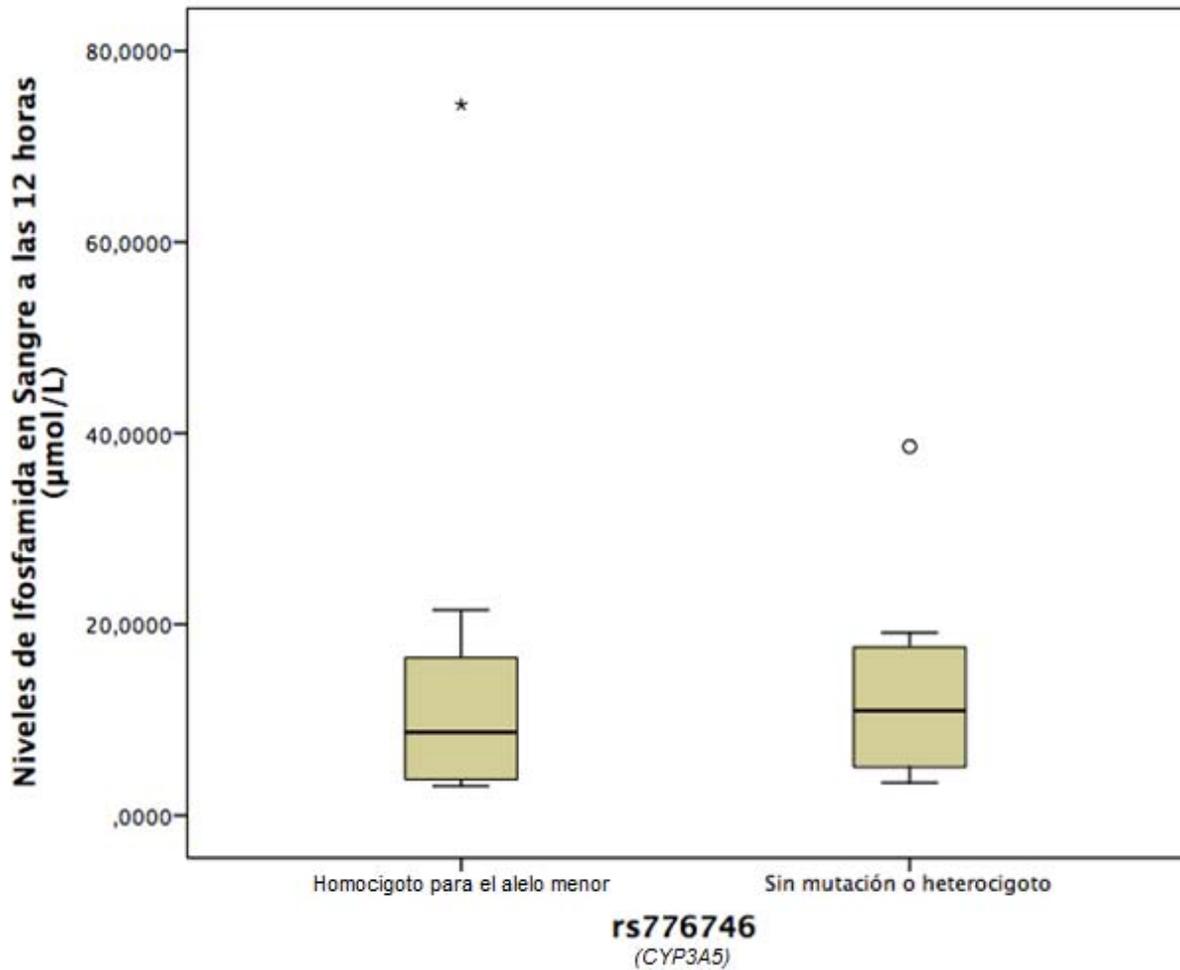
**Gráfico 5.** Comparación de niveles de Ifosfamida en sangre a las 12 horas de acuerdo a la presencia del polimorfismo rs3745274 del gen CYP2B6 en pacientes con tumores sólidos embrionarios ( $p=0.135$ ).

