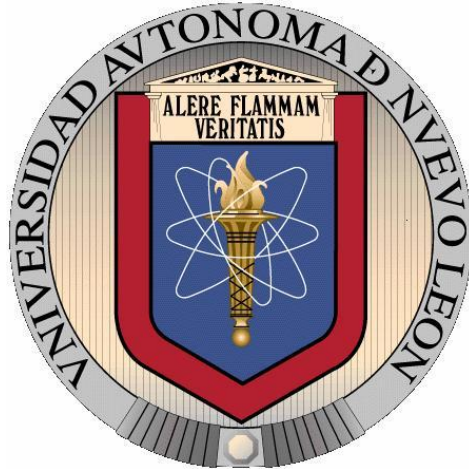


Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina



**“Evaluación molecular y metabólica de la respuesta al
tratamiento (AC) en mujeres con Cáncer de mama”**

Propuesta de tesis presentada por:

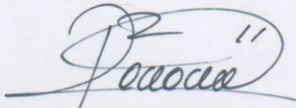
Q.F.B. Yadira Xitlalli Pérez Páramo

Como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética

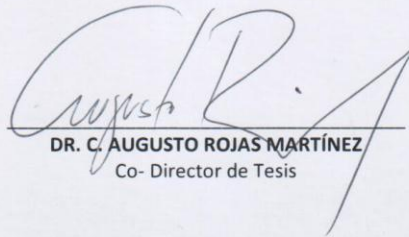
Diciembre de 2012

Evaluación molecular y metabólica del resultado al tratamiento (AC) en mujeres con cáncer de mama.

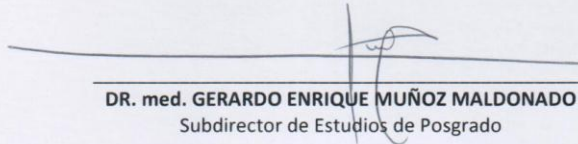
Aprobación de la Tesis:



DRA. C. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ
Directora de Tesis



DR. C. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
Co- Director de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León; bajo la dirección de la Dra. Rocío Ortíz López y la co-dirección del Dr. Augusto Rojas Martínez.

El reclutamiento de pacientes se llevó a cabo con la colaboración del Dr. Jorge Luis Martínez Rodríguez del Servicio de Oncología, y la asesoría del Dr. Servando Cardona Huerta del Servicio de Cirugía, ambos del Hospital Universitario José Eleuterio González, UANL.

La parte de Farmacocinética se realizó en el Laboratorio de laboratorio de Química Analítica de la empresa DEBBIOM (Desarrollos Biomédicos y Biotecnológicos de México, S.A. de C.V.) bajo la colaboración del QCB Aldo Villanueva Aldo y la Dra Lourdes Garza Ocañas.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMEN	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer de Mama	1
1.2. Epidemiología.....	2
1.3. Diagnóstico y clasificación.....	3
1.4. Tratamiento.....	5
1.4.1 Cirugía.....	5
1.4.2 Radioterapia.....	6
1.4.3 Terapia hormonal.....	6
1.4.4 Terapia dirigida.....	7
1.4.5 Quimioterapia.....	8
1.5. Farmacogenética.....	11
1.5.1 Doxorrubicina.....	14
1.5.2 Ciclofosfamida.....	16
1.6. Farmacocinética.....	19
1.6.1 Doxorrubicina.....	20
1.6.2 Ciclofosfamida.....	21
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo general.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23

4.	ESTRATEGIA GENERAL	24
5.	MATERIAL Y MÉTODOS	25
5.1.	Materiales.....	25
5.1.1	Consumibles.....	25.
5.1.2	Reactivos.....	25
5.1.3	Material Biológico.....	26
5.1.4	Equipo.....	26
5.1.5	Programas computacionales.....	27
5.2.	Métodos.....	27
5.2.1	Lugar donde se realizó el estudio.....	27
5.2.2	Grupo de estudio.....	28
5.2.3	Recolección de muestras.....	28
5.2.4	Extracción de DNA.....	29
5.2.5	Cuantificación de DNA por la técnica de Picogreen.....	30
5.2.6	Genotipificación de muestras mediante análisis de microarreglos (DMET Affymetrix).....	31
5.2.7	Estandarización del método UFLC-MS y análisis de las muestras.	41
5.2.8	Análisis estadístico.	48
6.	RESULTADOS	49
6.1.	Descripción de la población de estudio.....	49
6.2.	Perfiles Farmacocinéticos.....	56
6.2.1	Validación del método UFLC-MS.....	56
6.2.2	Resultados en las muestras de las pacientes.....	61
6.3.	Perfiles Farmacogenéticos.....	66
6.3.1	Frecuencia de alelos en genes previamente asociados al metabolismo de Doxorubicina y Ciclofosfamida.....	70
6.4	Análisis y relaciones entre genotipo y fenotipo.....	71
6.4.1	Farmacocinética vs Farmacogenética.....	71

6.4.2	Farmacogenética vs Efectos adversos.....	73
7.	DISCUSIÓN.....	74
7.1	Perfiles farmacocinéticos.....	75
7.2	Farmacocinética vs Farmacogenética.....	75
7.2.1	Correlación de Doxorubicina con el perfil farmacogenético....	76
7.2.2	Correlación de Ciclofosfamida con el perfil farmacogenético...77	
7.3	Farmacogenética vs efectos adversos.....	78
8.	CONCLUSIONES.....	80
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	81

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIA

LISTA DE ABREVIATURAS

4-OHCP	4-hidroxiciclofosfamida
AC	Adriamicina y Ciclofosfamida
ACO.	Anticonceptivos orales.
ADN.	Acido desoxirribonucleico.
CaMa	Cáncer de mama
CMTN	Cáncer de mama triple negativo
CP	Ciclofosfamida
DMSO	Dimetil sulfoxido
dNTPs.	Desoxiribonucleotidos.
DOX	Doxorrubicina
DOX-ol	Doxorrubicinol.
EM	Metabolizadores normales
HER2	Factor de crecimiento epidérmico humano 2
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IMC.	Índice de masa corporal.
MgCl ₂ .	Cloruro de magnesio.
OMS	Organización Mundial de la Salud
PARP.	Poli ADP-Ribosa polimerasa.
PCR.	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Metabolizadores pobres
PR.	Receptor de progesterona.
RE.	Receptor de estrógenos.
SEVAG	Cloroformo alcohol isoamilico

SNP.	Polimorfismos de un solo nucleótido.
TE	Tris EDTA
UFLC	Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución
UM	Metabolizadores rápidos.

