



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**“VARIACIONES GENÉTICAS EN *CYP2B6* ASOCIADAS A
TOXICIDAD EN PACIENTES PEDIÁTRICOS MEXICANOS
CON TUMORES SÓLIDOS EMBRIONARIOS TRATADOS
CON IFOSFAMIDA”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA :

CLAUDIA IBETH VALDEZ PANIAGUA

**ASESOR:
DR. JUAN LUIS CHAVEZ PACHECO**

**CO-ASESORA:
DRA. LUZ MARÍA TORRES ESPÍNDOLA**

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dedicatoria

A mi madre, por su amor, comprensión, dedicación, confianza y principalmente por su apoyo para lograr mis objetivos, gracias por guiar mi camino y siempre estar, te amo mami.

A mi padre, quien me ha enseñado a que nunca será tarde para ser una mejor persona, gracias por tu apoyo, te amo.

A mis hermanos, Daniel y Evelyn, por compartir infinidad de momentos, desde travesuras, platicas, risas, hasta llantos, pero, sobre todo por caminar siempre juntos, esperando que sea de inspiración para sus respectivos proyectos, los amo.

A Brenda y Diego, porque al final del camino, sea lejos o cerca, la familia siempre estará.

A mis abuelitos, Aurora y Modesto, a quienes debo la persona que soy, gracias infinitas por sus valores inculcados, por tener siempre una mano disponible para mí, por su confianza y apoyo, son mis guerreros, los amo por siempre.

A mis guías de vida, Antonia, Luis, Modesto porque de ustedes he aprendido el significado de "familia", gracias por sus consejos, platicas, risas, regaños, pero principalmente por su cariño y cuidado desde hace un poco más de 24 años, los amo.

A Erika, porque me impulsaste para ser mejor persona y salir adelante, te quiero mucho.

A Yomeli, Aislyn y Santiago, por robarme sonrisas y sacar de mi a la niña que llevo dentro, espero que sea una guía para ustedes, y luchen por sus sueños, siempre estaré para ustedes, los amo.

A Alejandro, mi compañero, por cada momento de diversión y aprendizaje, por tu cariño y apoyo infinito, pero principalmente por enseñarme a no darme por vencida, gracias por siempre estar, te amo.

A mis amigos, Fernanda, Berenice, Diana, Jessica, Mary, Josué, Erik, Gerardo, por recorrer este camino juntos. Así como a toda mi familia de danza, así como al profesor Víctor, sin olvidar a mi equipo de tocho y Couches, Cecilia, José Luis y Martínez, por confiar en mí, y por hacerme ver lo fuerte que soy, gracias por hacer de mí, una persona feliz y completa.

A mi Angelito ahora, porque, aunque lejos, en cada paso que doy, siempre estás en mi mente y en mi corazón.

Una dedicatoria especial a todos los niños que día a día luchan contra este padecimiento, los admiro por esa enorme valentía, fuerza y ganas de seguir adelante, esperando este proyecto sea de gran ayuda para ustedes en un futuro muy cercano.

Agradecimientos

A la Dra. Luz María Torres, por la oportunidad de formar parte de este equipo, por la confianza, el apoyo, las pláticas y consejos, y por el conocimiento brindado en este tiempo, la estimo mucho.

Al Dr. Juan Luis Chávez, por la oportunidad de incorporarme a su equipo de trabajo.

Al Dr. Manuel Castillejos, por su colaboración y apoyo estadístico, además del conocimiento brindado.

A la QFB. Francisca Trujillo, por su apoyo y confianza dentro y fuera del laboratorio.

A Daniela y Antonio por su apoyo, consejos y momentos amenos, sé que lograran sus objetivos.

A la Dra. Nancy Monroy, por la oportunidad, confianza, pero principalmente por mostrarme más a fondo el mundo de la genética, la admiro y estimo mucho.

A Blanca, Marisol, Mónica y Juan por su apoyo y paciencia brindada en mi estancia en el INNN y por esas pláticas tan amenas, los admiro y estimo.

A mi jurado asignado, los profesores: M. en C. Nydia Berenice González Angeles, M. en C. Maritere Domínguez Rojas, al Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García y en especial a la Q.F.B. Ma. Llasbeth Hernández Calderón, por todos sus comentarios, propuestas y apoyo en este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, así como a los profesores pertenecientes, por el conocimiento brindado, el cual ha hecho de mí, una mejor persona tanto en el ámbito profesional como personal.

Este proyecto fue financiado por CONACYT, en la convocatoria FOSISS
CONACYT S0008-2015-2-262406.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE GRÁFICAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	9
ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 Tumores Sólidos.....	13
1.2 Epidemiología del Cáncer infantil	13
1.3 Tratamiento de los Tumores sólidos.....	15
1.3.1 Quimioterapia.....	15
1.4 Ifosfamida	16
1.4.1 Mecanismo de acción y farmacocinética de la Ifosfamida.....	16
1.4.2 Farmacogenética de la Ifosfamida	18
1.5 Citocromo P450.....	19
1.5.1 Gen <i>CYP2B6</i>	20
1.5.1.1 Variante <i>CYP2B6</i> *2	21
1.5.1.2 Variante <i>CYP2B6</i> *5.....	22
1.5.1.3 Variante <i>CYP2B6</i> *6.....	22
1.6 Toxicidad asociada a Ifosfamida.....	24
2. HIPÓTESIS.....	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	26
4. OBJETIVOS.....	27
4.1 Objetivo general.....	27
4.2 Objetivos específicos	27

7.3.5 Frecuencia de la toxicidad hepática	51
7.3.6 Medianas de grado de toxicidad hepática por sexo y grupo de edad.....	53
7.3.7 Frecuencia de la toxicidad renal, cardíaca, tensión arterial y neurológica.	54
7.3.7.1 Frecuencia de toxicidad renal	54
7.3.7.2 Frecuencia de toxicidad cardíaca	55
7.3.7.3 Frecuencia de toxicidad en tensión arterial	55
7.3.7.4 Frecuencia de toxicidad neurológica	56
7.4 Comparación del genotipo con las medianas de la concentración de Ifosfamida en sangre	57
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	58
9. CONCLUSIONES	60
10. ANEXOS	61
11. REFERENCIAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de Ifosfamida.....	16
Figura 2. Metabolismo de Ifosfamida	17
Figura 3. Localización cromosómica del gen <i>CYP2B6</i>	20
Figura 4. Diseño de estudio.....	28
Figura 5. Estrategia experimental.....	32
Figura 6. Condiciones de amplificación de la PCR	36
Figura 7. Curva de discriminación alélica del polimorfismo rs3745274	43

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfico 1. Comparación de medianas de edad entre las categorías de sexo	40
Gráfico 2. Frecuencia de diagnóstico en población estudiada según el grupo de edad	41
Gráfico 3. Comparación de medianas de edad (años) entre pacientes fallecidos y no fallecidos	42
Gráfico 4. Comparación de medianas de fallecimiento	42
Gráfico 5. Frecuencia de medianas del grado de toxicidad hematológica durante los 6 ciclos de quimioterapia en la población estudiada	47
Gráfico 6. Frecuencia de medianas del grado de toxicidad gastrointestinal durante los 6 ciclos de quimioterapia en la población estudiada	50
Gráfico 7. Frecuencia de medianas del grado de toxicidad hepática, durante los 6 ciclos de quimioterapia en la población estudiada	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prevalencia de tumores en niños pertenecientes al Seguro Popular durante el año 2012	14
Tabla 2. Descripción de alelos de <i>CYP2B6</i>	21
Tabla 3. Distribución alélica de polimorfismos del gen <i>CYP2B6</i>	23
Tabla 4. Toxicidad y manifestaciones asociadas a Ifosfamida	25
Tabla 5. Definición de variables operacionales	30
Tabla 6. Mezcla de reacción para ensayo de discriminación alélica	35
Tabla 7. Sondas utilizadas en el ensayo de discriminación alélica	36
Tabla 8. Características de la población estudiada	41
Tabla 9. Distribución alélica de los polimorfismos de <i>CYP2B6</i>	44
Tabla 10. Frecuencia de toxicidad hematológica en la cohorte de pacientes con las variantes alélicas rs8192709, rs3211371 o rs3745274 en el gen <i>CYP2B6</i>	45

Tabla 11. Riesgo relativo (RR) de la toxicidad hematológica en pacientes con la variante alélica rs8192709, rs3211371 o rs3745274 comparado con los pacientes sin la variante.....	46
Tabla 12. Frecuencias de toxicidad gastrointestinal en pacientes con la variante rs8192709, rs3211371 o rs3745274 en <i>CYP2B6</i>	48
Tabla 13. Riesgo relativo (RR) de la toxicidad gastrointestinal en pacientes con la variante alélica rs8192709, rs3211371 o rs3745274 comparado con los pacientes sin la variante.....	49
Tabla 14. Frecuencia de toxicidad hepática en pacientes con la variante rs8192709, rs3211371 o rs3745274 en <i>CYP2B6</i>	51
Tabla 15. Riesgo relativo (RR) de la toxicidad hepática en pacientes con la variante alélica rs8192709, rs3211371 o rs3745274 comparado con los pacientes sin la variante	52
Tabla 16. Frecuencia de toxicidad renal en pacientes	54
Tabla 17. Frecuencia de toxicidad cardíaca en pacientes.....	55
Tabla 18. Frecuencia de toxicidad en tensión arterial en pacientes	55
Tabla 19. Frecuencia de toxicidad neurológica en pacientes	56
Tabla 20. Comparación del genotipo con las medianas de la concentración de ifosfamida a las 12 y 24 horas.....	57

ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µmol	Micromol
µl	Microlitro
°C	Grado Celsius
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín Trifosfato
CO	Monóxido de carbono
Cys	Cisteína
Fe ²⁺	Hierro ferroso
G	Gramo
Gln	Glicina
H	Hora
His	Histidina
IFA	Ifosfamida
INP	Instituto Nacional de Pediatría
Kg	Kilogramo
LC-MS	Cromatografía de líquidos acoplado a espectrómetro de masas
MAF	Frecuencia del alelo menor
Min	Minuto
Mm	Milímetros
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
Nm	Nanómetro
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Rpm	Revoluciones por minuto
RR	Riesgo relativo
Seg	Segundo
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TS	Tumor sólido
UPLC	Cromatografía líquida de ultra-alto desempeño
UV/Vis	Ultravioleta- visible
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

Los tumores sólidos (TS) en el año 2012 ocuparon el primer lugar en las 10 principales causas de atención hospitalaria. El tratamiento que se utiliza incluye a la *ifosfamida* (IFA); la IFA a pesar de ser muy eficaz, también ocasiona importante toxicidad multisistémica. Cada individuo reacciona de distinta forma, entre otros factores gracias a las enzimas metabolizadoras de fármacos antineoplásicos. Se han descrito polimorfismos genéticos en estas enzimas que incluyen a varios citocromos P450 (*CYP450*) que afectan la toxicidad.

OBJETIVO GENERAL: Determinar si existen variantes alélicas en el gen *CYP2B6*, que incrementen el riesgo de desarrollar toxicidad en pacientes pediátricos mexicanos con tumores sólidos embrionarios tratados con ifosfamida, mediante el ensayo de discriminación alélica por sondas TaqMan®.

METODOLOGIA. Se captaron 62 pacientes diagnosticados con TS tratados con IFA, se obtuvo el ADN genómico para su genotipificación, mediante la técnica de discriminación alélica mediante el uso de sondas TaqMan. Además, una muestra capilar de cada paciente, tomada a las 12 y 24 h después de la última infusión de IFA, con el fin del monitoreo de los niveles de IFA total, mediante *LC-MS* en fase reversa. Finalmente se realizó el análisis estadístico con el programa estadístico SPSS versión 20.

RESULTADOS. La frecuencia del alelo T; rs81927099, 3211371 y rs37452749 fue de (0.12, 0.07 y 0.3 respectivamente). Los pacientes con alelo T para la variante alélica rs81927099 presentaron hasta 1.15 veces mayor riesgo de presentar toxicidad hematológica comparada con los pacientes sin la variante (IC95% 1.029-1.294); para la toxicidad gastrointestinal se observó que portadores del alelo T para la variante alélica rs81927099 presentaron hasta 1.7 veces mayor riesgo de presentar toxicidad gastrointestinal comparada con los pacientes sin la variante (IC95% 1.337-2.171), mientras que portadores del alelo T para la variante rs37452749 presentaron hasta 1.7 veces menos riesgo de presentar toxicidad gastrointestinal comparada con los pacientes sin la variante (RR:0.6; IC95%0.486-0.872). Finalmente, portadores de la variante rs37452749 presentaron hasta 1.7 mayor riesgo de presentar toxicidad hepática comparada con los pacientes sin la variante, (IC95% 1.008-2.899).

CONCLUSIONES. El alelo T de la variante rs8192709 aumenta el riesgo de presentar toxicidad hematológica y gastrointestinal comparada con los pacientes sin la variante, los pacientes con el alelo T de la variante rs3745274 disminuye el riesgo de presentar toxicidad gastrointestinal comparada con pacientes sin la variante mientras que aumenta el riesgo de toxicidad hepática en pacientes con esta variante comparado en pacientes sin la variante.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 TUMORES SÓLIDOS

Los tumores sólidos son masas sólidas, formadas por células neoplásicas que se ubican en cualquier sitio anatómico. Su comportamiento es agresivo y son de crecimiento rápido¹.

1.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER INFANTIL.

Se estima que en el mundo existen 12 millones de personas diagnosticadas con cáncer, de los cuales el 3% (360 000) son niños, por lo cual el cáncer es la segunda causa de muerte en menores de 20 años a nivel mundial.

En México se estima que anualmente existen entre 5 000 y 6 000 casos nuevos de cáncer en menores de 18 años; cuyo predominio en el sexo masculino es de 54.9% del total de los casos. Entre los que destacan principalmente los tumores sólidos en un 60% del total de los tumores malignos infantiles y el 40% se diagnostica como leucemias y linfomas².

Por lo tanto, México tiene un promedio anual de 2 150 muertes por cáncer infantil en la última década.

Según el último censo de la población:

En el grupo preescolar (1 a 4 años), los tumores malignos de ocupar el 5º lugar en el año 2000, ocupó el 3º lugar en el año 2011.

En el grupo escolar (5 a 14 años) y en el grupo de edad reproductiva (15-64 años) las principales causas de mortalidad entre el año 2000 y 2011 se han mantenido de manera homogénea, donde los tumores malignos representan el 2º y 1er lugar respectivamente³.

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).

En el INP se registraron 1806 egresos hospitalarios, incluyendo transferencias intrahospitalarias por neoplasias (tumores), durante el año 2014⁴. Durante este periodo los tumores sólidos provocaron 57 defunciones aproximadamente, debido a estas cifras se situaron en el 2014 en el primer lugar entre las 10 principales causas de egreso hospitalario (6610 casos) y el primer lugar entre las causas de mortalidad hospitalaria (198 casos)⁵.

Los principales TS de acuerdo a su frecuencia en el Seguro Popular en el año 2012, ocuparon el primer lugar en las 10 principales causas de atención hospitalaria⁶ (Tabla 1).

Tabla 1. Prevalencia de tumores en niños pertenecientes al Seguro Popular durante el año 2012. Tomada de Agenda estadística; 2014

Diagnóstico	Prevalencia Casos N (%)
Linfomas	1,329 (49.7)
Tumores de células germinales	152 (5.6)
Sarcoma de partes blandas	112 (4.1)
Retinoblastoma	100 (3.7)
Tumores renales (Wilms)	87 (3.2)
Osteosarcoma	77 (2.8)
Neuroblastoma	46 (1.7)
Tumor de Ewing	24 (0.8)
Otros tumores sólidos	66 (2.4)
Total (n)	2,671

1.3 TRATAMIENTO DE LOS TUMORES SÓLIDOS

El tratamiento de las patologías oncológicas es multimodal, dependiendo de la histología tumoral.