Se realizó la comparación de los niveles de Ifosfamida en sangre a las 12 horas posteriores a la última dosis de ifosfamida en pacientes con el polimorfismo en rs3745274 en CYP2B6 obteniendo una mediana de 13,05µmol/L en el grupo homocigoto para el alelo menor mutado vs 3,85µmol/L encontrado en pacientes sin mutación o con solo 1 gen polimórfico (heterocigotos).



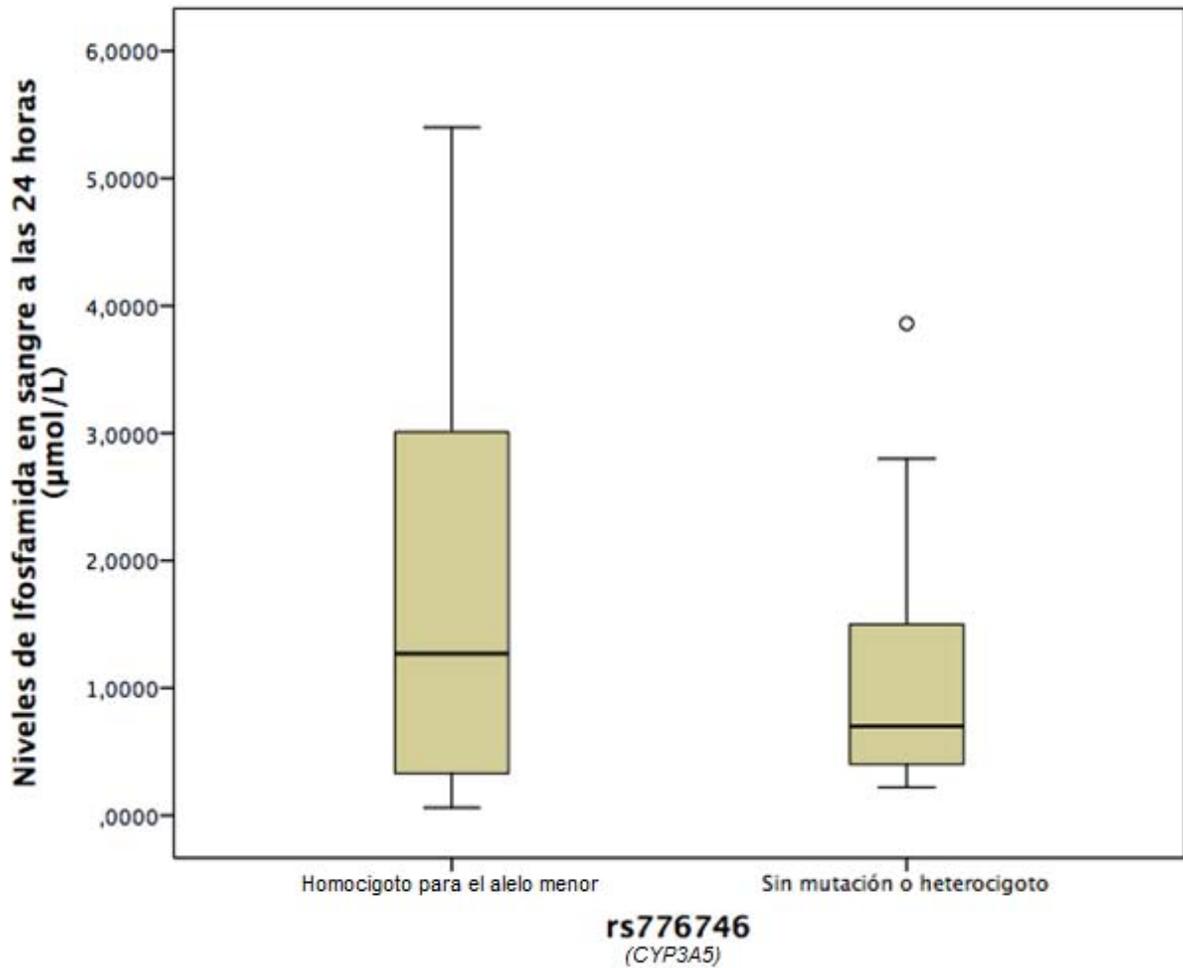
**Gráfico 6.** Comparación de niveles de Ifosfamida en sangre a las 24 horas de acuerdo a la presencia del polimorfismo rs3745274 en el gen CYP2B6 en pacientes con tumores solidos embrionarios ( $p=0.689$ ).