LISTA DE TABLAS

No.	Nombre	Pág.
1	Antecedentes de trabajos realizados, en los cuales se hace una correlación con la respuesta al tratamiento y genes asociados	19
2	Antecedentes de trabajos realizados, en los cuales se ha desarrollado algún método para la determinación de éstos metabolitos en plasma, así como un único antecedente en el cual se realiza la farmacocinética y asociación de genes con respuesta al tratamiento.	22
3	Curva de concentración para PicoGreen.	30
4	Master Mix para mPCR	32
5	Programa termociclador para mPCR	33
6	Master Mix Alineamiento	34
7	Programa del termociclador de Alineamiento.	34
8	Programa termociclador Gap Fill	35
9	Master Mix Universal Amp Mix	36
10	Programa termociclador PCR Clean Up.	36
11	Fragmentation Master Mix.	37
12	Programa termociclador Fragmentation.	38
13	Etiquetado Master Mix.	39
14	Hibridación Master Mix	39
15	Solución de teñido de microarreglos.	40
16	Concentraciones utilizadas para las Curvas de calibración para 4-OH-Ciclofosfamida y Doxorubicinol.	43
17	Concentraciones utilizadas para los puntos de control de calidad para 4-OH-Ciclofosfamida y Doxorubicinol.	44
18	Condiciones del cromatógrafo de líquidos para 4-OH-ciclofosfamida y Doxorubicinol.	58
19	Condiciones de voltaje para el cromatógrafo de masas para 4-OH-ciclofosfamida y Doxorubicinol.	59
20	Condiciones de la fuente de ionización para 4-OH-ciclofosfamida y Doxorubicinol.	59
21	Concentraciones obtenidas experimentalmente para la curva de calibración para doxorubicinol.	61
22	Concentraciones obtenidas experimentalmente para la curva de calibración para 4-OH-ciclofosfamida.	61
23	Resultados de la validación los cuales están dentro de las normas que marca la NOM 177 SSA-1998-1.	62
24	Concentraciones obtenidas para Doxorubicinol	63
25	Concentraciones obtenidas para 4-OH-ciclofosfamida	64
26	Concentraciones de DNA genómico obtenidas para cada una de las pacientes.	69
27	Frecuencia alélica y proporción de genes que habían sido reportados previamente involucrados en el metabolismo de Doxorubicina y 4-OH-ciclofosfamida.	73
28	Genes encontrados en correlación con el metabolismo acelerado UM para Doxorubicina, así como la proporción encontrada y los límites de confianza encontrados en el grupo EM.	74
29	Genes encontrados en correlación con el metabolismo acelerado UM para	74

	Ciclofosfamida, así como la proporción encontrada y los límites de confianza encontrados en el grupo EM.	
30	Genes encontrados en correlación con el metabolismo acelerado PM para Ciclofosfamida, así como la proporción encontrada y los límites de confianza encontrados en el grupo EM.	75
31	Genes encontrados en correlación con el grupo de pacientes que mostraban efectos adversos la proporción encontrada en éste grupo y los límites de confianza encontrados en el grupo sin efectos adversos.	76
32	Estudios de farmacogenética, farmacocinética y genes asociados. Resaltando nuestra aportación.	80

LISTA DE FIGURAS

No.	Nombre	Pág.
1	Factores de riesgo asociados al padecimiento de Cáncer de mama.	2
2	Algoritmo para el diagnóstico del CaMa.	4
3	Esquema de quimioterapia AC.	11
4	Diversos panoramas farmacogenéticos y sus efectos adversos.	14
5	Metabolismo de Doxorubicina, y algunos genes involucrados éste proceso.	16
6	Metabolismo de Ciclofosfamida, y algunos genes involucrados éste proceso.	18
7	Estrategia General.	24
8	Gel de control de calidad 1, banda esperada, entre las 100 y 150 pares de bases. Carriles 1-7 muestras de pacientes, con la banda esperada, carril 4 muestra una muestra sin la banda esperada, carril M, marcador de peso molecular de 1000-50 pb.	37
9	Gel de control de calidad 2, Barrido esperado menor a 100 pb, con una mancha principal entre las 75 y 50 pb. Carriles 1-3 muestras de pacientes, mostrando el barrido esperado, carril M, marcador de peso molecular de 1000-50 pb.	38
10	Gráfica que muestra el lugar de nacimiento más frecuente en nuestro grupo de estudio.	50
11	Gráfica que muestra la edad más frecuente en nuestro grupo de estudio.	50
12	Gráfica que muestra el estado civil más frecuente en nuestro grupo de estudio.	51
13	Gráfica que muestra la edad de menarquia más frecuente en nuestro grupo de estudio.	51
14	Gráfica que muestra la frecuencia de mujeres en menopausia en nuestro grupo de estudio.	52
15	Gráfica que muestra el uso de Anticonceptivos Orales más frecuente en nuestro grupo de estudio.	52
16	Gráfica que muestra el número de embarazos más frecuente en nuestro grupo de estudio.	52
17	Gráfica que muestra el porcentaje de mujeres que lactaron en nuestro grupo de estudio.	53
18	Gráfica que muestra la frecuencia de antecedentes familiares de cáncer de mama en nuestro grupo de estudio.	53
19	Gráfica que muestra el porcentaje de consumo de alcohol en nuestro grupo de estudio.	54
20	Gráfica que muestra el porcentaje de consumo de tabaco en nuestro grupo de estudio.	54
21	Gráfica que muestra el índice de masa corporal más frecuente en nuestro grupo de estudio.	54
22	Gráfica que muestra la localización del tumor en la mama más frecuente en nuestro grupo de estudio.	55
23	Gráfica que muestra el estadio clínico del tumor más frecuente en nuestro grupo de estudio.	55
24	Gráfica que muestra el tamaño del tumor más frecuente en nuestro grupo de estudio.	56
25	Gráfica que muestra la frecuencia de receptores histológicos presentes en el	56

	tumor en nuestro grupo de estudio.	
26	Gráfica que muestra la presencia de neutropenia 21 días post tratamiento en nuestro grupo de estudio.	57
27	Gráfica que muestra la presencia de vómito 21 días post tratamiento en nuestro grupo de estudio.	57
28	Gráfica que muestra la presencia de nauseas 21 días post tratamiento en nuestro grupo de estudio.	57
29	Cromatograma para doxorrubicinol con un tiempo de retención de 0.75 min.	60
30	Cromatograma para 4-OH-ciclofosfamida con un tiempo de retención de 0.74 min.	60
31	Curva de calibración para doxorrubicinol, con una regresión lineal $y=5.08e+003 x+1.01e+005$ con una $r=0.9951$.	61
32	Curva de calibración para 4-OH-ciclofosfamida, con una regresión lineal $y=258x+1.03e+005$ con una $r=0.9986$.	61
33	Gráfica que muestra el logaritmo de la concentración de doxorrubicinol en plasma en las 30 pacientes a 3 distintos tiempos, 1, 1,5 y 2 hrs.	65
34	Gráfica que muestra la concentración de doxorrubicinol en plasma en las 30 pacientes y se destaca el grupo de metabolizadoras que mostraron tener un contenido más alto de doxorrubicinol en plasma, las cuales se definieron como UM.	66
35	Gráfica que muestra el logaritmo de la concentración de 4-OH-ciclofosfamida en plasma en las 30 pacientes a 3 distintos tiempos, 1, 1,5 y 2 hrs.	67
36	Gráfica que muestra la concentración de doxorrubicinol en plasma en las 30 pacientes y se destaca los 2 grupos de metabolizadoras que mostraron tener un contenido más alto de 4-OH-ciclofosfamida en plasma, las cuales se definieron como UM, mientras que el grupo de pacientes que tuvieron una concentración más baja se les denominó PM.	68
37	Curva de calibración obtenida de las diluciones de estándares de Picogreen, a partir de la cual se obtuvo la regresión lineal $y= 0.0043x-4.0225$, con una $r= 0.9999$, con la cual se calculará la concentración de las muestras.	69
38	Gel de agarosa al 3%. En el carril M se encuentra el marcador de peso molecular de 1000pb-100pb, carril 01, 02, 03 muestras de pacientes con con la banda de nuestro interés de 100-150 pb.	70
39	Gel de agarosa al 3%. En el carril M se encuentra el marcador de peso molecular de 1000pb-100pb, carril 01, 02, 03 muestras de pacientes con un barrido de nuestro interés menor a 100 pb.	70
40	Imagen resultado del escaneo del microarreglo donde se muestra uno de los controles de calidad que tiene éste microarreglo.	71
41	Gráfica que muestra el resultado de 18 pacientes para el número de copias para el gen GSTM1. Obteniendo 10 pacientes con 0 copias, 5 pacientes con más de una copia y 3 pacientes indeterminadas.	74
42	Gráfica que muestra el resultado de 6 pacientes mostrando la discriminación alélica para el gen CHST3 *4107T>C. Obteniendo 2 pacientes homocigotas wild type, 2 pacientes heterocigotas y 2 pacientes homocigotas para la mutación.	74

RESUMEN

Introducción: El CaMa es un problema de salud pública que afecta a mujeres alrededor del mundo. Aunque existen terapias dirigidas contra las células malignas del CaMa, debido al diagnóstico en etapas tardías, cada vez es más común la administración de quimioterapias sistémicas, que junto con el efecto deseado, acarrearán una serie de efectos adversos. Por lo que es necesaria la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico y/o pronóstico que nos ayuden a entender los mecanismos de la respuesta al tratamiento, y tratar de ofrecer la opción de un *tratamiento personalizado* que mejore la respuesta individual y nos ayude a prevenir efectos secundarios.

