



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN.

**Toxicidad asociada a variantes alélicas en el gen *CYP2C9* en
pacientes pediátricos mexicanos con tumores sólidos tratados
con Ifosfamida.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A

ORTEGA AMBROCIO JANET

TUTOR DE TESIS:

DR. CHÁVEZ PACHECO JUAN LUIS

CO-TUTORA DE TESIS:

DRA. TORRES ESPÍNDOLA LUZ MARÍA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Instituto
Nacional
de Pediatría

Proyecto desarrollado en:

Instituto Nacional de Pediatría (INP)

Laboratorio de Farmacología

Agosto 2016- Febrero 2017

Este proyecto fue financiado por CONACYT, en la convocatoria FOSSIS

CONACYT S0008-2015-2-262406

*“Amor y respeto al pueblo que me vio
nacer: México; pero honor y gloria al
pueblo que me forjó: la UNAM”*

Israel López

Dedicatoria.

A la memoria de mi padrino y Profesor Raúl Hernández Vega:

Porque gracias a su guía y apoyo he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida, fruto de su inmensa generosidad, cariño y confianza que en mí depósito. Porque fue parte fundamental en mi formación profesional y por ser mi inspiración para superarme día con día

Siempre he creído que desde el día que ya no pudo estar conmigo físicamente es porque se convirtió en la estrella más brillante del firmamento, en un eterno resplandor que ilumina mi vida y regresa la fe a mi corazón. Lo quiero mucho y este triunfo es para usted.

A mi mamá, María Z. Ambrocio Ventura:

Mami, es usted la bendición más grande en mi vida, gracias por amarme tanto y por estar siempre a mi lado, por todos los sacrificios que he implicado, por levantarme cuando he tropezado, por ser mi mejor amiga y por absolutamente todo lo que ha hecho por mi mamita. La amo.

A mi papá, Jorge Ortega Cruz:

Papí, gracias por su inmenso amor, por saber ser un excelente padre, por conducirme por el camino de rectitud y humildad, gracias por todos sus esfuerzos para que yo siempre saliera adelante, por darme fuerzas cuando creí que no lo lograría, gracias por su cariño, es usted el mejor del mundo. Lo amo.

A mi hermana, Sandra Lizbeth Ortega Ambrocio:

Baby, gracias por darme ánimo siempre, por escucharme y por darme grandes lecciones de vida, por ser siempre tan fuerte y por estar siempre para mí. Gracias por todo tu cariño, por tu ternura y porque espero esto sea para ti motivo para seguir con tus estudios y triunfar como siempre lo has hecho. Te amo.

A mi madrina, Marta Ambrocio Ventura:

Por ser como una segunda madre para mi hermana y para mí, gracias por su apoyo y por todo su cariño, es una gran mujer, la quiero mucho y yo sé que algún día volverá a estar junto al amor de su vida, mi padrino. GRACIAS POR TODO.

*A mis abuelitos, especialmente a mi abuelita **Lupita**:*

Porque a pesar de que fue muy poco el tiempo en el que conviví con usted, aún recuerdo sus besos y sus abrazos, gracias por querernos tanto a mi hermana y a mí, espero que donde quiera que esté, se sienta muy orgullosa abuelita. La amo.

A mis padrinos, Amalia Ambrocio y Adán García:

Por cuidar de mí cuando era pequeña, por sus consejos y por demostrarme su apoyo siempre que lo necesitaba, los quiero mucho.

A mis padrinos, Alicia Ambrocio y Ángel Jurado:

Por demostrarnos a mi hermana y a mí, su cariño en forma de abrazos y bromas, gracias por habernos apoyado en todos los aspectos cuando realmente lo necesitamos, los quiero mucho, de todo corazón, GRACIAS.

A mis padrinos, Gloria Ambrocio y Víctor Gonzáles:

Porque la distancia no ha sido un problema para recibir sus consejos y sobre todo su apoyo incondicional, gracias por siempre estar al pendiente de nosotros, los quiero.

A mis tíos, María Ambrocio y Pablo Rodríguez:

Por todos los momentos de alegría que he pasado a su lado, gracias por todo el apoyo que nos brindaron cuando eran momentos difíciles para nosotros, y sobre todo por sus atenciones, en verdad, GRACIAS.

A mis tíos, Rosaura Ambrocio e Ignacio Vázquez:

Por su apoyo, sus consejos y sobre todo por los momentos tan divertidos que nos hacen pasar en familia, los quiero.

A todos mis primos:

Simplemente por eso, por ser parte de mi familia y por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos. Sigán con sus éxitos que bien merecidos los tienen. Los quiero.

A mis amigas de la secundaria Dani, Karen Abigail y Martha, en verdad que las quiero con todo mi corazón, son ya casi once años de conocernos y a pesar de que nuestras vidas han tomado distintas direcciones, siempre estamos al pendiente la una de la otra. Las amo.

A mis amigos del CCH- Azcapotzalco Lupita, Sandi, Fanny, Lina, Janet, Elisa, Cindel, Nallely, Mercedes, Valeria, Adriana, Brenda, Karla, Alejandro y Thomas, por todas las locuras que hemos compartido juntos, las cuales recuerdo y me hacen sonreír, gracias por todos los bonitos momentos, que siempre llevaré conmigo, pero sobre todo gracias por confiar en mí. LOS QUIERO.

A mis grandes amigos de la Universidad:

Mariana, Areli, Lucy, Gaby, Andrea, Chavi, Sarahi, Diana, Marissa, Citlalli, Perlita, Eva, Chío, Laura, Nicolás, Salvador, Oscar, Víctor y Daniel, gracias por los buenos y malos momentos que hemos pasado juntos, porque de alguna u otra forma he aprendido algo de cada uno de ustedes, gracias por todos esos goyas que hemos gritado al unisono, gracias por confiar en mí y por permitirme confiar en ustedes. GRACIAS POR SER MIS AMIGOS, LOS QUIERO MUCHO.

A mis amigos de toda la vida, Mariana y Nicolás, porque hemos crecido juntos en muchos aspectos, por demostrarme que la verdadera amistad existe... una amistad incondicional, sé que llegarán muy lejos, gracias por todos y cada uno de los momentos que pasamos juntos. LOS QUIERO AMIGOS.

A mi gran amiga Areli, porque eres un ejemplo de superación y dedicación, porque siempre me has apoyado y me has mostrado la linda persona que eres, gracias por todos los momentos que he vivido a tu lado. TE QUIERO AMIGA.

A mi amigo Oscar, porque con él es imposible tener un momento de tristeza, gracias por tu alegría, por todos tus consejos y por estar siempre para mí, y sobre todo gracias por haber pensado en mí cuando viste aquella publicación sobre este proyecto. TE QUIERO AMIGO.

A mi amigo Salvador, porque a tu lado he conocido países sin siquiera haber viajado, porque he comprendido que la verdadera amistad perdura a pesar de la distancia, gracias por estar ahí y seguir a mi lado, gracias por entenderme y apoyarme. TE QUIERO AMIGO.

*A toda la generación 05 de Bioquímica Diagnóstica de la FES Cuautitlán.
GRACIAS.*

Agradecimientos.

Quiero expresar un profundo agradecimiento a **Dios** por ser infinitamente generoso conmigo, por escucharme y darme fuerza y serenidad en aquellos momentos tan difíciles que pase durante la carrera. Gracias por permitirme concluir esta etapa de mi vida.

A la **Dra. Luz María Torres Espíndola**, por haberme dado la oportunidad de superarme profesionalmente, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y darme su confianza sin siquiera conocerme. Gracias por brindarme su apoyo, sus consejos y sobre todo gracias por todos los conocimientos que adquirí a su lado. Que Dios la bendiga siempre.

Al **Dr. Juan Luis Chávez Pacheco** por brindarme su confianza y permitirme desempeñarme como profesionista. Gracias por sus consejos y apoyo.

Al **Dr. Manuel Castillejos** por haberme apoyado con el análisis estadístico de este trabajo, por los consejos y por las clases que fueron de gran ayuda para comprender el maravilloso mundo de la estadística.

A la **Dra. Janett Flores y la Química Carmen Flores** por sus consejos, apoyo y por sus palabras de superación.

A las personas que conocí en el Laboratorio de Farmacología del INP y en quienes encontré apoyo y amistad: **Abigail, Paulina, Adriana, Claudia, Grecia, Antonio, Alberto y especialmente a Daniela** por su ayuda, paciencia y cariño. Sé que llegaran muy lejos y créanme que se han vuelto un motivo de inspiración para seguir creciendo profesionalmente.

Al **Químico Shomar** del Hospital General de Zona IMSS 57 por haberme adentrado en el mágico mundo de la Microbiología, por su paciencia, su apoyo y todos los momentos agradables que compartimos, pero sobre todo por sus consejos y por haber creído siempre en mí, lo estimo mucho.

A mis sinodales, los profesores: **Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, QFB. Rosalba Bonilla Sánchez, M. en C. Maritere Domínguez Rojas y QFB. Gabriel Lima Villeda;** por sus consejos y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y cuyos puntos de vista ayudaron a mejorarlo.

A todos mis profesores por compartirme sus conocimientos y dejar huella en mi formación académica y personal.

A mi *alma mater* la Universidad Nacional Autónoma de México- FES Cuautitlán por darme el privilegio de pertenecer a ella, cuna de gran aprendizaje académico y de vida.

A **TODOS GRACIAS DE TODO CORAZÓN**, No me queda más que decir:

**¡¡¡ México, Pumas, Universidad!!! ¡Goya! ¡Goya! ¡Cachun, Cachun, Ra, Ra!
¡Cachun, Cachun, Ra, Ra! ¡Goya! ¡UNIVERSIDAD!**

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	12
ÍNDICE DE TABLAS.....	13
ABREVIATURAS.....	14
RESUMEN	15
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1 Definición de Tumores Sólidos	16
1.2 Epidemiología del Cáncer infantil	16
1.2.1 Cáncer Infantil a Nivel Mundial.....	16
1.2.2 Cáncer Infantil en México.....	17
1.2.2.1 Incidencia de Tumores Sólidos en el INP.....	18
1.3 Tratamiento de los Tumores Sólidos en edad pediátrica	19
1.3.1 Quimioterapia en el Tratamiento de Tumores Sólidos.....	19
1.3.1.1 Fármacos Antineoplásicos.....	19
1.4 Ifosfamida	21
1.4.1 Propiedades de la Ifosfamida	21
1.4.2 Metabolismo y Farmacocinética de la Ifosfamida.....	21
1.4.3 Mecanismo de acción de la Ifosfamida.....	23
1.4.4 Farmacogenética de la Ifosfamida.....	24
1.5 Familia Citocromo P450	24
1.6 Biología molecular del Gen <i>CYP2C9</i>	25
1.6.1 Variantes Alélicas del Gen <i>CYP2C9</i>	26
1.6.1.1 Variante Alélica <i>CYP2C9</i> *2 (rs 1799853).....	27
1.6.1.2 Variante Alélica <i>CYP2C9</i> *3 (rs 1057910).....	28

1.6.1.2 Implicaciones Clínicas de las Variantes Alélicas.....	30
1.7 Toxicidad asociada a la Ifosfamida.....	31
2. HIPÓTESIS	33
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo General	33
3.2 Objetivos Específicos	33
4. JUSTIFICACIÓN	34
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	34
5.1 Población de estudio	35
5.1.1 Reclutamiento de la Cohorte.....	35
5.2. Clasificación de los Criterios de Elección	36
5.2.1 Criterios de Inclusión	36
5.2.2 Criterios de Exclusión.....	36
5.2.3 Criterios de Eliminación.....	36
5.3 Descripción de Variables Operacionales	38
6. METODOLOGÍA.....	40
6.1 Estrategia experimental.....	40
6.2 Toma de muestra	40
6.3 Procesamiento de muestras biológicas	41
6.3.1 Lisis de Células Sanguíneas	41
6.3.2 Extracción y Purificación de DNA.....	42
6.4 Cuantificación de DNA	43
6.5 Genotipificación mediante el Ensayo de Discriminación Alélica.....	44
6.6 Monitoreo de la Concentración de Ifosfamida	46

6.6.1 Condiciones Cromatográficas.....	46
6.6.2 Condiciones Espectrométricas.....	47
6.6.3 Elaboración de estándares y Controles.....	47
6.6.4 Procesamiento de las muestras (extracción).....	48
6.7 Evaluación de Toxicidad y Respuesta a Tratamiento.....	48
6.7.1 Grado de Toxicidad.....	48
6.7.2 Respuesta a Tratamiento.....	49
6.8 Análisis Estadístico.....	49
7. RESULTADOS	51
7.1 Características de la población estudiada.....	51
7.2 Frecuencias génicas en la población estudiada.....	54
7.3 Toxicidad en pacientes con tumores sólidos.....	55
7.3.1 Frecuencia de la toxicidad hematológica.....	55
7.3.1.1 Medianas de toxicidad hematológica por sexo y edad.....	57
7.3.2 Frecuencia de la toxicidad gastrointestinal.....	58
7.3.2.1 Medianas de toxicidad gastrointestinal por sexo y edad.....	60
7.3.3 Frecuencia de la toxicidad hepática.....	61
7.3.3.1 Medianas de toxicidad hepática por sexo y edad.....	63
7.3.4 Frecuencia de la toxicidad neurológica.....	64
7.4 Comparación del genotipo con los niveles de Ifosfamida en sangre.....	66
7.5 Frecuencia de la Respuesta a Tratamiento.....	67
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	69
9. CONCLUSIÓN	72

10. ANEXOS	73
11. REFERENCIAS.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales causas de defunción por 100.000 habitantes, 1980-2011 ...	16
Figura 2. Estructura química de la Ifosfamida	21
Figura 3. Metabolismo de la Ifosfamida.....	22
Figura 4. Enzimas de <i>CYP450</i>	25
Figura 5. Localización cromosómica del Gen <i>CYP2C9</i>	26
Figura 6. Localización de las variantes alélicas <i>CYP2C9*2</i> y <i>CYP2C9*3</i>	28
Figura 7. Estructura cristalina de la proteína <i>CYP2C9</i>	29
Figura 8. Condiciones de amplificación de la PCR	45

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfico 1.Comparación de medianas de edad entre las categorías de sexo	51
Gráfico 2.Frecuencia de Diagnóstico en población estudiada según el grupo de edad	52
Gráfico 3.Frecuencia de medianas del grado de toxicidad hematológica durante los seis ciclos de quimioterapia en la cohorte de estudio	57
Gráfico 4.Frecuencia de medianas del grado de toxicidad gastrointestinal durante los seis ciclos de quimioterapia en la cohorte de estudio	60
Gráfico 5. Frecuencia de medianas del grado de toxicidad hepática durante los seis ciclos de quimioterapia en la cohorte de estudio.	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de Tumores Sólidos en el INP, 2014	18
Tabla 2. Fármacos antineoplásicos más comunes	20
Tabla 3. Farmacocinética de la Ifosfamida	23
Tabla 4. Descripción de Variantes Alélicas descritas para el Gen <i>CYP2C9</i>	27
Tabla 5. Toxicidad asociada a IFM.....	32
Tabla 6. Definición de Variantes Operacionales	38
Tabla 7. Mezcla de Reacción para la Genotipificación	45
Tabla 8. Frecuencia de los TMS encontrados en la población de estudio	52
Tabla 9. Ciclos con Quimioterapia en la Cohorte al final del estudio.....	53
Tabla 10. Antecedentes familiares de enfermedades crónico degenerativas	53
Tabla 11. Frecuencia Genotípica y distribución alélica en <i>CYP2C9</i>	54
Tabla 12. Frecuencia de toxicidad Hematológica registrada durante los seis ciclos de quimioterapia en la cohorte de pacientes	55
Tabla 13. Riesgo Relativo de la toxicidad hematológica en pacientes con la variante con la variante rs1799853 o rs1057910 y en pacientes sin la variante ...	56
Tabla 14. Frecuencia de toxicidad gastrointestinal registrada durante los seis ciclos de quimioterapia en la cohorte de pacientes	58
Tabla 15. Riesgo Relativo de toxicidad gastrointestinal en pacientes con la variante alélica rs1799853 o rs1057910 y en pacientes sin la variante	59
Tabla 16. Frecuencia de toxicidad hepática registrada durante los seis ciclos de quimioterapia en la cohorte de pacientes	61
Tabla 17. Riesgo Relativo de toxicidad hepática en pacientes con la variante alélica rs1799853 o rs1057910 y en pacientes sin la variante	62
Tabla 18. Frecuencia de toxicidad neurológica registrada durante los seis ciclos de quimioterapia en la cohorte de pacientes	64
Tabla 19. Frecuencia de la Toxicidad neurológica (por cada sistema) en la cohorte de pacientes	65
Tabla 20. Comparación del Genotipo con la medianas de la concentración de Ifosfamida a las 12 y 24 horas.....	66
Tabla 21. Frecuencia de la Respuesta a Tratamiento en la cohorte	67
Tabla 22. Riesgo Relativo de la Respuesta a Tratamiento en pacientes con la variante alélica rs1799853 o rs1057910 y pacientes sin la variante.....	68

ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µmol	Micromol
µl	Microlitros
°C	Grado Celcius
ACOs	Anticoagulantes
AINE´s	Antiinflamatorio no esteroideo
Arg	Arginina
CeNSIA	Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia
CFM	Ciclofosfamida
CYP 450	Citocromo P 450
Cys	Cisteína
DNA	Desoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribunucleico)
Hrs.	Horas
IFM	Ifosfamida
Ile	Isoleucina
INP	Instituto Nacional de Pediatría
IV	Vía Intravenosa
LC-MS	Cromatografía de líquidos acoplado a espectrómetro de masas
Leu	Leucina
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
Min.	Minutos
mm	Milímetros
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)
nm	Nanometros
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
rpm	Revoluciones por minuto
SNP	Polimorfismo de un solo Nucleótido
TMS	Tumores Sólidos
UPLC	Cromatografía líquida de ultra-alto desempeño
UV-Vis	Ultravioleta- visible
Vs	Versus

RESUMEN

La ifosfamida (IFM) es uno de los principales fármacos empleados en la quimioterapia con éxito terapéutico para tratar tumores sólidos (TMS), sin embargo a pesar de su alta eficacia en el tratamiento, también ocasiona una importante toxicidad a nivel sistémico, esto debido a que cada individuo reacciona de distinta forma, entre otros factores, gracias a la acción de enzimas metabolizadoras de fármacos antineoplásicos pertenecientes a la familia de los citocromos P450 (CYP 450). La presencia de polimorfismos genéticos en estas enzimas puede afectar la expresión, el nivel de actividad y/o la función de dichas enzimas; lo que conlleva a un incremento en la toxicidad y una mala respuesta al tratamiento. Por lo que este trabajo tiene como objetivo, determinar si las variantes alélicas rs1799853 y rs1057910 en el gen *CYP2C9* incrementan el riesgo de desarrollar toxicidad en pacientes pediátricos con tumores sólidos tratados con ifosfamida, por medio del ensayo de discriminación alélica.