Se realizó la comparación de los niveles de Ifosfamida en sangre a las 24 horas posteriores a la última dosis de ifosfamida en pacientes con el polimorfismo rs3745274 en el gen CYP2B6 obteniendo una mediana de 0,81µmol/L en el grupo homocigoto para el alelo menor mutado vs 0,70µmol/L encontrado en pacientes sin mutación o con solo 1 gen polimórfico (heterocigotos).



**Gráfico 7.** Comparación de niveles de Ifosfamida en sangre a las 12 horas de acuerdo a la presencia del polimorfismo rs776746 en el gen CYP3A5 en pacientes con tumores sólidos embrionarios ( $p=0.595$ ).

Se realizó la comparación de los niveles de Ifosfamida en sangre a las 12 horas posteriores a la última dosis de ifosfamida en pacientes con el polimorfismo rs776746 en el gen CYP3A5 obteniendo una mediana de 8,7µmol/L en el grupo homocigoto para el alelo menor mutado vs 10,97µmol/L encontrado en pacientes sin mutación o con solo 1 gen polimórfico (heterocigotos).



**Gráfico 8.** Comparación de niveles de Ifoxamida en sangre a las 24 horas de acuerdo a la presencia del polimorfismo rs776746 en el gen CYP3A5 en pacientes con tumores sólidos embrionarios ( $p=0.754$ ).

Se realizó la comparación de los niveles de Ifoxamida en sangre a las 24 horas de término de la última dosis de ifosfamida en pacientes con el polimorfismo rs776746 en el gen CYP3A5 obteniendo una mediana de 1,27µmol/L en el grupo homocigoto para el alelo menor mutado vs 0,70µmol/L en pacientes con el alelo normal o heterocigotos.

## Discusión

En este trabajo se estudió a 24 pacientes con diagnóstico de tumores sólidos embrionarios y sarcomas de alto riesgo, 20 de ellos completaron el seguimiento de los 6 ciclos de quimioterapia con ifosfamida y se determinó si el genotipo contribuye como factor pronóstico de la respuesta a tratamiento.

La casuística, por limitarse a tumores susceptibles a tratamiento con ifosfamida no es comparable con la epidemiología nacional reportada para tumores sólidos, a pesar de esto coincide al sumar todos los casos de tumores del sistema nervioso central planteándolos en grupo como la neoplasia sólida más frecuente en el estudio al igual a lo reportado<sup>1</sup> en contraste segundo lugar encontramos al retinoblastoma, esto en gran parte a ser la ifosfamida parte de su esquema quimioterapéutico de elección aunado a otros fármacos (ICE)<sup>10</sup>.

Se ha observado que cada individuo reacciona de manera diferente a los agentes antineoplásicos y puede ocurrir que un paciente reaccione favorablemente a la quimioterapia (respondedor) o que no presente ninguna respuesta al tratamiento (no respondedor), esto se atribuye a diversos factores tanto genéticos como no genéticos. La ifosfamida es metabolizada por genes de citocromo p450, en este estudio se analizaron 5 polimorfismos de un solo nucleótido en una muestra de 24 pacientes con tumores sólidos embrionarios que recibieron ifosfamida como parte de su tratamiento antineoplásico.

Para rs8192709 y 3211371 en el gen *CYP2B6* el alelo de mayor frecuencia fue el normal con un 98% para el alelo C y un 96% para alelo C respectivamente. La frecuencia fue similar a la que se reporta en las bases de datos del HAPMAP-MEX<sup>24</sup>.