Objetivo: Evaluar el resultado al tratamiento por quimioterapia en pacientes diagnosticadas clínicamente con Cáncer de mama, evaluando la farmacogenética, la farmacocinética y las vías de muerte celular activadas con el tratamiento.

Materiales y métodos: Se incluyeron pacientes del servicio de oncología del Hospital Universitario “José Eleuterio González” que estaban recibiendo quimioterapia sistémica con el esquema de AC. Se recolectaron muestras de sangre periférica, utilizando Heparina de sodio (3 mL) como anticoagulante 24 horas antes del ciclo de quimioterapia. Durante el ciclo de quimioterapia se recolectó muestra de sangre periférica, utilizando heparina de sodio como anticoagulante al tiempo 0', 30', 60', 90' y 120'.

- a) **Plasma:** Se separó el plasma inmediatamente después de la extracción, a los cuales se les agregó 50uL cloruro de dancilo 10mM como derivatizante. Se determinaron los metabolitos activos de los fármacos (4-Hidroxi Ciclofosfamida, Desoxirubicinol). Estos fueron determinados utilizando la técnica de UFLC-MS.
- b) **Paquete globular:** Se extrajo el ADN genómico, mediante el kit Maxwell el cual fue utilizado para llevar a cabo la genotipificación de los diversos genes implicados en la biotransformación del fármaco. El ADN fue hibridado en los microarreglos DMET 3.0 de Affymetrix, de donde se obtuvieron los datos para ser analizados.

Ya con los datos de la farmacocinética, se relacionaron con los datos de la genotipificación de los pacientes, para encontrar si existe relación entre las alteraciones del genotipo y el porcentaje de fármaco biotransformado. De ésta manera se encontraron

biomarcadores que nos servirán para la predicción del resultado a este esquema de quimioterapia en pacientes con cáncer.

Resultados: Se recolectaron muestras de 36 pacientes con diagnóstico clínico confirmado de CaMa, que estaban recibiendo el régimen de quimioterapia AC (Adriamicina/Ciclofosfamida). A éstas pacientes se les determinó el perfil farmacocinético y el perfil farmacogenético, así como también se recolectaron datos clínicos relacionados con los efectos adversos al término del primer ciclo de quimioterapia. Se encontraron pacientes que tuvieron un metabolismo un poco más lento para Ciclofosfamida (PM=4), un grupo que metabolizaba de manera normal a las cuales se les denominó (EM=21) y un grupo de metabolizadoras rápidas (UM=5). De la misma manera evaluando la manera de metabolizar la Doxorubicina a doxorubicinol, se encontraron, un grupo de pacientes que metaboliza de manera normal (EM=27) y un grupo de pacientes que metaboliza de forma rápida la doxorubicina (UM=3). Al momento de realizar la correlación entre los perfiles farmacocinéticos y farmacogenéticos encontramos varios genes asociados con los distintos niveles de metabolitos en plasma CYP3A4 14956C>T, GSTA2 335G>C(S112T), NR112 795-93G>A, CBR3 398-12G>A, SLC22A12_c.426T>C (H142H), así como también distintos genes asociados con la presencia de efectos agudos en nuestras pacientes, NQO1 559C>T(P187S), ABCC4 311G>A.

Conclusiones: En el presente trabajo se encontraron diferentes grupos de pacientes de acuerdo a la farmacocinética, a los cuales se les otorgó una probable clasificación a la manera de metabolizar los fármacos. (PM, EM, UM) para ambos fármacos. Se encontraron variantes polimórficas asociadas al fenotipo que no habían sido asociadas antes, principalmente enzimas de la Fase 2 y Fase 3. Es el primer trabajo que involucra 3 aspectos, lo cual se muestra en la siguiente tabla:

- 1.- Análisis farmacocinético de los fármacos del esquema AC.
- 2.- Perfil farmacogenético, con un análisis masivo de genes y no solamente de genes candidatos.
- 3.- Respuesta al tratamiento.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Cáncer de mama.

El Cáncer de mama (CaMa) es una enfermedad genética compleja caracterizada por la acumulación de múltiples alteraciones moleculares. Se caracteriza por una proliferación rápida y descontrolada de células en el tejido de la mama, usualmente en los ductos (túbulos que acarrean la leche hacia el pezón) 90% y los nódulos (glándulas productoras de leche) 10%.¹

La heterogeneidad clínica resultante de esto, hace que el diagnóstico y estrategias terapéuticas actuales no estén adaptados para cada paciente, antes bien el manejo se basa en lineamientos o esquemas generales, porque los factores clínicos y patológicos son insuficientes para captar la cascada compleja de eventos que conducen al comportamiento clínico individual de los tumores de mama.

Los factores de riesgo que se han asociado con el riesgo a padecer cáncer de Mama, son la hipertensión, diabetes, sobrepeso y obesidad, nuliparidad, o primer parto después de los 30 años, origen africano o hispano, bajo nivel socioeconómico, presencia de síndrome metabólico (glucosa alta, triglicéridos altos o bajos niveles de colesterol); también son asociados con menor supervivencia y peor pronóstico en mujeres pre y post menopaúsicas.²

Cáncer de mama

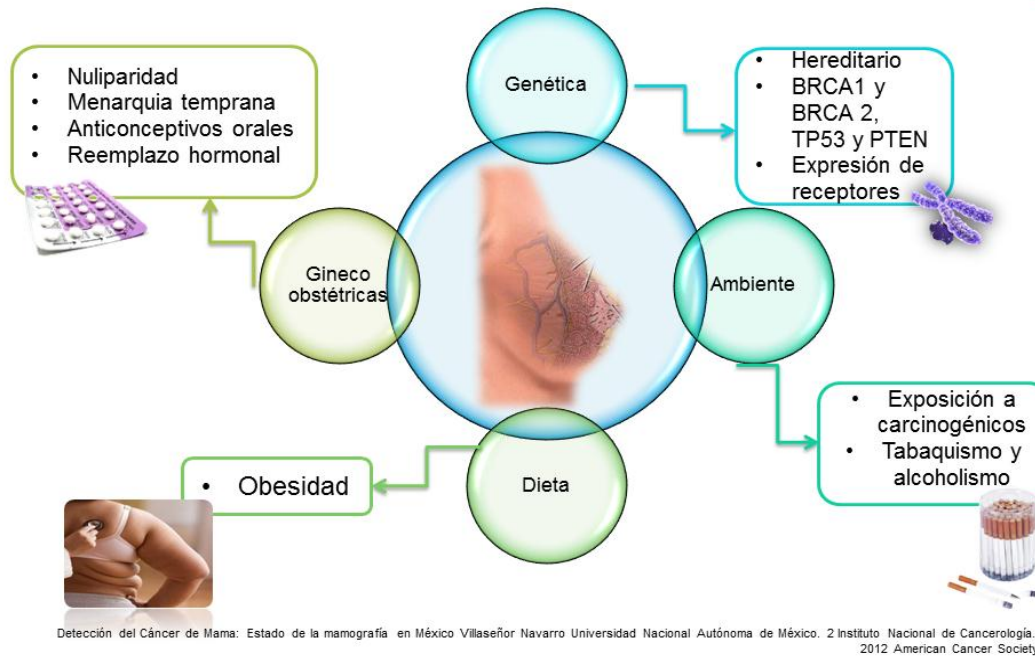


Figura 1. Factores de riesgo asociados al padecimiento de Cáncer de mama.