Se captaron 90 de pacientes diagnosticados con algún tipo de TMS tratado con IFM; posteriormente se obtuvo el DNA genómico para su genotipificación, mediante la técnica de discriminación alélica por sondas TaqMan®. Además, se tomaron dos muestras capilares de cada paciente, una a las 12 y otra a las 24 Hrs de la última infusión de IFM, con la finalidad de monitorear los niveles de IFM total en sangre periférica, mediante LC-MS en fase reversa. Finalmente se llevó a cabo el análisis estadístico con el programa estadístico SPSS versión 20.

La frecuencia del alelo T para la variante rs1799853 fue de 0.051 y para el alelo C del rs1057910 fue de 0.011. Se encontró que para la variante rs1799853 el presentar el alelo de riesgo (T) se asoció a mayor concentración de IFM en sangre comparado con los pacientes con alelo C. Finalmente, se encontró asociación entre los pacientes portadores del genotipo heterocigoto (A/C) para el rs1057910 y fracaso en la respuesta al tratamiento.

Se halló que la toxicidad más frecuente observada en esta cohorte de estudio fue la hematológica, siendo los linfocitos el parámetro más afectado de este sistema. Los pacientes con la variante rs1799853 presentaron 4.5 veces menor riesgo de presentar toxicidad hematológica, comparado con los pacientes sin la variante. Para el caso del rs1057910 se observó una asociación entre el genotipo (A/C) y fracaso en la respuesta al tratamiento para TMS.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 DEFINICIÓN DE TUMORES SÓLIDOS.

Los tumores sólidos (TMS) son masa anormal de tejido que normalmente no contiene quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos). Los diferentes tipos de tumores sólidos se denominan así por el tipo de células que los forman.¹

1.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER INFANTIL.

1.2.1 CÁNCER INFANTIL A NIVEL MUNDIAL.

En las últimas décadas, los patrones epidemiológicos de morbilidad y mortalidad destacan mayor incidencia de cáncer no sólo en la población adulta, sino también en la población infantil (Figura 1).

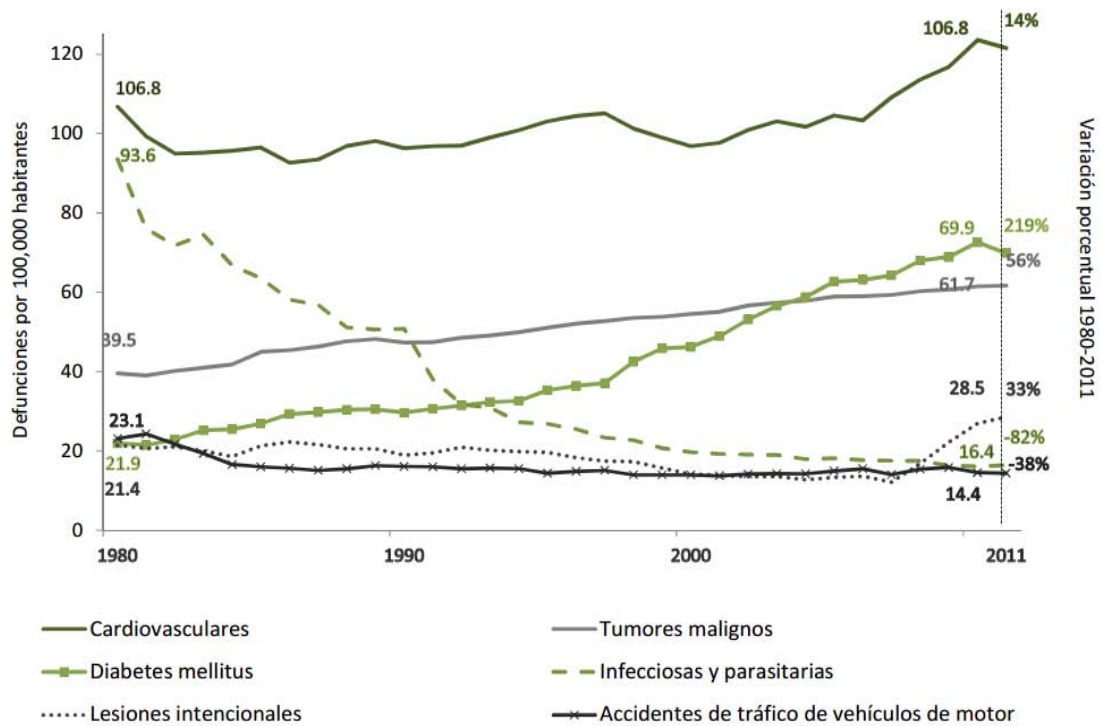


Figura 1. Principales causas de defunción por 100,000 habitantes, 1980-2011.²

Cada año, 175 mil niños en todo el mundo son diagnosticados con cáncer, de los cuales se estima que 90 mil mueren como consecuencia de la enfermedad. Se estima que entre el 60% y 80% de los casos ocurren en países en vías de desarrollo. Por lo que el cáncer se ha convertido en la segunda causa de muerte en niños solo precedido por accidentes. El tipo más común de cáncer es la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), que comprende aproximadamente la mitad de todos los casos.²

1.2.2 CÁNCER INFANTIL EN MÉXICO.

El cáncer infantil en México es un problema de salud pública, al ser la principal causa de muerte por enfermedad entre los 5 y 14 años de edad, cobrando más de 2,000 vidas anuales. Esta enfermedad representa una de las principales causas con mayor número de años de vida potencialmente perdidos, ya que se estima que cada niño que no sobrevive al cáncer, pierde en promedio 70 años de vida productiva.³

El cáncer en los niños de 4 a 15 años representa la segunda causa de mortalidad en México, la incidencia nacional reportada en niños de 0 a 18 años durante el periodo del 2008 al 2013 en el censo del programa del seguro popular fue de 9.4 por cada 100,000 habitantes afiliados.⁴

Dentro de las razones por las que la mortalidad es elevada en este grupo de pacientes incluyen:

- ❖ El retraso en el diagnóstico
- ❖ La agresividad de los tumores
- ❖ La condición clínica al inicio del tratamiento
- ❖ La toxicidad de los antineoplásicos.

De acuerdo con los registros del Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia (CeNSIA), el 75% de los casos de cáncer en menores de 18 años en México se diagnostican en etapas avanzadas de la enfermedad, lo que incrementa

considerablemente el tiempo y costo del tratamiento, y disminuye de manera importante la posibilidad de curarse.⁵

Recientemente se ha demostrado un incremento de los tumores sólidos malignos, principalmente en los grupos de 1 a 4 y 15 a 19 años de edad.⁶

1.2.2.1 INCIDENCIA DE TUMORES SÓLIDOS EN EL INP.

En el año 2015, los tumores (neoplasias) ocuparon el tercer lugar (1,038 casos) entre las diez principales causas de consulta de primera vez en el INP. De igual forma se registraron 1,798 egresos hospitalarios, incluyendo transferencias intrahospitalarias por tumores.⁷ Durante este periodo, los TMS ocasionaron 33 defunciones aproximadamente, situándose en el primer lugar entre las diez principales causas de egreso hospitalario (6,749 casos) y el segundo lugar entre las causas de mortalidad hospitalaria con un total de 156 casos.

En la tabla 1 se muestra la frecuencia de TMS en el INP de acuerdo a lo reportado en su agenda estadística del 2014.⁸

Tabla 1. Frecuencia de Tumores Sólidos en el Instituto Nacional de Pediatría, 2014⁸.

TUMOR SÓLIDO	No. DE CASOS	PORCENTAJE (%)
Linfomas	1329	68.96
Tumores de Células Germinales	152	7.88
Sarcoma de partes blandas	112	5.82
Retinoblastoma	100	5.19
Tumores renales	87	4.52
Osteosarcoma	77	3.99
Neuroblastoma	46	2.39
Tumor de Ewing	24	1.25
TOTAL	1927	100

1.3 TRATAMIENTO DE TUMORES SÓLIDOS EN EDAD PEDIÁTRICA.

El tratamiento de las patologías oncológicas es multimodal, dependiendo de la histología tumoral, y su objetivo principal, es desarrollar estrategias que minimicen la toxicidad terapéutica, reduciendo con ello la morbimortalidad.

Los diferentes componentes terapéuticos son la quimioterapia, radioterapia, cirugía, inmunoterapia y trasplante de médula ósea.⁹

1.3.1 QUIMIOTERAPIA EN EL TRATAMIENTO DE TUMORES SÓLIDOS.

La quimioterapia mantiene un importante papel como adyuvante en la reducción tumoral en enfermedades localizadas y como el principal tratamiento de tumores diseminados. El propósito de esta terapia es provocar la muerte de las células tumorales mediante un efecto citotóxico letal; dicho efecto se dirige generalmente al DNA o a los lugares metabólicos esenciales para la replicación celular.¹⁰

1.3.1.1 FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS.

En el tratamiento farmacológico del cáncer es frecuente la administración de asociaciones de antineoplásicos, ya que de esta forma el tratamiento es más eficaz, el riesgo de aparición de resistencia de las células tumorales al citostático disminuye y se pueden asociar fármacos con distinta toxicidad.

Los fármacos antineoplásicos tienen unas características especiales que los hacen diferentes a otros grupos farmacológicos:

- ❖ Son fármacos con un estrechísimo margen terapéutico
- ❖ Una elevada toxicidad
- ❖ Pueden inducir la aparición de resistencia en las células cancerosas.

Un punto importante de las características antes mencionadas, es la elevada toxicidad que provocan los antineoplásicos al organismo, ésta es debida fundamentalmente a que no actúan sólo sobre las células tumorales sino también sobre las sanas, especialmente sobre las células con mayor velocidad de división, como las de la mucosa digestiva, las de la médula ósea y las de los folículos pilosos. Como consecuencia de este efecto citotóxico sobre células normales producen alteraciones gastrointestinales, anemia, trombocitopenia, leucopenia y alopecia; muchos de estos fármacos pueden producir también esterilidad, teratogenicidad y carcinogenicidad.¹¹

Los fármacos antineoplásicos más comunes se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Fármacos antineoplásicos más comunes.¹⁰

TIPO DE FÁRMACO	AGENTE	TUMORES SUSCEPTIBLES	TOXICIDAD
Alquilantes	Carboplatino	TC, TCG, NBL,TPB	A,H,M
	Cisplatino	TC,TCG,NBL,OSC	A,N/V, R, Neuro
	Ciclofosfamida	TMO, Amplio	A,N/V, SIADH, M,R, Cardio, Cistitis
	Ifosfamida	Amplio	A, SNC,N/V,M,R, Cardio, Cistitis
	Melfalan	NBL,RMS,TMO	M,N/V, Mucositis, Diarrea
Antimetabolitos	Fluoroacilo	HT, Carcinoma GI	SNC, N/V,M, Cardio, Diarrea, Mucositis
	Metotrexato	OSC	SNC,H,M,R, Mucositis
Antibióticos	Dactinomicina	RMS, TW	A,H,M, N/V, Mucositis
	Bleomicina	TCG	P, Mucositis, Piel
	Adriamicina	Amplio	A,M,N/V, Cardio, Diarrea, Mucositis
Alcaloides	Etopósido	Amplio	A,M,N/V, Neuro, Diarrea, Mucositis
	Vincristina	Amplio	A, SIADH, Neuro
	Vinblastina	TCG	A,M, Mucositis
	Topotecan	NBL,RMS	A,H,M,N/V, Mucositis, Diarrea, Piel
	Irinotecan	NBL/RMS	A,H,M,N/V, Diarrea
Misceláneos	L-Asparaginasa	Leucemia	SNC, H, Pancreatitis, Coagulopatía
	Esteroides	TC, Leucemia	AN, Metabólicos, HT, Pancreatitis

A: Alopecia; SNC: Sistema Nervioso Central; H: Hepatotoxicidad; M: Mielosupresor; N/V: Náusea/Vómito; P: Pulmonar; R: Renal; SIADH: Síndrome de secreción inadecuada de ADH; HT: Hipertensión; TMO: Trasplante de Médula Ósea; TC: Tumor cerebral; TCG: Tumor de células germinales; NBL: Neuroblastoma; OSC: Osteosarcoma; RMS: Rabdmiosarcoma; TPB: Tumor de partes blandas; TW: Tumor de Wilms.

De acuerdo a los “Protocolos técnicos para el cáncer en niños”, existen varios esquemas de tratamiento implementados para tratar los tumores sólidos, uno de los principales fármacos antineoplásicos para tratar estos tumores es la ifosfamida (IFM) y se usa en combinación con otros fármacos para diversos tumores sólidos y linfomas en adultos y niños¹². De manera general, el tratamiento del cáncer en la edad pediátrica con IFM ha incrementado la sobrevivida hasta un 70% de los casos.¹³

1.4 IFOSFAMIDA

1.4.1 PROPIEDADES DE LA IFOSFAMIDA.

La fórmula química de la IFM es $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ y tiene un peso molecular de 261.09 (figura 2). Es una oxazafosforina alquilante perteneciente al grupo de las mostazas nitrogenadas, dentro de la familia de los agentes alquilantes.¹⁴

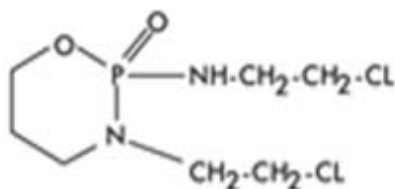


Figura 2. Estructura química de la Ifosfamida.¹⁴

1.4.2 METABOLISMO Y FARMACOCINÉTICA DE LA IFOSFAMIDA.

La IFM es un profármaco, que se administra por vía intravenosa en infusión continua; es decir la IFM se administra en su forma inactiva y posteriormente ésta es metabolizada in vivo hasta sus metabolitos tanto activos como inactivos: 2-dicloroetilfosfamida, 3-dicloroetilfosfamida, cloroacetaldehído, 4-hidroxifosfamida y Aldoifosfamida.

El primer paso es cuando el fármaco es transportado específicamente por eritrocitos hasta la célula hepática e ingresa al interior de dicha célula mediante un receptor desconocido; en el interior de la célula el fármaco es metabolizado mediante la acción de las enzimas de la familia del citocromo P450 (CYP450).

La IFM se biotransforma inicialmente en sus metabolitos 2-dicloroetilfosfamida, 3-dicloroetilfosfamida y cloroacetaldehído (este último se ha demostrado que es neurotóxico) mediante las enzimas CYP3A4, CYP2B6 y CYP3A5; así como también en intermediarios hidroxilados, 4-hidroxiifosfamida y Aldoifosfamida mediante CYP3A5, CYP3A4, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8 y CYP2C9; estos intermediarios se desdoblan formando compuestos activos, donde después de la β – eliminación de la acroleína (responsable de provocar urotoxicidad), se forma la mostaza fosforamida (alqueno)¹⁵. (Figura 3).

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

La farmacocinética de la IFM, así como de sus metabolitos, es compleja y aún no se ha dilucidado por completo. En la tabla 3 se describe de manera general los procesos farmacocinéticos de la IFM.

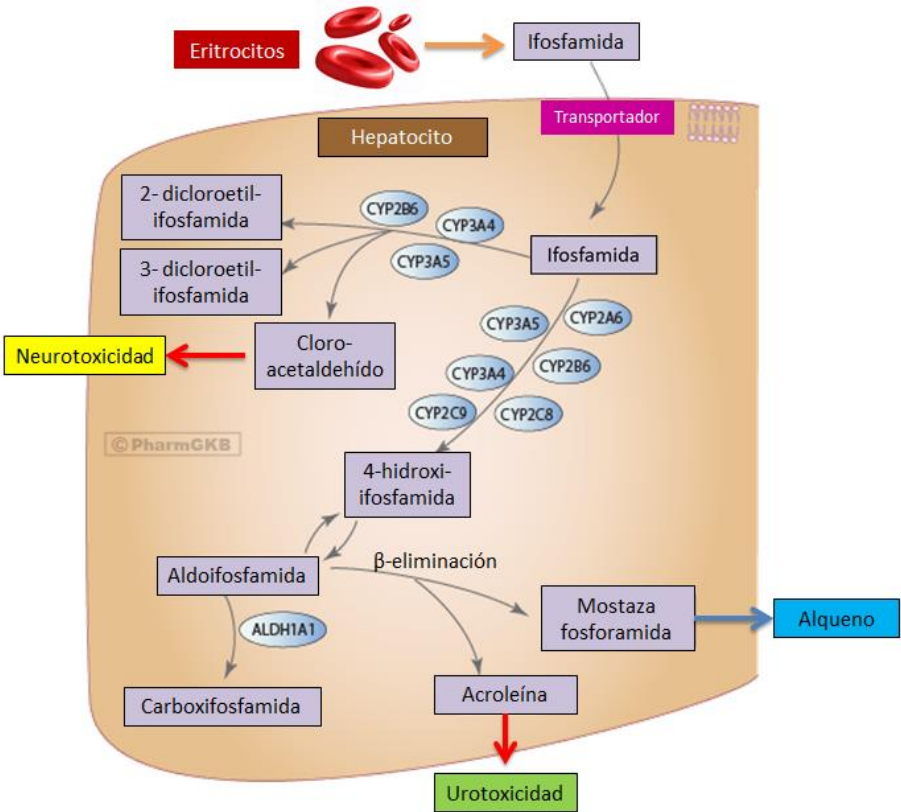


Figura 3. Metabolismo de la Ifosfamida.¹⁵

Tabla 3. Farmacocinética de la Ifosfamida.¹⁶

PROCESO FARMACOCINÉTICO	DESCRIPCIÓN
Absorción	90-100% (Pico alto en 1 hora)
Metabolismo	Hepático (incluyendo la activación inicial y la subsecuente degradación).
Distribución	Ampliamente distribuida en todo el organismo. Atraviesa la barrera hematoencefálica en cantidades limitadas.
Eliminación	Se elimina principalmente por el riñón a través de la orina, el 61% de una dosis de 5.0 g/m ² de superficie corporal y del 12 al 18 % de una dosis de 1.2 a 2.4 g/m ² de superficie corporal se excretan como medicamento sin cambios, el resto lo hace en forma de metabolitos.
Vías de Administración	Es generalmente administrada por vía intravenosa (VI), también puede ser bien absorbida por vía subcutánea (VS) o por vía oral (VO), con reportes de biodisponibilidad de 90-100%.
Vida Media	La vida media de IFM es terminal a: <ul style="list-style-type: none"> ❖ Dosis baja (1.8 g/m² de superficie corporal) de 4-7 Hrs. ❖ Dosis alta (3.8 a 5.0 g/m² de superficie corporal) de 11 a 15 Hrs. Después de dosis repetidas (terapia fraccionada), ocurre una disminución en la vida media terminal posiblemente debida a la autoinducción de su metabolismo.