Los diferentes componentes terapéuticos son la quimioterapia, radioterapia, cirugía, inmunoterapia y trasplante de médula ósea.

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.

1.3.1 QUIMIOTERAPIA

Su propósito es causar un fenómeno citotóxico letal o apoptosis en la célula cancerosa, que detenga la progresión del tumor. El ataque se dirige generalmente al ADN o a los lugares metabólicos esenciales para la replicación celular; lo ideal es que los fármacos antineoplásicos interfieran solo en los procesos celulares que son exclusivos de las células malignas, sin embargo, afectan a todas las células proliferantes, normales y anormales⁷.

La QT con combinación de fármacos tiene mayor éxito que el uso de solo un fármaco. En base a esto se han desarrollado numerosos protocolos de tratamiento del cáncer, como es el caso de los “protocolos técnicos para el cáncer en niños” del cual se basan para diversos esquemas de tratamiento para tumores sólidos⁸.

Asimismo, el principal agente antineoplásico para tratar tumores sólidos es la Ifosfamida, la cual de manera general ha incrementado la sobrevida hasta el 70% de los casos⁹.

1.4 IFOSFAMIDA

La ifosfamida (IFA) es un isómero estructural de la ciclofosfamida (CFA), introducida como un agente contra el cáncer a principios del año 1970¹⁰.

El compuesto (cloro-2-etil)-3[(cloro-2-etil) amino]-2-tetrahidro-2-H-oxazafosforina) es una oxazafosforina alquilante perteneciente al grupo de las mostazas nitrogenadas, dentro de la familia de los agentes alquilantes (Figura 1). Actualmente aplicado como un agente quimioterápico en el tratamiento de varios tumores sólidos y hematológicos en adultos y niños¹¹.

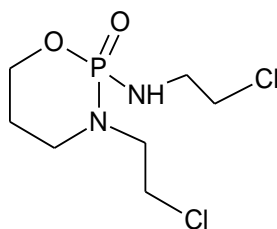


Figura 1. Estructura química de la Ifosfamida. Tomada de Kerbusch; 2001

En la actualidad existe controversia en cuanto a la eficacia antitumoral y los efectos adversos¹², esto 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.

1.4.1 MECANISMO DE ACCIÓN Y FARMACOCINÉTICA DE LA IFOSFAMIDA

La IFA es administrada vía intravenosa en infusión continua, como profármaco, el cual es transportado específicamente por eritrocitos hasta la célula hepática, a la cual ingresa por medio de un receptor desconocido.

En el interior del hepatocito, la IFA es metabolizada a través del sistema enzimático de la familia del citocromo P450 (CYP), biotransformándose inicialmente en metabolitos tales como, 2-dicloroetilfosfamida, 3-dicloroetilfosfamida y cloroacetaldehído (neurotóxico) mediante las isoformas CYP3A4, CYP2B6, CYP3A5, así como en intermediarios hidroxilados, 4-hidroxifosfamida y Aldoifosfamida

mediante CYP3A5, 3A4, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9; estos intermediarios se desdoblan formando compuestos activos, donde después de la β – eliminación de la acroleína (urotóxica), se forma la mostaza fosforamida (alquilante)¹³ (Figura 2).

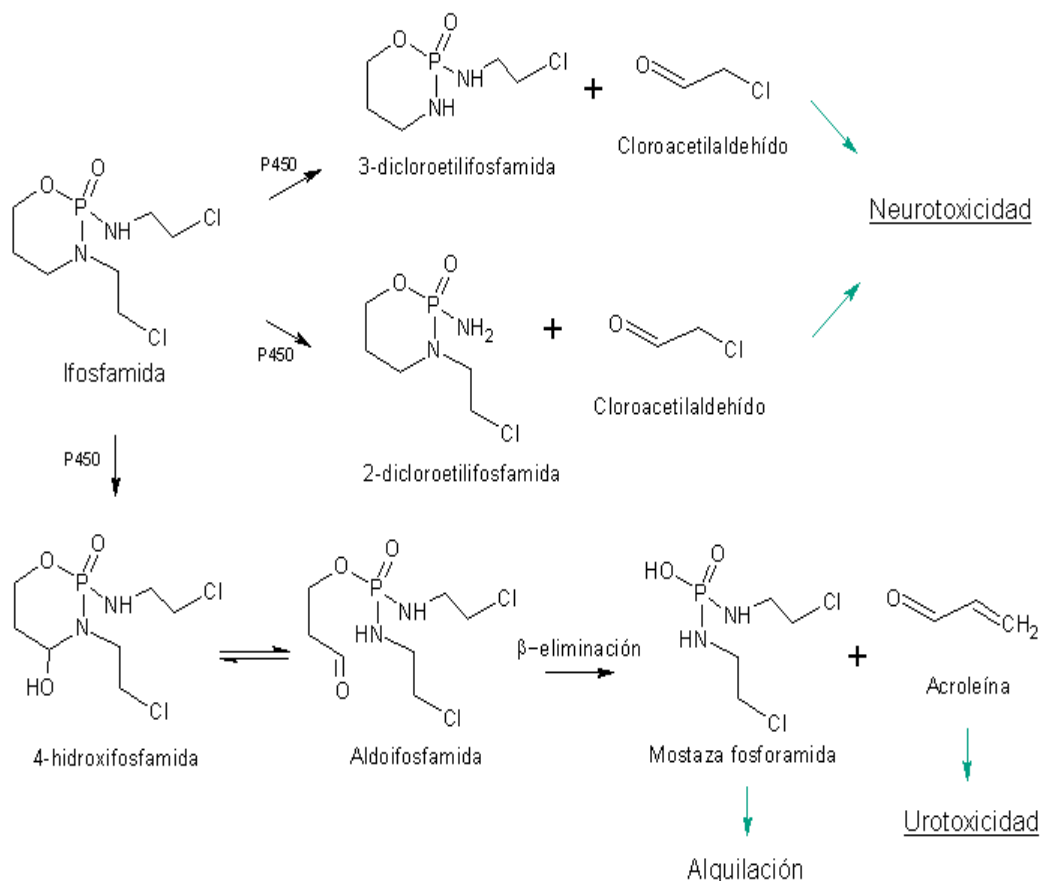


Figura 2. Metabolismo de la Ifosfamida. Modificada de Vredenburg; 2015

Posteriormente los metabolitos difunden de manera pasiva fuera de las células hepáticas, circulando y entrando pasivamente a otras células.

Por lo que el resultado de la alquilación directa del ADN es probablemente la reacción citotóxica crucial para destruir las células tumorales y de este modo bloquear la replicación del ADN celular y la transcripción del ARN y, por lo tanto, la mitosis y la síntesis de proteínas, debido a efectos citotóxicos ocasionados por la formación de enlaces covalentes entre los grupos alquilo del fármaco con diversos grupos nucleófilos presentes en las células, especialmente las bases nitrogenadas del ADN.

La IFA ejerce su acción durante todo el ciclo celular sin diferenciar entre las células que ciclan y las que están en reposo, pero son más activos (tóxicos) sobre las células en rápida división¹⁴.

La dosis de IFA varía según el protocolo. Sin embargo, las más utilizadas son:

- 1.200-1.800 mg/m²/día, durante 3-5 días, cada 3-4 semanas.
- 5 g/m² dosis única cada 3-4 semanas.
- 3 g/m²/día durante 2-3 días cada 3-4 semanas¹⁵.

La vida media de IFA es terminal a:

Dosis baja (1 800 mg/m²) de 4-7 h y dosis alta (3800 a 5000 mg/m²) de 11 a 15 h, eliminándose del 60-80% de una dosis, en la orina como fármaco sin modificar y metabolitos.

Los parámetros de vigilancia son: Biometría hemática completa con diferencial y plaquetas, análisis de orina, pruebas de función hepática y renal; electrolitos séricos. Este fármaco es mutágeno, carcinógeno y tiene la capacidad de generar procesos malignos secundarios como la leucemia aguda entre otros.

1.4.2 FARMACOGENÉTICA DE LA IFOSFAMIDA

Cada individuo reacciona de manera diferente a los agentes quimioterapéuticos, es decir, que un paciente reaccione favorablemente a la quimioterapia “respondedor” o que no presente respuesta al tratamiento “no respondedor”, también 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 IFA 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 como *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP3A4/5*.

Los genes CYP pertenecen a una súper familia de genes citocromo P450 (CYT450), la cual está integrada por más de 200 genes. 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, 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 genes tendrán diferencias en el metabolismo de los fármacos¹⁶.

- a) Metabolizador rápido (MR): procesa los fármacos en tiempo y forma (dos alelos de función normal)
- b) Metabolizador intermedio (MI): procesa los fármacos un poco más lento que un EM (un alelo funcional con un alelo no funcional)
- c) Metabolizador lento (ML): no es capaz de procesar los fármacos (dos alelos no funcionales)
- d) Metabolizador ultrarrápido (MU): considerado como aquel que transforma los fármacos muy rápidamente (dos alelos de función incrementada/ un alelo de función incrementada con otro de función normal).

1.5 CITOCROMO P450

Es una familia de enzimas responsables del metabolismo oxidativo de una gran variedad de xenobióticos (fármacos, pesticidas, esteroides y alcaloides) y de la degradación de sustancias producidas por el propio organismo (esteroides, sales biliares, vitaminas liposolubles A y D, alcaloides endógenos, etc.) de las que se han identificado más de 2,000 isoformas.

Una característica del complejo enzimático de CYP450, es la enorme versatilidad funcional tanto en la variedad de procesos que cataliza como en la gran diversidad de sustratos que puede transformar, jugando un papel importante pues durante la fase oxidativa del metabolismo de ciertos fármacos, algunos tienen la capacidad de aumentar o disminuir la actividad de las enzimas del CYP450.

La nomenclatura de cada isoenzima se nombra actualmente de acuerdo al grado de similitud de la secuencia de aminoácidos en las diferentes enzimas del citocromo.

Las enzimas de una misma familia son homologas en 40% al 55% de la secuencia y las enzimas de la misma subfamilia en más del 55%¹⁷.

1.5.1 GEN *CYP2B6*

El gen *CYP2B6* (Citocromo P450, familia 2, subfamilia B, polipéptido 6), se localiza en la región cromosómica 19q13.2 (Figura 3), tiene un tamaño aproximado de 27.0 Kb, está constituido por 11 exones, y el ARNm produce 6 transcritos (isoformas *1,*2,*3,*4,*5 y *6). El gen *CYP2B6* codifica para una proteína de 491 aa¹⁸. La expresión de la proteína en hígado es del 2-5% del contenido total¹⁹ y el contenido extrahepático es en intestino, riñones, pulmón, piel y cerebro²⁰.

La enzima *CYP2B6* es responsable de la activación metabólica de fármacos antineoplásicos como la IFA²¹, la capacidad de activación de esta enzima es variable entre individuos desde 4-9 veces ya que se ha reportado variabilidad interindividual e interétnica en la cantidad y actividad catalítica de *CYP2B6* esta variabilidad puede deberse a polimorfismos genéticos en el gen y con ello diferencias en la respuesta y/o toxicidad.

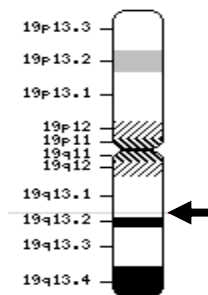


Figura 3. Localización cromosómica del gen *CYP2B6*.

Tomada de NCBI Map Viewer; 2016

Lang y colaboradores en el año 2001, identificaron nueve mutaciones puntuales del gen *CYP2B6* en una población de personas blancas. Cinco de las cuales causaron sustituciones de aminoácidos en los exones 1, 4, 5, y 9. Ellos encontraron seis diferentes alelos denominados *CYP2B6*2*, *CYP2B6*3*, *CYP2B6*4*, *CYP2B6*5*, *CYP2B6*6*, y *CYP2B6*7* (silvestre, *CYP2B6*1*) por análisis de haplotipos²² (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción de alelos de *CYP2B6*. Tomada de Jinno; 2003

Alelo	Cambios De Ácidos Nucleicos	Sustitución De Aminoácidos	Actividad Enzimática
CYP2B6*1^a	Ninguno	Ninguno	Normal
CYP2B6*2	64C>T	Arg22Cys	Disminuida
CYP2B6*3	777C>A	Ser259Arg	
CYP2B6*4	785A>G	Lys262Arg	Incrementada
CYP2B6*5	1459C>T	Arg487Cys	Disminuida
CYP2B6*6	516G>T; 785A>G	Gln172His; Lys262Arg	Disminuida
CYP2B6*7	516G>T; 785A>G; 1459C>T	Gln172His; Lys262Arg; Arg487Cys	

^a Normal

1.5.1.1 VARIANTE *CYP2B6*2*

El rs8192709, presenta un cambio de aminoácidos Arg22Cys (64C>T).

Presenta una baja respuesta a Doxorrubicina y Ciclofosfamida, los cuales son utilizados como antineoplásicos en pacientes con cáncer de mama de población caucásica; se desconoce el efecto funcional²³.

1.5.1.2 VARIANTE CYP2B6*5

El rs3211371, presenta un cambio de aminoácido Arg487Cys (1459 C>T).

Se ha reportado que esta variante reduce la expresión de la proteína CYP2B6 en el hígado y cerebro, así como disminución del metabolismo de mafenitoína²⁴.

Se ha observado que homocigotos para el alelo T presentan altas dosis acumuladas de Ciclofosfamida y Doxorubicina (indicador de alta toxicidad)²⁵.

En una cohorte de pacientes que recibieron Tiotepa (fármaco para tratar TS), se observó que pacientes con el mismo genotipo (TT) presentaron menos exposición a sustratos de CYP2B6 lo que indica que presentaron fenotipo metabolizadores rápidos²⁶. Su frecuencia se ha analizado en una muestra de individuos residentes en Los Ángeles con ascendencia mexicana de 0.12.

1.5.1.3 VARIANTE CYP2B6*6

La isoforma *CYP2B6*6* se caracteriza por la presencia de dos variantes no sinónimos CYP2B6: 516G > T y CYP2B6: 785A >G.

El rs3745274, presenta un cambio de aminoácido Gln172His (516G>T), el cual genera un splicing aberrante, que como resultado ocasiona una baja expresión de la isoforma.

Un estudio in vitro, mostró que la variante es asociada a una menor expresión de la proteína CYP2B6 y la actividad de Bupropion y Efavirenz en microsomas de hígado. Otros estudios con CFA y 7-etoxi-4-trifluoro-metilcumarina, mostraron mayor actividad. Además, se realizó un estudio en pacientes con leucemia sometidos a un trasplante de células madre hematopoyéticas, tratados con CFA, mostrando una asociación de CYP2B6*6 con una mayor toxicidad en hígado, lo que sugiere que la variante fue más activa en el procesamiento de la CFA. También, un estudio in vivo, mostró un incremento en la concentración plasmática de Efavirenz en pacientes japoneses con VIH (incrementando hasta 3 y en sangre 2 veces)²⁷. Sugiriéndose una menor actividad de la variante²⁸.

El polimorfismo rs3745274, es asociada a una reducción en la expresión de la proteína CYP2B6 hepática, así como la actividad. Además, se presenta con mayor frecuencia en personas de raza negra africana en comparación con los caucásicos. El alelo 516T se ha asociado con una mayor exposición a Efavirenz en plasma. El genotipo TT es asociado con la farmacocinética de Efavirenz, además de los efectos secundarios psiquiátricos. Por lo contrario, el genotipo GG se asocia con concentraciones plasmáticas subterapéuticas de Efavirenz²⁹.