1.2 Epidemiología.

El CaMa es una enfermedad neoplásica que afecta a más de millones de mujeres alrededor del mundo, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. El cáncer de mama es una de las patologías asociadas al envejecimiento, al retraso en el inicio de la vida reproductiva y a los estilos de vida; además, representa un problema de salud pública, debido al incremento gradual y sostenido de dicha enfermedad, así como al costo de su tratamiento.³ Según la OMS, a nivel mundial, el cáncer de mama afecta al 16% de la población femenina que padeció algún tipo de cáncer.⁴ Es importante mencionar que en México, el cáncer de mama es detectado principalmente por la propia mujer en etapas avanzadas; por ello, la promoción de la autoexploración y del examen clínico de senos adquiere una gran relevancia en la prevención y el control en países como el nuestro.⁵ En 2008, la incidencia de cáncer de mama en nuestro país fue de 7.57 casos por cada 100 mil

habitantes, afectando principalmente a las mujeres, quienes presentan una incidencia de 14.63 frente a la de 0.27 de los varones.³

En México el CaMa a partir del 2006, es la primera causa de muerte por neoplasia maligna entre las mujeres mayores de 25 años de edad con 4440 defunciones registradas y una tasa de mortalidad de 15.8 fallecimientos por 100 mil mujeres de 25 años o más, lo que representa un incremento de 9.7% en relación con el año 2000³.

El mayor nivel de incidencia de CaMa en nuestro país lo tienen los estados con mayor nivel de desarrollo socioeconómico del país, entre ellos Nuevo León, que en análisis por municipios a nivel nacional, muestra que Monterrey ocupa el 3 lugar, con 89 defunciones por CaMa por año para el 2006³.

1.3 Diagnóstico y clasificación.

Uno de los eventos claves en la supervivencia del CaMa es la detección diagnóstico y tratamiento oportunos. Entre los procedimientos de detección, que incluyen también la autoexploración y el examen clínico, la mamografía es la única técnica que puede ofrecer una detección suficientemente oportuna. En general en México, el CaMa es detectado por las mujeres por lo general en estados tardíos de la enfermedad. En un estudio realizado en mujeres mexicanas se estimó que las pacientes reconocieron por sí mismas la presencia de algún signo o síntoma de CaMa en una proporción del 90%, lo que las llevó a búsqueda de atención médica y en la mayor parte de los casos correspondieron a estadios avanzados de la enfermedad.⁶ Por lo que se sigue el siguiente algoritmo para las pacientes que acuden al médico ya con la presencia de algún signo o síntoma.²

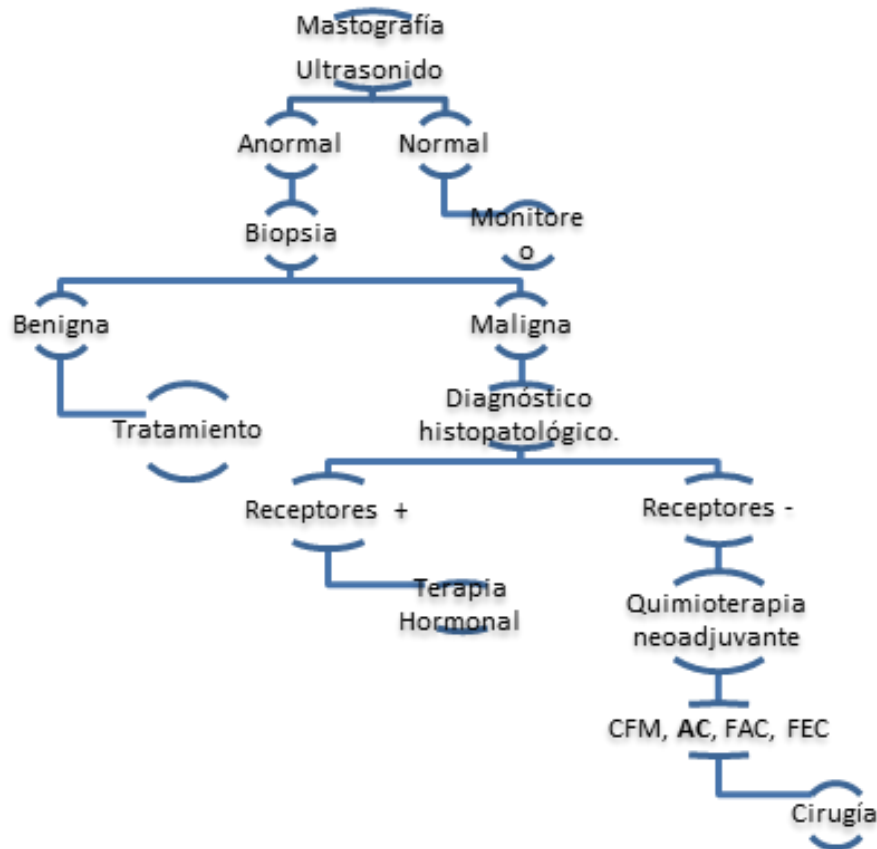


Figura 2. Algoritmo para el diagnóstico del CaMa.

Muchos factores clínicos e histopatológicos se han estudiado para el CaMa, sin embargo entre los más importantes son la expresión de 3 biomarcadores: Receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y el Factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2). La tinción negativa para estos 3 marcadores define el fenotipo triple negativo (CMTN) para el cáncer de mama, el cual representa aproximadamente el 15% de todos los cánceres de mama invasivos. Este tipo de cáncer es caracterizado por una histología ductal frecuentemente de alto grado, y altas tasas de proliferación y mitosis. Mujeres con CMTN tienen alta tasa de recurrencia y pobre supervivencia. Este subtipo es asociado con alta mortalidad y pocas opciones terapéuticas, y la terapia convencional es el único tratamiento efectivo.⁷

1.4 Tratamiento.

Actualmente existen varias opciones de tratamiento, las cuales dependerán del estadio clínico en el que se encuentre la enfermedad de la mujer afectada con esta enfermedad. Se cuentan con 6 opciones diferentes de tratamiento, que a continuación se describen.

1.4.1 Cirugía

La mayoría de las pacientes de CaMa se someten a cirugía a fin de extirparle el tumor. Normalmente se extirpan algunos de los ganglios linfáticos de abajo del brazo y se observan bajo un microscopio para verificar si contienen células cancerosas.

Cirugía para preservar la mama: una operación para extirpar el cáncer, pero no la mama. Incluye los siguientes procedimientos:

- Lumpectomía: cirugía para extirpar el tumor (masa) y una pequeña cantidad de tejido normal alrededor del mismo.
- Mastectomía parcial: cirugía para extirpar la parte de la mama que tiene cáncer y algo del tejido normal que la rodea. También se puede extirpar el revestimiento de los músculos pectorales debajo del cáncer. Este procedimiento también se llama mastectomía segmentaria.