1.4.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA IFOSFAMIDA.

El resultado de la alquilación directa del DNA es probablemente la reacción citotóxica crucial para destruir las células tumorales y de este modo bloquear la replicación del DNA celular y la transcripción del RNA y, por lo tanto, la mitosis y la síntesis de proteínas.¹⁷

La IFM no es específica de fase del ciclo celular por lo que puede actuar en cualquier etapa del ciclo, aunque las células son más sensibles al final de la fase G1 y S, teniendo mayor afinidad por los tejidos de proliferación rápida en donde

existe mayor proporción de células en constante división interfiriendo con su crecimiento.¹⁸

1.4.4 FARMACOGENÉTICA DE LA IFOSFAMIDA.

La IFM, así como la mayoría de los fármacos de mayor uso son metabolizados por genes que pertenecen a la familia del citocromo P450 (CYP450) entre los que se pueden encontrar *CYP2B6*, *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9* y *CYP3A4/5*.¹⁹

Los genes CYP pertenecen a una súper familia de genes citocromo P450 (CYP450), 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 fármacos²⁰.

1.5 FAMILIA CITOCROMO P450.

Los citocromos P450 (CYP 450) forman una superfamilia de hemoproteínas, cuyo grupo *hemo* se sitúa en el sitio activo de la enzima y es esencial para su actividad catalítica. Estas monooxigenasas son el primer recurso en el metabolismo de xenobióticos (Figura 4). La familia de isoenzimas del citocromo P450 están implicadas en el metabolismo Fase I de cerca del 90% de los fármacos utilizados comúnmente en la práctica clínica²¹.

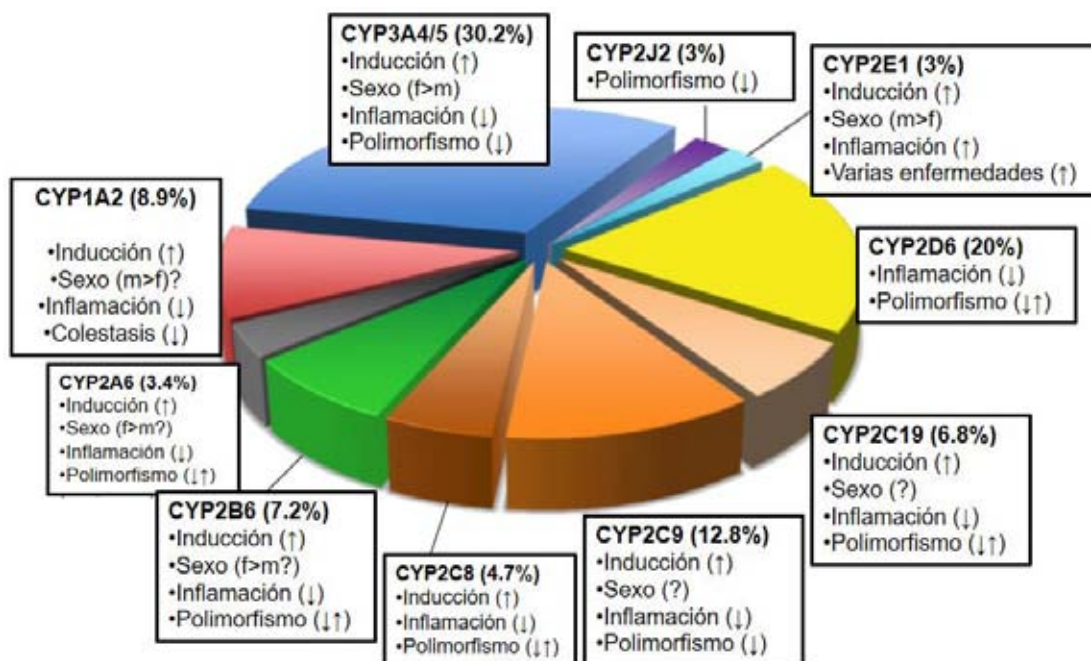


Figura 4. Enzimas de CYP 450.²²

Se muestra el porcentaje en el que cada una de ellas se ven implicadas en el metabolismo de fármacos usados clínicamente y los factores que influyen en la variabilidad. (↑, actividad aumentada, ↓, actividad disminuida, ↑ ↓, aumento y disminución de la actividad).

Existen cerca de 57 proteínas P450 codificadas en el genoma humano, están distribuidas en 18 familias que comparten 40% o más de la secuencia de aminoácidos.²² CYP2C9 es la forma individual 9 de la subfamilia C de la familia 2 de los citocromos P450.

1.6 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL GEN CYP2C9

(Citocromo P450, familia 2, subfamilia C, polipéptido 9).

El CYP2C9 posee nueve exones y está localizado en el cromosoma 10, en la región 10q.24. (Figura 5). Este gen se encuentra en una región de 500 kb²³, codifica para una proteína de 490 aminoácidos. Se ha especulado que la proteína puede tener más de un sitio de unión e interactúa con el ácido araquidónico para producir ácido hidroxieicosatetraenoico y ácido epoxieicosatrienoicos²⁴. En mamíferos, los citocromos P450 están localizados en la membrana del retículo

endoplasmático del hígado e intestino delgado. Sin embargo, la expresión de los citocromos es diferencial en los tejidos. A nivel hepático, no todos los citocromos se expresan en igual concentración, los *CYP3A4*, *2C9*, *2C8*, *2E1* y *1A2* se encuentran más abundantemente, mientras que los *CYP2A6*, *2D6*, *2B6*, *2C19* y *3A5* poseen menor expresión y otros como *CYP2J2*, *1A1* y *1B1* se expresan a nivel extra hepático²⁵.

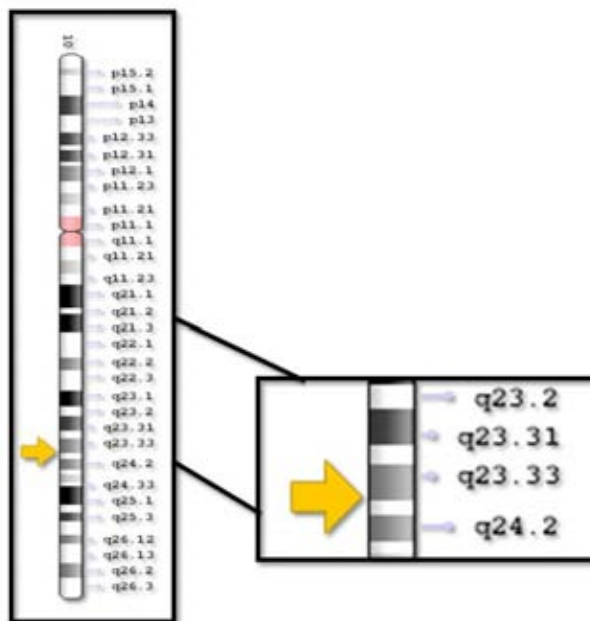


Figura 5. Localización Cromosómica del Gen *CYP2C9*.²³

1.6.1 VARIANTES ALÉLICAS DEL GEN *CYP2C9*.

Las variantes alélicas del *CYP2C9* tienen una diferente repercusión funcional (Tabla 4). Las mutaciones que dan lugar a las variantes *CYP2C9*3*, *CYP2C9*4* y *CYP2C9*5* se encuentran muy cerca unas de las otras en el exón 7 (5'...AGA TAC A1075/CT1076/CT GAC1080/G CTT...3'), localizadas en el SRS 5 (sitio 5 de reconocimiento de sustrato) del *CYP2C9*²⁶. Por tanto, a priori, estas variantes darán lugar a enzimas con una afinidad de sustrato alterada.

Tabla 4. Descripción de Variantes Alélicas descritas para el Gen *CYP2C9*²⁷.

VARIANTE ALÉLICA	POLIMORFISMO	CAMBIO DE AMINOÁCIDO	TIPO DE MUTACIÓN	ACTIVIDAD DE LA ENZIMA
<i>CYP2C9</i> *2	430 C>T	R144C	Sentido erróneo	Disminuida
<i>CYP2C9</i> *3	1075 A>C	I359L	Sentido erróneo	Disminuida
<i>CYP2C9</i> *5	1080 C>G	D360E	Sentido erróneo	Disminuida
<i>CYP2C9</i> *6	818 delA	K273f	Marco de Lectura-delección	Nula
<i>CYP2C9</i> *8	449 G>A	R150H	Sentido erróneo	Disminuida
<i>CYP2C9</i> *9	10535 A>G	H251R	Sentido erróneo	ND
<i>CYP2C9</i> *10	10598 A>G	E272G	Sentido erróneo	ND
<i>CYP2C9</i> *11	42542 C>T	R335W	Sentido erróneo	Disminuida
<i>CYP2C9</i> *12	50338 C>T	P489S	Sentido erróneo	Disminuida
<i>CYP2C9</i> *13	3276 T>C	L90P	Sentido erróneo	Disminuida
<i>CYP2C9</i> *15	9100 C>A	S162X	Sin sentido	Nula
<i>CYP2C9</i> *25	3531_3540 delAG AAATGGAA	KKWK118	Marco de Lectura-delección	Nula
<i>CYP2C9</i> *27	3627 G>T	R150L	Sentido erróneo	ND

ND: Actividad enzimática no descrita en la base de datos oficial.

1.6.1.1 VARIANTE ALÉLICA *CYP2C9**2 (rs1799853)

La variante alélica *CYP2C9**2 se debe a una transición de Citocina por Timina en el nucleótido 430; lo que codifica la sustitución de Arginina (Arg) por Cisteína (Cys) en el residuo de aminoácido 144 (Figura 6). La sustitución de aminoácidos no se encuentra localizada en ninguno de los 6 sitios SRS (sitio de reconocimiento de sustrato) conocidos del centro activo de la proteína, por lo que no está asociado con la disminución en la capacidad de unión de los sustratos cumarínicos como *CYP2C9**3. Sin embargo, la variante *2 juega un papel en la interacción de *CYP2C9* con la enzima CYP-reductasa para oxidar el fármaco sustrato, por lo que la tasa máxima de metabolismo (V_{Max}) es reducida al 40% frente al alelo ancestral²⁸.

1.6.1.2 VARIANTE ALÉLICA CYP2C9*3 (rs1057910)

Esta variante se produce por la transversión de Adenina por Citocina en el nucleótido 1075, esto se traduce en la sustitución de Leucina (Leu) por Isoleucina (Ile) en el aminoácido 359. Está variación está localizada en proximidad al centro activo de la enzima conocido como 5-SRS (sitio 5 de reconocimiento de sustrato), lo cual causa una disminución en la capacidad de unión al sustrato cumarínico, así como disminución de acceso al centro catalítico. Esto ocasiona que la capacidad metabólica de CYP2C9*3 sea de 3-11%, con respecto al alelo ancestral. Principalmente portadores del genotipo *3/*3, tienen riesgo más elevado de experimentar una severa hemorragia durante el tratamiento con ACOs.^{29, 30, 31.}

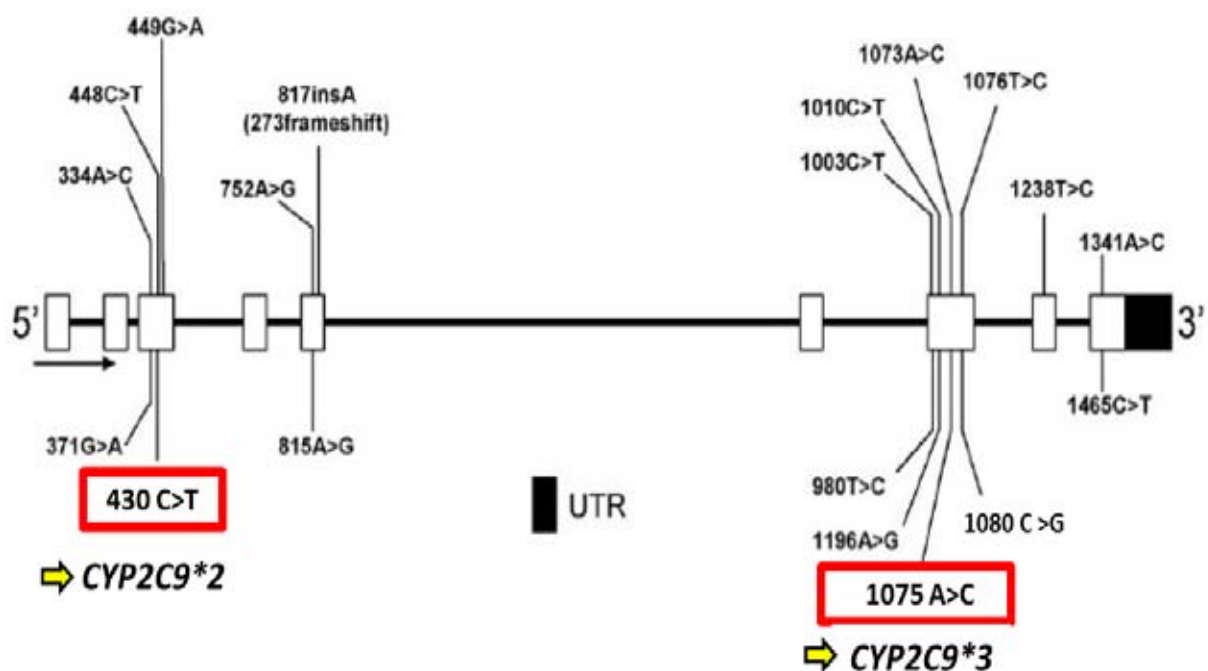


Figura 6. Localización de las variantes alélicas CYP2C9*2 y CYP2C9*3.³²

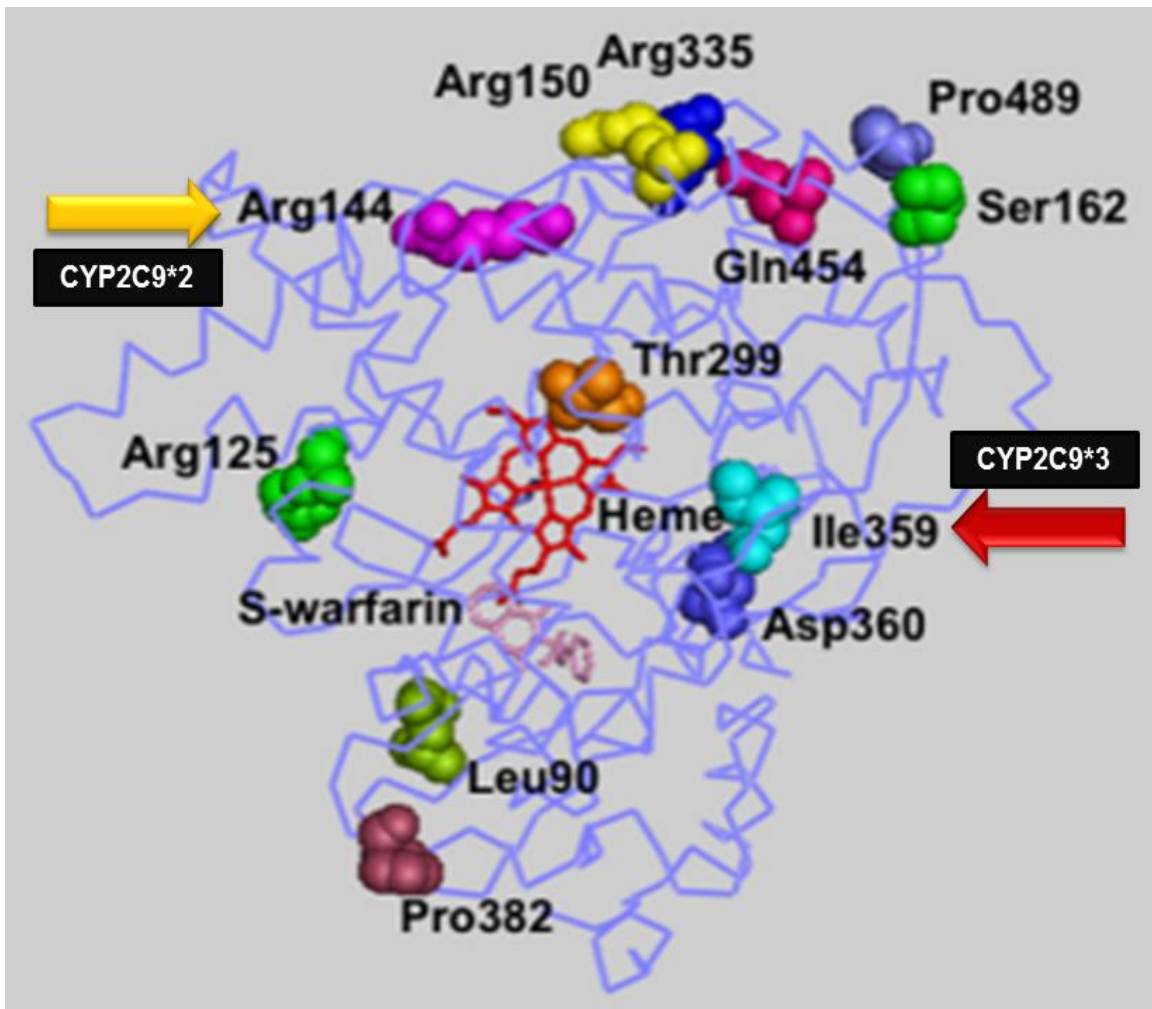


Figura 7. Estructura cristalina de la proteína *CYP2C9* unida a la Warfarina³³.

Se cartografiaron las mutaciones con efectos funcionales, la *S*-warfarina se representa con el modelo tridimensional rosa, y el grupo Hemo se representa en rojo.