A continuación, se muestran distribuciones alélicas de los SNPs de *CYP2B6* de diferente origen étnico (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución alélica de polimorfismos del gen *CYP2B6*. Tomado de NCBI, Ensembl, HapMap; 2016

Origen Étnico	CYP2B6*2 (rs8192709)		CYP2B6*5 (rs3211371)		CYP2B6*6 (rs3745274)	
	Alelo C	Alelo T (MAF)	Alelo C	Alelo T (MAF)	Alelo G	Alelo T (MAF)
Todos	0.952	0.048	0.946	0.054	0.684	0.316
Europa	0.937	0.063	0.888	0.112	0.764	0.236
África	0.958	0.042	0.989	0.011	0.626	0.374
América	0.957	0.043	0.928	0.072	0.627	0.373
Asia oriental	0.953	0.047	0.997	0.003	0.785	0.215
México	0.990	0.010	ND	ND	0.710	0.290

ND: No determinada

1.6 TOXICIDAD ASOCIADA A IFOSFAMIDA

Los fármacos antineoplásicos son toxinas que constituyen una amenaza letal para las células, por lo que estas elaboran mecanismos de defensa, para protegerse de dichas toxinas químicas.

Por lo que el éxito de la QT se ve disminuido debido a la aparición de resistencia hacia diferentes agentes y la generación de toxicidad a tejidos normales³⁰.

Así, toxicidad según G. Steven, se define como efectos adversos para la salud causados por agentes químicos, físicos o biológicos en los organismos vivos³¹.

La IFA por sí misma es poco citotóxica y es metabolizada in vivo y genera los metabolitos 2-dicloroetilfosfamida, 3-dicloroetilfosfamida, cloroacetaldehído (neurotóxico), 4-hidroxifosfamida, aldofosfamida y acroleína (urotóxica), los cuales son altamente tóxicos.

El metabolismo del huésped es quizá el determinante más importante de la respuesta al tumor y se sabe que esta toxicidad es debida a que la actividad de CYP3A5 y CYP2B6 presente en el riñón y el hígado puede producir toxicidad renal a nivel de los túbulos proximales.

Por lo que el tratamiento, se debe aplicar de forma intermitente, aproximadamente con 21 días de pausa con el fin de que el sistema inmune del paciente se recupere ya que también se ve afectado por el quimioterapéutico y reduce el riesgo de infecciones graves³².

Se ha documentado que el cuadro clínico que se presenta después de la administración de IFA, varía desde datos clínicos como somnolencia, letargia, irritabilidad, excitación, desorientación, confusión, debilidad, asterixis, alucinaciones y crisis convulsivas, hasta signos clínicos graves, como la degeneración del cerebelo, atrofia cerebral, dolor secundario a neuropatía periférica, y degeneración del sistema nervioso central. Incluso existen reportes de trastornos del movimiento como hemibalismo, corea o atetosis en pacientes pediátricos³³.

La toxicidad causada por IFA, es impredecible y por lo general severa si no se restringe el tratamiento (Tabla 4).

Tabla 4. Toxicidad y manifestaciones asociadas a la Ifosfamida.

Tomada de Ames; 2010

Toxicidad	Manifestación
Hematológica	Mielosupresión-leucocitopenia
Urotoxicidad	Cistitis hemorrágica
Nefrotoxicidad	Síndrome de Falconi y toxicidad glomerular
Cardiaca	Arritmias, falla cardiaca
SNC	Somnolencia, letargo, confusión, psicosis depresiva, alucinaciones, mareo, convulsiones, fiebre, ataxia, coma.
Neurológica	Encefalopatía severa
Dermatológica	Alopecia, hiperpigmentación
Gastrointestinal	Nauseas, vomito, estomatitis, diarrea
Endocrinas y metabólicas	Acidosis metabólica

La aparición de estos síntomas se ha observado desde el inicio del tratamiento, de 2 a 48 horas después del inicio de la infusión de IFA, hasta 1 a 3 días después. Incluso se han descrito secuelas psicológicas a largo plazo, hasta 10 semanas después de la administración de la IFA³⁴.

Se ha reportado que la dosis acumulada de IFA para causar neurotoxicidad es cuando excede los 60 g/m². En un reporte de caso en población mexicana³⁵ se encontró que la dosis acumulada fue de 36 g/m² y esta fue necesaria y suficiente para causar neurotoxicidad.

2. HIPOTESIS

Existen variantes alélicas en el gen *CYP2B6* que incrementen el riesgo de desarrollar toxicidad en pacientes pediátricos mexicanos con tumores sólidos embrionarios y sarcomas de alto riesgo tratados con ifosfamida.

3. JUSTIFICACIÓN

La administración de fármacos antineoplásicos en nuestra población hasta ahora se lleva a cabo por extrapolación ciega de datos generados en otras poblaciones genéticamente diferentes a la nuestra. Con base a las variaciones interétnicas en enzimas metabolizadoras de fármacos antineoplásicos, es fundamental establecer las frecuencias alélicas en nuestra población para buscar (tamizar) a aquellos pacientes que tengan las variantes alélicas en el gen *CYP2B6* que causen toxicidad por la administración de ifosfamida, con el fin de establecer regímenes de administración y dosificación adecuados a nuestra población. Esta investigación busca un impacto directo en fortalecer el esquema de quimioterapia individualizada.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si existen variantes alélicas en el gen *CYP2B6*, que incrementen el riesgo de desarrollar toxicidad en pacientes pediátricos mexicanos con tumores sólidos embrionarios tratados con ifosfamida, mediante el ensayo de discriminación alélica por sondas TaqMan®.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes alélicas en el gen *CYP2B6*.
- b) Obtener la frecuencia de toxicidad (hematológica, gastrointestinal, hepática, neurológica, renal, cardíaca) entre pacientes pediátricos mexicanos tratados con ifosfamida que presentan la variante alélica y compararlos con aquellos que no presentan la variante alélica.
- c) Monitorear los niveles de ifosfamida en gota de sangre seca en papel filtro, a las 12 y 24 horas después de concluir la última dosis de infusión de ifosfamida en pacientes pediátricos.
- d) Comparar los niveles de ifosfamida en gota de sangre en pacientes que presentan la variante alélica, con los pacientes que no la presentan.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 DISEÑO DE ESTUDIO

Es un estudio observacional, comparativo, prospectivo y longitudinal.

El reclutamiento de la cohorte inició a partir del inicio del tratamiento con IFA en el primer ciclo y hasta los 6 ciclos del esquema, a aquellos pacientes que cumplieron con los criterios de selección.

El diseño permitió evaluar clínicamente a los pacientes hasta el final de tratamiento y clasificarlos de acuerdo a su estatus de presentación de toxicidad (presentó toxicidad versus no presentó toxicidad).

La cohorte se construyó de acuerdo al siguiente esquema:

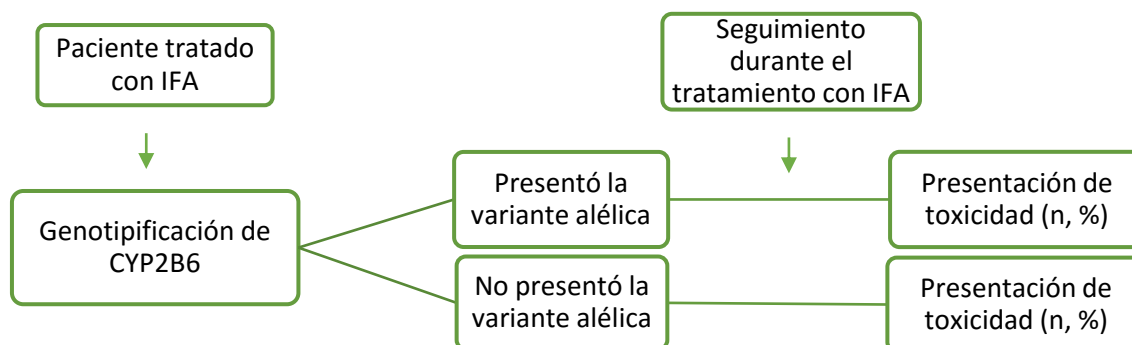


Figura 4. Diseño de estudio

5.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

5.2.1 POBLACIÓN OBJETIVO

Pacientes captados del servicio de Hemato-Oncología del INP, diagnosticados con tumores sólidos, tratados con Ifosfamida.

5.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

5.3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron pacientes con tumores sólidos tratados con ifosfamida por primera vez, menores de 1 año y hasta los 17 años, cualquier género. Para todos los pacientes se requirió una carta de Consentimiento Informado (Anexo 1) por parte de los padres y/o tutores, en el caso de pacientes mayores a 12 años firmaron Carta de Asentimiento (Anexo 2).

Todos los pacientes captados fueron 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.

5.3.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes que presentaron un diagnóstico diferente a tumor sólido, Pacientes con transfusión sanguínea con paquete eritrocitario no desleucocitado o plasma, desnutrición de grado III y/o cualquier alteración que pueda afectar la determinación de los niveles del fármaco, pacientes que no estén en el primer ciclo con ifosfamida, pacientes con daño renal o hepático y pacientes que no sean mexicanos.

5.3.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

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

5.4 DEFINICION DE VARIABLES OPERACIONALES

Tabla 5. Definición de variables operacionales

Variable	Definición Operacional	Clasificación	Categoría
Género	Características biológicas que permiten diferenciar entre hombre y mujer.	Cualitativa Dicotómica	1= Femenino 2= Masculino
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento del sujeto.	Cuantitativa continua	Años
Evolución	Tiempo transcurrido desde el inicio de síntomas hasta la fecha de última consulta.	Cuantitativa continua	Meses
Seguimiento	Tiempo transcurrido desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de última consulta.	Cuantitativa continua	Meses
Dosis de Ifosfamida	Cantidad de fármaco administrado por vía IV por 5 días	Cuantitativa discreta	800mg/m ² /día
Frecuencia alélica de polimorfismos	Proporción de un alelo respecto al conjunto de los que pueden ocupar un locus determinado en la población.	Cualitativa politémica	1= homocigoto 2=heterocigoto 3= Normal
Toxicidad	Cualquier efecto no deseado que se presente durante el tratamiento con un medicamento o especialidad medicinal		1= Si 2= No
Toxicidad Gastrointestinal			
Náuseas	Sensación de urgencia de vomitar	Cualitativa dicotómica	0= sin evento adverso
Vómito	Expulsión espasmódica del contenido del estómago a través de la boca.	Cualitativa ordinal	1= leve
Diarrea	Deposición de tres o más veces al día, de heces sueltas o líquidas.	Cualitativa ordinal	2= moderado 3= alto
Estomatitis	Inflamación de la mucosa bucal	Cualitativa Ordinal	4= muy alto

Tabla 5. Definición de variables operacionales (Continuación)

Variable	Definición Operacional	Clasificación	Categoría
Toxicidad hepática	Actividad de las enzimas transaminasa, fosfatasa alcalina y nivel de bilirrubina. Se definirá daño hepático cuando alguna de las enzimas duplique (2N) el valor basal obtenido antes de la quimioterapia.	Cualitativa ordinal	0= sin evento adverso
Toxicidad renal	Creatinina, proteinuria, hematuria. Se describirá daño si se rebasa al menos alguno de los límites máximos establecidos.	Cualitativa ordinal	1= leve 2= moderado 3= alto
Toxicidad neurológica	Presencia de datos de alteración neurosensorial, neuromotora, neurocortical, neurocerebelar, cefalea, estreñimiento, audición, visión	Cualitativa Ordinal	4= muy alto
Toxicidad cardíaca	Presencia de datos de disritmias, isquemia cardíaca, función cardíaca.	Cualitativa Ordinal	
Niveles de Ifosfamida			
En sangre	Cantidad de fármaco cuantificado a las 12 y 24 horas del término de la infusión de la ifosfamida	Cuantitativa continua	µM

6. METODOLOGÍA

6.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

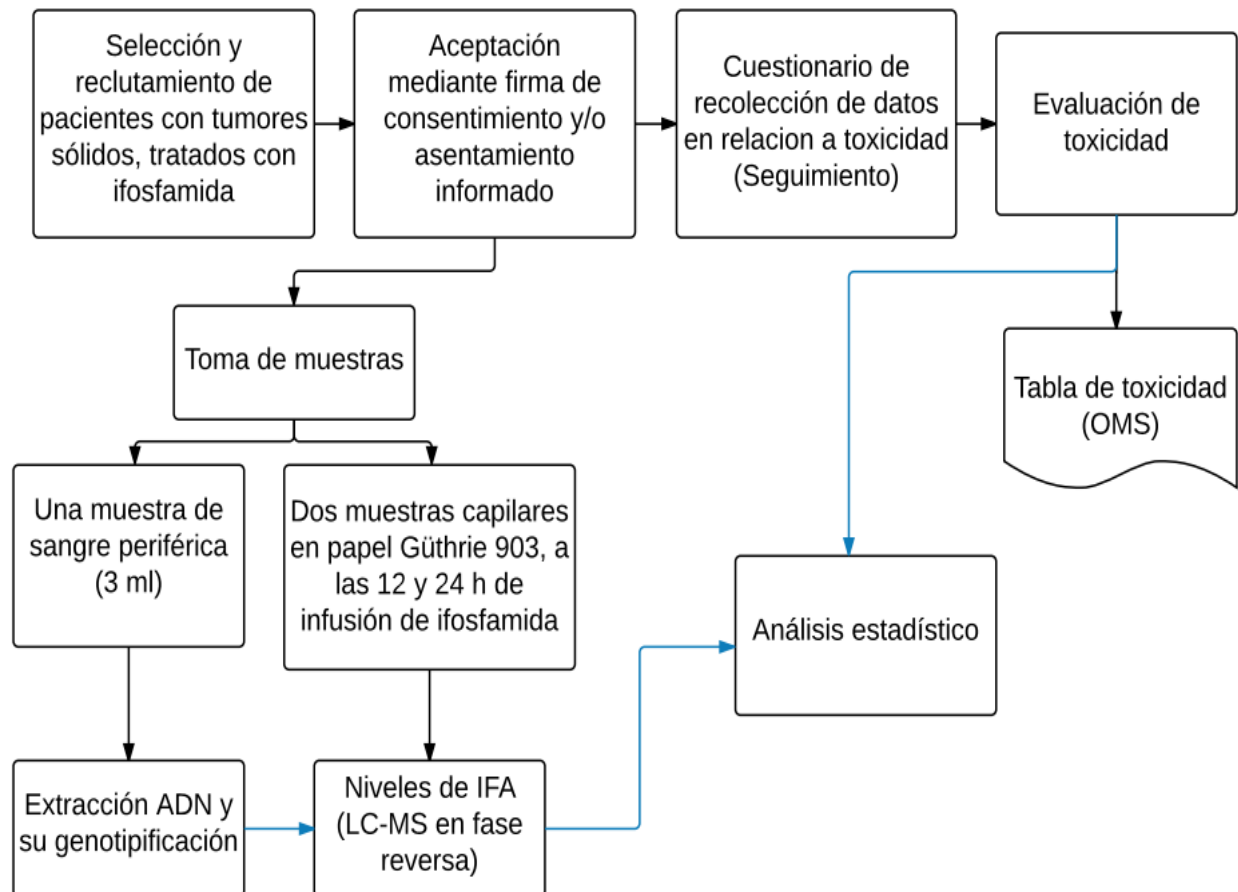


Figura 5. Estrategia experimental

6.2 TOMA DE MUESTRA

Tomar 3 muestras de sangre a cada paciente:

- Una muestra de sangre total, con un volumen de 3 ml aproximadamente, para el análisis del material genético.
- Dos muestras capilares, utilizar una lanceta automática y retráctil, *Contact-Activated* de la marca *BD Microtainer*®.