Se puede administrar quimioterapia antes de la cirugía para extirpar el tumor. Cuando la quimioterapia se administra antes de la cirugía, reducirá el tamaño del tumor y la cantidad de tejido que es necesario extirpar durante la cirugía. El tratamiento administrado antes de la cirugía se llama terapia **neoadyuvante**. Incluso si el médico extirpa todo el cáncer que se puede ver en el momento de la cirugía, algunas pacientes pueden recibir radioterapia, quimioterapia o terapia con hormonas después de la cirugía para destruir cualquier célula cancerosa que haya quedado. El tratamiento administrado después de la cirugía para disminuir el riesgo de que el cáncer vuelva, se llama terapia **adyuvante**.

1.4.2 Radioterapia

La radioterapia usa rayos de alta energía para destruir las células cancerosas. Afecta únicamente las células en la parte del cuerpo que está siendo tratada y puede usarse después de la cirugía para destruir las células cancerosas que quedan en el área. Existen dos tipos de radioterapia:

- *Radioterapia externa*: La radiación procede de una máquina situada fuera del cuerpo que envía radiación al área donde se encuentra el cáncer. Este tipo de tratamiento se realiza en hospitales. Los tratamientos son generalmente 5 días a la semana durante 4 ó 6 semanas. La radiación externa es el tipo de radioterapia que se usa generalmente para el CaMa.

- *Radiación interna* (radiación por implante o braquiterapia): El médico coloca uno o más tubos delgados dentro del seno por una incisión pequeña. El tubo se carga con una sustancia radiactiva. La sesión de tratamiento puede durar unos pocos minutos, después de los cuales se retira la sustancia. Cuando dicha sustancia se retira, no queda radiactividad en el cuerpo.

1.4.3 Terapia hormonal

La terapia con hormonas es un tratamiento para el cáncer por el que se bloquea su acción, y se impide el crecimiento de las células cancerosas.. Algunas hormonas pueden hacer crecer ciertos cánceres. Si las pruebas muestran que las células cancerosas ofrecen sitios donde pueden adherirse las hormonas (receptores), se utilizan medicamentos, cirugía o radioterapia para reducir la producción de hormonas o impedir que funcionen. La hormona estrógeno, que hace crecer algunos tipos de CaMa, es elaborada en su mayor parte por los ovarios. El tratamiento para impedir que los ovarios elaboren estrógeno se llama ablación ovárica.

La terapia hormonal con tamoxifeno a menudo se suministra a pacientes con estadios tempranos de la enfermedad y a pacientes de CaMa metastásico (cáncer que se diseminó hasta otras partes del cuerpo). La terapia hormonal con un inhibidor de la aromatasa se administra a algunas mujeres posmenopáusicas que padecen de CaMa hormonodependiente. Este necesita de la hormona estrógeno para crecer. Los inhibidores de la aromatasa

disminuyen el estrógeno en el cuerpo porque impiden que una enzima que se llama aromatasa convierta el andrógeno en estrógeno.

Ciertos inhibidores de la aromatasa pueden usarse para el tratamiento de CaMa en un estadio temprano como terapia adyuvante o después de dos años o más de tamoxifeno. Los inhibidores de la aromatasa se están probando en ensayos clínicos para compararlos con la terapia hormonal con tamoxifeno en el tratamiento del CaMa metastásico.

1.4.4 Terapia dirigida

La terapia dirigida es un tipo de tratamiento para el que se utilizan medicamentos u otras sustancias para identificar y atacar células cancerosas específicas, sin dañar a las células normales. Los anticuerpos monoclonales y los inhibidores de la tirosina cinasa son dos de los principales tipos de terapia dirigida que se usan para el tratamiento del CaMa. Otro tipo de este tipo de terapia son los inhibidores de la Poli ADP-Ribosa Polimerasa (PARP), sustancias que se usan para bloquear la reparación del ADN e intentar destruir las células cancerosas. La terapia con este tipo de inhibidores del PARP está en estudio para el tratamiento del CMTN.

La terapia con anticuerpos monoclonales es un tratamiento para el cáncer en el que se utilizan anticuerpos producidos en el laboratorio a partir de un tipo único de células del sistema inmunitario. Estos anticuerpos pueden identificar moléculas en las células cancerosas o sustancias normales en el cuerpo que contribuyen al crecimiento de estas. Los anticuerpos se adhieren a dichas moléculas o sustancias y así buscan eliminar las células cancerosas, al impedir su crecimiento o prevenir su diseminación. Los anticuerpos monoclonales se administran por infusión y se pueden utilizar solos o para administrar medicamentos, toxinas o material radiactivo directamente a las células cancerosas. Los anticuerpos monoclonales se pueden usar en combinación con la quimioterapia, como terapia adyuvante. De entre los más conocidos está el trastuzumab (Herceptin). Este es un anticuerpo monoclonal que bloquea los efectos del factor de crecimiento HER2, el cual envía señales a las células

cancerosas de la mama. Alrededor de una cuarta parte de las pacientes de CaMa tienen tumores que se pueden tratar con trastuzumab combinado con quimioterapia.

En el cáncer, la tirosina cinasa detecta factores de crecimiento que los tumores necesitan para crecer, mismos que se encuentran sobreexpresados en las células neoplásicas, propiciando el crecimiento acelerado de los tumores. Los inhibidores de la tirosina cinasa son medicamentos que se usan en la terapia dirigida para bloquear las señales que favorecen el crecimiento. Los inhibidores de la tirosina cinasa se pueden usar en combinación con otros medicamentos anticancerosos como terapia adyuvante.

El lapatinib es un inhibidor de la tirosina cinasa que bloquea las señales intracelulares desatadas por la acción de la proteína HER2 y de otras proteínas que estimulan a las células tumorales. Se puede utilizar para tratar a pacientes que tienen tumores positivos para los receptores de HER2 y no respondieron al trastuzumab.

1.4.5 Quimioterapia

La quimioterapia es un tratamiento del cáncer en el que se usan medicamentos para interrumpir el crecimiento de las células cancerosas, ya sea mediante su destrucción o impidiendo su multiplicación. Cuando la quimioterapia se administra vía oral o se inyecta en una vena o músculo, los medicamentos ingresan en el torrente sanguíneo y afectan a células cancerosas de todo el cuerpo (quimioterapia sistémica). Cuando la quimioterapia se coloca directamente en el líquido cefalorraquídeo, un órgano o una cavidad corporal como el abdomen, los medicamentos afectan principalmente las células cancerosas de esas áreas (quimioterapia regional). La forma en que se administre la quimioterapia depende del tipo y el estadio del cáncer que se está tratando.