En población caucásica la frecuencia genotípica de $*1/*2$ es del 19%, en un estudio realizado en individuos sanos de origen México-americanos encontraron una frecuencia de 15% para el genotipo $*1/*2$ IC 95% 0.095–0.24 y del 10% para la forma $*1/*3$ IC95% 0.055–0.18.³²

1.6.1.3 IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LAS VARIANTES ALÉLICAS *CYP2C9*2* Y *CYP2C9*3*.

En un estudio con pacientes tratados con tolbutamida, aquellos que presentaban los genotipos *CYP2C9*3/*3* y *CYP2C9*2/*3* mostraron un incremento en la vida media y una reducción en el aclaramiento del fármaco, en comparación con un grupo de pacientes control³⁴. Otro estudio realizado por Van der Weide y colaboradores en 2001 mostró que en pacientes epilépticos en tratamiento con fenitoína³⁵, los portadores de al menos una variante alélica de *CYP2C9* (*CYP2C9*2* o *CYP2C9*3*), requerían menos dosis de fenitoína comparado a los individuos con alelo normal, la dosis media de la fenitoína que se requería para lograr una concentración sérica terapéutica fue aproximadamente un 37% menor que la dosis media requerida por los individuos sin la variante (199 mg / día vs. 314 mg / días; $p < 0,01$).

Por otro lado, ha sido reportado en el estudio de Wypaseky E. y colaboradores en el 2015, que los portadores de los genotipos *CYP2C9*2* y **3* se caracterizan por tener una reducción en la dosis diaria de warfarina ($M_e=21$, $RQ= 21-35$ mg/semana, $p=0.02$) frente a ($M_e= 35$, $RQ=28-42$ mg/semana, $p = 0,02$) y real (27.8 ± 13.2 frente a 46.3 $P < 0,001$), que los pacientes con alelo normal.³⁶

Yasar U. y colaboradores en el 2002, encontraron que la variante **2* en el genotipo *CYP2C9*1/*2*, aumenta el riesgo de hemorragia gastrointestinal en pacientes que reciben AINE's, los cuales son metabolizados principalmente por el *CYP2C9*, en comparación de los que no presentan estas variantes ($OR=2.6$).³⁷

La variante *CYP2C9*2* también se ha asociado a una mala respuesta clínica a la quimioterapia neoadyuvante en pacientes con cáncer de mama. En el estudio realizado por Tatyana A. Seredina y colaboradores, se observó una correlación significativa entre la variante *CYP2C9*2* y la resistencia a la quimioterapia con CMF (Ciclofosfamida/metotrexato/fluorouracilo), FAC (fluorouracilo/Adriamicina/Ciclofosfamida) y CA (Ciclofosfamida/Adriamicina), en mujeres de Siberia ($OR = 4.64$, $IC 95\% = 1.01$ a 20.91). El efecto quimioterapéutico se estimó después de 2-

4 ciclos de quimioterapia a través de la exploración por ultrasonido y mamografía, encontrándose remisión completa de la enfermedad en 3% de las pacientes; la tasa de remisión parcial fue del 47%; la tasa de enfermedad estable fue de 46% y 4% de las pacientes mostró progresión de la enfermedad.³⁸

1.7 TOXICIDAD ASOCIADA A LA IFOSFAMIDA

La IFM por sí misma es poco citotóxica, es metabolizada *in vivo* y genera los metabolitos (2-decloro etil ifosfamida, 3-decloro etil ifosfamida, cloro acetaldehído, 4-hidroxi ifosfamida y aldo ifosfamida) que son altamente tóxicos, estos metabolitos pueden causar nefrotoxicidad y neurotoxicidad. El metabolismo del huésped es quizá el determinante más importante de la respuesta al tumor.

Se ha documentado que el cuadro clínico que se presenta en forma variable después de la administración de la IFM incluye: Somnolencia, letargia, irritabilidad, excitación, desorientación, confusión, debilidad, alucinaciones y crisis convulsivas, hasta signos clínicos graves como degeneración del cerebelo, atrofia cerebral, dolor secundario a neuropatía periférica, y degeneración del sistema nervioso central. En pacientes pediátricos se han descrito además trastornos del movimiento como hemibalismo, corea o atetosis³⁹.

La aparición de estos síntomas se ha observado desde el inicio del tratamiento, de 2 a 48 Hrs después del inicio de la infusión hasta 1 a 3 días después de iniciado el tratamiento⁴⁰. La toxicidad causada por IFM, es impredecible y por lo general severa si no se restringe el tratamiento (tabla 5).

En población Latinoamericana se ha reportado que la dosis acumulada de IFM para causar neurotoxicidad es cuando excede los 60 g/m², sin embargo, en un reciente reporte del 2011, se encontró que una dosis acumulada de 36 g/m² fue suficiente para ocasionar elevada neurotoxicidad⁴¹. En otras poblaciones, se ha encontrado que los factores de mayor peso para desarrollar neurotoxicidad son: hipoalbuminemia menor de 3.3 g/dL, hiponatremia, edad del paciente y dosis acumulativa de IFM.

Tabla 5. Toxicidad asociada a IFM⁴⁰.

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	Náuseas, vómito, estomatitis, diarrea
Endocrinas y metabólicas	Acidosis metabólica

2. HIPÓTESIS.

La presencia de las variantes alélicas rs1799853 y rs1057910 en el gen *CYP2C9* incrementarán el riesgo de desarrollar toxicidad sistémica en pacientes pediátricos mexicanos con tumores sólidos tratados con ifosfamida.

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo General

Determinar si las variantes alélicas rs1799853 y rs1057910 en el gen *CYP2C9* incrementan el riesgo de desarrollar toxicidad en pacientes pediátricos con tumores sólidos tratados con ifosfamida, por medio del ensayo de discriminación alélica.

3.2 Objetivos Específicos.

- a. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes alélicas rs1799853 y rs1057910 en el gen *CYP2C9*.
- b. Obtener la incidencia de toxicidad (hematológica, gastrointestinal, hepática, neurológica, renal, cardíaca, tensión arterial) entre aquellos pacientes que presentan el polimorfismo y comparar con aquellos que no presentan la variante alélica.
- c. Cuantificación de Ifosfamida a las 12 y 24 horas después de concluir la última infusión de Ifosfamida y comparar los niveles de los que presentan la variante alélica, con los pacientes que no la presentan.
- d. Determinar la respuesta a tratamiento del total de pacientes y compararla entre aquellos que presentan la variante alélica y los pacientes que no presentan la variante alélica.

4. JUSTIFICACIÓN.

La alta tasa de mortalidad producida por la toxicidad de los agentes antineoplásicos está retrasando el éxito en los tratamientos, se sabe que el factor genético juega un papel importante en el desarrollo de dicha toxicidad. El conocer si hay variantes alélicas en el gen *CYP2C9* que predispongan a presentar toxicidad, ayudará a los clínicos a poder brindar una terapia alternativa y como consecuencia obtener el éxito terapéutico deseado con una mayor y mejor calidad de vida para el paciente, disminuyendo de esta manera los costos intrahospitalarios que se generan por la presencia de la toxicidad.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL.

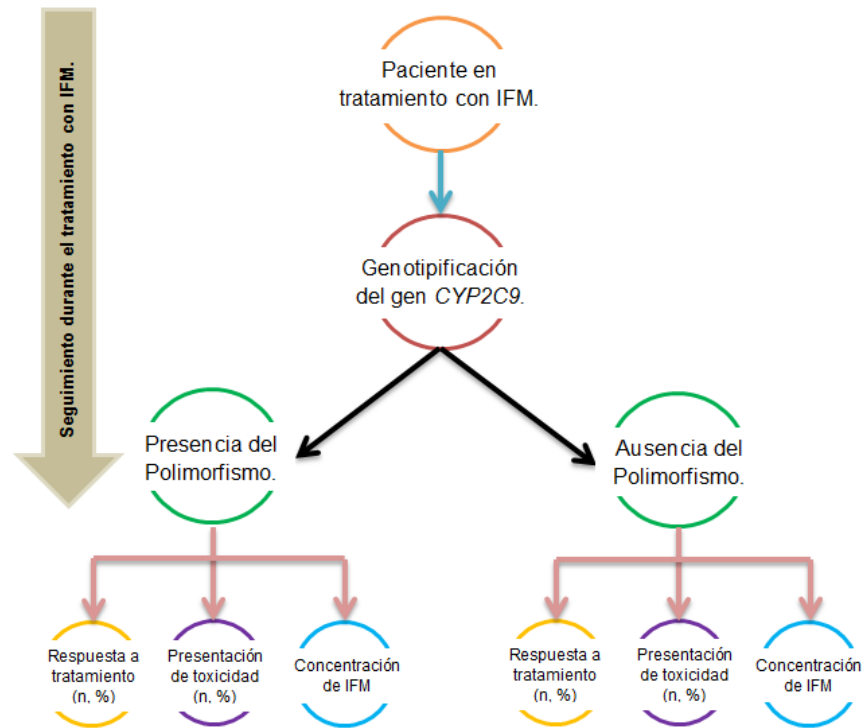
Es un estudio observacional, comparativo, prospectivo y longitudinal.

El reclutamiento de la cohorte comenzó a partir del inicio del tratamiento con IFM en el primer ciclo y hasta los seis ciclos que comprenden el esquema de quimioterapia, a aquellos pacientes que cumplan con los criterios de selección.

La exposición estuvo definida como presencia vs ausencia de la variante polimórfica estudiada en *CYP2C9*.

El diseño permitió evaluar clínicamente a los pacientes al final de tratamiento y clasificarlos de acuerdo a su estatus de presentación de toxicidad (presentó toxicidad vs no presentó toxicidad) y de respuesta a tratamiento (respondió vs no respondió).

La cohorte se construyó de acuerdo al siguiente esquema:



5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Se captaron pacientes con tumores sólidos embrionarios y sarcomas de alto riesgo, con terapia con IFM en su ciclo de quimioterapia en el servicio de oncología del INP.

5.1.1. RECLUTAMIENTO DE LA COHORTE.

Los pacientes fueron seleccionados a partir de la pre-consulta, es decir que fueron enviados a Consulta Externa de primera vez con diagnóstico presuntivo de cáncer. El Oncólogo de consulta externa, una vez habiendo diagnosticado el cáncer con su estirpe celular y su estadio, refirió al paciente a Oncología. El médico Oncólogo eligió a los pacientes por medio de los criterios de inclusión. A los pacientes que cubrieron dichos requisitos se les explicó el objetivo del estudio y se les invitó a participar mediante firma del consentimiento informado. (ANEXO 1).

5.2. CLASIFICACIÓN DE LOS CRITERIOS DE ELECCIÓN.

5.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- ❖ Paciente con presencia de tumores sólidos embrionarios y sarcomas de alto riesgo, con terapia con IFM en primer ciclo.
- ❖ Paciente que tenga edad de entre 0 años y hasta los 17 años.
- ❖ Paciente de género indistinto.
- ❖ Para cada paciente se requerirá una carta de Consentimiento Informado por parte de los padres y/o tutores; en el caso de pacientes mayores a 12 años deberán firmar Carta de Asentimiento.(ANEXO 2)
- ❖ El paciente tendrá que ser “mestizo mexicano”, que se define como individuo que nació en México, así como sus dos generaciones anteriores (padres y abuelos) y se evaluará mediante un cuestionario.

5.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- ❖ Paciente con diagnóstico distinto a tumor sólido.
- ❖ Paciente con transfusión sanguínea con paquete eritrocitario no desleucocitado o plasma.
- ❖ Paciente que presente desnutrición de grado III y/o cualquier alteración que pueda afectar la determinación de los niveles del fármaco.
- ❖ Paciente que no esté en el primer ciclo con IFM.
- ❖ Paciente con daño renal o hepático.
- ❖ Paciente que no sea “mestizo mexicano”.

5.2.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

- ❖ Pacientes a quien se le retiró el fármaco de la quimioterapia.
- ❖ Paciente que no acudió regularmente a su tratamiento (No se apegó al tratamiento: determinado por un porcentaje menor al 5% de administraciones efectivas).
- ❖ Paciente que retire voluntariamente su consentimiento y/o asentimiento

para participar en el estudio.

- ❖ Paciente del que no se obtenga un DNA de buena calidad para la genotipificación y/o cuantificación del fármaco.
- ❖ Paciente que no tenga completo el cuestionario de toxicidad, (ANEXO 3).

5.3 DEFINICIÓN DE VARIABLES OPERACIONALES.

Tabla 6. Definición de Variables operacionales.

Variable	Definición operacional	Clasificación	Categoría
Grupo de riesgo	Se definen por factores clínicos (edad, sexo, recuento de blastos) y biológicos (estirpe de linfocitos, antígenos de superficie, etc.) que inciden en el pronóstico de remisión.	Cualitativa ordinal	1=Bajo 2=Habitual 3=Alto 4=Muy alto
Género	Características biológicas que permiten diferenciar entre hombre y mujer.	Cualitativa Dicotómica	1=Masculino 2=Femenino
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	1,800mg/m ² /día
Frecuencias Genotípicas de polimorfismos	Proporción de un alelo respecto al conjunto de los que pueden ocupar un locus determinado en la población.	Cualitativa politómica	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
Respuesta a tratamiento	El paciente respondió a la quimioterapia.	Cualitativa dicotómica	1=Respuesta 2=No respuesta
Tipo de Respuesta al Tratamiento	El tipo de respuesta de acuerdo a la clasificación de criterios RECIST.	Cualitativa politómica	1=Respuesta completa. 2=Respuesta parcial. 3=Enfermedad estable. 4=Progresión de la enfermedad 5=No valorable
TOXICIDAD GASTROINTESTINAL			
*Náuseas	Sensación desagradable, subjetiva que se localiza en la parte superior de la garganta y en el estómago, seguida o no del vómito.	Cualitativa dicotómica	0=sin toxicidad 1=leve 2=moderado 3=alto 4=muy alto
*Vómito	Contracciones potentes de los músculos abdominales que hacen que el contenido del estómago sea expulsado de forma violenta de la boca.	Cualitativa ordinal	0=sin toxicidad 1=leve 2=moderado 3=alto 4=muy alto
*Diarrea	Se define como diarrea la deposición, tres o más veces al día (o con una frecuencia mayor que la normal para la persona) de heces sueltas o líquidas.	Cualitativa ordinal	0=sin toxicidad 1=leve 2=moderado 3=alto

			4=muy alto
*Estomatitis	Es una inflamación de la membrana mucosa de cualquiera de las estructuras de la boca.	Cualitativa ordinal	0=sin toxicidad 1=leve 2=moderado 3=alto 4=muy alto
TOXICIDAD HEPÁTICA			
*Bilirrubina *Transaminasas (ALT, AST) *Fosfatasa Alcalina	Se define daño hepático cuando alguna de las enzimas duplique (2N) el valor basal obtenido antes de la quimioterapia.	Cualitativa ordinal	0=sin toxicidad 1=leve 2=moderado 3=alto 4=muy alto
TOXICIDAD RENAL			
*Creatinina *Proteinuria *Hematuria	Se describe daño renal si se rebasa al menos alguno de los límites máximos establecidos.	Cualitativa ordinal	0=sin toxicidad 1=leve 2=moderado 3=alto 4=muy alto
TOXICIDAD NEUROLÓGICA			
*Neurosensorial *Neuromotor *Neurocortical *Neurocerebelar *Cefalea *Estreñimiento *Audición *Visión	Se sospecha de daño neurológico cuando exista dolor e inestabilidad al caminar, debilidad en parte distal de las extremidades, pérdida de fuerza en dedos de manos, dificultad para realizar tarea que requieren de precisión, pérdida de audición y sensibilidad, alteraciones sensitivas, desaparición de los reflejos osteotendinosos, ruidos intestinales y alteración en la motilidad intestinal.	Cualitativa ordinal	0=sin toxicidad 1=leve 2=moderado 3=alto 4=muy alto
TOXICIDAD CARDIACA			
*Disrritmias *Función Cardíaca *Isquemia cardíaca	Se define daño en el músculo cardíaco cuando se presenta una miocardiopatía que evoluciona a insuficiencia cardíaca.	Cualitativa ordinal	0= sin toxicidad 1=leve 2=moderado 3=alto 4=muy alto
TOXICIDAD EN PRESIÓN ARTERIAL			
*Hipertensión *Hipotensión	Se registra toxicidad cuando hay un aumento o disminución de la tensión arterial.	Cualitativa ordinal	0= sin toxicidad 1=leve 2=moderado 3=alto 4=muy alto
MONITOREO DE IFOSFAMIDA			
Sangre	Concentración de fármaco cuantificado a las 12 y 24 Hrs. al término de la infusión de la ifosfamida.	Cuantitativa continua	µM

6. METODOLOGÍA

6.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.



6.2 TOMA DE MUESTRA.

Se tomaron tres muestras de sangre a cada uno de los pacientes:

- ❖ Una muestra de sangre periférica, con un volumen aproximado de 3 ml, para el análisis del material genético (extracción de DNA y genotipificación).

- ❖ Las siguientes dos muestras capilares se tomaron a las 12 y 24 horas después de terminar la infusión con IFM. Se utilizó para ello una lanceta automática y retráctil, *Contact-Activated* de la marca *BD Microtainer*®, la cual realiza en un solo disparo una perforación de 2mm de profundidad x 1.5mm de diámetro. Una vez que se obtuvo la gota de sangre (eliminando la primera gota obtenida), esta se colocó en una tarjeta *Güthrie 903*. Ambas muestras se sometieron a secado durante toda la noche a temperatura ambiente protegiéndola de la luz solar en posición horizontal. Posteriormente las tarjetas se colocaron en bolsas de plástico de baja permeabilidad a los gases con desecante añadido para reducir la humedad y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

6.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

6.3.1 LISIS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS.

Las células sanguíneas de donde se obtiene el DNA son los glóbulos blancos (leucocitos), por lo que para obtenerlos se tuvo que someter a centrifugación la muestra de sangre periférica a 3,500 rpm por 20 min.

Una vez centrifugada la muestra, entre el plasma y los glóbulos rojos (eritrocitos) se encuentra la llamada “capa leucocitaria”, la cual se obtuvo con una pipeta *Pasteur* estéril, y se trasladó a un tubo Falcón; posteriormente se lisaron los glóbulos rojos que se tomaron a la hora de recolectar la capa leucocitaria con amortiguador de lisis de células rojas (*RCLB*), hasta que el concentrado de glóbulos blancos no contuviera glóbulos rojos.

El botón de glóbulos blancos se trasladó a un tubo *ependorf* estéril para su posterior lisis en condiciones de desnaturalización a altas temperaturas y de esta manera obtener el DNA.

6.3.2 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA.

La purificación de DNA se realizó mediante el método descrito en el *QIAamp DNA Mini kit*.