Tomar las muestras capilares a las 12 y 24 horas después de terminar la última infusión con IFA. Al obtener la gota de sangre, colocarla en una tarjeta *Güthrie 903*. Someter la muestra a secado toda la noche a temperatura ambiente y proteger de la luz solar (posicionar la tarjeta de forma horizontal); posteriormente colocar las tarjetas en bolsas de plástico de baja permeabilidad a los gases con desecante añadido, para reducir la humedad, y almacenar a -80°C hasta su análisis.

6.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

6.3.1 OBTENCIÓN DE LA CAPA LEUCOCITARIA

La capa de leucocitos, es el componente intermedio, que se obtiene de una unidad de sangre total, al centrifugar a 3,500 rpm por 20 min.

Obtenerla con una pipeta *Pasteur* estéril, y trasladarla a un tubo Falcón, posteriormente, lisar los eritrocitos con amortiguador de lisis de células rojas (*RCLB*), hasta que el concentrado de leucocitos no contenga eritrocitos, trasladar el botón de leucocitos a un tubo *eppendorf* estéril.

6.3.2 OBTENCIÓN DE ADN

Realizar la purificación de ADN, mediante el método descrito en el *QIAamp DNA Mini kit*³⁶.

- a) Adicionar al concentrado de leucocitos, contenidos en un tubo *ependorf*, 200 μ l de amortiguador *AL* (*QIAGEN*TM), continuar con 20 mg/ml proteasa (*Proteinasa K*), homogeneizar la muestra.
- b) Incubar la muestra, a una temperatura de 56°C por 8 h; al finalizar el tiempo de incubación, mantener la muestra a temperatura ambiente.
- c) Agregar 200 μ l de etanol absoluto a la muestra, homogeneizar por inversión.
- d) Cargar la muestra a la columna de *QIAamp Mini Spin*. Centrifugar a 8 000 rpm por 1 min; descartar el filtrado (contenedor de residuos).
- e) Adicionar a la columna 500 μ l de amortiguador *AW1* (*QIAGEN*TM). Incubar a temperatura ambiente por 3 min y centrifugar a 8 000 rpm por 1 min, descartar el filtrado nuevamente.
- f) Agregar amortiguador *AW2* (*QIAGEN*TM). Incubar a temperatura ambiente por 3 min y posteriormente centrifugar a 12 000 rpm por 1 min, desechar el filtrado.
- g) Colocar la columna *Mini Spin* en un nuevo tubo colector, desechar el tubo colector previo.
- h) Agregar 200 μ l de amortiguador *AE* (*QIAGEN*TM). Incubar la muestra a 60°C por 10 min, posteriormente centrifugar a 9 000 rpm por 1 min.
- i) Transferir el filtrado a un tubo *ependorf* estéril, previamente etiquetado y almacenar la muestra hasta su posterior uso.

Por cuestiones éticas, etiquetar las muestras con códigos de letras y números, de tal forma que no se indique información de la persona (paciente), y así, permanecer anónima para el investigador.

6.4 CUANTIFICACIÓN DE ADN

Cuantificar la concentración y evaluar la pureza del ADN de cada muestra, mediante espectrofotometría a través del equipo *EPOCH*™ de BioTek, el cual utiliza un Software Gen5, para Análisis de Datos³⁷.

Estimar la concentración de ADN por medio del espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm para proteínas. Establecer la pureza del ADN, mediante la relación de las lecturas de absorbancias a 260 y 280 nm (260/280), siendo la relación óptima de 1.8 a 2.0; por lo que una relación inferior a 1.8 indica contaminación con proteínas, y una relación mayor, contaminación con ARN.

6.5 GENOTIPIFICACIÓN MEDIANTE EL ENSAYO DE DISCRIMINACIÓN ALÉLICA

Realizar el análisis de los genotipos mediante el ensayo de discriminación alélica y utilizar sondas TaqMan®.

Para genotipificar, se genera una mezcla o mix de reacción, la cual contiene lo siguiente:

Tabla 6. Mezcla de reacción para ensayo de discriminación alélica

Reactivos	Volumen (µl) para 1 reacción
Mix de reacción	
Master mix	5.0
Sonda	0.4
Agua	1.6
Muestra biológica	
ADN (10 ng/µl)	3.0
Volumen total de reacción	10.0

Agregar el mix de reacción a la muestra de ADN.

Es necesario anexar al ensayo un control negativo (sin ADN), un control normal (Homocigoto alelo 1), un control heterocigoto (Alelo 1 y Alelo 2) y un control positivo (Homocigoto Alelo 2) para cada sonda. Las sondas utilizadas se adquirieron de Applied biosystems (Tabla 7).

Tabla 7. Sondas utilizadas en el ensayo de discriminación alélica

Variante	rs
CYP2B6*2	8192709
CYP2B6*5	3211371
CYP2B6*6	3745274

Procesar las reacciones con el método para ensayos *TaqMan®Drug Metabolism Genotyping* y seguir las condiciones. (Figura 6)

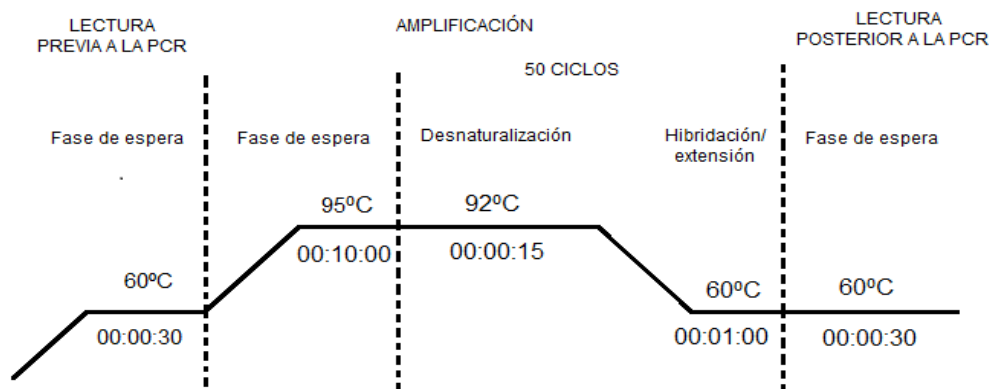


Figura 6. Condiciones de amplificación de la PCR

Utilizar el equipo *Step One*, con el *software SDS 2.2.1* para discriminación alélica.

6.6 MONITOREO DE NIVELES DE IFOSFAMIDA

Monitorear los niveles de IFA total en sangre periférica mediante LC-MS en fase reversa, por un método desarrollado en el laboratorio.

Para el sistema de cromatografía líquida de ultra-alto desempeño (UPLC), utilizar un equipo modelo *AcQuity* acoplado a un espectrómetro de masas *Quattro micro tandem* operado en modo de ionización positiva (ESI (+): “electrospray positive ionization mode”) y controlado por el programa computarizado *MassLynx* NT 4.0.

- a) Separar los compuestos en una columna *Acquity*, a 40 °C y automuestreador a 15 °C, velocidad de flujo de 0.20 ml/min.
- b) El tiempo de corrida es de 3.5 min. Los tiempos de retención son de 1.9 min para IFA y 2.0 min para ciclofosfamida (CFA).
- c) La fase móvil consiste en formiato de amonio 5 mM, con metanol y acetonitrilo (MeOH:ACN).
- d) Mezclar la fase móvil en dos reservorios independientes, en uno de ellos colocar metanol y ACN, y en el otro colocar el formiato de amonio.

En relación a las condiciones espectrométricas, medir los analitos a través de monitorización de reacción múltiple. Usar las siguientes transiciones iónicas:

$m/z1+ 260.99 > 91.63$ Th para IFA y $261.00 > 139.90$ Th para CFA.

La energía de cono es de 25 V para ambos analitos, mientras que la energía de colisión es de 25 V para IFA y 20 V para CFA. Se utilizó un “dwell” de 0.2 s.

Procesar los datos mediante el programa *MassLynx*.

Para la elaboración de estándares y controles, preparar las soluciones iniciales de IFA y CFA (1 mg/ml), individualmente en metanol al 100%. A partir de la solución inicial de IFA, elaborar soluciones de trabajo 20X en metanol al 70%, para obtener las soluciones de los calibradores a concentraciones de 2, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 µg/ml. Para los puntos controles de calidad bajo, medio y alto, preparar soluciones de 6, 80 y 160 µg/ml, respectivamente.

Preparar las curvas de calibración independientes (100, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 7,500, y 10,000 ng/ml)

- a) Colocar 475 μL de sangre total (hematocrito 30% y 45%) con 25 μL de solución de IFA a las diferentes concentraciones (20X).
- b) Colocar 40 μL de la mezcla en tarjetas Whatman S&S 903 (tarjetas Guthrie) en cada círculo por separado.
- c) Secar las tarjetas en posición horizontal por 6 horas a temperatura ambiente. Almacenar debidamente etiquetadas en bolsas de plástico de baja permeabilidad a gases, acompañadas de material secante, a temperatura ambiente, a 4 °C y -80 °C, hasta el momento de analizarse.
- d) Preparar los puntos controles de calidad bajo, medio y alto (300, 4000 y 8000 ng/mL, respectivamente) de la misma forma que la curva de calibración, emplear las respectivas soluciones iniciales 20X.

Para la extracción, utilizar la muestra capilar de cada paciente, contenidas en las tarjetas Guthrie:

- a) Realizar perforaciones circulares de 3 mm de diámetro (confetis) en la parte central de cada círculo impreso, con la ayuda de un perforador manual calibrado marca *McGill*.
- b) Depositar los confetis en tubos *ependorf* con capacidad para 1.5 ml y adicionar estándar interno (EI).
- c) Agregar ACN:acetato de etilo 50:50 v/v, agitar a máxima velocidad por 1 min y centrifugar a 13 500 rpm/ 5 min.
- d) Decantar el sobrenadante (fase orgánica), y evaporar las muestras a 40 °C bajo corriente de oxígeno.
- e) Una vez seca la muestra, reconstituir con agua: MeOH:ACN y agitar a máxima velocidad por 10 seg.
- f) Transferir el sobrenadante a viales para inyectarlo al sistema cromatográfico de líquidos.

6.7 GRADO DE TOXICIDAD DE ACUERDO A LA OMS

Registrar la toxicidad durante los 6 ciclos de quimioterapia, de acuerdo a escala de valoración homogénea, principalmente a la escala de la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificada de acuerdo a la función de los órganos y sistemas afectados. La escala a utilizar va de 0-4 para indicar el grado de afectación.

6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis Univariado: obtener las medianas del grado de toxicidad, análisis descriptivo y percentiles.

Análisis Bivariado: obtener las frecuencias de la toxicidad (hematológica, gastrointestinal, hepática, renal, etc.) de los pacientes que presentan la variante alélica comparado con los pacientes que no presentan la variante alélica, y así, utilizar razón de momios o Riesgo Relativo (RR) y realizar la estimación con intervalos de confianza del 95% (IC95%), para obtener como resultado un valor de p inferior a 0.05 y ser estadísticamente significativo. Comparar el genotipo con las medianas de la toxicidad en cada uno de los sistemas a analizar, por medio de las pruebas de U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. Para dichos análisis utilizar el software de SPSS versión 20.0

Generar las frecuencias genotípicas observadas y esperadas para obtener el equilibrio Hardy-Weinberg de cada variante alélica en *CYP2B6* en la cohorte de pacientes a estudiar.

7. RESULTADOS

7.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

Se analizó una cohorte de 62 pacientes, de los cuales 28 (45%) fueron sexo femenino y 34 (55%) sexo masculino, la mediana de la edad fue de 10 años en mujeres y 8 años en hombres (Gráfico 1).

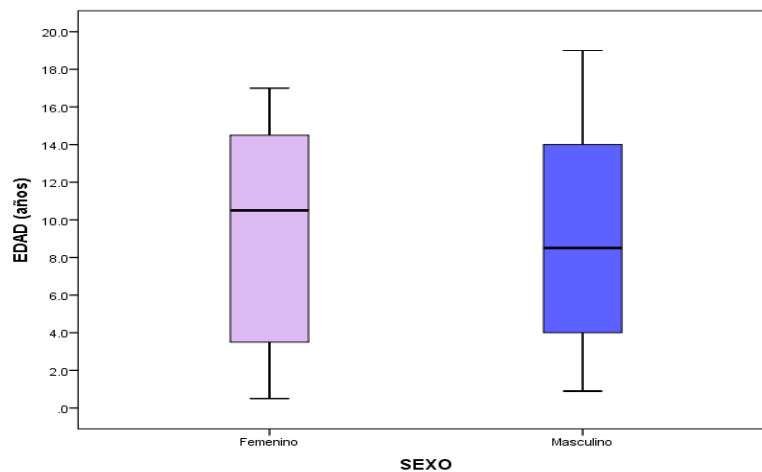


Gráfico 1. Comparación de medianas de edad entre las categorías de sexo

Se encontró que el diagnóstico más frecuente fueron los Sarcomas de partes blandas y tumores del sistema nervioso central (SNC), dentro de este último grupo se incluye el Glioblastoma (6%), Neuroblastoma (6%), Meduloblastoma (3%), Hepatoblastoma (3%), Ependimoma (3%), Neuroepitelioma (2%) y Pineoblastoma (2%); los menos frecuentes fueron osteosarcoma (5%), tumor rabdoide (5%) y tumor de Wilms (3%).

Además, el 58.1% de los pacientes completaron sus ciclos de quimioterapia con IFA (ciclo 6) y el 9.7% de los pacientes han fallecido (Tabla 8).

Tabla 8. Características de la población estudiada

Característica	Femenino	Masculino
Sexo	28 (45%)	34 (55%)
Edad (Q ₂₅ -Q ₇₅), años	10 (3-15)	8 (4-14)
Diagnóstico	N	%
Sarcomas	16	26
Tumores del SNC	16	26
Retinoblastoma	10	15
Tumor de Ewing	6	10
Tumor germinal	6	10
Osteosarcoma	3	5
Tumor Rabdoide	3	5
Tumor de Wilms	2	3
Ciclo de quimioterapia (total)	N	%
1	62	100.0
2	59	95.2
3	57	91.9
4	50	80.6
5	42	67.7
6	36	58.1
Pacientes fallecidos		
Si	6	9.7
No	56	90.3

El diagnóstico que prevaleció en pacientes menores a 5 años fue Retinoblastoma, mientras que en los grupos de edad de 5 a 9, 10 a 14 y 15 a 17 años el más frecuente fue Sarcoma de partes blandas (Gráfico 2).

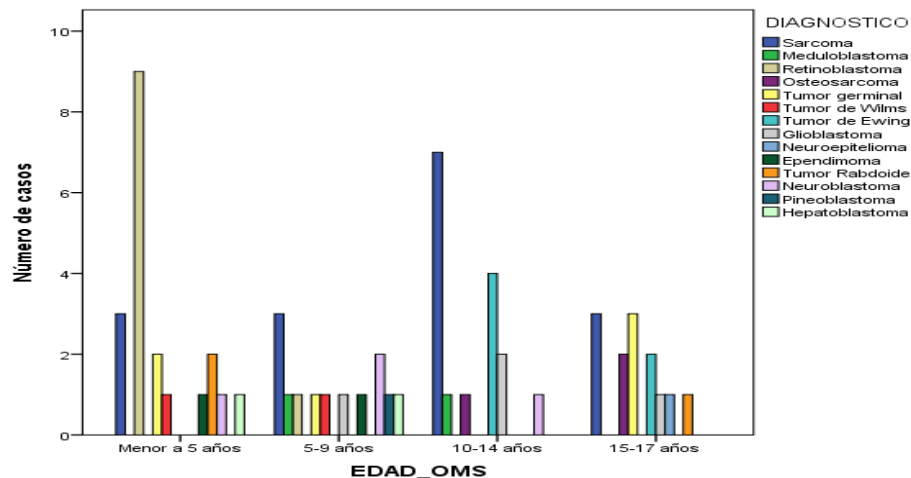


Gráfico 2. Frecuencia de diagnóstico en población estudiada según el grupo de edad

Se compararon las medianas de edad entre pacientes que han fallecido, la cual fue de 6 años, y los que no han fallecido de 9 años (Gráfico 3).