Después del diagnóstico mediante mamografía y una biopsia del CaMa es precisa la prescripción de un tratamiento eficaz, el cual dependerá de la

presencia o no de algún marcador histológico en la biopsia analizada. Si algún marcador histológico está presente se administra un esquema de quimioterapia dirigido. Por ejemplo, trastuzumab está indicado para pacientes con cáncer de mama que presentan amplificación del oncogen HER-2 o presentan una sobreexpresión de la proteína en la biopsia tumor⁸. La quimioterapia sistémica es el tratamiento estándar para muchas formas diferentes de cáncer, la terapia para el cáncer de mama, frecuentemente involucra el uso de agentes quimioterapéuticos combinados usando regímenes basados en antraciclinas. La combinación de agentes citotóxicos y un esquema de dosis intensa han probado ser mejores en el tratamiento del cáncer de mama; sin embargo al mismo tiempo se ha relacionado con el compromiso en la calidad de vida del paciente como resultado de la alta toxicidad. Los efectos adversos más comunes asociados con la quimioterapia neoadjuvante, son la mielosupresión, neutropenia febril, alopecia y toxicidades gastrointestinales. Estas toxicidades, si son persistentes pueden llevar a un retraso en la reducción del tamaño del tumor, lo cual puede terminar en una recaída.⁹

Sin embargo y debido a que el CaMa se detecta por lo general en etapas avanzadas, se administra quimioterapia sistémica con fármacos como antraciclinas, agentes alquilantes y taxanos.¹⁰

Aproximadamente 6 meses de quimioterapia basada en antraciclinas (ej. Con Fluorouracilo, ciclofosfamida y doxorubicina o epirubicina (FEC-CEF) mostró reducir el índice de mortalidad por cáncer de mama en un 38% para mujeres menores de 50 años y aproximadamente en un 20% para mujeres de entre 50 y 69 años, independiente del uso de tamoxifeno, estado del receptor de estrógenos, estatus de los nódulos linfáticos y otras características del tumor.¹¹

No obstante, amplias variaciones son observadas en la respuesta al tratamiento así como a la toxicidad asociado con la terapia anticancerígena.¹² La etiología de esta variación es multifactorial, pero es debida en parte a las variaciones genéticas del huésped. Estudios de Farmacogenética y farmacogenómica han identificado satisfactoriamente variantes genéticas que contribuyen a esta diversidad en la susceptibilidad a quimioterapia.¹³

El proceso que se tiene que seguir para determinar la Farmacogenética y el impacto de ésta en una droga antineoplásica :¹³

- 1.- Determinar el rol de la genética en la respuesta al fármaco.
- 2.- Realizar un tamizaje e identificar los marcadores genéticos.
- 3.- Validar marcadores genéticos.
- 4.- Evaluación de la utilidad clínica.
- 5.- Impacto farmacoeconómico.

Con el avance de la tecnología, es ahora posible evaluar ampliamente el genoma humano en una manera relativamente barata y eficiente; sin embargo es necesaria una extensiva investigación en la Farmacogenética, para tratar de trasladar los conceptos de la Farmacogenética a la práctica clínica.¹³

El régimen Doxorrubicina y Ciclofosfamida (AC) es uno de los regímenes disponibles de un gran número de regímenes, se usa en un gran número de pacientes con indicación de quimioterapia, con un riesgo moderado a bajo de recurrencia.¹⁴ Éste régimen es en el que se centrará principalmente nuestro estudio, por lo que revisaremos a detalle los aspectos farmacogenéticos y farmacocinéticos que afectan la respuesta a este tratamiento.

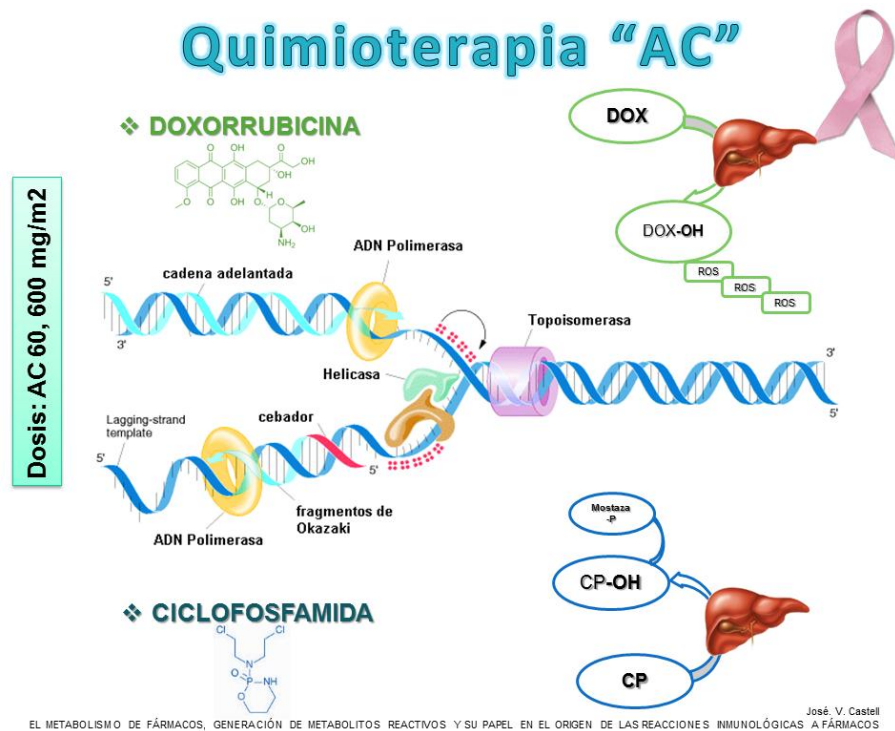


Figura 3. Esquema de quimioterapia AC (Doxorrubicina-Ciclofosfamida).

1.5 Farmacogenética.

El objetivo de la Farmacogenética es personalizar la terapia basándose en el genotipo individual, en algunos otros casos la información genética ha sido utilizada en la identificación del riesgo a una enfermedad (ej. mutaciones en BRCA1 evalúan el riesgo a padecer CaMa), elección de los agentes para tratamiento (ej HLA-B*1502 para carbamazepina), guiar la dosis de fármacos (ej. CYP2C9 y VKORC1 para la dosis de Warfarina, UGT1A1 para irinotecan, y TPMT para 6-mercaptopurina y azatioprine). Esto es de particular importancia para los agentes anticancerígenos, los cuales en general afectan tanto células tumorales, como células no tumorales, por lo que tienen un margen terapéutico muy estrecho, teniendo el potencial de poner en riesgo la vida por sus altas toxicidades. Oncólogos y hematólogos se están esforzando en busca de individualizar el tratamiento contra el cáncer con el fin de maximizar la eficacia y minimizar la toxicidad en pacientes. Identificando las variaciones genéticas del huésped que contribuyen a la eficacia en las drogas o bien al riesgo en la

toxicidad, lo cual proporcionará un medio para adecuar el tratamiento. Las variaciones genéticas pueden explicar variaciones incluyendo la farmacocinética, alteraciones en la actividad o en la expresión del blanco terapéutico, o proteínas involucradas en el mecanismo de acción de las drogas. Los estudios de farmacogenómica de agentes anticancerígenos son complicados debido a mutaciones somáticas en el tumor, aunque esto parece no afectar el impacto en la toxicidad.¹³

Los polimorfismos genéticos del sistema enzimático encargado del metabolismo de fármacos podrían explicar la diferencia interindividual e interétnica a la respuesta a fármacos. Así, en individuos que reciben dosis seguras y eficaces para la mayoría de la población (EM) pueden producirse respuestas anormales, como la presentación de efectos secundarios en metabolizadores lentos (PM) o fracasos terapéuticos en metabolizadores rápidos (UM) o ultrarrápidos. La frecuencia de individuos portadores de determinadas variantes genéticas presenta diferencias dependiendo de la raza y la geografía, lo que podría explicar la variabilidad interétnica que en la eficacia de tratamientos se ha observado entre distintos grupos étnicos.¹⁵