- a) Se adicionó al botón de glóbulos blancos, contenidos en un tubo *ependorf*, 200 μ l de amortiguador *AL (QIAGEN™)*, seguido de 20 μ l de proteasa (*Proteinasa K*), homogeneizando la muestra con un vórtex por 15 segundos.
- b) Posteriormente la muestra se incubó en el *VORTEMP*, a una temperatura de 56^oC por 17 Hrs a 470 rpm; al finalizar el tiempo de incubación, se mantuvo la muestra a temperatura ambiente.
- c) Se procedió a agregar 200 μ l de etanol absoluto a la muestra, la cual se homogenizo por inversión.
- d) La muestra se trasladó a la columna de *QIAamp Mini Spin*, una vez esto, la muestra se sometió a centrifugación a 8,000 rpm por 1 min; descartando el filtrado (contenedor de residuos).
- e) Se agregó a la columna 500 μ l de amortiguador *AW1(QUIAGEN™)*, se incubó a temperatura ambiente por 3 min y consecuente se centrifugó a 8 000 rpm por 1 min, se descartó el filtrado nuevamente.
- f) Se adicionó amortiguador *AW2 (QUIAGEN™)*, incubándose a temperatura ambiente por 3 min y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 3 min, y nuevamente se desechó el filtrado.
- g) La columna *QIAamp Mini Spin* se colocó en un nuevo tubo colector, desechando el tubo colector anterior.
- h) Se añadió 100 μ l de amortiguador *AE (QUIAGEN™)*, incubándose la muestra nuevamente en el *VORTEMP* pero a condiciones de 60^oC por 10 min a 470 rpm.
- i) Posteriormente se centrifugó a 9,000 rpm por 1 min y se incubó a temperatura ambiente durante 3 min.
- j) Se procedió a agregar otros 100 μ l de amortiguador *AE (QUIAGEN™)*, y se centrifugó nuevamente a 9,000 rpm por 1 min.

- k) Finalmente se transfirió el filtrado contenido en el tubo colector, a un tubo *ependorf* estéril, previamente etiquetado y se almacenó la muestra hasta su posterior uso.

El kit comercial QIAGEN™, se fundamenta en la unión de DNA a una matriz inorgánica, que en este caso es una membrana de sílice. Antes de pasar la solución de lisis a través de la columna, se adiciona etanol a la solución, con la finalidad de eliminar la capa hidratante del DNA y de esta forma exponer sus grupos fosfato, facilitando con ello la adsorción de la molécula a la membrana cargada positivamente.⁴² Los lípidos y proteínas no son afines a la membrana de sílice, por lo que se eliminan con ayuda de la solución de lavado AW1 y AW2, además de varios ciclos de centrifugación; mientras que el material genético permanecerá unido a la matriz hasta que se agregue el amortiguador de elución (AE), el cual volverá a formar la capa hidratante del DNA y con ello se dará su consecuente liberación de la membrana.

6.4 CUANTIFICACIÓN DE ADN.

Una vez obtenido el material genético, fue importante determinar el rendimiento (concentración) y evaluar la pureza del DNA obtenido, mediante espectrofotometría a través del equipo *EPOCH*™ de BioTek, el cual emplea un Software Gen5, para Análisis y Reducción de Datos⁴³.

Una característica del DNA es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Esto se explica mejor por medio de la ley de Beer-Lambert que indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz que absorbe.

Mientras que la pureza del DNA, se estableció mediante la relación de las lecturas de absorbancias a 260 y 280 nm (260/280), la proporción de 1.8 es aceptada como DNA puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas y las mayores, contaminación con RNA.

- a) A cada uno de los pozos de la microplaca se les colocó 3 μ l de agua libre de DNAsas.
- b) Una vez que los pozos contenían el agua libre de DNAsas, se limpió la microplaca de manera uniforme, con una toalla absorbente libre de pelusa *KIMWIPES*.
- c) En los dos primeros pozos de la microplaca se cargaron los blancos (Agua libre de DNAsas).
- d) Se procedió a cargar 1.5 μ l de las muestras pendientes por cuantificar en la microplaca.
- e) Posteriormente se colocó la microplaca dentro de la bandeja del equipo *EPOCH*™ de BioTek.
- f) Se ingresó al Software para Análisis de Datos Gen5™; se indicaron las posiciones de los blancos y de las muestras.
- g) Se verificó que el equipo leyera perfectamente los blancos y se obtuvieron resultados de cuantificación con la proporción 260/280.
- h) Finalmente se retiraron las muestras de los pozos con una toalla absorbente *KIMWIPES* y se volvió a limpiar la microplaca con Agua libre de DNAsas.

6.5 GENOTIPIFICACIÓN MEDIANTE EL ENSAYO DE DISCRIMINACIÓN ALÉLICA POR SONDAS TaQMan®.

El análisis de los genotipos se llevó a cabo por medio del ensayo de discriminación alélica utilizando sondas TaqMan®.

Las sondas utilizadas se adquirieron de Applied biosystems, las variantes fueron CYP2C9*2 la cual se identifica con el rs1799853 y CYP2C9*3 identificada por el rs1057910. Para la genotipificación, se generó una mezcla o mix de reacción, la cual contuvo los siguientes reactivos:

Tabla 7. Mezcla de reacción para la Genotipificación.

REACTIVOS	VOLUMEN (µl) PARA 1 REACCIÓN
H ₂ O	1.6
Master Mix	5.0
Sonda	0.4
DNA (10 ng/µl)	3.0
Volumen Total	10.0

En cada experimento siempre fue necesario anexar:

- ❖ Un control negativo (no contiene DNA, se utilizó agua grado PCR libre de RNAsas y DNAsas)
- ❖ Un control normal (Alelo 1/ Alelo 1)
- ❖ Un control positivo (Alelo 2/ Alelo 2)
- ❖ Un control heterocigoto (Alelo 1/ Alelo 2)

Sonda CYP2C9*2 (rs1799853):

- Alelo 1: C
- Alelo 2: T

Sonda CYP2C9*3 (rs1057910):

- Alelo 1: A
- Alelo 2: C

El método utilizado para procesar las reacciones fue el de *TaqMan® Drug Metabolism Genotyping* y las condiciones se muestran en la figura número 7.

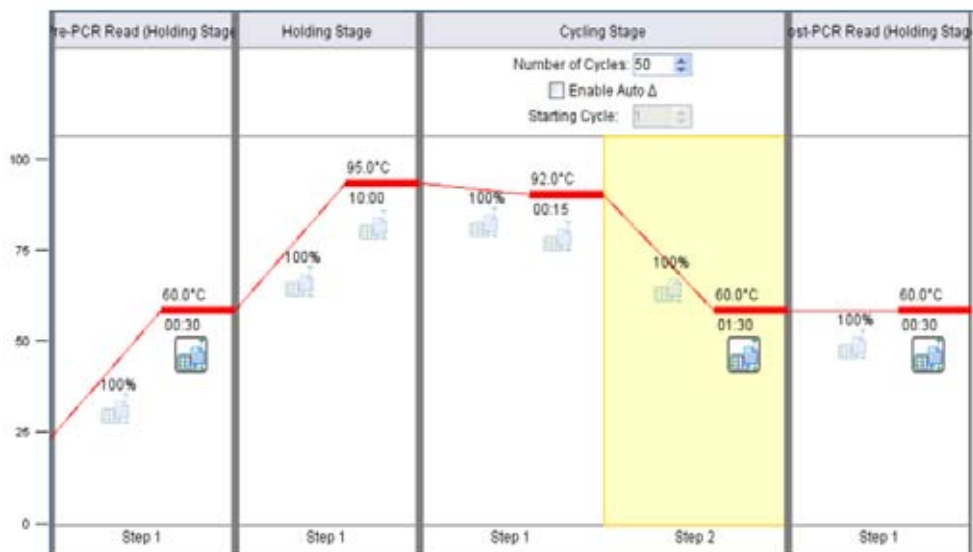


Figura 8. Condiciones de amplificación de la PCR.

Las sondas TaqMan se basan en el principio FRET (*Flourescence Resonance Energy Transfer* por sus siglas en inglés), que consta en la transferencia de energía entre dos fluoróforos, los cuales emiten fluorescencia a diferente longitud de onda.

Para cada ensayo de discriminación alélica se obtuvieron sondas específicas (rs1799853 y rs1057910) marcadas con fluoróforos diferentes en el extremo 5', VIC para el alelo 1 y FAM para el alelo 2 de Applied Biosystems, ambas sondas se caracterizaban por poseer en el extremo 3' un "quencher" (TAMRA) el cual mientras la sonda permanece intacta, inhibe la emisión de fluorescencia. Durante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (*PCR*) los cebadores hibridan con una secuencia específica del templado de DNA. Si éste contiene la secuencia polimórfica, la sonda *TaqMan* también hibrida con su secuencia homóloga. Durante la PCR, la *AmpliTaq Gold*, que tiene actividad tanto de DNA polimerasa como de exonucleasa 5'-3', es capaz de digerir la sonda marcada durante la amplificación y liberar el colorante fluorescente de la acción del "quencher", de tal manera que, dadas las condiciones de astringencia utilizada durante la reacción, sólo la sonda específica para el polimorfismo presente será capaz de hibridar.

Por lo tanto, es posible diferenciar un alelo del otro con base en el tipo de fluorescencia emitida.

Es así como se cuantificó la fluorescencia de cada muestra en el equipo *Step One*, utilizando el *software SDS 2.2.1* para discriminación alélica (*Applied Biosystems Foster City, CA, USA*)⁴⁴.

6.6 MONITOREO DE LA CONCENTRACIÓN DE IFOSFAMIDA.

6.6.1 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

El sistema de cromatografía líquida de ultra-alto desempeño utilizado fue un equipo modelo AcQuity acoplado a un espectrómetro de masas Quattro micro tándem operado en modo de ionización positiva (ESI (+): "electrospray positive ionization mode") y controlado por el programa computarizado MassLynx NT

4.0. La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna Acquity UPLC BEH-C18, 2.1 x 100 mm, 1.7 μm (WatersTM) a 40 °C, automuestreador a 15 °C, velocidad de flujo de 0.20 mL/min. El tiempo de corrida fue de 3.5 minutos. Los tiempos de retención fueron 1.9 min para ifosfamida y 2.0 min para ciclofosfamida. La fase móvil consistió en formiato de amonio 5 mM, con metanol y acetonitrilo (MeOH:ACN), en proporción 40:48:12, respectivamente. La fase móvil se mezcló en dos reservorios independientes, en uno de ellos se colocó metanol y acetonitrilo en proporción 80:20 v/v, y en el otro se colocó el formiato de amonio 5mM.

6.6.2 CONDICIONES ESPECTROMÉTRICAS.

Los analitos de interés se midieron a través de monitorización de reacción múltiple, usando las siguientes transiciones iónicas: $m/z1+ 260.99 > 91.63$ Th para IFM y $261.00 > 139.90$ Th para CFM. La energía de cono fue de 25 V para ambos analitos, mientras que la energía de colisión fue de 25 V para ifosfamida y 20 V para CFM. Se utilizó un “dwell” de 0.2 s. Los datos se procesaron mediante el programa MassLynx Ver. 4.1.

6.6.3 ELABORACIÓN DE ESTÁNDARES Y CONTROLES.

Las soluciones iniciales de ifosfamida y ciclofosfamida (1mg/mL) se prepararon individualmente en metanol al 100%. A partir de la solución inicial de ifosfamida se elaboraron 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 $\mu\text{g/mL}$. Para los puntos controles de calidad bajo, medio y alto se prepararon soluciones de 6, 80 and 160 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Se prepararon curvas de calibración independientes (100, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 7,500, y 10,000 ng/mL) colocando 475 μL de sangre total (hematocrito 30% y 45%) con 25 μL de solución de ifosfamida a las diferentes concentraciones (20X). 40 μL de la mezcla se colocaron en tarjetas Whatman S&S 903 (tarjetas Guthrie) en cada círculo por

separado. Las tarjetas se dejaron secar en posición horizontal por 6 horas a temperatura ambiente. Una vez secas, se almacenaron 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. Los puntos controles de calidad bajo, medio y alto (300, 4000 y 8000 ng/mL, respectivamente) se prepararon igual que la curva de calibración, empleando las respectivas soluciones iniciales 20X.

6.6.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS (EXTRACCIÓN).

Se cortaron cinco discos de 3.0 mm de diámetro por cada círculo impregnado de sangre seca, empleando una perforadora manual McGill, Incorporated®. Se colocaron en un microtubo con capacidad para 1.5 mL y se les agregaron 20 µL del ciclofosfamida (3000 ng/mL en metanol al 70%), se agitaron por 10 segundos y posteriormente se les adicionaron 100 µL de ACN y 200 µL de acetato de etilo, se agitaron por 2 minutos en agitador de toque a máxima velocidad y posteriormente se sonicaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. La fase orgánica se decantó y se evaporó a 40 °C bajo corriente de oxígeno en otro tubo. La muestra extraída y seca se reconstituyó con 200 µL de una solución de agua: MeOH: ACN, en proporción 40:48:12, v/v. Se inyectaron 8 µL al sistema cromatográfico.

6.7 EVALUACIÓN DE TOXICIDAD Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO.

6.7.1 GRADO DE TOXICIDAD.

Se aplicó un cuestionario diseñado con la tabla de toxicidad OMS (ANEXO 4) para registro de la toxicidad en cada ciclo durante los seis ciclos que comprendió el esquema de quimioterapia, los datos que no pudo contestar el paciente o en su defecto un familiar del mismo, se capturaron del expediente clínico del paciente, obtenido de la base de datos *MedSys*.

6.7.2 RESPUESTA A TRATAMIENTO.

Se revisó la respuesta al tratamiento al final de los 3 y 6 ciclos de acuerdo a los criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos RECIST por sus siglas en inglés (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors)⁴⁵, se repitió el estudio de gabinete (tomografía computarizada de alta resolución o tomografía de emisión de positrones) para valorar la respuesta tumoral según criterios establecidos para determinar cuatro niveles de respuesta al tratamiento⁴⁶. Se dividió esta en: 1. Respuesta completa: 90% o más de reducción de las lesiones, 2. Respuesta parcial: Reducción del tamaño tumoral entre 50 y 89% en el tamaño acumulado de las lesiones, 3. Respuesta estable: Reducción del tamaño tumoral presente pero menor al 50% del tamaño en el estudio Inicial o 4. Progresión de la enfermedad. En base al tipo de tumor se consideró respuesta al tratamiento una respuesta tipo 1, 2 y 3 en aquellos tumores donde la indicación de quimioterapia era como tratamiento neo adyuvante y 4 como sin respuesta al tratamiento; o 1 y 2 como respuesta y por su parte respuesta tipo 3 y 4 como sin respuesta al tratamiento cuando la intención del tratamiento no es la neoadyuvancia si no la medida terapéutica principal.

6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Análisis Univariado: Para ello se obtuvieron las medianas del grado de toxicidad, análisis descriptivo y percentiles.

Análisis Bivariado: Se obtuvieron las frecuencias de la toxicidad (hematológica, gastrointestinal, hepática, renal, etc.) en la cohorte de estudio, a partir del registro de la toxicidad de cada sistema durante los seis ciclos de quimioterapia de acuerdo a la tabla de la OMS (ANEXO 4), y a partir de las variables cualitativas las cuales se indican en la tabla 6 para graduar el grado de toxicidad, se crearon variables dicotómicas (1= 3 y 4 (elevada toxicidad); 2 =0,1 y2 (escasa o nula toxicidad). Posteriormente se calculó el Riesgo Relativo (RR) y se realizó 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. También se llevó a cabo la comparación del genotipo con las medianas de la toxicidad en cada uno de los sistemas analizados, mediante la prueba de U de Mann-Whitney. Para dicho análisis se utilizó el software de SPSS versión 20.0. Finalmente se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes rs1799853 y rs1057910 del gen *CYP2C9* en la cohorte de estudio, y asumiendo que existe transmisión mendeliana, se analizó si existe equilibrio de Hardy-Weinberg mediante prueba de Chi cuadrada comparando los valores observados con los esperados.

7. RESULTADOS.

7.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.

Se analizó una cohorte de 90 pacientes con diagnóstico de TMS, de los cuales 40 (44.5%) fueron sexo femenino y 50 (55.5%) sexo masculino, encontrando que la mediana de la edad fue de 8 y 8.5, respectivamente. (Gráfico 1).

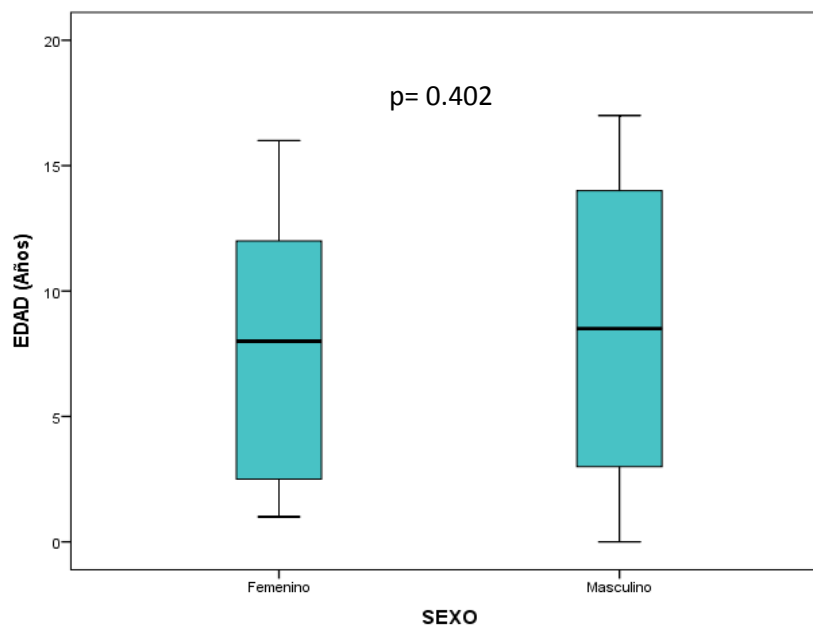


Gráfico 1. Comparación de medianas de edad entre las categorías de sexo.

Respecto a los TMS más frecuentes se encontraron los Retinoblastomas (21.2%) y tumores del Sistema Nervioso Central (SNC), dentro de este último grupo se incluye Meduloblastoma (5.6%), Neuroblastoma (4.5%), Epéndimoma (3.3%), Glioblastoma (2.2%), Pineoblastoma (2.2%) y Neuroepitelioma (1.1%); posteriormente encuentran los Sarcomas de partes blandas (16.7%).

Los menos frecuentes fueron tumor Rabdoide (6.6%), Hepatoblastoma (3.3%) y tumor de Wilms (1.2%). (Tabla 8).

Tabla 8. Frecuencia de los Tumores Sólidos encontrados en la población de estudio.