En el caso del rs3745274 del gen *CYP2B6*, el genotipo encontrado con mayor frecuencia fue el heterocigoto (GT) con un 57%, el alelo de mayor frecuencia fue el alelo T con un 41%. Este resultado contrasta con la frecuencia encontrada en el HAPMAP-MEX de 29% para el alelo T<sup>24</sup>. Este gen codifica para enzimas que forman parte del proceso para la descomposición de la ifosfamida en 2-dicloroetilfosfamida, 3-dicloroetilfosfamida y cloroacetaldehído<sup>18</sup>.

Para el gen *CYP3A5* se analizó el rs776746 encontrando el genotipo heterocigoto (CT) en el 33% de los pacientes, respecto a la frecuencia alélica se encontró un 80% para el alelo normal, el HAPMAP-MEX reporta un 44% en estado heterocigoto; para las frecuencias alélicas que reporta HAPMAP-MEX 74% para el alelo normal C y un 26% para el alelo menor (T), los resultados encontrados en este trabajo son similares a los ya reportados en el HAPMAP de la base de datos de NCBI-PUBMED<sup>24</sup>. Otro estudio que analizó las frecuencias alélicas en este gen en individuos sanos mexicanos reporta una frecuencia del 90.1% para el alelo C y un 9.8% para el alelo menor<sup>25</sup>.

Para la variante en el gen *CYP2C9* (rs1799853) se encontró una mayor frecuencia del alelo normal (C) del 98% y un 2% para el alelo menor. Para esta variante no hay reportes de la frecuencia génica en la base de datos HAMMAP-MEX.

Se ha mostrado que polimorfismos de un solo nucleótido en el gen *CYP2B6* provocan alteración en la actividad y expresión de la proteína, por ejemplo se ha observado en estudios *in vitro* que los niveles de la proteína producto de la variante alélica son menores en comparación a los niveles de la proteína producida por el alelo normal<sup>26</sup>. Estas diferencias en la actividad y expresión de la proteína pueden alterar la respuesta al tratamiento dependiendo del genotipo de cada individuo.

En este trabajo no se logra demostrar un efecto de las variantes alélicas en estos genes en la respuesta al tratamiento por el número reducido de pacientes que concluyeron su esquema de quimioterapia (6 ciclos).

Se observó que existe una tendencia de que la variante rs3745274 contribuya a altos niveles de ifosfamida en sangre en los pacientes con tumores sólidos tratados con ifosfamida a las 12 hr y 24 hr. Sin embargo no alcanza a la significancia por el reducido tamaño de muestra.

La variante rs776746 en el gen (*CYP3A5*) conduce a un splicing alternativo y trunca la proteína y por lo tanto hay completa ausencia de la actividad de la proteína. Para esta variante se observó una tendencia en la correlación del rs776746 del gen *CYP3A5* con la probable respuesta a tratamiento, al parecer los pacientes que presentan la variante alélica en estado heterocigoto u homocigoto para el alelo menor responden menos en comparación a los que presentan la variante normal ( $p=0.06$ ) aunque para corroborar esta probabilidad hace falta incrementar el número de pacientes. Se analizó también si el genotipo en la variante rs776746 provoca altos niveles de ifosfamida y se comprobó que hay una tendencia de que esta variante contribuye a altos niveles de ifosfamida en sangre en los pacientes con tumores sólidos tratados con ifosfamida a las 12 hr y 24 hr. Sin embargo no alcanza a la significancia por el reducido tamaño de muestra.

En términos de sobrevida la tasa global de mortalidad de los pacientes estudiados fue del 16.7% superando la media nacional calculada en 2012 del 32%<sup>1</sup>, en asociación con los genotipos estudiados no se observan diferencias significativas entre ausencia o presencia del polimorfismo para rs3745274, en contraste, para rs776746 se describe a los 253 días una tasa de mortalidad del 0.0% para pacientes con genotipo normal vs 21.4% de mortalidad en el mismo periodo de tiempo para los pacientes homocigotos para el alelo menor de la mutación rs776746. Aunque la asociación no fue significativa por el tamaño reducido de muestra. Hace falta aumentar el tamaño de la muestra para ver si la tendencia se mantiene.