Alrededor del 15% de todos los cánceres de mama son histológicamente clasificados como lobulares, lo cual se refiere a una pérdida de la expresión de e-caderina y un patrón específico de crecimiento. Muchos reportes sugieren que este tipo de cáncer de mama responde menos a la quimioterapia y debe de ser considerado solo para terapia endocrina. Hay evidencia preliminar que los tumores con bajo riesgo requieren ensayos multigénicos predictivos, como el Puntaje de recurrencia (Oncotype Dx) o el ensayo de 70 genes de Amsterdam (Mammaprint) pueden ser resistentes a la quimioterapia⁸. Sin embargo estos estudios están diseñados para genes con polimorfismos frecuentes en la población caucásica.¹⁶

Muchas modalidades de terapéuticas están disponibles para el tratamiento del cáncer de mama. Como consecuencia el interés ha crecido en definir marcadores que identifiquen subgrupos de pacientes que se puedan beneficiar de las terapias adjuvantes sistémicas para el desarrollo de

marcadores predictivos en respuesta a los diversos tratamientos. El régimen de tratamiento **Doxorrubicina/Ciclofosfamida** seguida de paclitaxel es generalmente aceptada como un estándar de tratamiento en pacientes con CaMa y nódulos linfáticos positivos.¹⁷

La terapia adjuvante reduce la mortalidad en cáncer en al menos un cuarto, aunque es claro que su resultado está asociado con sobretreatmento de una gran porción de pacientes. La respuesta al tratamiento con quimioterapia es altamente variable entre las pacientes con cáncer de mama. Por lo que son necesarias pruebas que predigan la resistencia a la quimioterapia para reducir el sobre tratamiento. Desafortunadamente esas pruebas no están disponibles y la mayoría de las decisiones con respecto al uso de quimioterapia adjuvante están basadas en parámetros de pronóstico, como el tamaño y el grado del tumor primario, el número de nódulos axilares afectados y la expresión de receptores de hormonas. Aunque el riesgo de recaída y el índice de mortalidad es alto en tumores que carecen de expresión de receptores de hormonas y en tumores que tienen amplificado el gen HER2, el pronóstico para los tumores con receptores de estrógenos sin amplificación HER2 es más variable.¹⁶

Debido a los distintos efectos adversos que puede causar dicho tratamiento, es imperativo aplicar un régimen y dosis apropiados para asegurarse que todos los pacientes se beneficien con el tratamiento más efectivo, y minimizando al máximo el riesgo de toxicidad. Se ha investigado sobre la posible influencia en la tolerancia, intensidad de dosis y toxicidad de este tratamiento en función a la variación en los genes que codifican para las proteínas transportadoras y enzimas encargadas del metabolismo de drogas.¹⁸

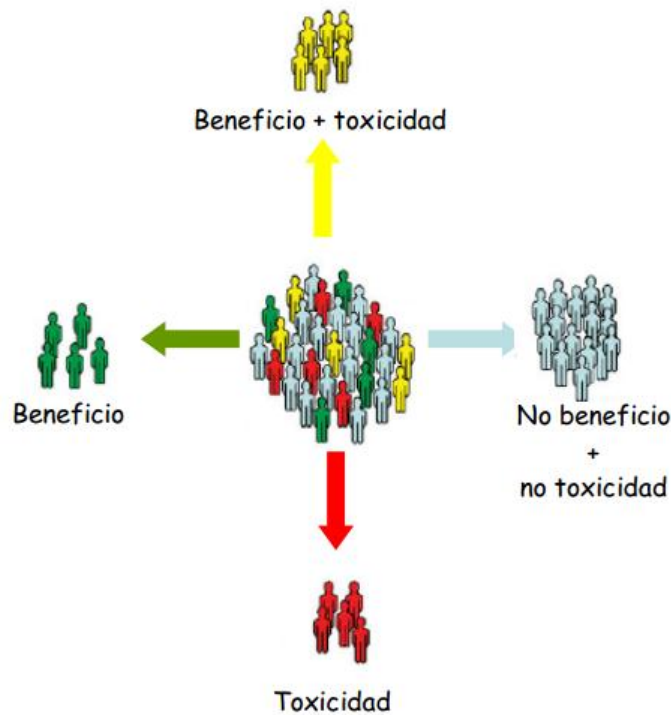


Figura 4. Diversos panoramas farmacogenéticos y sus efectos adversos.

1.5.1 Doxorrubicina

Doxorrubicina (DOX) o adriamicina es un antibiótico tipo antraciclina que posee un amplio espectro en la actividad antineoplásica, y es uno de los más importantes agentes anticancerosos en uso. Sin embargo su utilidad clínica está obstaculizada, y su dosis limitada por la cardiotoxicidad, mielosupresión, y el desarrollo de resistencia¹⁹. Fue aislada en los años 50's del microorganismo *Streptomyces peucetius*. Se usa comúnmente para tratar varios tipos de cáncer entre los que se encuentran, leucemias, vejiga, pecho, pulmón, ovarios, tiroides y cáncer de mama. Esta droga se administra intravenosamente, en su forma de sal hidrocloorada, es fotosensible.²⁰

Su mecanismo de acción se piensa que interactúa con el ADN por intercalación e inhibición de la biosíntesis macromolecular. Esto inhibe la progresión de la enzima topoisomerasa II. La parte de la molécula aromática

planar se intercala entre 2 pares de bases del ADN, mientras que la parte del azúcar se sienta en el surco menor del ADN.²⁰

Su metabolismo es hepático a través del citocromo p450 en su variante **CYP3A4**, con una vida media de 15-18.5 hrs (*hasta 55hrs en su forma pegilada*) si se administra con liposomas.²⁰

DOX está compuesta de un esqueleto de aglicona unido a un azúcar daunosina a través de un enlace O-glicosídico al carbono 7. La droga pasa por un extenso metabolismo en el hígado y es excretado principalmente en las bilis. Una pequeña fracción (<10%) es eliminado a través de la orina, aproximadamente un 22% de la dosis puede pasar por reciclaje entero hepático.¹⁹

La reducción y deglicosilación de la DOX resulta en la formación de múltiples metabolitos hidroxilados y de aglicona estructuralmente similares. El metabolito primario doxorubicinol (DOX-ol) es producido mediante la carbonil reductasa citosólica, a través de **NADPH**- dependiente de una aldocetoreducción del grupo funcional carbonilo en el C-13. Deglicosilación en el azúcar daunosina en el C-7 produce doxorubicinona y doxorubicinolona. El grupo hidroxilo resultante puede ser metabolizado a 7-deoxidoxorrubicinona o 7-deoxidoxorrubicinilona. Los metabolitos sulfonados y glucorinados se han identificado como metabolitos urinarios.¹⁹

Su efecto adverso más común es la cardiotoxicidad. Sus efectos adversos incluyen náuseas, vómito y arritmias cardíacas, neutropenia, alopecia. La cardiotoxicidad es caracterizada por un declive en la fosforilación oxidativa mitocondrial. Especies reactivas de oxígeno, generadas por la interacción de la doxorubicina con hierro, puede dañar miocitos, causando pérdida microfibrilar y producen vacuolización citoplasmática.²¹

Bray, J y cols, reportaron algunos de los genes que intervienen el metabolismo de la Doxorubicina reportaron que el receptor **Pregane-X Receptor (PXR)**, transportador de entrada de solutos **SLC22A16**, transportadores de flujo de salida (**ABCB1, ABCG2, ABCC5, ABCB5 and RLIP76**) y algunas enzimas metabolizadoras de drogas como Carbonil

reductasas (**CBRI**, **CBR3**) las cuales convierten la doxorubicina en doxorrubinol. Y el citocromo **CYP3A4**.¹⁸