TIPO DE TUMOR	N	%
Retinoblastoma	19	21.2
Tumores del SNC	17	18.9
Sarcomas	15	16.7
Tumor de Ewing	11	12.2
Tumor Germinal	10	11.1
Osteosarcoma	8	8.8
Tumor Rabdoide	6	6.6
Hepatoblastoma	3	3.3
Tumor de Wilms	1	1.2
TOTAL	90	100

El diagnóstico que prevaleció en los distintos grupos de edad establecidos por la OMS fue el Retinoblastoma en pacientes menores de 5 años, mientras que en el grupo de 5 a 9 años el más frecuente fue Meduloblastoma, para el grupo de 10 a 14 años prevalecieron los Sarcomas de partes blandas y finalmente para los pacientes de 15 a 17 años de edad se reportaron más casos de Osteosarcoma y Tumor Germinal. (Gráfico 2).

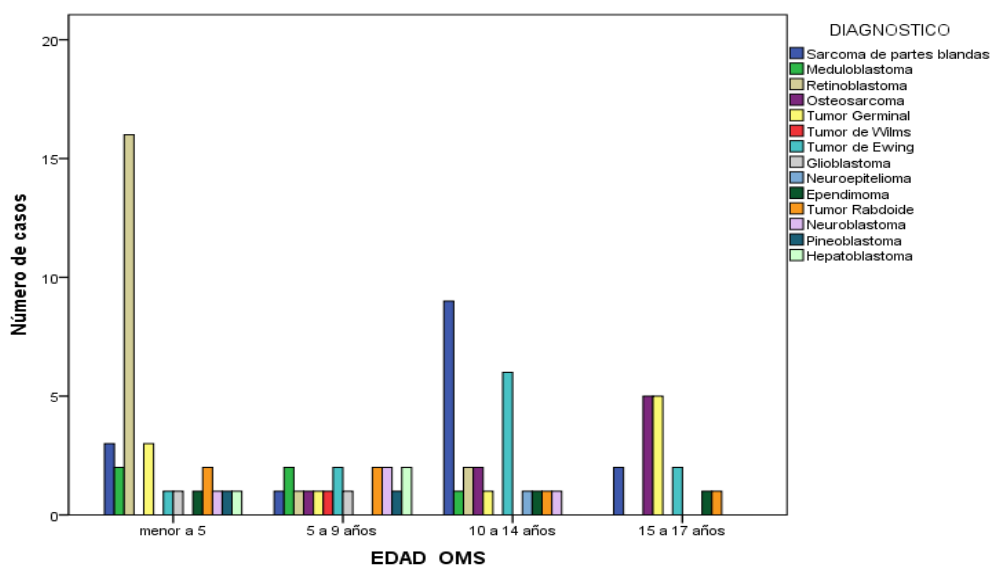


Gráfico 2. Frecuencia de Diagnóstico en población estudiada según el grupo de edad.

Se realizó un análisis de las características generales de la cohorte de acuerdo al ciclo de quimioterapia al final del estudio, encontrando que el 63.3% completaron los seis ciclos de quimioterapia con IFM y el 13.3% de los pacientes han fallecido. (Tabla 9).

Tabla 9. Ciclos con quimioterapia en la cohorte al final del estudio.

Ciclo de Quimioterapia (Total)	N	%
1	90	100
2	87	96.6
3	85	94.4
4	77	85.5
5	66	73.3
6	57	63.3
Pacientes Fallecidos		
Si	12	13.3
No	78	86.7

También se analizaron los antecedentes familiares de alguna enfermedad crónico degenerativa en la población estudiada, en donde se encontró que un 12.2% y un 27.8% de los pacientes tienen un familiar de primera y segunda línea con Cáncer, respectivamente. Además, un 34.4% afirmó tener un familiar de primera línea con Diabetes Mellitus (DM) y en cuanto a la Hipertensión Arterial (HAS) un 23.3% de los pacientes afirmó tener un familiar de primera línea con dicha enfermedad. (Tabla 10).

Tabla 10. Antecedentes familiares de enfermedades crónico degenerativas en la población de estudio.

	Antecedentes de 1 ^{ra} Línea		Antecedentes de 2 ^{da} Línea	
	N	%	N	%
Cáncer	11	12.2	25	27.8
Diabetes Mellitus	31	34.4	-	-
Hipertensión Arterial	21	23.3	-	-

7.2 FRECUENCIAS GÉNICAS EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA.

Se analizaron 89 muestras de DNA provenientes de los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión, mediante PCR en Tiempo Real (RT-PCR) con sondas TaqMan, encontrando las siguientes frecuencias génicas:

Para el rs1799853 se encontró una frecuencia para el genotipo CC de 0.90 (90 %), para el genotipo heterocigoto CT de 0.10 (10%) y para el genotipo TT una frecuencia de 0.00 (0.0%). Respecto a la distribución alélica se encontró para el alelo C de 0.95 y para el alelo T de 0.05.

Y para el rs1057910 la frecuencia para el genotipo AA fue de 0.978 (97.8%), para el genotipo AC fue de 0.022 (2.2%) y para el genotipo CC una frecuencia de 0.0 (0.0%). La distribución alélica fue de 0.99 para el alelo A y de 0.01 para el alelo C. Ambos polimorfismos en esta población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg (Tabla 11).

Tabla 11. Frecuencia genotípica y distribución alélica de los polimorfismos en CYP2C9.

VARIANTE	N (89)	GENOTIPO	FRECUENCIA GENOTÍPICA	FRECUENCIA ALÉLICA
rs1799853 C/T	80	CC	0.90 (90%)	(C) 0.95 (T) 0.05
	9	CT	0.10 (10%)	
	0	TT	0.00 (0.0%)	
rs1057910 A/C	87	AA	0.978 (97.8%)	(A) 0.99 (C) 0.01
	2	AC	0.022 (2.2%)	
	0	CC	0.00 (0.0%)	

7.3 TOXICIDAD EN PACIENTES CON TUMORES SÓLIDOS.

7.3.1 FRECUENCIA DE LA TOXICIDAD HEMATOLÓGICA.

Se obtuvo la frecuencia de la toxicidad hematológica de la cohorte de estudio, durante los seis ciclos de quimioterapia. Los porcentajes entre los pacientes que presentaron elevada toxicidad y aquellos que registraron escasa o nula toxicidad, se muestran en la tabla 12, encontrando que en todos los ciclos la mayoría de los pacientes presentó alta toxicidad hematológica.

Tabla 12. Frecuencia de toxicidad hematológica registrada durante los seis ciclos de quimioterapia en la cohorte de pacientes.

Variable dicotómica	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5	Ciclo 6
Elevada Toxicidad	65.9%	65.9%	80.5%	79.7%	81.5%	73.6%
Escasa o nula Toxicidad	34.1%	34.1%	19.5%	20.3%	18.5%	26.4%

También se obtuvieron los riesgos relativos (RR) para cada una de las variantes alélicas estudiadas. Encontrando que las variantes estudiadas no se asociaron a la toxicidad hematológica $p > 0.05$.

Hasta este momento, con este número de muestra, el valor de p apenas resulta significativa (0.051) para la variante rs1799853; debido a que se encontró un RR= 0.22, los pacientes con el alelo T de esta variante presentan un factor protector para la toxicidad hematológica comparado con los pacientes sin la variante (IC95% 0.064-0.812). Los pacientes con la variante rs1057910 no aumenta el riesgo de presentar toxicidad hematológica comparada con los pacientes sin la variante, con este tamaño de muestra (valores estadísticamente significativos $p < 0.05$). (Tabla 13).

Tabla 13. Riesgo Relativo (RR) de la toxicidad hematológica en pacientes con la variante alélica rs1799853 o rs1057910 comparado con los pacientes sin la variante.

SNP	Riesgo Relativo de la Toxicidad Hematológica.					
	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3	
	RR (IC95%)	Valor de p	RR (IC95%)	Valor de p	RR (IC95%)	Valor de p
1799853	0.43 (0.104-0.1.771)	0.354	0.228 (0.064-0.812)	0.051	NC	NC
1057910	NC	NC	NC	NC	NC	NC
SNP	Ciclo 4		Ciclo 5		Ciclo 6	
	RR (IC95%)	Valor de p	RR (IC95%)	Valor de p	RR (IC95%)	Valor de p
	1799853	0.606 (0.80-4.558)	0.509	NC	NC	NC
1057910	NC	NC	1.0 (0.488-2.046)	1.0	1.0 (0.60-1.665)	1.0

NC= No Calculable

7.3.1.1 MEDIANAS DE GRADO DE TOXICIDAD HEMATOLÓGICA 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. En el gráfico 3 se representa las medianas de acuerdo a la categoría de sexo (A) y de edad (B), en donde se puede observar que las medianas de la toxicidad hematológica son grado 3 y 4, tanto en hombres como mujeres, y en los diferentes grupos de edad OMS. Con un conteo de linfocitos <1000, grado 3 y 4 en todos los ciclos.

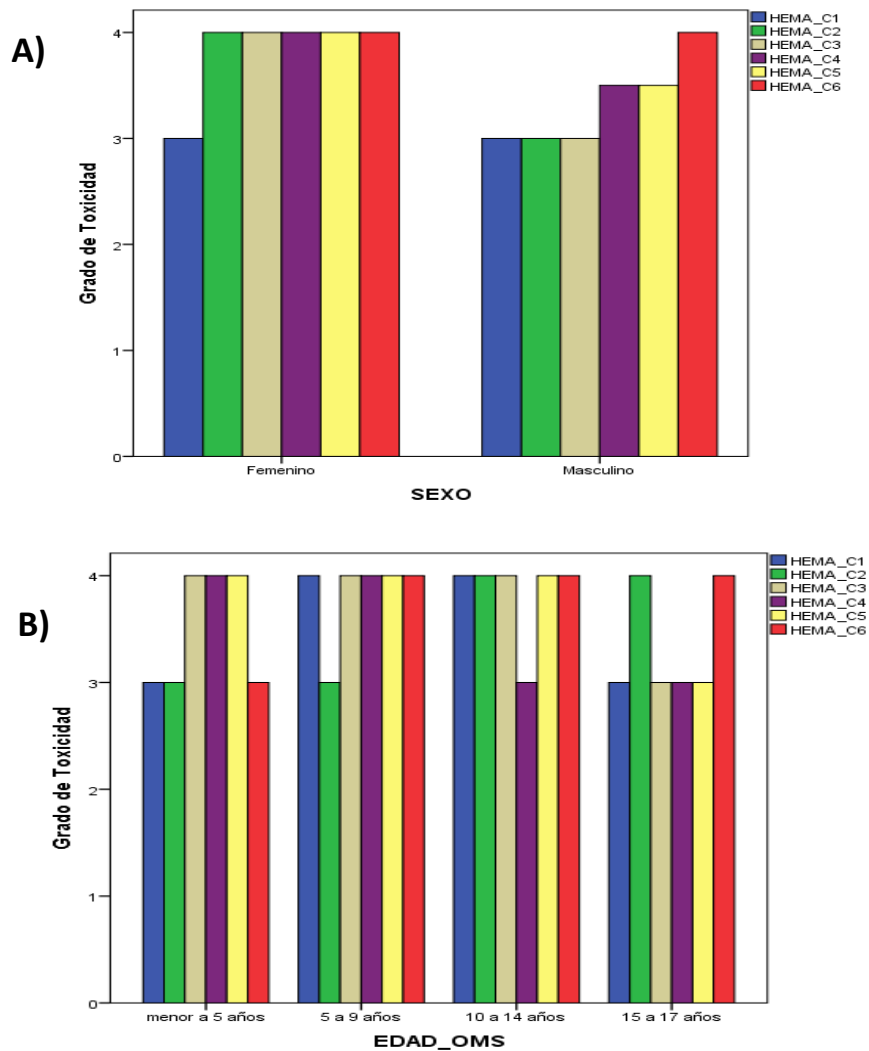


Gráfico 3. Frecuencia de medianas del grado de toxicidad hematológica durante los seis ciclos de quimioterapia en la cohorte de estudio. A) Categoría de sexo; B) Grupos de edad OMS.

7.3.2 FRECUENCIA DE LA TOXICIDAD GASTROINTESTINAL.

Se obtuvo la frecuencia de la toxicidad gastrointestinal de la cohorte de estudio, durante los seis ciclos de quimioterapia. Los porcentajes entre los pacientes que presentaron elevada toxicidad y aquellos que registraron escasa o nula toxicidad, se muestran en la tabla 14, encontrando que la toxicidad gastrointestinal fue menos frecuente en todos los ciclos de la quimioterapia, en comparación a la hematológica.

Tabla 14. Frecuencia de toxicidad gastrointestinal registrada durante los seis ciclos de quimioterapia en la cohorte de pacientes.

Variable dicotómica	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5	Ciclo 6
Elevada Toxicidad	10.0%	5.7%	9.4%	7.8%	4.5%	3.4%
Escasa o nula Toxicidad	90.0%	94.3%	90.6%	92.2%	95.5%	96.6%

Se calcularon los riesgos relativos (RR) para conocer si la toxicidad gastrointestinal reportada era debida a una de las dos variantes alélicas en estudio. Se reporta en la Tabla 15, que tanto para la variante alélica rs1799852 (C/T) como para la variante alélica rs1057910 (A/C), no se asociaron a la toxicidad ($p \geq 0.05$).

Tabla 15. Riesgo Relativo (RR) de la toxicidad gastrointestinal en pacientes con la variante alélica rs1799853 o rs1057910 comparado con los pacientes sin la variante.

Riesgo Relativo de la Toxicidad Gastrointestinal.						
SNP	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3	
	RR (IC95%)	Valor de p	RR (IC95%)	Valor de p	RR (IC95%)	Valor de p
1799853	0.616 (0.083-4.572)	1.0	0.472 (0.063-3.534)	0.677	0.563 (0.074-4.272)	1.0
1057910	NC	NC	NC	NC	NC	NC
SNP	Ciclo 4		Ciclo 5		Ciclo 6	
	RR (IC95%)	Valor de p	RR (IC95%)	Valor de p	RR (IC95%)	Valor de p
1799853	0.537 (0.069-4.171)	1.0	NC	NC	NC	NC
1057910	NC	NC	1.0 (0.659-1.516)	1.0	1.0 (0.522-1.912)	1.0

NC= No Calculable

7.3.2.1 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 1 tanto en mujeres (ciclo 1, 2 y 3) como en hombres (ciclo 1). (Gráfico 4-A). También se llevó a cabo el análisis de la toxicidad gastrointestinal durante los seis ciclos de la quimioterapia de acuerdo a los grupos de edad según la OMS. Se pudo observar que en todos los grupos (Menor a 5 años, de 5 a 9 años, de 10 a 14 años y de 15 a 17 años) la toxicidad se mantuvo en grado 1. (Gráfico 4-B).

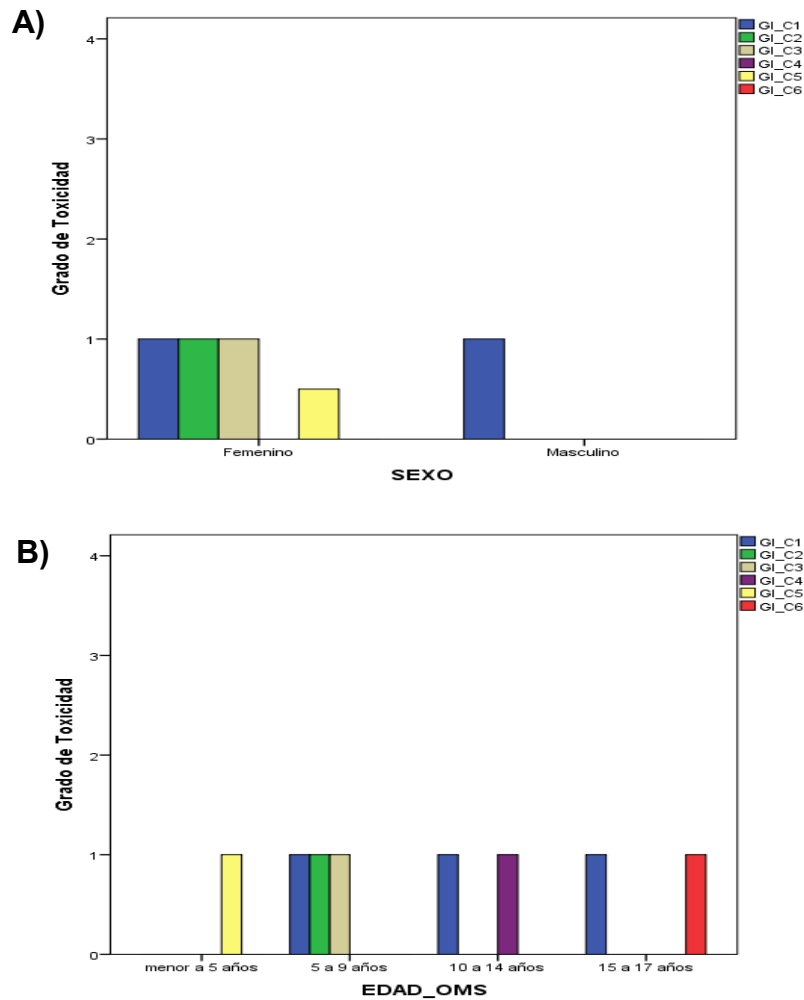


Gráfico 4. Frecuencia de medianas del grado de toxicidad gastrointestinal durante los 6 ciclos de quimioterapia en la cohorte de estudio. A) Categoría de sexo; B) Grupos de edad OMS.

7.3.3 FRECUENCIA DE LA TOXICIDAD HEPÁTICA.

Se calculó la frecuencia de la toxicidad hepática durante los seis ciclos de quimioterapia de la cohorte de estudio. Los porcentajes entre los pacientes que presentaron elevada toxicidad y aquellos que registraron escasa o nula toxicidad, se muestran en la tabla 16, encontrando que la toxicidad hepática fue menos frecuente en todos los ciclos de la quimioterapia, incluso en el ciclo 2 el 0% de los pacientes presentó elevada toxicidad.

Tabla 16. Frecuencia de toxicidad hepática registrada durante los seis ciclos de quimioterapia en la cohorte de pacientes.

Variable dicotómica	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5	Ciclo 6
Elevada Toxicidad	3.5%	0%	1.3%	1.4%	3.5%	2.1%
Escasa o nula Toxicidad	96.5%	100%	98.7%	98.6%	96.5%	97.9%

También se calcularon los riesgos relativos (RR), observando que tanto para la variante alélica rs1799852 (C/T) como para la variante alélica rs1057910 (A/C), con este tamaño de muestra, no se asociaron a la toxicidad hepática $p \Rightarrow 0.05$. (Tabla 17).

Tabla 17. Riesgo Relativo (RR) de la toxicidad hepática en pacientes con la variante alélica rs1799853 o rs1057910 comparado con los pacientes sin la variante.