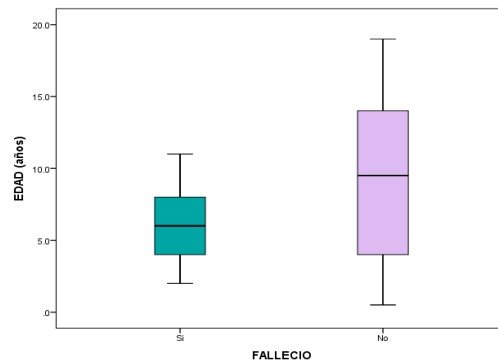


Gráfico 3. Comparación de medianas de edad (años) entre pacientes fallecidos y no fallecidos. Mediante la prueba de U de Mann-Whitney, $p=0.193$

Se analizó la comparación de medianas entre evolución y fallecimiento, donde la mediana de la evolución fue de 1.10 años en pacientes fallecidos, y de 1.5 años en pacientes que no han fallecido. (Gráfico 4.a)

Respecto al seguimiento, los pacientes que fallecieron presentaron una mediana de 1.2 años y los pacientes que no han fallecido presentan un seguimiento de 1 año. (Gráfico 4.b)

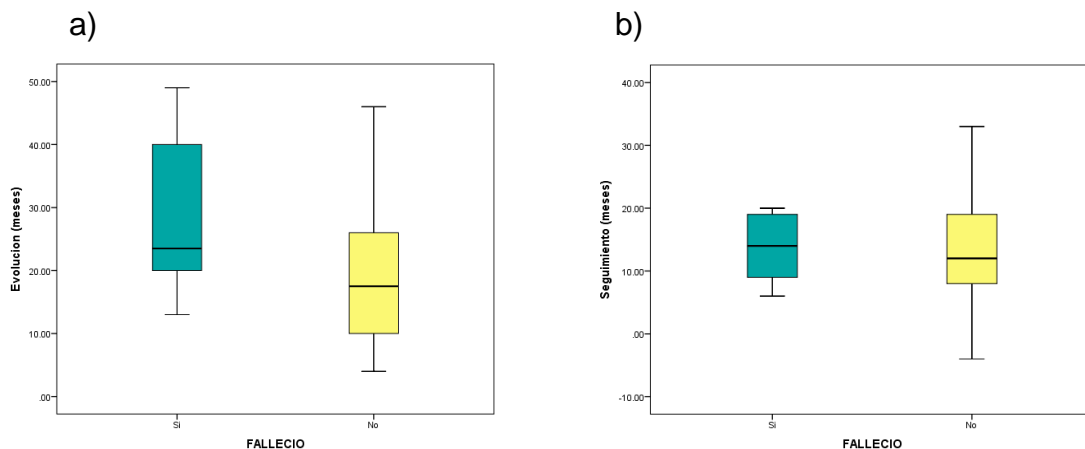


Gráfico 4. Comparación de medianas de fallecimiento. a) Evolución (meses) y fallecimiento ($p=0.086$). b) Seguimiento (meses) y fallecimiento ($p=0.633$). Mediante Prueba de U de Mann-Whitney

7.2 FRECUENCIAS GÉNICAS EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA

Se analizaron 62 muestras de ADN provenientes de los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión, mediante PCR en Tiempo Real (TR) con sondas TaqMan. Se muestra la curva de discriminación alélica (Figura 7), en la cual se observan puntos rojos que corresponden a genotipos homocigotos silvestres, los puntos verdes a genotipos heterocigotos, puntos azules a homocigotos mutados, mientras que los cuadros negros corresponden a controles negativos.

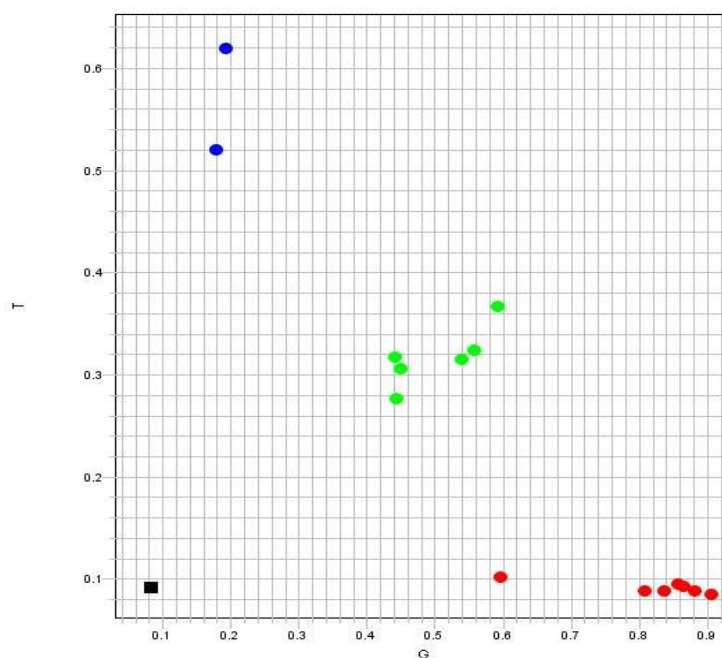


Figura 7. Curva de discriminación alélica del polimorfismo rs3745274

Para el rs8192709 se encontró una frecuencia para el genotipo CC de 0.758 (75.8%) para el genotipo heterocigoto CT de 0.242 (24.2%) y para el genotipo TT una frecuencia de 0.0 (0.0%).

Respecto a la distribución alélica se encontró para el alelo C de 0.879 y para el alelo T de 0.121. El polimorfismo en esta población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg.

Para el rs3211371 la frecuencia para el genotipo CC fue de 0.887 (88.7%) para el genotipo heterocigoto CT fue de 0.081 (8.1%) y para el genotipo TT se encontró de 0.032 (3.2%); la distribución alélica fue de 0.927 para el alelo C y de 0.073 para el alelo T. El polimorfismo en esta población no se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg.

Y finalmente para el rs3745274 la frecuencia para el genotipo GG fue de 0.468 (46.8%), para el genotipo GT fue de 0.419 (41.9%) y para el genotipo TT es de 0.113 (11.3%). La distribución alélica fue de 0.677 para el alelo G y de 0.323 para el alelo T. El polimorfismo en esta población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg (Tabla 9).

Tabla 9. Distribución alélica de los polimorfismos de *CYP2B6*

Variante	N (62)	Frecuencia Alélica
rs8192709 C>T	47	(C) 0.88
	15	
	0	(T) 0.12
rs3211371 C>T	55	(C) 0.93
	5	
	2	(T) 0.07
rs3745274 G>T	29	(G) 0.68
	26	
	7	(T) 0.32

7.3 FRECUENCIA DE LA TOXICIDAD EN PACIENTES CON TUMORES SÓLIDOS

7.3.1 FRECUENCIA DE LA TOXICIDAD HEMATOLÓGICA

Se obtuvo la frecuencia de la toxicidad hematológica durante los seis ciclos de la QT, en pacientes que presentan las variantes alélicas (rs8192709, rs3211371 o rs3745274). Los pacientes con alguna de las tres variantes alélicas, presentaron un mayor grado de toxicidad (86-100%) en los 6 ciclos analizados respectivamente (Tabla 10).

Tabla 10. Frecuencia de toxicidad hematológica en la cohorte de pacientes con las variantes alélicas rs8192709, rs3211371 o rs3745274 en el gen *CYP2B6*

Polimorfismo	Frecuencia de toxicidad hematológica (%)					
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5	Ciclo 6
rs8192709	15/54 (100)	10/55 (91)	11/57 (100)	9/46 (100)	7/40 (100)	5/35 (100)
rs3211371	6/54 (86)	5/55 (100)	6/57 (100)	4/46 (100)	3/40 (100)	3/35 (100)
rs3745274	30/54 (94)	30/55 (97)	31/57 (100)	26/46 (96)	23/40 (100)	19/35 (100)

Se obtuvieron también los riesgos relativos (RR) para cada una de las variantes alélicas estudiadas. Encontrando que pacientes con el alelo T de la variante rs8192709 aumenta el riesgo de presentar toxicidad hematológica 1.15 veces más comparado con los pacientes sin la variante (IC95% 1.029-1.294). Los pacientes con las variantes rs3211371 y rs3745274 no aumentan el riesgo de presentar toxicidad hematológica comparado con los pacientes sin la variante, hasta este momento con este número de muestra no hay resultados estadísticamente significativos $p = >0.05$ para estas variantes alélicas (Tabla 11).

Tabla 11. Riesgo relativo (RR) de la toxicidad hematológica en pacientes con la variante alélica rs8192709, rs3211371 o rs3745274 comparado con los pacientes sin la variante

SNP	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3	
	RR (IC95%)	valor de P	RR (IC95%)	valor de P	RR (IC95%)	valor de P
rs8192709	1.154 (1.029-1.294)	0.321	0.949 (0.780-1.155)	0.474	NC	NC
rs3211371	0.946 (0.691-1.296)	0.541	1.06 (0.992-1.132)	1.0	NC	NC
rs3745274	1.094 (0.917-1.304)	0.404	1.045 (0.923-1.184)	0.593	NC	NC
SNP	Ciclo 4		Ciclo 5		Ciclo 6	
	RR (IC95%)	valor de P	RR (IC95%)	valor de P	RR (IC95%)	valor de P
rs8192709	1.054 (0.980-1.134)	1.0	1.027 (0.975-1.082)	1.0	NC	NC
rs3211371	1.048 (0.982-1.117)	1.0	1.027 (0.975-1.082)	1.0	NC	NC
rs3745274	1.011 (0.896-1.141)	1.0	1.059 (0.947-1.184)	0.439	NC	NC

NC: No calculable

7.3.2 MEDIANAS DE GRADO DE TOXICIDAD HEMATOLOGICA POR SEXO Y GRUPO DE EDAD

Debido a que la toxicidad hematológica fue la más frecuente se realizó el análisis de las medianas de acuerdo a edad y sexo para saber si había una diferencia en la toxicidad con estas dos variables (Gráfico 5), se observan las medianas de toxicidad de acuerdo a las categorías de edad y sexo, observándose toxicidad hematológica grado 3 y 4, tanto en hombres como en mujeres. Con un conteo de linfocitos < 1000, grado 3 y grado 4 en todos los ciclos.

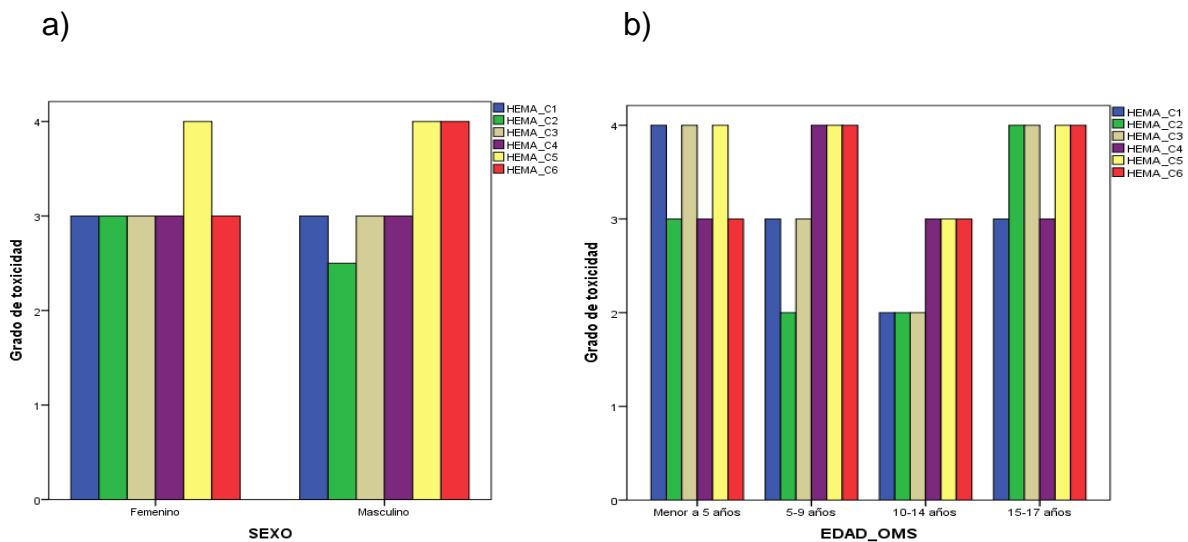


Gráfico 5. Frecuencia de medianas del grado de toxicidad hematológica durante los 6 ciclos de quimioterapia en la población estudiada. a) Categoría de sexo. b) Grupos de edad.

7.3.3 FRECUENCIA DE LA TOXICIDAD GASTROINTESTINAL

Se obtuvo la frecuencia de la toxicidad gastrointestinal en los pacientes que presentan las variantes alélicas (rs8192709, rs3211371 o rs3745274), en los seis ciclos de quimioterapia se observó grado de toxicidad (48-100%) (Tabla 12).

Tabla 12. Frecuencias de toxicidad gastrointestinal en pacientes con la variante rs8192709, rs3211371 o rs3745274 en *CYP2B6*

Polimorfismo	Frecuencia de toxicidad gastrointestinal (%)					
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5	Ciclo 6
rs8192709	10/47 (67)	10/36 (91)	11/38 (100)	7/30 (78)	5/27 (71)	3/23 (50)
rs3211371	4/47 (57)	4/36 (80)	6/38 (100)	4/30 (100)	2/27 (67)	3/23 (100)
rs3745274	20/47 (61)	19/36 (61)	23/38 (74)	13/30 (48)	13/27 (56)	11/23 (55)

Se calcularon los riesgos relativos (RR) para conocer si esta toxicidad era debida a la variante alélica. Encontrando que para la variante rs8192709 los pacientes presentaron un riesgo en el segundo ciclo de 1.643 veces de presentar toxicidad (IC95% 1.196-2.258) $p=0.039$ comparado a los pacientes sin la variante, mientras que en el ciclo tres los pacientes con la misma variante alélica presentaron un riesgo de 1.704 veces (IC 95% 1.337-2.171) $p=0.010$. Otra variante alélica que presento un RR estadísticamente significativo fue la rs3745274 encontrando que en el ciclo uno los pacientes con dicha variante alélica al parecer es un factor protector de toxicidad RR: 0.651 (IC95% 0.486-0.872) $p=0.003$; comparado a los pacientes sin la variante. Sin embargo, con la otra variante rs3211371 hasta el momento con este tamaño de muestra no se encontró riesgo de toxicidad estadísticamente significativo (Tabla 13).

Tabla 13. Riesgo relativo (RR) de la toxicidad gastrointestinal en pacientes con la variante alélica rs8192709, rs3211371 o rs3745274 comparado con los pacientes sin la variante

SNP	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3	
	RR (IC95%)	valor de P	RR (IC95%)	valor de P	RR (IC95%)	valor de P
rs8192709	0.847 (0.575-1.248)	0.489	1.643 (1.196-2.258)	0.039	1.704 (1.337-2.171)	0.010
rs3211371	0.731 (0.379-1.409)	0.345	1.325 (0.812-2.162)	0.640	1.594 (1.290-1.969)	0.164
rs3745274	0.651 (0.486-0.872)	0.003	0.973 (0.651-1.456)	0.896	1.286 (0.871-1.898)	0.188
SNP	Ciclo 4		Ciclo 5		Ciclo 6	
	RR (IC95%)	valor de P	RR (IC95%)	valor de P	RR (IC95%)	valor de P
rs8192709	1.386 (0.891-2.157)	0.285	1.136 (0.667-1.937)	1.0	0.75 (0.324-1.736)	0.645
rs3211371	1.769 (1.373-2.280)	0.140	1.04 (0.452-2.394)	1.0	1.65 (1.253-2.172)	0.288
rs3745274	0.651 (0.411-1.032)	0.064	0.767 (0.490-1.200)	0.248	0.733 (0.451-1.193)	0.214

NC: No calculable

7.3.4 MEDIANAS DE GRADO DE TOXICIDAD GASTROINTESTINAL POR SEXO Y GRUPO DE EDAD

Se analizaron las medianas de la toxicidad gastrointestinal; los resultados obtenidos muestran que no se encontró toxicidad en este sistema ya que se mantuvo en grado 2 en hombres (ciclo 5 y 6) en mujeres y grado 1 (ciclo 5 y 6) hombres (Gráfico 6a).