Hay muy pocos estudios donde se asocie el genotipo y los niveles del fármaco así como la influencia del genotipo en la respuesta a tratamiento en relación a ifosfamida.

### **Conclusión.**

El presente estudio identificó una alta frecuencia alélica para el rs3745274 en *CYP2B6* y para el rs776746 en *CYP3A5* en esta muestra de pacientes con tumores sólidos y sarcomas de alto riesgo tratados con ifosfamida. Además, observamos que existe una tendencia de que el genotipo contribuya como factor pronóstico de la respuesta a tratamiento así como al incremento en los niveles de ifosfamida en sangre en los pacientes con tumores sólidos tratados con ifosfamida en estos genes de metabolismo de la ifosfamida.

La importancia de este estudio preliminar radica en poder brindar tratamientos individualizados, ya que al detectar metabolizadores lentos, rápidos o ultrarrápidos se pueda hacer un ajuste de dosis para poder obtener buena respuesta al tratamiento con la menor toxicidad para mejorar el apego al tratamiento y lograr una mayor sobrevida.

## Bibliografía

<sup>1</sup>Rivera-Luna, Roberto; Cárdenas-Cardos, Rocío; Olaya-Vargas, Alberto; Shalkow-Klincovstein, Jaime; Pérez-García, Martín; Pérez-González, Oscar Alberto; Díaz-Jiménez, Virginia; Amador-Zarco, Jaime Jorge; Vidal, Yadira Melchor. El niño de población abierta con cáncer en México. Consideraciones epidemiológicas, *AnMed (Mex)*,60,2,91-97,2015

<sup>2</sup>Mulder R, Paulides M, Langer T, Kremer L, van Dalen E. Ciclofosfamida versus ifosfamida para niños y adultos jóvenes con sarcoma de tejidos blandos y óseo (Revision Cochrane traducida): Biblioteca Cochrane Plus. 2010 Número 2.

<sup>3</sup>Chang T, Weber G, Crespi C, Waxman D. Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res.* 1993; 56:29-37.

<sup>4</sup>Dirección General de Información en Salud (DGIS). Base de datos de egresos hospitalarios por mortalidad en Instituciones Públicas, 2004-2007. [en línea]: Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). [México]: Secretaría de Salud. <<http://www.sinais.salud.gob.mx>> [Consulta: 4 julio 2013].

<sup>5</sup>Navajasa A y Peri R. Tumores de la infancia: consideraciones epidemiológicas y terapéuticas. *JANO* 2007. 668: 29-37.

<sup>6</sup>M<sup>a</sup> Jesús Martínez González, Ainhoa García Ribes, Carmen Garaizar Axpe Tumores cerebrales infantiles: diagnóstico y semiología neurológica. Sección de Neurología Pediátrica Hospital Universitario de Cruces, Baracaldo 2008 Capítulo 27.

<sup>7</sup>Cárdenas Cardós, R. (2010). Sarcomas de partes blandas: rhabdomyosarcomas y otros sarcomas no rhabdomyosarcomas. En Rivera Luna, R. Editor, *Protocolos Técnicos Cáncer en Niños*(pp. 251-281); México: ETMSA, ISBN 978-607-7817-10-9.

<sup>8</sup>National Cancer Institute – U.S. National Institutes of Health. [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov). Última actualización. Mayo de 2004.

<sup>9</sup>Helen Dimaras, Kahaki Kimani, Elizabeth A O Dimba, Peggy Gronsdahl, Abby White, Helen S L Chan, Brenda L Gallie Retinoblastoma. *Lancet* 2012; 379: 1436–46.

<sup>10</sup>Dr. José Fernando Pérez-Pérez, Dra. Ma. Estela Arroyo-Yllanes, Dra. Ana Ayón-Cárdenas, Dr. Pedro Acevedo-González. Características clínicas y tratamiento del retinoblastoma. *RevMex Oftalmología*; Enero-Febrero 2007; 21-24.