SNP	Riesgo Relativo de la Toxicidad Hepática.					
	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3	
	RR (IC95%)	Valor de p	RR (IC95%)	Valor de p	RR (IC95%)	Valor de p
1799853	2.027 (0.289-14.202)	0.437	3 (0.532-16.897)	0.322	0	1.0
1057910	0	1.0	0	1.0	NC	NC
SNP	Ciclo 4		Ciclo 5		Ciclo 6	
	RR (IC95%)	Valor de p	RR (IC95%)	Valor de p	RR (IC95%)	Valor de p
1799853	0	1.0	4 (0.530-30.161)	0.281	0	1.0
1057910	0	1.0	1 (0.486- 2.056)	1.0	1 (0.434-2.299)	1.0

NC= No Calculable

7.3.3.1 MEDIANAS DE GRADO DE TOXICIDAD HEPÁTICA POR SEXO Y GRUPO DE EDAD.

Se llevó a cabo el análisis de las medianas de la toxicidad hepática de acuerdo al sexo durante los seis ciclos de quimioterapia, encontrando que los pacientes no presentaron toxicidad en este sistema, ya que ni en mujeres ni en hombres se registró toxicidad igual o superior al grado 1.

En cuanto al análisis de la toxicidad de dicho sistema durante los seis ciclos de la quimioterapia de acuerdo a los grupos de edad según la OMS, se observa que en todos los grupos (Menor a 5 años, de 5 a 9 años, de 10 a 14 años y de 15 a 17 años) la toxicidad se mantuvo en grado 1. (Gráfico 5-A).

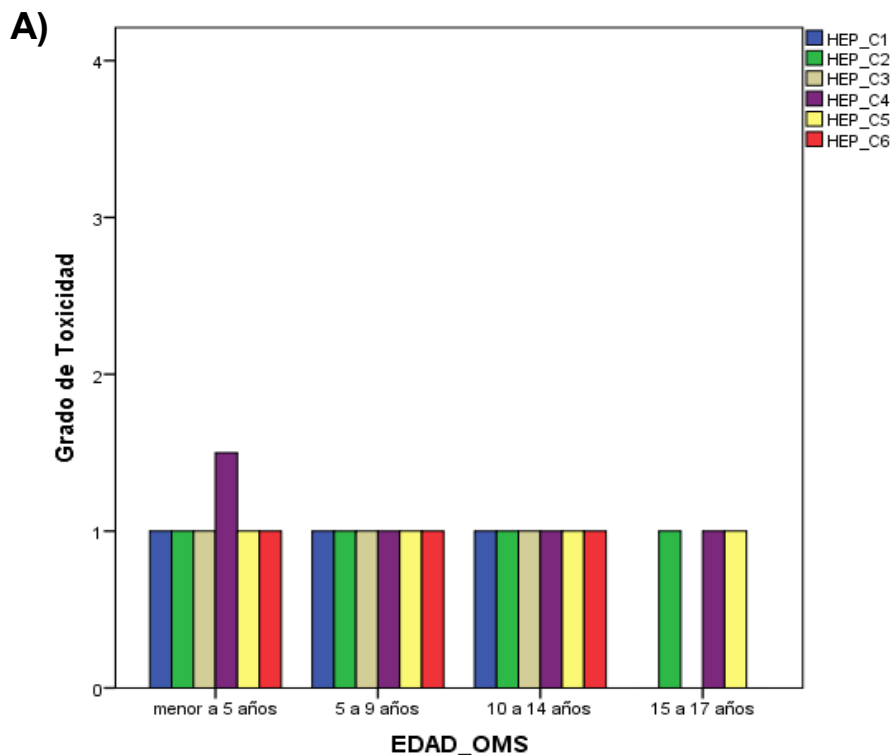


Gráfico 5. Frecuencia de medianas del grado de toxicidad hepática durante los 6 ciclos de quimioterapia en la cohorte de estudio. A) Grupos de edad OMS.

7.3.4 FRECUENCIA DE LA TOXICIDAD NEUROLÓGICA.

De igual forma se obtuvo la frecuencia de la toxicidad neurológica de la cohorte estudio, durante los seis ciclos de quimioterapia. Los porcentajes entre los pacientes que presentaron elevada toxicidad y aquellos que registraron escasa o nula toxicidad, se muestran en la tabla 18, encontrando que en todos los ciclos de quimioterapia se presentó un porcentaje mínimo de elevada toxicidad, para el ciclo 4 y 6 se reporta toxicidad en grado 0.

Tabla 18. Frecuencia de toxicidad neurológica registrada durante los seis ciclos de quimioterapia en la cohorte de pacientes.

Variable dicotómica	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5	Ciclo 6
Elevada Toxicidad	6.7%	4.6%	1.2%	0%	1.5%	0%
Escasa o nula Toxicidad	93.3%	95.4%	98.8%	100%	98.5%	100%

Dado que la toxicidad observada fue baja; el 3.3% de la población de estudio presentan un bajo grado de toxicidad (grado 1) para sistema Neurosensorial; el 51% presentó toxicidad para el sistema Neuromotor (grados 1, 2,3 y 4); el 33.3% de la población en estudio registró toxicidad Neurocortical (grado 1, 2 y 4), en donde sólo un paciente presentó toxicidad grado 4; se reporta que el 5.5% de los pacientes presentaron toxicidad Neurocerebelar (grado 1 y 2); 11% presentó Cefalea, el 23.2% presentaron Estreñimiento (grado 1, 2 y 3), solamente dos pacientes (2.2%) presentaron toxicidad grado 1 en audición y tres pacientes (3.3%) presentaron toxicidad grado 1 y 3 en visión. (Tabla 19).

Tabla 19. Frecuencia de la toxicidad neurológica (por cada sistema) en la cohorte de pacientes.

Neurosensorial N (%)		Neuromotor N (%)		Neurocortical N (%)	
Grado 1	3 (3.3%)	Grado 1	28 (31.1%)	Grado 1	26 (28.9%)
		Grado 2	15 (16.6%)	Grado 2	3 (3.3%)
		Grado 3	2 (2.2%)	Grado 4	1 (1.1%)
		Grado 4	1 (1.1%)		
Neurocerebelar N (%)		Cefalea N (%)		Estreñimiento N (%)	
Grado 1	3 (3.3%)	Grado 1	6 (6.6%)	Grado 1	11 (12.2%)
Grado 2	2 (2.2%)	Grado 3	4 (4.4%)	Grado 2	6 (6.6%)
				Grado 3	4 (4.4%)
Audición N (%)			Visión N (%)		
Grado 1	2 (2.2%)		Grado 1	1 (1.1%)	
			Grado 3	2(2.2%)	

7.4 COMPARACIÓN DEL GENOTIPO CON LAS MEDIANAS DE LA CONCENTRACIÓN DE IFOSFAMIDA EN SANGRE ENTRE PACIENTES CON LA VARIANTE Y SIN LA VARIANTE.

Se analizó la comparación del genotipo con las medianas de la concentración de ifosfamida en sangre en una N=73 a las 12 horas y una N=74 a las 24 horas de término de la última infusión, debido a que no todos los pacientes de la cohorte final de estudio (N=90) contaban con muestra de 12 y 24 horas. Encontrando que para la variante rs1799853 se observa una diferencia en la concentración de ifosfamida a las 24 horas entre los pacientes con genotipo normal (C/C) comparado con los pacientes con genotipo heterocigoto (C/T), siendo el valor de $p=0.013$. Para el rs1057910 se observa diferencias en las concentraciones a las 12 y 24 horas, aunque la asociación no alcanza a ser significativa ($p>0.05$). (Tabla 20).

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

rs	SNP	Concentración de Ifosfamida (µMol/L)					
		12 Hrs.			24 Hrs.		
		N=73 (%)	Mediana (Q ₁ -Q ₃)	Valor de p	N=74 (%)	Mediana (Q ₁ -Q ₃)	Valor de p
1799853	C/C	66 (90.4)	20.0 (11.25- 69.25)	0.534	69 (93.2)	3.0 (1-11.5)	0.013
	C/T	7 (9.6)	30.0 (13.5-70.5)		5 (6.8)	20.0 (3.5-99)	
1057910	A/A	72 (98.6)	20.0 (12-61)	0.967	73 (98.6)	3.0 (1-16)	0.702
	A/C	1 (1.4)	51.5 (4- 99)		1 (1.4)	50.0 (1-99)	

7.5 FRECUENCIA DE LA RESPUESTA A TRATAMIENTO EN LA COHORTE DE ESTUDIO.

Se calculó la frecuencia de la respuesta a tratamiento en la cohorte de estudio al final de los ciclos de quimioterapia. El número de pacientes y el porcentaje representativo se registraron en la tabla 21, encontrando que el 35.6% (N=32) de la población tuvo como respuesta progresión de la enfermedad y un 22.2% (N=20) presentó Respuesta completa, lo que indica la erradicación completa de la enfermedad.

Tabla 21. Frecuencia de la Respuesta a Tratamiento en la cohorte de pacientes.

TIPO DE RESPUESTA	N	%
Respuesta Completa	20	22.2
Respuesta Parcial	24	26.6
Enfermedad Estable	9	10.0
Progresión de la Enfermedad	32	35.6
No Valorables	5	5.6
TOTAL	90	100

También se obtuvieron los riesgos relativos (RR) para cada una de las variantes alélicas de estudio, para ello se realizaron variables dicotómicas; para fracaso al tratamiento (se consideró a la enfermedad estable y progresión de la enfermedad) y éxito al tratamiento (cuando la respuesta fue completa y parcial). Encontrando para la variante rs1799853 a ocho pacientes con genotipo CT. En el caso del rs1057910 los dos pacientes con genotipo AC presentaron fracaso al tratamiento, por lo que de acuerdo al intervalo de confianza se considera que el incremento en el riesgo es estadísticamente significativo (OR= 2.157, IC95%:1.709- 2.723). (Tabla 22).

Tabla 22. Riesgo Relativo (RR) de la Respuesta a Tratamiento en pacientes con la variante alélica rs1799853 o rs1057910 comparado con los pacientes sin la variante.

Variante	Fracaso al Tx.	Éxito al Tx.	RR	IC 95%	p
1799853					
CC	37	39	1.041	(0.501-2.165)	0.914
CT	4	4			
Variante	Fracaso al Tx.	Éxito al Tx.	RR	IC 95%	p
1057910					
AA	39	43	2.157	(1.709- 2.723)	0.133
AC	2	0			

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

En el presente estudio, se evaluó la asociación de dos variantes en un gen de metabolismo de ifosfamida (*CYP2C9*) y los niveles de ifosfamida, la toxicidad, así como la respuesta a tratamiento en 90 pacientes con tumores sólidos embrionarios.

El gen *CYP2C9* es un gen altamente polimórfico y ya se ha estudiado en otras poblaciones para otros fármacos como warfarina, tolbutamida, fenitoina, losartan y numerosos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Castelán y col. en 2013 reporto en individuos sanos de poblaciones mexicanas las frecuencias alélicas para los polimorfismos rs1799853 y rs1057910, encontrando para la variante rs1799853 que el alelo más frecuente es el C con una frecuencia de 0.945 y de 0.051 para el alelo T; así mismo para la variante rs1057910 el alelo más frecuente fue el A con una frecuencia de 0.961 y de 0.039 para el alelo C⁴⁷. En este estudio las frecuencias encontradas en pacientes con tumores sólidos, fueron similares a las ya reportadas^{48,49} así como en la base de datos HAP-MAP.

Existen 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, pero no hay datos por ciclo de quimioterapia. Por lo que en este trabajo se evaluó la incidencia de toxicidad (hematológica, gastrointestinal, hepática, neurológica, etc.) en una cohorte de 90 pacientes con tumores sólidos en cada uno de los ciclos de tratamiento. En esta cohorte de pacientes se encontró a la toxicidad hematológica como la más frecuente en grado 4 durante los seis ciclos de quimioterapia, siendo el parámetro más afectado los linfocitos con una proporción muy elevada de toxicidad (grado 4), debido a que la IFM produce una reducción de células, al actuar sobre la maduración y proliferación de sus células precursoras.⁵⁰ Se ha reportado que, para la población adulta, la toxicidad más frecuente es la neurotoxicidad, manifestada por encefalopatía en el 40% de los pacientes tratados con IFM^{51, 52, 53}. 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%^{54, 55}. En esta cohorte de pacientes pediátricos con TMS, el comportamiento no fue el reportado.

Se calcularon los RR para conocer si alguna de las variantes alélicas aumentaba el riesgo de presentar toxicidad hematológica y no se encontró que alguna variante aumente el riesgo desarrollar toxicidad debido a que no se encontraron diferencias significativas con este tamaño de muestra. Sin embargo, se observó que los pacientes con el alelo T para la variante rs1799853 presentaron 4.5 veces menor riesgo de presentar toxicidad hematológica (RR=0.228 IC95%:0.064-0.812), comparado con los pacientes sin la variante con este tamaño de muestra.

También se evaluaron los niveles de IFM en sangre, pues se ha observado que tiene ventajas como marcador de toxicidad, ya que esta toxicidad podría estar asociada directamente con la cantidad de IFM en sangre y se podría realizar un ajuste de dosis en caso de ser necesaria. Encontrando que para la variante rs1799853 el presentar el alelo de riesgo se asoció a mayor concentración de IFM en sangre comparado con los pacientes sin la variante ($p=0.013$). En el estudio de Lee C y col. en 2002, se demostró que individuos portadores de los alelos *CYP2C9**2 y *3 están asociados a reducciones significativas en el aclaramiento intrínseco de fenitoina⁵⁶, lo que los clasifica como metabolizadores lentos. Por otro lado, Yasar y col. 2002, observaron que pacientes con alelo T de la variante rs1799853, se asociaban a una baja respuesta a losartan⁵⁷, mientras que Griskevicius y col. en el 2003, encontraron la misma asociación para esta variante, solo que el fármaco en estudio era Ciclofosfamida⁵⁸.

Para la variante rs1057910, se observó la misma tendencia, los pacientes con la variante alélica C acumularon mayor concentración de IFM en sangre comparado con los pacientes sin la variante. Aunque con este tamaño de muestra la p no alcanza a ser significativa. Goldstein y col. en el 2003 encontró que el alelo C de la variante rs1057910 se asoció a toxicidad grave durante el tratamiento con Warfarina^{59, 60}.

Finalmente, se analizaron los RR para conocer si alguna de las variantes se asociaba al fracaso en la respuesta al tratamiento. Hallando diferencias estadísticamente significativas para la variante rs1057910 (RR=2.157, IC95%: 1.709- 2.723), en donde se encontró que los pacientes portadores del genotipo heterocigoto (A/C) obtuvieron como respuesta al tratamiento, progresión de la enfermedad, lo que indica que lejos de responder a la quimioterapia con IFM, la enfermedad siguió avanzando, dando como resultado una mala respuesta a tratamiento. En el estudio realizado por Tatyana A. y col. 2012, se observó una correlación significativa entre las variantes rs1799853 y rs1057910 y la resistencia a diferentes esquemas de quimioterapia los cuales incluían Ciclofosfamida, Metrotexate, Fluorouracilo y Doxorubicina, en mujeres de Siberia con cáncer de mama⁶¹.

Limitaciones del estudio.

Para la toxicidad renal, cardíaca y tensión arterial no se pudo llevar a cabo el análisis debido a un restringido seguimiento a los pacientes en estos sistemas y debido a la falta de datos y/o exámenes que no se realizaban de manera rutinaria a los pacientes, por lo cual, no se asegura la ausencia de toxicidad en los pacientes incluidos en este estudio.

No todos los resultados obtenidos en este estudio son estadísticamente significativos, debido principalmente a la baja frecuencia de las variantes alélicas de *CYP2C9* para la población mexicana. Además de la influencia de los diferentes esquemas empleados a cada paciente, ya que algunos pacientes no solo eran tratados con IFM y los estudios de rutina no se hicieron en los seis ciclos de la quimioterapia.

Perspectivas.

Se espera contribuir con más información de los genes que intervienen en la vía metabólica de la IFM. Para ello se están analizando variantes alélicas en otros genes que participan en la vía metabólica de la IFM tal como; *CYP2B6*, *CYP3A4* y *CYP3A5*. Ya que se ha demostrado que variantes alélicas de tipo SNP se han

asociado a toxicidad y respuesta a tratamiento en otras poblaciones genéticamente diferentes a la nuestra, por lo que se busca establecer regímenes de administración y dosificación adecuados a nuestra población. Esta investigación busca un impacto directo en fortalecer el esquema de quimioterapia individualizada.

9. CONCLUSIONES.

Se halló que la toxicidad más frecuente observada en esta cohorte de estudio fue la hematológica, grado 4, siendo los linfocitos, el parámetro más afectado de este sistema.

La toxicidad hematológica presentada tanto en hombres como en mujeres en los seis ciclos de quimioterapia no presentó diferencias estadísticamente significativas.

Los pacientes con la variante rs1799853 presentaron 4.5 veces menor riesgo de presentar toxicidad hematológica, comparado con los pacientes sin la variante.

El alelo T en la variante rs1799853 se asoció a mayor concentración de IFM en sangre comparado con alelo C en los pacientes de esta cohorte.

Finalmente, se observó una asociación entre el genotipo heterocigoto (A/C) para el rs1057910 y fracaso en la respuesta al tratamiento para tumores sólidos.

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 EN 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.

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.

Es un estudio que se llevará 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.

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 por punción en un dedo **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 sus metabolitos, y además que nos responda un cuestionario de toxicidad. El estudio tendrá una duración de 3 años.

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.

¿Cómo se realizará 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 pasa si tengo (tengo 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.

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 médico del estudio también 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.

aplica)

- a) Después del estudio su DNA así como la sangre y plasma **se desecharán** 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 identificará 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)	_____ Fecha
_____ Recibí copia de este consentimiento	
_____ 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.

“T x

CY 450

”.

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.

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.

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.

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 por punción en un dedo a las 12 y 24 hrs después de **concluir la última infusión de la ifosfamida**, para la cuantificación de los metabolitos y además responda un cuestionario de toxicidad. El estudio tendrá una duración de 2 años.

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).

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.

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. (APLICADO PARA LOS SEIS CICLOS). TOXICIDAD ASOCIADA A VARIANTES ALÉLICAS EN GENES DE CYP450 EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON TUMORES SÓLIDOS EMBRIONARIOS TRATADOS CON IFOSFAMIDA.