También se realizó el análisis de la toxicidad gastrointestinal durante los 6 ciclos de la quimioterapia de acuerdo a los grupos de edad según la OMS. Se pudo observar que en los grupos de 5 a 9, de 10 a 14 años y 15 a 17 años la toxicidad se mantuvo en grado 1 y 2 (Gráfico 6b).

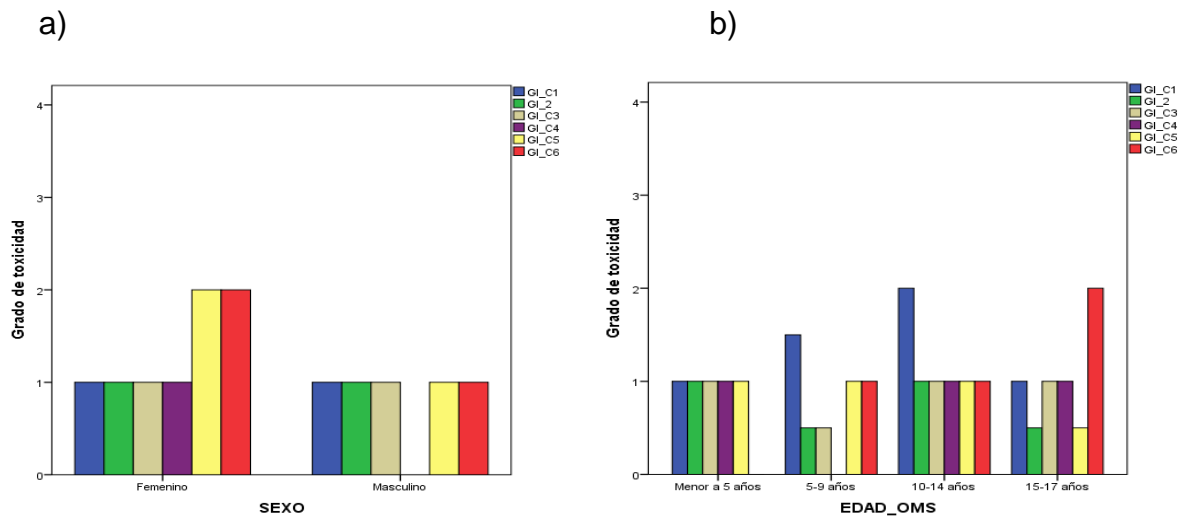


Gráfico 6. Frecuencia de medianas del grado de toxicidad gastrointestinal durante los 6 ciclos de quimioterapia en la población estudiada. a) Categoría de sexo. b) Grupo de edad.

7.3.5 FRECUENCIA DE LA TOXICIDAD HEPÁTICA.

Se obtuvo la frecuencia de la toxicidad hepática durante los seis ciclos de QT en los pacientes que presentan las variantes alélicas (rs8192709, rs3211371 o rs3745274) en el gen *CYP2B6*. Se observó que se presentó toxicidad en grado 1 (33-77%) en todos los ciclos de quimioterapia (Tabla 14).

Los pacientes con las tres variantes alélicas, presentaron un mayor grado de toxicidad (86-100%) en los 6 ciclos analizados respectivamente

Tabla 14. Frecuencia de toxicidad hepática en pacientes con la variante rs8192709, rs3211371 o rs3745274 en *CYP2B6*

Polimorfismo	Frecuencia de Toxicidad hepática (%)					
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5	Ciclo 6
rs8192709	10/38 (67)	7/38 (64)	4/33 (36)	5/29 (56)	4/22 (57)	2/15 (50)
rs3211371	4/38 (57)	2/38 (40)	2/33 (33)	2/29 (50)	1/22 (33)	1/15 (33)
rs3745274	24/38 (75)	22/38 (71)	21/33 (68)	20/29 (77)	15/22 (68)	10/15 (56)

Se calcularon, los riesgos relativos encontrando que la para la variante rs3745274 en el ciclo uno y tres se encontró que tienen 1.5 veces de presentar toxicidad comparado con los pacientes sin la variante (IC95% 0.985-2.285) y RR de 1.709 (IC95% 1.008-2.899) $p=0.045$ y 0.026 respectivamente. Mientras que en las otras variantes no se encontró un riesgo relativo estadísticamente significativo (Tabla 15).

Tabla 15. Riesgo relativo (RR) de la toxicidad hepática en pacientes con la variante alélica rs8192709, rs3211371 o rs3745274 comparado con los pacientes sin la variante

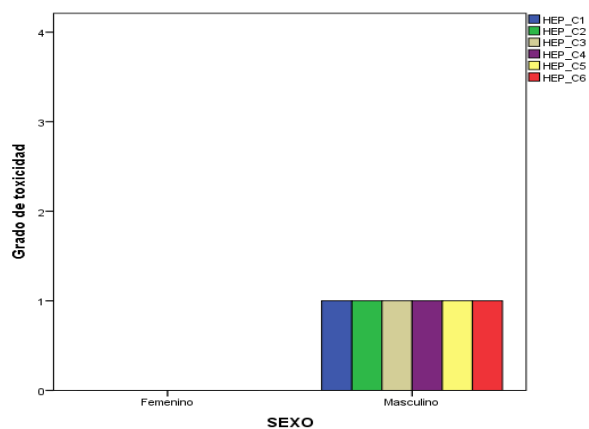
SNP	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3	
	RR (IC95%)	valor de P	RR (IC95%)	valor de P	RR (IC95%)	valor de P
rs8192709	1.071 (0.701-1.637)	1.0	0.944 (0.578-1.541)	1.0	0.577 (0.256-1.300)	0.173
rs3211371	0.891 (0.455-1.745)	0.700	0.578 (0.194-1.716)	0.321	NC	0.227
rs3745274	1.5 (0.985-2.285)	0.045	1.153 (0.790-1.683)	0.452	1.468 (0.907-2.374)	0.100
SNP	Ciclo 4		Ciclo 5		Ciclo 6	
	RR (IC95%)	valor de P	RR (IC95%)	valor de P	RR (IC95%)	valor de P
rs8192709	0.856 (0.456-1.609)	0.707	1.016 (0.499-2.067)	1.0	1.038 (0.361-2.983)	1.0
rs3211371	0.778 (0.284-2.126)	0.619	0.571 (0.113-2.897)	0.570	0.667 (0.129-3.446)	1.0
rs3745274	1.709 (1.008-2.899)	0.026	1.656 (0.877-3.127)	0.092	1.444 (0.648-3.222)	0.347

NC: No calculable

7.3.6 MEDIANAS DE GRADO DE TOXICIDAD HEPÁTICA POR SEXO Y GRUPO DE EDAD

Se realizó el análisis de las medianas de la toxicidad en este sistema durante los 6 ciclos de quimioterapia, encontrando toxicidad en grado 1 (Gráfico 7).

a)



b)

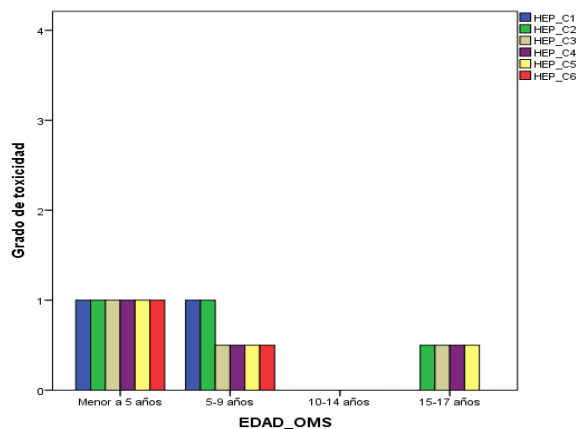


Gráfico 7. Frecuencia de medianas del grado de toxicidad hepática, durante los 6 ciclos de quimioterapia en la población estudiada. a) Categoría de sexo. b) Grupo de edad.

7.3.7 FRECUENCIA DE LA TOXICIDAD RENAL, CARDÍACA, TENSIÓN ARTERIAL, Y NEUROLÓGICA

No se realizó el análisis estadístico de la toxicidad en estos sistemas debido a la falta de datos respecto a pruebas o exámenes que no se realizan de forma rutinaria.

Solo el 58.1% de la población en estudio, hasta ahora ha completado los 6 ciclos de QT, mientras que el resto se encuentra en seguimiento.

7.3.7.1 FRECUENCIA DE TOXICIDAD RENAL

Para el caso de la toxicidad renal solo se pudo analizar la toxicidad para el parámetro creatinina y en todos los pacientes analizados los valores se encontraron en rangos normales. Las proteínas no se pudieron monitorear ya que en cada ciclo solo se realiza una tira reactiva en orina y ninguna nota en el expediente clínico ni en la hoja de enfermería refirió ninguna cruz haciendo referencia a la presencia de proteínas, para el caso de hematuria solo 2 pacientes (3.2%) presentaron toxicidad grado 3 por hematuria (Tabla 16).

Tabla 16. Frecuencia de toxicidad renal en pacientes

Número de pacientes	Creatinina N (%)	Proteinuria N (%)	Hematuria N (%)
62	62 (100)	ND	2 (3.2)
	Grado 0		Grado 3

ND: no determinado

7.3.7.2 FRECUENCIA DE TOXICIDAD CARDÍACA

Respecto a la toxicidad cardíaca, el 6.4% de la población estudiada, presentó un bajo grado de toxicidad por disritmias, mientras que el resto de los parametros no se pudieron analizar debido a que no existe en el expediente clínico el ecocardiograma de cada paciente (Tabla 17).

Tabla 17. Frecuencia de toxicidad cardíaca en pacientes

Numero de pacientes	Disritmias N (%)		Funcion cardíaca N (%)	Isquemia cardíaca N (%)	Pericardio N (%)
	Grado1	Grado 2			
62	Grado1	3 (4.8)	ND	ND	ND
	Grado 2	1 (1.6)			

ND: No determinado

7.3.7.3 FRECUENCIA DE TOXICIDAD EN TENSIÓN ARTERIAL

Para la toxicidad en presión arterial, el 67.7% de la población estudiada presentó algún grado de toxicidad por hipertensión, mientras que solo el 17.4% presento toxicidad minima por hipotensión grado 1 (Tabla 18).

Tabla 18. Frecuencia de toxicidad en tensión arterial en pacientes

Numero de pacientes	Hipertensión N (%)		Hipotensión N (%)	
	Grado 1	Grado 2	Grado 1	Grado 2
62	Grado 1	38 (61.3)	Grado 1	11 (17.4)
	Grado 2	3 (4.8)		
	Grado 3	1 (1.6)		

7.3.7.4 FRECUENCIA DE TOXICIDAD NEUROLÓGICA

La toxicidad observada fue baja; el 12.9% de la población de estudio presentan un bajo grado de toxicidad (grado 1 y 2) para sistema neurosensorial, el 54.8% presento toxicidad para sistema neuromotor (grados 1,2 y 3), el 54.8% neurocortical un solo paciente presento toxicidad en grado 4, el 16.1% neurocerebelar (grado 1 y 2), 16.1 % presento cefalea, el 9.6% presentaron estreñimiento (grado 1 y 3), cinco pacientes presentaron toxicidad grado 1 el 8.1 en audicion y solo dos pacientes 3.2% presentaron toxicidad grado 1 y 3 en visión (Tabla 19).

Tabla 19. Frecuencia de toxicidad neurológica en pacientes

Neurosensorial N (%)		Neuromotor N (%)		Neurocortical N (%)	
Grado 1	5 (8.1)	Grado 1	19 (30.6)	Grado 1	29 (46.8)
Grado 2	3 (4.8)	Grado 2	13 (21.0)	Grado 2	4 (6.4)
		Grado 3	2 (3.2)	Grado 4	1 (1.6)
Neurocerebelar N (%)		Cefalea N (%)		Estreñimiento N (%)	
Grado 1	7 (11.3)	Grado 1	10 (16.1)	Grado 1	3 (4.8)
Grado 2	2 (3.2)	Grado 2	1 (1.6)	Grado 3	3 (4.8)
Grado 3	1 (1.6)	Grado 3	3 (4.8)		
Audición N (%)			Visión N (%)		
Grado 1	5 (8.1)		Grado 1	1 (1.6)	
			Grado 3	1 (1.6)	

7.4 COMPARACIÓN DEL GENOTIPO CON LAS MEDIANAS DE LA CONCENTRACIÓN DE IFOSFAMIDA EN SANGRE

Se analizó la comparación del genotipo con las medianas de la concentración de ifosfamida en sangre a las 12 y 24 horas de término de la última infusión. Para la variante rs8192709 se observa diferencia en la concentración de ifosfamida a las 12 h entre los pacientes con genotipo normal (CC) comparado con los pacientes con genotipo (CT/TT) aunque la p no es significativa con este tamaño de muestra $p = >0.05$. A las 24 h no se observó diferencia entre las medianas de la concentración en ninguno de los genotipos estudiados. Para el rs3211371 y rs3745274 se observan diferencias en las concentraciones a las 12 h y 24 h, aunque la asociación no alcanza a ser significativa $p = >0.05$ con este tamaño de muestra (Tabla 20).

Tabla 20. Comparación del genotipo con las medianas de la concentración de Ifosfamida a las 12 y 24 horas

Polimorfismo		Concentración de Ifosfamida ($\mu\text{Mol/L}$)					
		12 h			24 h		
		N= 62 (%)	Mediana (Q_{25} - Q_{75})	P*	N= 60 (%)	Mediana (Q_{25} - Q_{75})	P*
rs8192709	CC	47 (75.8)	16.0 (6.0-35.0)	0.6	45 (75.0)	1.5 (0.7-4.9)	0.2
	CT/TT	15 (24.2)	16.0 (12.0-34.0)		15 (25.0)	3.0 (1.0-6.0)	
rs3211371	CC	55 (88.7)	16.0 (8.0-34.0)	0.4	53 (88.3)	1.5 (0.8-4.4)	0.2
	CT/TT	7 (11.3)	28.0 (13.0-36.0)		7 (11.7)	4.0 (1.0-11.0)	
rs3745274	GG	29 (46.8)	16.0 (5.0-32.0)	0.5	27 (45.0)	2.0 (0.7-6.0)	0.9
	GT/TT	33 (53.2)	16.0 (10.0-37.5)		33 (55.0)	2.0 (1.0-4.4)	

*Prueba de U de Mann-Whitney

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio, se evaluó la frecuencia alélica en tres variantes de *CYP2B6*; este gen es muy polimórfico y ya se ha estudiado en otras poblaciones para otros fármacos, la frecuencia es variable en diferentes poblaciones, esta variante se ha estudiado en población mexicana residente en EUA encontrando el alelo más frecuente el C para la variante rs8192709 con una frecuencia de 0.9 y de 0.1 para el alelo T, en este estudio las frecuencias encontradas en pacientes con tumores sólidos embrionarios fue similar a la reportada en el HAPMAP, lo mismo ocurrió para la variante rs3748274, la frecuencia genotípica y alélica encontrada fue similar a la ya reportada por el HAPMAP. Sin embargo, para la variante rs3211371, la frecuencia del alelo G fue de 0.68 y para el alelo T fue de 0.32 la frecuencia de este alelo no está registrada en el HAPMAP.