<sup>11</sup>Zapata Tarrés, M. (2010). Tumor de Wilms. En Rivera Luna, R. Editor, *Protocolos Técnicos Cáncer en Niños* (pp. 235-242); México: ETMSA, ISBN 978-607-7817-10-9.

<sup>12</sup>Correa González, C. (2010). Tumores renales no Wilms. En Rivera Luna, R. Editor, *Protocolos Técnicos Cáncer en Niños* (pp. 243-250); México: ETMSA, ISBN 978-607-7817-10-9.

<sup>13</sup>Liliana Esther Bernal-Casseres, Sandra Flor Páez-Aguirre. Osteosarcoma, experiencia en un hospital de tercer nivel. *Gaceta Mexicana de oncología*. Vol. 11 Núm. 5, septiembre – octubre 2012

<sup>14</sup>Gorlick R. Khanna C. Osteosarcoma. *J Bone Mineral Res* 2010; 25(4):683- 691.

<sup>15</sup>Klein M, Michel J. Osteosarcoma anatomy and histology variants. *Am J Clin Pathol* 2006;125:555-581.

<sup>16</sup>Mulder R, Paulides M, Langer T, Kremer L, van Dalen E. Ciclofosfamida versus ifosfamida para niños y adultos jóvenes con sarcoma de tejidos blandos y óseos (Revisión Cochrane traducida): Biblioteca Cochrane Plus. 2010 Número 2.

<sup>17</sup>Zhang J, Tian Q, Chan S, Duan W, and Zhou S. Insights into oxazaphosphorine resistance and possible approaches to its circumvention. *Drug Resistance Updates*. 2005 28: 271-97.

<sup>18</sup>Lewis D. 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics* 2004. 5(3): 305–318.

- 
- <sup>19</sup>Romero JA, Pinzón BA, Nuevo enfoque en la evaluación de pacientes oncológicos, Revista Colombiana de Radiología Vol. 17 No. 2, 1949-1954, Jun 2006.
- <sup>20</sup>Ribaudo H, Liu H, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Motsinger-Reif A, Ritchie M, Zanger U, Acosta E, Morse G, Gulick R, Robbins G, Clifford, D., and Haas, D.. Effect of CYP2B6, ABCB1, and CYP3A5 Polymorphisms on Efavirenz Pharmacokinetics and Treatment Response: An AIDS Clinical Trials Group Study. *J Infect Dis.* 2010 202(5):717-722
- <sup>21</sup>Rotger M, Tegude H, Colombo S, Cavassini M, Furrer H, Décosterd L, Bliedernicht J, Saussele T, Günthard F, Schwab M, Eichelbaum M, Telenti A, Zanger U. Predictive value of known and novel alleles of CYP2B6 for efavirenz plasma concentrations in HIV-infected individuals. *Clin Pharmacol Ther.* 2007 81:557-66.
- <sup>22</sup>Bray J, Sludden J, Griffin M, Cole M, Verrill M, Jamieson D and Boddy A. Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *British Journal of Cancer.* 2010 102:1003 – 1009.
- <sup>23</sup>Ekhart C, Doodeman V, Rodenhuis S, Smits P, Beijnen J and Huitema A. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes (GST, CYP2B6 and CYP3A) affect the pharmacokinetics of thiotepa and tepa. *British Journal of Clinical Pharmacology.* 2008 67(1): 50-60.
- <sup>24</sup> [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=3745274](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3745274)
- <sup>25</sup> Vargas G, Ramírez J, Peña A, Calderón B, Peña M, Martínez M, Ramirez S, Perez, Fragoso J. Distribution of ABCB1, CYP3A5, CYP2C19, and P2RY12 gene polymorphisms in a Mexican Mestizo population. *Mol Biol Rep* (2014) 41:7023–7029.
- <sup>26</sup> Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Ohno A, Makino Y, Matsushima E, Hanioka N, et al. Functional characterization of cytochrome P450 2B6 allelic variants. *Drug Metab Dispos* 2003; 31:398–403.