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

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

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 PRESENTÓ 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"/> nauseas(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 asintomático) (tinnitus) (funcion) (sordera)	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"/> nauseas(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 funcion) (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 asintomático) (tinnitus) (funcion) (sordera)	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"/> nauseas(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) (pérdida sensorial grave) 6 <input type="checkbox"/> Neuromotor (debilidad) (leve debilidad) (deterioro funcion) (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 asintomático) (tinnitus) (funcion) (sordera)

	12 <input type="checkbox"/> visión (pérdida subtotal 3) (severa 4) 13 <input type="checkbox"/> OTROS _____	12 <input type="checkbox"/> visión (pérdida subtotal 3) (severa 4) 13 <input type="checkbox"/> OTROS _____	12 <input type="checkbox"/> visión (pérdida subtotal 3) (severa 4) 13 <input type="checkbox"/> OTROS _____
9. POR CUANTO TIEMPO PRESENTÓ EL (LOS EVENTOS)?	1 <input type="checkbox"/> Horas ____ 2 <input type="checkbox"/> Días ____ 3 <input type="checkbox"/> Semanas ____ 4 <input type="checkbox"/> Otro ____	1 <input type="checkbox"/> Horas ____ 2 <input type="checkbox"/> Días ____ 3 <input type="checkbox"/> Semanas ____ 4 <input type="checkbox"/> Otro ____	1 <input type="checkbox"/> Horas ____ 2 <input type="checkbox"/> Días ____ 3 <input type="checkbox"/> Semanas ____ 4 <input type="checkbox"/> Otro ____
10. LE RECETÓ ALGO SU MÉDICO PARA DETENER EL EVENTO?	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
11.- QUE FÁRMACO LE RECETO?			
12.- POR CUANTO TIEMPO TOMÓ EL FÁRMACO?	___ ___ Días	___ ___ Días	___ ___ Días
13.-HUBO RESPUESTA AL TRATAMIENTO ONCOLÓGICO?	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.- COMO 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

ANEXO 4. TABLA DE TOXICIDAD DE LA OMS.

Toxicidad Hematológica.					
Grado de Toxicidad	0	1	2	3	4
Leucocitos (µL)	4.0	3.0-3.9	2.0-2.9	1.0-1.9	<1.0
Plaquetas (nL)	150-400	75.0	50.0-74.9	25.0-49.9	<25.0
Hemoglobina (nL)	11 (F) 13 (M)	10.0	8.0-10.0	6.5-7.9	<6.5
Neutrófilos Totales (µL)	>2.0	1.5-1.9	1.0-1.4	0.5-0.9	<0.5
Linfocitos (µL)	>2.0	1.5-1.9	1.0-1.4	0.5-0.9	<0.5

Toxicidad Gastrointestinal.					
Grado de Toxicidad	0	1	2	3	4
Náuseas	No	Capaz de comer	Disminución significativa	Casi no ingiere	No come
Vómito	No	1 episodio en 24 Hrs	2 a 5 episodios en 24 Hrs	6 a 10 episodios en 24 Hrs	>10 episodios en 24 Hrs
Diarrea	No	2 a 3 evacuaciones al día	4 a 6 evacuaciones al día; evacuaciones nocturnas y cólicos	7 a 9 evacuaciones al día; incontinencia, cólicos intensos	>10 evacuaciones al día, hematoquezia, requiere alimentación parental
Estomatitis	No	Úlceras sin dolor; eritema	Eritemas dolorosos; edema o úlceras, pero puede comer	Eritemas dolorosos; edema o úlceras, no puede comer	Requiere soporte parenteral o enteral

Toxicidad Hepática.					
Grado de Toxicidad	0	1	2	3	4
Bilirrubina Directa	<0.4	-	<1.5	1.5 -3.0	>3.0 cifras
Bilirrubina Total (mg/dL)	0.20 - 1				
Transaminasas					
ALT	5.0-46.0	115.0	230.0	920.0	>920.0
AST	5.0-37.0	92.5	185.0	740.0	>740.0
Fosfatasa Alcalina (IU/L)	30.0-110.0	111.0-275.0	550.0	2200.0	>2200.0

Toxicidad Renal.					
Grado de Toxicidad	0	1	2	3	4
Creatinina (mg/dL)	0.5-1.3	3.25	3.9	7.8	>7.8
Proteinuria (g/dL)	Negativo	<3.0	3.0-10.0	>10.0	Síndrome nefrótico
Hematuria	Negativo	Microscópico	Macroscópico	Microscópico con coágulos	Requiere transfusión

Toxicidad Cardíaca.					
Grado de Toxicidad	0	1	2	3	4
Disritmias	Ninguna	Asintomático transitorio; no requiere tratamiento	Recurrente o persistente pero no requiere tratamiento	Requiere tratamiento	Requiere monitoreo, taquicardia ventricular o fibrilación
Función cardíaca	Normal	Asintomático Disminuye la FEV a < 20% de su basal	Asintomático Disminuye la FEV a < 20% de su basal	Leve insuficiencia cardíaca que responde al tratamiento	Grave o insuficiencia congestiva o refractaria
Isquemia Cardíaca	Ninguna	Onda T aplanada inespecífica	Asintomático Ondas T y ST	Angina sin evidencia de	Infarto agudo al miocardio

			con cambios que sugieren isquemia	infarto	
Pericardio	Normal	Derrame asintomático, no requiere tratamiento	Pericarditis Dolor retroesternal con cambios ECG	Derrame sintomático que requiere drenaje	Taponamiento cardíaco que requiere drenaje urgente

Toxicidad en Presión arterial.					
Grado de Toxicidad	0	1	2	3	4
Hipertensión	Sin cambios	Incremento transitorio asintomático >de 20 mm Hg ó de > de 150/100	Incremento recurrente o persistente mayor de 20 mm Hg ó >50/100	Requiere tratamiento	Crisis Hipertensiva
Hipotensión	Sin cambios	Cambios que no requieren tratamiento	Requiere remplazo hídrico y TX, pero no hospitalización	Requiere TX y hospitalización por lo menos de 48 Hrs	Requiere TX y hospitalización por más de 48 Hrs

Toxicidad Neurológica.					
Grado de Toxicidad	0	1	2	3	4
Neurosensorial	No	Leve parestesia Pérdida de reflejos osteotendinos	Parestesias moderadas Pérdida sensorial moderada	Pérdida sensorial grave que interfiere con la función	-
Neuromotor	No	Subjetiva debilidad sin datos objetivos	Leve debilidad objetiva sin deterioro importante de la función	Debilidad objetiva con deterioro de la función.	Parálisis
Neurocortical	No	Leve somnolencia y agitación	Moderada somnolencia y agitación	Intensa somnolencia, agitación, alucinaciones, desorientación y confusión	Coma, convulsiones y psicosis tóxica
Neurocerebelar	No	Leve incoordinación, disdiadococi-nesia	Temblor de intención, disimetría, nistagmos, lenguaje confuso	Ataxia locomotora	Necrosis cerebelar
Cefalea	No	Leve	Moderada o intensa pero transitoria	Requiere TX	-
Estreñimiento	No	Leve	Moderado	Grave	Íleo más de 96 Hrs
Audición	No	Pérdida asintomática perceptible por audiometría	Tinnitus	Pérdida de la audición que interfiere con la función, pero corregible con ayuda	Sordera no corregible
Visión	No	-	-	Pérdida subtotal sintomática de la visión	Ceguera

11. REFERENCIAS.

1. Gavhane Y. N., Shete A. S., Bhagat A. K., Shinde V. R., Bhong K. K., Khairnar G. A., Yadav A. V. (2011). Solid Tumors: Facts, Challenges and Solutions. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)* Vol.2 (1), 1-12.
2. Temas de Salud Cáncer [en línea]. U.S: Organización Mundial de la Salud. (2014). [fecha de acceso 30 de Septiembre de 2016]. URL disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
3. Childhood Cancer Statistics [en línea]. U.S: American Childhood Cancer Organization. (2013). [fecha de acceso 30 de Septiembre de 2016]. URL disponible en: <http://www.acco.org/information/aboutchildhoodcancer/childhoodcancerstatistics.aspx/>
4. Catálogo de indicadores INP. (2012). Secretaría de Salud.
5. Sistema de Gastos Catastróficos, casos de cáncer en menores de 18 años. México: Comisión Nacional de Proyección Social en Salud. (periodo de información 2008-2010). SEED [en línea]. México: Dirección General de Información en Salud; 2008-2012. [Fecha de acceso 25 de Septiembre del 2016]. URL disponible en: <http://www.dgis.salud.gob.mx/cubos>
6. Sistema de Información Social en Salud, Informe de Resultados 2007. [en línea]. México: Comisión Nacional de Proyección Social en Salud. [Fecha de acceso 30 de Septiembre de 2016]. URL disponible en: http://www.seguropopular.salud.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=339&Itemid=388
7. Instituto Nacional de Pediatría. (2015). Agenda Estadística. Ciudad de México.
8. Instituto Nacional de Pediatría. (2014). Agenda Estadística. Ciudad de México.
9. González, G. (2010). Tumores sólidos en niños: diagnóstico y terapéutica quirúrgica. *Revista Médica Clínica Las Condes, Hospital Luis Calvo Mackenna*. 120-129.
10. Hirsch J. (2006). An anniversary for cancer chemotherapy. *JAMA*; 296: 1518-1520.
11. Mosquera JM, Galdos P. (2001). *Farmacología Clínica para enfermería*. Madrid, McGraw-Hill Interamericana.
12. Rivera R. Editor. (2010). *Protocolos Técnicos Cáncer en Niños*. Consejo Nacional para la prevención y el tratamiento del cáncer en la infancia y la adolescencia. 374 pp. Impreso en México ISBN 978-607-7817-10-9.
13. López Aguilar, E., & al. (2011). Neurotoxicidad por Ifosfamida. Informe de un caso y revisión bibliográfica. *GAMO*.
14. Wagner T. (1994). Ifosfamide clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*; 26: 439–56
15. Lowenberg Daniella, Caroline F. Thorn, Seruesenay Desta, David A. Flockhart, Russ B. Altman and Teri E. Klein. (2014). PharmGKB summary: ifosfamide pathways, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics, USA*; 24(2): 133–138.
16. Fármaco FAMIFODA. [En línea]. Laboratorio Alharma Medicamento. Última modificación: 02 de Abril del 2016 a las 04:57 pm. [Fecha de acceso 11 de Octubre de 2016]. URL disponible en: <http://mx.mivademeccum.com/medicamento-famifoda-id-27036>

17. Vredenburg, G., & al, e. (2015). Activation of the anticancer drugs cyclophosphamide and ifosfamide by cytochrome P450 BM3 mutants. Elsevier, 182-192.
18. Antineoplásicos en el tratamiento de Neoplasias de Cuello Uterino. [En línea]. Liga contra el Cáncer. 2008. [Fecha de acceso 11 de Octubre de 2016]. URL disponible en: <http://neoplasiaunmsm.peruforpeople.com/paginas/ifosfamida.html>
19. Lewis D. (2004). 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics*. 5(3): 305–318.
20. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich F. (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*. 270:414-23.
21. Guengerich FP, Gillam EM, Ohmori S, Sandhu P, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M. (1998). Expression of human cytochrome P-450 enzymes in yeast and bacteria and relevance to studies on catalytic specificity. *Toxicology*; 82:21-37
22. Ulrich M. Zanger and Matthias Schwab. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*. 138; 103–141.
23. Van Booven D., Marsh S., McLeod H., Carrillo MW, Sangkuhl K, Klein TE et al. (2010). Cytochrome P450 2C9- CYP2C9. *Pharmacogenet Genomics*: 20; 277-281.
24. Gray IC. Nobile C, Muresu R, Ford S, Spurr NK. (1995). A 2.4-megabase physical map spanning the CYP2C gene cluster on chromosome 10q24. *Genomics*; 28: 328-332.
25. Raimundo, S., Toscano, C., Klein, K., Fischer, J., Griese, E. -U., Eichelbaum, M., et al. (2004). A novel intronic mutation, 2988G>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2C9 in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 76, 128–138.
26. Kirchheiner J, Brockmöller J. (2005). Clinical Consequences of cytochrome P4502C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther*. 77:1-16.
27. CYP2C9 allele nomenclature. [En línea]. Hum. Cytochrome P450 Allele Nomencl. Database. [Fecha de acceso 19 de Octubre de 2016]. URL disponible en: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm>
28. Red de Farmacogenómica. Global Biotech Consulting Group. [En línea]. Fenotipos metabolizadores de fármacos. 2009. [Fecha de acceso 15 de Octubre de 2016]. URL disponible en: <http://www.gbcbiotech.com/farmacogenomica/fenotipos.html>
29. Kircheiner J, Tsahuridu M, Janbrane W, Roots I, et al. (2004) The CYP2C9 polymorphism: from enzyme kinetics to clinical dose recommendations. *Personalized Med*. 1(1): 63-84.
30. Lal S, Rao Js, Xiang X, Lim W-T, et al.(2006). Pharmacogenetics of target genes across the warfarin pharmacological pathway. *Clin Pharmacokinetic*. 45(12): 1189-1200.
31. Llerena A, Dorado P, O'kirwan F, Jepson R, et al. (2004). Lower frequency of CYP2C9*2 in Mexican-Americans compared to Spaniards. *Pharmacogen J*. 4: 403-6.
32. Kirchheiner J, Brockmöller J. (2005). Clinical Consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther*. 77:1-16.

33. Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1 – Rationale and perspectives. 2007. [Fecha de acceso 28 de Abril de 2017] URL disponible en: <http://sites.stedwards.edu/charlesh-binf341101sp2015-acallej/>
34. Rodriguez D. (2005). Impact of CYP2C9 genotype on pharmacokinetics: are cyclooxygenase inhibitors the same?. *Drug metabolism and disposition*. 33:1567–1575.
35. Van der Weide J, Steijns LS, van Weelden MJ, de Haan K. (2001). The effect of genetic polymorphism of cytochrome P-450 CYP2C9 on phenytoin dose requirement. *Pharmacogenetics*; 11:287-291.
36. Ewa Wypasek, Marek Cieśła, Bogdan Suder, Łukasz Janik, Jerzy Sadowski, Anetta Undas, (2015) Cyp2c9 Polymorphism And Unstable Anticoagulation With Warfarin In Patients Within The First 3 Months Following Heart Valve Replacement, *Adv Clin Exp Med*, 24, 607–614.
37. Yasar U, Lundgren S, Eliasson E, Bennet A, Wiman B, de Faire U, and Rane A. (2002). Linkage between the CYP2C8 and CYP2C9 genetic polymorphisms. *Biochem Biophys Res Commun*. 299:25–28.
38. Tatyana A Seredina, Olga B Goreva, Valeria O Talaban, Alevtina Yu Grishanova, Vyacheslav V Lyakhovich. (2012). Association of Cytochrome P450 Genetic Polymorphisms with Neoadjuvant Chemotherapy Efficacy In Breast Cancer Patients. *Bmc Medical Genetics*.
39. Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM, Miners JO, Birkett DJ, Goldstein JA. (1996). The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics* ;6:341-349
40. Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, Grandone E, Di Minno G. (2000). Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost*; 84:775-778.
41. Ames B, Lewis L, Chaffee S. et al. (2010). Ifosfamide-induced encephalopathy and movement disorder. *Pediatr Blood Cancer*. 54:624-6.
42. QUIAGEN. (14 de Septiembre 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>
43. BioTek. (7 de Octubre de 2016). BioTek Instruments. Obtenido de http://www.biotek.es/es/products/microplate_detection/epoch_microplate_spectrophotometer.htm?tab=accessories
44. STEP ONE. (06 de Octubre de 2016). Thermo Fisher. Obtenido de: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4376357>
45. Cervera Deval J. RECIST y el radiólogo. *Radiología* 2012;59(3):193:205.
46. Eisehauer, E., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L., Sargent D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwynter, S., Mooney, M., Rubinstein, L., Shankar, L., Dodd, L., Kaplan, R., Lacombe, D., and Verweij J. 2009. New response evaluation criteria in solid tumors: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer* 45:228-247.
47. Castelán-Martínez, O.D., et al. (2013). Allele frequency distribution of CYP2C9*2 and CYP2C9*3 polymorphisms in six Mexican populations, *Gene*. Elsevier B.V. All rights reserved.

48. dbSNP. Short Genetic Variations [En línea] NCBI-PubMed. Rs1799853 [Fecha de acceso 23 de Febrero de 2017]. URL disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs1799853
49. dbSNP. Short Genetic Variations [En línea] NCBI-PubMed. Rs1057910 [Fecha de acceso 23 de Febrero de 2017]. URL disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1057910
50. Loebstein R, Koren G. (1998). Ifosfamide – induced nephrotoxicity in children: critical review of predictive risk factors. *Pediatrics* 101: E8.
51. Sukasem, C., & al, e. (2012). Pharmacogenetic markers of CYP2C9 asociated withefavirenz plasmaconcentrations in HIV-1infected Thai adults. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1005-1012.
52. Suarez-Kurtz, G., & al., e. (2012). Pharmacogenomic Diversity Among Brazilians: influence of Ancestry, Self-Reported Colr, and Geographical Origin. En J. A. Agúndez, *Functional Polymorphisms of Xenobiotic Metabolizing Enzymes (XME)*, *Frontiers in Pharmacology*, 114-119.
53. Haroun, F., & al., e. (2015). Effects of CYP2C9 genetic polymorphisms in patients receiving cyclophosphamide combination chemotherapy for breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 207-214.
54. González, G. (2010). Tumores Sólidos en niños: diagnóstico y terapéutica quirúrgica. *Revista Médica Clínica Las condes*, 120-129.
55. Michelle CM Cheung, Robin L Jones and Ian Judson. (2004). Acute liver toxicity with ifosfamide in the treatment of sarcoma: a case report.
56. Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA.(2002) Cytochrome P-450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics*.12:251-263
57. Yasar Ü, Forslund-Bergengren C, Tybring G, Dorado P, LLerena A, Sjoqvist F et al.(2002). Pharmacokinetics of losartan and its metabolite E-3174 in relation to the CYP2C9 genotype. *Clin Pharmacol Ther*; 71: 89–98.
58. Griskevicius L, Yasar U, Sandberg M, Hidestrand M, Eliasson E, Tybring G et al.(2003). Bioactivation of cyclophosphamide: the role of polymorphic CYP2C enzymes. *Eur J Clin Pharmacol*; 59: 103–109.
59. Goldstein JA. (2001). Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol*; 52: 349–355.
60. Schwarz UI. (2003).Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C9 gene. *Eur J Clin Invest*; 33(Suppl 2): 23–30.
61. Tatyana A Seredina, Olga B Goreva, Valeria O Talaban, Alevtina Yu Grishanova, Vyacheslav V Lyakhovich. (2012). Association of Cytochrome P450 Genetic Polymorphisms with Neoadjuvant Chemotherapy Efficacy In Breast Cancer Patients. *Bmc Medical Genetics*.