Existen en la actualidad muchos reportes donde han mostrado la contribución de variantes alélicas en genes de metabolismo de fármacos con la presencia de toxicidad o en la respuesta a los tratamientos. Por otra parte, se evaluó la frecuencia de toxicidad (hematológica, gastrointestinal, hepática, neurológica, etc.) en una cohorte de 62 pacientes con tumores sólidos embrionarios, encontrando a la toxicidad hematológica como la más frecuente en grado 3 y 4, tanto en mujeres como en hombres, en los 6 ciclos de quimioterapia. Esto debido a que, tanto los linfocitos como otras células, se producen en la medula ósea donde se localizan las células hematopoyéticas, las cuales tienen una gran capacidad de replicación o renovación por lo que son las más expuestas a su destrucción (mielosupresión). Así, la IFA produce una reducción de células, al actuar sobre la maduración y proliferación de sus células precursoras

³⁸. Se ha reportado que, para población adulta, la toxicidad más frecuente es la neurotoxicidad, manifestada por encefalopatía en el 40% de los pacientes tratados con ifosfamida ^{39, 40, 41}. Así como, la toxicidad urológica la cual se manifiesta como cistitis hemorrágica y nefrotoxicidad, esta condición en la población pediátrica es más vulnerable, la incidencia en otras poblaciones va de 1.4 al 5%^{42, 43}. En esta cohorte de pacientes pediátricos con tumores sólidos embrionarios y sarcomas de alto riesgo,

el comportamiento no fue el reportado. Sin embargo, se ha documentado que el uso de este antineoplásico provoca importante toxicidad a nivel sistémico^{44, 45, 46}.

Se calcularon los RR para conocer si alguna de las variantes alélicas aumentaba el riesgo de presentar toxicidad, como ya se ha reportado para otros fármacos no antineoplásicos ^{15, 47,48}. Sin embargo, sólo para una de las variantes alélicas rs8192709 mostró una asociación estadísticamente significativa para la toxicidad hematológica. Es decir, pacientes con alelo T, en esta variante presentan mayor riesgo de toxicidad hematológica.

Para la toxicidad gastrointestinal se observó que pacientes con el alelo T en la variante alélica rs8192709, presentaron mayor riesgo de presentar toxicidad comparado con los pacientes sin la variante alélica, mientras que pacientes con el alelo T para la variante rs3745274, presentaron menor riesgo de presentar toxicidad gastrointestinal. Mientras que para la toxicidad hepática se observó que pacientes con alelo T de la variante alélica rs3745274, mostraron riesgo de presentar toxicidad de hasta 1.7 veces más, comparado con los pacientes sin la variante alélica.

En esta cohorte de pacientes analizados, no se encontró asociación entre el genotipo y los niveles de IFA en sangre a las 12 y 24 h, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, para la variante rs3211371 se observó un exceso en la concentración de ifosfamida de 12 $\mu\text{Mol/L}$ en pacientes con el alelo T, en contraste con los pacientes con alelo C, los cuales presentaban una menor concentración a las 12 h, la misma tendencia se observó a las 24 h; lo cual podría deberse a que los pacientes con la variante son metabolizadores lentos y acumulan mayor concentración de ifosfamida, lo que los predispone a un mayor riesgo de presentar toxicidad. Brooks y col. en el 2013, observaron pacientes con alelo T, asociados a una baja respuesta a doxorubicina y CFA ⁴⁹.

No todos los resultados obtenidos en este estudio son estadísticamente significativos, debido principalmente al tamaño de muestra, ya que la cohorte total de pacientes es de 114, con el fin de conseguir poder estadístico. Además de la influencia de los diferentes esquemas empleados a cada paciente, ya que algunos pacientes no solo eran tratados con IFA y los laboratorios de rutina no se hicieron en los 6 ciclos de la quimioterapia. Por otro lado, la parte retrospectiva de este estudio

arrojo algunas limitaciones ya que parte los registros en el archivo están limitados en información médica y de laboratorios que en cierta forma son de rutina; es por ello que no se logró evaluar la toxicidad cardíaca, en tensión arterial, la toxicidad renal y neurológica con todos los parámetros que marca la OMS.

9. CONCLUSIONES

La toxicidad más frecuente observada en esta cohorte fue la hematológica, grado 4, tanto en hombres como en mujeres en los 6 ciclos de la quimioterapia. El parámetro más afectado en la toxicidad hematológica fueron los linfocitos hasta grado 4.

Se observó que los pacientes con alelo T para el rs rs8192709 presentaron hasta 1.15 veces mayor riesgo de presentar toxicidad hematológica comparada con los pacientes sin la variante.

Los pacientes con el alelo T para la variante rs8192709 presentaron hasta 1.7 veces mayor riesgo de presentar toxicidad gastrointestinal comparada con los pacientes sin la variante.

Los pacientes con alelo T para la variante alélica rs3745274, presentaron 1.7 veces menos riesgo de presentar toxicidad gastrointestinal.

Por otro lado, pacientes con alelo T para la variante rs3211371 presentaron 12 $\mu\text{Mol/L}$ más de IFA en sangre a las 12 y 24 h, en comparación a los pacientes con alelo C.

A pesar que la toxicidad hepática observada, fue en menor grado; el alelo T de la variante rs3745274 aumenta el riesgo de 1.7 veces de presentar toxicidad en pacientes con este alelo comparado con pacientes sin la variante.

No obstante, aún falta completar el tamaño de la muestra, para así obtener un poder estadístico que avale todos los resultados obtenidos. Si se disminuye la toxicidad al realizar un tamizaje previo a su tratamiento a aquellos pacientes que presenten la variante alélica en el gen *CYP2B6* pueda brindarse un tratamiento alternativo, generando un mejor apego a su QT, mejor respuesta a tratamientos, menor resistencia a los fármacos antineoplásicos y mejor calidad de vida.

10. ANEXOS

ANEXO 1.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PROTOCOLO 068/2013

Sr (a): su hijo tiene un tumor sólido embrionario y está en tratamiento oncológico con ifosfamida, es por ello que lo invitamos a participar en un estudio de investigación **“Toxicidad asociada a variantes alélicas en genes de CYP450 de pacientes pediátricos con tumores sólidos embrionarios tratados con ifosfamida”**.

Por lo que es necesario que usted (su hijo) decida si participará o no en el estudio. Lea cuidadosamente este formato y pregunte al médico del estudio cualquier duda al respecto.

¿Para qué se efectúa este estudio?

Con los hallazgos en este estudio se disminuirá la toxicidad, a partir de realizar un tamizaje de aquellos pacientes que tengan variaciones en su material genético, que causen toxicidad por la administración de ifosfamida y como consecuencia se generará una mayor y mejor calidad de vida de los pacientes a quienes se les proporcionaría un tratamiento alternativo.

¿En qué consiste el estudio?

Es un estudio que se llevara a cabo aquí en este instituto, donde se pretende analizar a 204 pacientes con tumores sólidos embrionarios.

¿Quiénes pueden participar en el estudio?

Se incluirán pacientes del Servicio de Oncología de este instituto con tumores sólidos embrionarios tratados con ifosfamida, edad de 1 a 17 años, cualquier género, cualquier tumor sólido embrionario, la quimioterapia debe incluir ifosfamida en cualquier curso.

¿Quiénes no deben participar en el estudio?

Los pacientes que no podrán entrar a este estudio son aquellos pacientes con transfusión sanguínea previa al estudio, desnutrición de grado III y/o cualquier alteración que pueda afectar la determinación de los niveles de los metabolitos de la ifosfamida.

¿Qué se me pedirá (se le pedirá a su hijo) que haga?

Que nos proporcione **tres** muestras de sangre, una muestra de **3 mL (equivalente a una cucharadita de café)** de sangre periférica para el análisis de su ADN **al momento de la firma del consentimiento** y las otras dos muestras de sangre periférica (3 ml) **a las 12 y 24 hrs después concluir la última infusión con ifosfamida** estas dos muestras se utilizarán para la cuantificación de la ifosfamida, y además que nos responda un cuestionario de toxicidad. El estudio tendrá una duración de 3 años.

¿Quién sufrirá los gastos del estudio?

Este estudio no tiene ningún costo, y su tratamiento así como sus análisis de laboratorio y la atención médica recibida por su padecimiento no será afectada.

¿Qué efectos indeseables pueden pasarme (pasar a su hijo) al participar en el estudio?

Se me comunicó que las tomas de muestra de sangre serán realizadas por personal capacitado y que la punción venosa es de riesgo mínimo de acuerdo al reglamento de la Ley General de Salud (Artículo 17).

¿Qué debo hacer en caso de que tenga (tenga mi hijo) alguna molestia?

Este estudio no le generará efectos indeseables, pero si usted tuviera alguna duda relacionada a este estudio de investigación puede comunicarse a los teléfonos que aparecen al final de este consentimiento.

¿Qué beneficio puedo (mi hijo puede) esperar?

El paciente no tendrá ningún beneficio durante su primer ciclo de tratamiento antineoplásico, sin embargo posterior a este se podrá clasificar como respondedor o no respondedor a tratamiento debido a los genotipos que posea en citocromo P450. De ser no respondedor o en su caso mostrar mayor toxicidad al tratamiento con ifosfamida se le podrá ofrecer otra alternativa para mejorar su pronóstico.

¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?

Al final de este consentimiento están los números telefónicos a los que puede comunicar.

¿Puedo negarme (mi hijo puede negarse) a participar en este estudio y se me puede pedir (pedirle a mi hijo) que abandone el estudio?

Su participación es voluntaria, puede negarse a participar desde un inicio o en el momento en que lo desee sin que esto tenga consecuencia alguna. El medico del estudio puede retirar a usted (a su hijo) del estudio en caso de que se necesite otro tratamiento debido a su enfermedad o que no siga el tratamiento prescrito o que no acuda regularmente a sus citas.

¿Quiénes van tener información de mis datos (de mi hijo)

Sus datos personales solo los conocerán los Investigadores y personal de salud que participe en este estudio de investigación sus datos serán confidenciales y la publicación que se genere no va a incluir su nombre.

¿Qué se va a hacer con las muestras biológicas y los estudios de imágenes (si aplica)

- a) Después del estudio su DNA así como la sangre y plasma **se desecharan** de acuerdo a los procedimientos de desecho de biológico-infeccioso.
- b) La muestra va a ser utilizada exclusivamente para este estudio.
- c) No se compartirá la muestra con otros investigadores.
- d) La muestras se guardarán por 1 año más después de terminado el estudio.
- e) Se identificara la muestra con las primeras 4 letras del nombre del fármaco en estudio y un número consecutivo.
- f) Solo usted puede tener acceso a la información de los estudios de DNA
- g) Si usted desea retirar sus muestras del estudio favor de comunicarse a los teléfonos de abajo y venir por ellas para ser testigo del desecho.
- h) Los resultados del análisis de DNA se mantendrán confidenciales.

¿Puedo conocer los resultados del estudio?

Si así lo desea puede llamar a los números telefónicos proporcionados y se le agendará una cita para que recoja sus resultados.

He leído y entiendo el presente consentimiento. Mis preguntas han sido contestadas y acepto participar (que mi hijo participe) en este estudio.

_____ Nombre del niño	_____ Fecha
_____ Nombre y firma del Padre, o Tutor	_____ Fecha
_____ Nombre y firma de la madre o tutor	_____ Fecha
_____ Nombre y firma de Testigo (Es conveniente que anote su dirección)	_____ Fecha
_____ Relación que tiene con el voluntario	_____ Fecha
_____ Nombre y firma de Testigo (Es conveniente que anote su dirección) Recibí copia de este consentimiento	_____ Fecha
_____ Nombre y firma	_____ Fecha

Contacto con los investigadores principales: Dra. Luz María Torres Espíndola Ext. 1426; celular: **5540156734**, Dra. Rocío Cárdenas Cardos, Dr. Juan Luís Chávez Pacheco. Ext 1426; celular: **5516776305** Dra. Matilde Ruiz García, Presidente del Comité de Ética. Tel. 10840900 Ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos como participante.

ANEXO 2.

CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO. PROTOCOLO 068/2013

“Toxicidad asociada a variantes alélicas en genes de CYP450 de pacientes pediátricos con tumores sólidos embrionarios tratados con ifosfamida”.

Se te invita a participar en un estudio de investigación. Es necesario que decidas si participarás o no en el estudio. Lee cuidadosamente este formato y pregunta al médico del estudio cualquier duda al respecto.

¿Para qué se efectúa este estudio?

Con los hallazgos en este estudio se disminuirá la frecuencia de toxicidad, a partir de realizar un tamizaje de aquellos pacientes que tengan variaciones en su material genético, que causen eventos adversos por la administración de ifosfamida y como consecuencia se generará una mayor y mejor calidad de vida de los pacientes a quienes se les proporcionaría un tratamiento alternativo.

¿En qué consiste el estudio?

Es un estudio que se llevara a cabo aquí en este instituto, donde se pretende analizar a 204 pacientes con tumores sólidos embrionarios y que se están tratando con ifosfamida.

¿Quiénes pueden participar en el estudio?

Se incluirán pacientes de 1 a 17 años, cualquier género, cualquier tumor sólido embrionario, la quimioterapia debe incluir ifosfamida en cualquier curso.

¿Qué se me pedirá que haga?

Que nos proporciones **tres** muestras de sangre, una muestra de **3 mL (equivalente a una cucharadita de café)** de sangre periférica para el análisis de tu ADN **al momento de la firma del consentimiento informado** y otras dos muestras de sangre periférica de 3ml a las 12 y 24 hrs después de **concluir la última infusión de la ifosfamida**, para la cuantificación de los metabolitos y además reposadas un cuestionario de toxicidad. El estudio tendrá una duración de 3 años.

¿Qué efectos indeseables pueden pasarme al participar en el estudio?

Se me comunicó que las tomas de muestra de sangre serán realizadas por personal capacitado y que la punción venosa es de riesgo mínimo de acuerdo al reglamento de la Ley General de Salud (Artículo 17).

¿Qué debo hacer en caso de que tenga alguna molestia?

Este estudio no te generará efectos indeseables, pero si tuvieras alguna duda relacionada a este estudio de investigación pueden comunicarse a los teléfonos que aparecen al final de este consentimiento.

¿Qué beneficio puedo esperar?

El paciente no tendrá ningún beneficio durante su primer ciclo de tratamiento antineoplásico, sin embargo posterior a este se podrá clasificar como respondedor o no respondedor a tratamiento debido a los genotipos que posea en citocromo P450. De ser no respondedor o en su caso mostrar mayor toxicidad al tratamiento con ifosfamida se le podrá ofrecer otra alternativa de tratamiento para mejorar su pronóstico.

¿Puedo negarme a participar en este estudio y se me puede pedir que abandone el estudio? Tu participación es voluntaria, puedes negarte a participar desde un inicio o en el momento en que lo desees sin que esto tenga consecuencia alguna.

¿Quiénes van tener información de mis datos.

Tus datos personales solo los conocerán los Investigadores y personal de salud que participe en este estudio de investigación tus datos serán confidenciales y la publicación que se genere no va a incluir tu nombre.

He leído y entiendo el presente consentimiento. Mis preguntas han sido contestadas y acepto participar en este estudio.

Firmas

Nombre y firma del Participante

Nombre y firma del Padre o Tutor

Nombre y firma de la madre o tutor

Nombre y firma de testigo No 1

Nombre y firma de testigo No 2

Nombre y firma del investigador responsable

Fecha

ANEXO 3. CUESTIONARIO DE TOXICIDAD ASOCIADA AL TRATAMIENTO CON IFOSFAMIDA, (6 CICLOS)

FOLIO _____	No. EXP. _____
DIAGNÓSTICO _____	
NOMBRE DEL PACIENTE: _____	
TELÉFONO _____	
DIRECCIÓN DEL PACIENTE: _____	
FECHA INGRESO: _____	FECHA DE EGRESO: _____
FECHA DE REINGRESO _____	MOTIVO DE REINGRESO: _____

1.- Caducidad: _____, 2.- Vía de administración _____, 3.- Dosis calculada de ifosfamida: _____ mg/ m²/día. 4.- Dosis calculada de Ifosfamida: _____ mg/ 5.- Dosis total de Ifosfamida: _____ mg/día.

CICLO	1	2	3
6.- FECHA DE TRATAMIENTO	INICIO ____/____/____ FINAL ____/____/____	INICIO ____/____/____ FINAL ____/____/____	INICIO ____/____/____ FINAL ____/____/____
7.- ¿PRESENTÓ ALGÚN EVENTO ADVERSO?	1 <input type="checkbox"/> SI 2 <input type="checkbox"/> NO	1 <input type="checkbox"/> SI 2 <input type="checkbox"/> NO	1 <input type="checkbox"/> SI 2 <input type="checkbox"/> NO
8. ¿CUAL DE ESTOS EVENTOS PRESENTO USTED?	1 <input type="checkbox"/> Vomito (1) (2-5) (6-10) (>10) 2 <input type="checkbox"/> Diarrea (2-3) (4-6) (7-9) (>10) 3 <input type="checkbox"/> Náuseas(come) (disminución (ingiere) (No come) 4 <input type="checkbox"/> Estomatitis (ulcera) (dolor y come) (dolor y no come) (soporte parenteral) 5 <input type="checkbox"/> Neurosensorial (parestesias) (parestesias moderadas) (perdida sensorial grave) 6 <input type="checkbox"/> Neuromotor (debilidad) (leve debilidad) (deterioro función) (parálisis) 7 <input type="checkbox"/> Neurocortical (leve somnolencia) (moderada) (alucinaciones) (coma, convulsiones) 8 <input type="checkbox"/> Neurocerebelar (incoordinación) (temblor) (ataxia) (necrosis) 9 <input type="checkbox"/> Cefalea (leve) (moderada) (TX) 10 <input type="checkbox"/> Estreñimiento (leve) (moderado) (grave) (íleo) 11 <input type="checkbox"/> Audición (perdida asintomática) (tinnitus) (función) (sordera) 12 <input type="checkbox"/> Visión (pérdida subtotal 3) (ceguera 4) 13 <input type="checkbox"/> OTROS _____	1 <input type="checkbox"/> Vomito (1) (2-5) (6-10) (>10) 2 <input type="checkbox"/> Diarrea (2-3) (4-6) (7-9) (>10) 3 <input type="checkbox"/> Náuseas(come) (disminución (ingiere) (No come) 4 <input type="checkbox"/> Estomatitis (ulcera) (dolor y come) (dolor y no come) (soporte parenteral) 5 <input type="checkbox"/> Neurosensorial (parestesias) (parestesias moderadas) (perdida sensorial grave) 6 <input type="checkbox"/> Neuromotor (debilidad) (leve debilidad) (deterioro función) (parálisis) 7 <input type="checkbox"/> Neurocortical (leve somnolencia) (moderada) (alucinaciones) (coma, convulsiones) 8 <input type="checkbox"/> Neurocerebelar (incoordinación) (temblor) (ataxia) (necrosis) 9 <input type="checkbox"/> Cefalea (leve) (moderada) (TX) 10 <input type="checkbox"/> Estreñimiento (leve) (moderado) (grave) (íleo) 11 <input type="checkbox"/> Audición (perdida asintomática) (tinnitus) (función) (sordera) 12 <input type="checkbox"/> Visión (perdida subtotal 3) (ceguera 4) 13 <input type="checkbox"/> OTROS _____	1 <input type="checkbox"/> Vomito (1) (2-5) (6-10) (>10) 2 <input type="checkbox"/> Diarrea (2-3) (4-6) (7-9) (>10) 3 <input type="checkbox"/> Náuseas(come) (disminución (ingiere) (No come) 4 <input type="checkbox"/> Estomatitis (ulcera) (dolor y come) (dolor y no come) (soporte parenteral) 5 <input type="checkbox"/> Neurosensorial (parestesias) (parestesias moderadas) (perdida sensorial grave) 6 <input type="checkbox"/> Neuromotor (debilidad) (leve debilidad) (deterioro función) (parálisis) 7 <input type="checkbox"/> Neurocortical (leve somnolencia) (moderada) (alucinaciones) (coma, convulsiones) 8 <input type="checkbox"/> Neurocerebelar (incoordinación) (temblor) (ataxia) (necrosis) 9 <input type="checkbox"/> cefalea (leve) (moderada) (TX) 10 <input type="checkbox"/> Estreñimiento (leve) (moderado) (grave) (íleo) 11 <input type="checkbox"/> Audición (perdida asintomática) (tinnitus) (funcion) (sordera) 12 <input type="checkbox"/> visión (perdida subtotal 3) (ceguera 4) 13 <input type="checkbox"/> OTROS _____
11.-¿QUÉ FARMACO LE RECETO?			

12.- ¿POR CUÁNTO TIEMPO TOMO EL FÁRMACO?	___ ___ Días	___ ___ Días	___ ___ Días
13.- ¿HUBO RESPUESTA AL TRATAMIENT O ONCOLÓGIC O?	1 <input type="checkbox"/> SI 2 <input type="checkbox"/> NO	1 <input type="checkbox"/> SI 2 <input type="checkbox"/> NO	1 <input type="checkbox"/> SI 2 <input type="checkbox"/> NO
14.- ¿CÓMO FUE LA RESPUESTA ?	1 <input type="checkbox"/> Completa 2 <input type="checkbox"/> Parcial 3 <input type="checkbox"/> Progresión 4 <input type="checkbox"/> Estable 5 <input type="checkbox"/> Otro	1 <input type="checkbox"/> Completa 2 <input type="checkbox"/> Parcial 3 <input type="checkbox"/> Progresión 4 <input type="checkbox"/> Estable 5 <input type="checkbox"/> Otro	1 <input type="checkbox"/> Completa 2 <input type="checkbox"/> Parcial 3 <input type="checkbox"/> Progresión 4 <input type="checkbox"/> Estable 5 <input type="checkbox"/> Otro
15. RESPUESTA FINAL	1 <input type="checkbox"/> Completa 2 <input type="checkbox"/> Parcial 3 <input type="checkbox"/> Progresión 4 <input type="checkbox"/> Estable 5 <input type="checkbox"/> Otro	1 <input type="checkbox"/> Completa 2 <input type="checkbox"/> Parcial 3 <input type="checkbox"/> Progresión 4 <input type="checkbox"/> Estable 5 <input type="checkbox"/> Otro	1 <input type="checkbox"/> Completa 2 <input type="checkbox"/> Parcial 3 <input type="checkbox"/> Progresión 4 <input type="checkbox"/> Estable 5 <input type="checkbox"/> Otro

11. REFERENCIAS

- ¹ Cancer Research UK. *Cancer*, 2016. Consultado el 10 de marzo de 2016. Obtenido de <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer>.
- ² Navajasa, A., & Peri, R. (2007). *Tumores de la infancia: consideraciones epidemiológicas y terapéuticas*. *JANO*, 29-37.
- ³ Secretaria de Salud. (2011). *Perfil Epidemiológico del Cáncer en Niños y Adolescentes en México*. Ciudad de México, México.
- ⁴ Rivera Luna, R. & al. (2015). El niño de población abierta con cáncer en México. Consideraciones epidemiológicas. *Medigraphic*, 91-97.
- ⁵ Secretaria de Salud. (2015). *Panorama Epidemiológico y Estadístico de la Mortalidad en México 2011*. Ciudad de México, México.
- ⁶ Instituto Nacional de Pediatría. (2014). *Agenda Estadística*. Ciudad de México
- ⁷ González, G. (2010). Tumores sólidos en niños: diagnóstico y terapéutica quirúrgica. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 120-129.
- ⁸ Rivera, R. (2010). *Protocolos Técnicos para el Cáncer en Niños*. México: Consejo Nacional para la Prevención y el Tratamiento del Cáncer en la Infancia y la Adolescencia.
- ⁹ DeVita, V. (2000). *Principios del tratamiento del cáncer: Quimioterapia*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- ¹⁰ López, E., & al. (2011). Ifosfamide neurotoxicity. Case report and literature review. *GAMO*, 55-58.
- ¹¹ Kerbusch, T., & al. (2001). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ifosfamide and its Metabolites. *Drug Disposition*, 41-62.
- ¹² Kerbusch, T., & al. (2000). Evaluation of the autoinduction of ifosfamide metabolism by a population pharmacokinetic approach using NONMEM. *Science Ltd*, 555-561.
- ¹³ Mulder, R., & al. (2010). Ciclofosfamida versus Ifosfamida para niños y Adultos jóvenes con Sarcoma de Tejidos Blandos y Óseo. *Biblioteca Cochrane Plus*.
- ¹⁴ Vredenburg, G., & al, e. (2015). Activation of the anticancer drugs cyclophosphamide and ifosfamide by cytochrome P450 BM3 mutants. *Elsevier*, 182-192.
- ¹⁵ Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. (2012) *Pediamécum*. Ifosfamida. Consultado el 10 marzo de 2016. Obtenido de <http://www.pediamecum.es>.
- ¹⁶ Goodman, & Gilman. (2006). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11a ed. McGraw-Hill.

-
- ¹⁷ Shimada, T., & al, e. (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*, 414-423.
- ¹⁸ Galli, E., & Feijoo, L. (2002). Citocromo P-450 y su importancia clínica. *Revista de Neuro-Psiquiatría*, 187-201.
- ¹⁹ NCBI. *NCBI Map Viewer*. Consultado el 14 de marzo de 2016. Obtenido de [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=19&query=uid\(-2121938285,-1071465993,-1071465992,-1071465991,-1071465989,-1071465987,-1071465985,1071465983\)&QSTR=1555%5Bgene_id%5D&maps=gene_set&cmd=focus](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=19&query=uid(-2121938285,-1071465993,-1071465992,-1071465991,-1071465989,-1071465987,-1071465985,1071465983)&QSTR=1555%5Bgene_id%5D&maps=gene_set&cmd=focus).
- ²⁰ Zhang, W., & al, e. (2003). Drug metab. En *Interaction of buprenorphine and its metabolite norbuprenorphine with cytochromes p450 in Vitro*, 768-772.
- ²¹ Chang, T., & al, e. (1993). Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res*, 5629-37.
- ²² Jinno, H., & al, e. (2003). Funtional characterization of cytochrome P450 2B6 allelic variants . *Drug Metabolism and disposition*, 398-403.
- ²³ Lang, T., & al., e. (2001). Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics*, 399-415.
- ²⁴ Brooks, J., & al.(2013). Common variants in genes coding for chemotherapy metabolizing enzymes, transporters, and targets: a case–control study of contralateral breast cancer risk in the WECARE Study. *Cancer Causes Control*, 1605-1614.
- ²⁵ Bray, J., & al, e. (2010). Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *British Journal of Cancer*, 1003-1009.
- ²⁶ Ekhart, C., & al, e. (2008). Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes (GST, CYP2B6 and CYP3A) affect the pharmacokinetics of thiotepa and tepa. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 50-60.
- ²⁷ Thorn, C. F., & al., e. (2010). PharmGKB summary: Very important pharmacogene information for CYP2B6. *Pharmacogenet Genomics*, 520-523.
- ²⁸ Haas, D. W., & al., e. (2004). Pharmacogenetics of efavirenz and central nervous system side effects: an Adult AIDS Clinical Trials Group study. 2391.2400.
- ²⁹ Ribaudó, H., & al, e. (2010). Effect of CYP2B6, ABCB1, and CYP3A5 Polymorphisms on Efavirenz Pharmacokinetics and Treatment Response: An AIDS Clinical Trials Group Study . *J Infect Dis*, 717-722.

-
- ³⁰ Manase HR Thompson KK. (2005). Medication safety : a guide for health care facilities American Society of Health-System Pharmacists. *Bethesda MD*, 380.
- ³¹ González, G. (2010). Tumores sólidos en niños: diagnóstico y terapéutica quirúrgica. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 120-129.
- ³² Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. (2012) *Pediamécum*. Ifosfamida. Consultado el 10 marzo de 2016. Obtenido de <http://www.pediamecum.es>.
- ³³ Clark, M. A. et al. (2012). Farmacología. 5ª ed. Barcelona: Wolters Kluwer Health
- ³⁴ Ames, B., & al, e. (2010). Ifosfamide-induced encephalopathy and movement disorder. *Pediatr Blood Cancer*, 624-626.
- ³⁵ López Aguilar, E., & al. (2011). Neurotoxicidad por Ifosfamida. Informe de un caso y revisión bibliográfica. *GAMO*.
- ³⁶ QUIAGEN. (10 de marzo de 2016). *QIAamp DNA Mini Kit*. Obtenido de QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit : <https://www.qiagen.com/mx/shop/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/qiaamp-dna-mini-kit>.
- ³⁷ BioTek . (10 de marzo de 2016). *BioTek Instruments*. Obtenido de http://www.biotek.es/es/products/microplate_detection/epoch_microplate_spectrophotometer.html?tab=accessories.
- ³⁸ Fundación para la Excelencia y la Calidad de la Oncología. (2014). Efectos Secundarios de la Quimioterapia. *ECO*, 1-66.
- ³⁹ Sukasem, C., & al, e. (2012). Pharmacogenetic markers of CYP2B6 associated with favirenz plasma concentrations in HIV-1 infected Thai adults. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1005-1012.
- ⁴⁰ Suarez-Kurtz, G., & al., e. (2012). Pharmacogenomic Diversity Among Brazilians: Influence of Ancestry, Self-Reported Color, and Geographical Origin. En J. A. Agúndez, *Functional Polymorphisms of Xenobiotics Metabolizing Enzymes (XME)*, *Frontiers in Pharmacology*, 114-119.
- ⁴¹ Haroun, F., & al., e. (2015). Effects of CYP2B6 genetic polymorphisms in patients receiving cyclophosphamide combination chemotherapy for breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 207-214.
- ⁴² Loebstein R, Koren G. (1998). Ifosfamide-induced nephrotoxicity in children: critical review of predictive risk factors. *Pediatrics* 101: E8.
- ⁴³ Skinner R, Sharkey IM, Pearson ADJ, et al. (1993) Ifosfamide, mesna, and nephrotoxicity in children. *J Clin Oncol*; 11: 173-190.

-
- ⁴⁴ Davies, S., Pearson, A., Craft A. (1989). Toxicity of high-dose ifosfamide in children. *Cancer Chemother Pharmacol* (24 (Suppl): S 8- S 10.
- ⁴⁵ Antman K, Elias A, Ryan L. (1990). Ifosfamide and mesna: response and toxicity at standard- and high-dose schedules. *Semin Oncol. Apr*;17(2 Suppl 4):68-73.
- ⁴⁶ Goorin, A., et al. (2002). Phase II/III Trial of Etoposide and High-Dose Ifosfamide in Newly Diagnosed Metastatic Osteosarcoma: A Pediatric Oncology Group Trial. *Journal Clinical Oncology*. 426-433
- ⁴⁷ Manase HR Thompson KK. (2005). Medication safety : a guide for health care facilities American Society of Health-System Pharmacists. *Bethesda MD*, 380.
- ⁴⁸ González, G. (2010). Tumores sólidos en niños: diagnóstico y terapéutica quirúrgica. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 120-129.
- ⁴⁹ Brooks, J., & al, e. (2013). Common variants in genes coding for chemotherapy metabolizing enzymes, transporters, and targets: a case–control study of contralateral breast cancer risk in the WECARE Study. *Cancer Causes Control*, 1605-1614.