Con respecto a los transportadores se ha reportado que la variante **ABCB1 G2677 T/A** rs2032582 (solo la variante A) está asociada con menor TTP (tiempo para progresión) y OS (supervivencia global), pero no tiene impacto en la intensidad de la dosis. En contraste la variante **SLC22A16 T1226C** fue asociado con una mayor incidencia en el retraso de la dosis, pero no tuvo impacto en la supervivencia. Otro SNP que se ha encontrado que tiene un efecto significativo en TTP fue el **ABCB1 G2677 T/A**, esta variante no sinónima resulta en una sustitución de serina o treonina por alanina. Otra importante mutación de **ABCB1 C3435T** in exon 26 (rs1045642).¹⁸

La expresión de **SLC22A16 T1226C** en células cancerosas está asociada con un incremento en la sensibilidad a los efectos citotóxicos de la doxorubicina, esto puede ser debido a que los pacientes con esta variante son capaces de tomar más doxorubicina en células normales y cancerosas.¹⁸

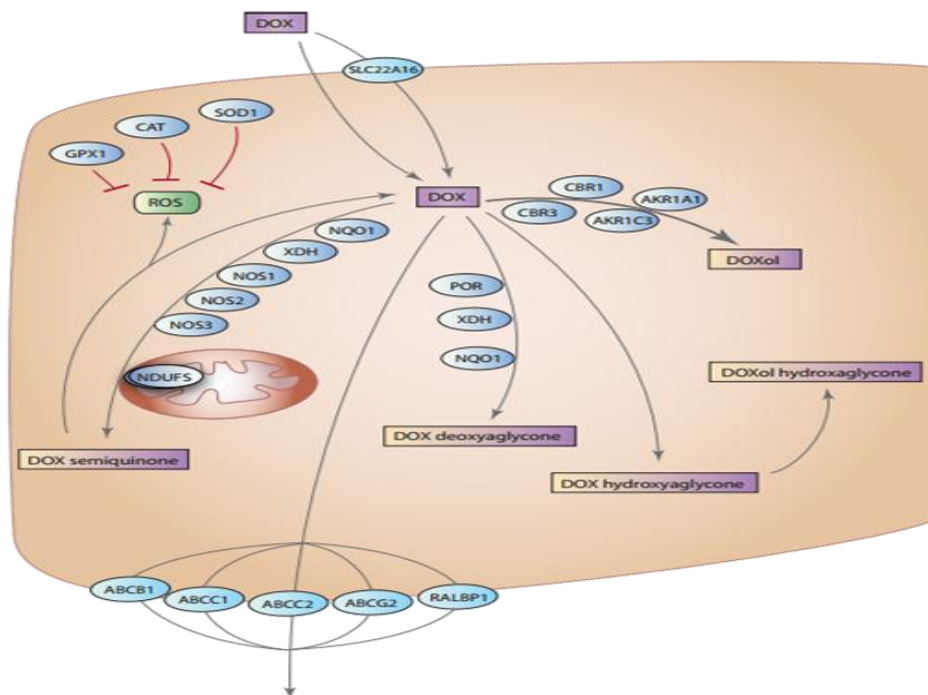


Figura 5. Metabolismo de Doxorubicina, y algunos genes involucrados éste proceso.

1.5.2 Ciclofosfamida

La ciclofosfamida es una oxazofosforina, es un alquilante bifuncional del ADN, fue uno de los primeros agentes no hormonales que mostró actividad antitumoral en humanos. A bajas dosis posee un efecto inmunomodulatorio que es usado como una segunda línea de tratamiento en muchos desordenes inmunitarios. Como otros quimioterapéuticos, la variación en la eficacia y toxicidad de este fármaco existe.²²

La ciclofosfamida es un profarmaco que entra en el hígado y es metabolizado por el sistema del citocromo P450 a compuestos activos e inactivos. Lo convierte en 4-hidroxiciclofosfamida (4-OHCPA) un metabolito activo. Este compuesto es luego transportado a tejidos blanco y transformado en una mostaza fosforamida cuando entra a la célula, lo que produce eventos citotóxicos alquilando el ADN nuclear. Polimorfismos genéticos en las familias enzimáticas CYP-citocromo p450- (**CYP2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 3A4 y 3A5**) encargados de convertir la ciclofosfamida a 4-hidroxiciclofosfamida, GST-Glutation transferasa- (**GSTM1, GSTT1, GSTA1 y GSTP1**)y **ALDH** –aldehído deshidrogenasa- (**ALDH1A1 and ALDH3A1**) se han encontrado que tienen alto impacto en la respuesta y/o toxicidad en las terapias basadas en Ciclofosfamida.^{18, 23}

En especial **CYP2B6*2, *8, *4, y *9**, los cuales se han asociado con una prognosis pobre. **CYP2B6*5** se ha asociado con una mayor incidencia de retraso de dosis (dose delay) y puede estar asociado con un mayor sobrevivencia, ambos pueden ser indicativos de un alto índice de activación de la ciclofosfamida. El polimorfismo **CYP2C19*2** da como resultado un splicing aberrante que genera un marco de lectura alternativo y un codón de paro prematuro, lo cual ha sido asociado con una constante de eliminación más baja para la ciclofosfamida, así como una menor incidencia en la enfermedad falla en ovarios prematura.²³

Se ha observado que pacientes que son homocigotos para e **CYP2C19*2** tienen un riesgo más bajo de desarrollar falla en ovarios

Tabla 1. Antecedentes de trabajos realizados, en los cuales se hace una correlación con la respuesta al tratamiento y genes asociados.

País	Autor	Año	Fármaco (s)	Muestra	Genes correlacionados con respuesta al tto.
Reino Unido	AV Boddy	2010	DOX	Sangre periférica	GSTP1
China	Lin Dong-xin	2011	CP, DOX	Sangre periférica	GSTP1, ABCB1, SLC22A16, CYP2B6
India	Deepa Agrawal	2011	FAC	Sangre periférica	GSTM1 y GSTT1
Arabia Saudita	Ingolf Cascorbi	2011	CP	Sangre Periférica	CYP2C19, ALDH3A1 y GSTA1

1.6 Farmacocinética

La variabilidad interindividual en farmacocinética puede llevar a toxicidades y eficacias impredecibles. Esta variabilidad es particularmente importante en la terapia contra el cáncer debido a l estrecho margen terapéutico que poseen loa agentes anticancerígenos. Algunos factores que contribuyen a la variabilidad entre pacientes son: los ambientales (por ejemplo, edad, dieta, estilo de vida, terapias concomitantes con otras drogas) y fisiológicos así como también genéticos. Polimorfismos en los genes que codifican para las enzimas metabolizadoras, transportadores, o blancos terapéuticos pueden explicar las variaciones interindividuales.²⁴

El campo de la Farmacogenética se enfoca en el metabolismo de drogas, pero también comprende el aspecto de la distribución de las drogas, incluyendo el transporte, excreción y distribución de las drogas.²¹ Relaciones farmacocinéticas, farmacodinámicas y farmacogenéticas han sido demostradas por varios grupos de investigación.

Por esto es importante la determinación de metabolitos en plasma, esto con el objetivo de determinar la cantidad de metabolitos activos. La acción de cualquier fármaco requiere que haya una concentración adecuada de éste en el

medio que baña el órgano diana, para la mayoría de los fármacos el efecto se relaciona con el tiempo entre el aumento y la disminución en la concentración en el tejido diana.

1.6.1 Doxorrubicina

Químicamente las antraciclinas (doxorrubicina) consisten en un anillo de aglicona acoplada a un azúcar amino. Su reducción estereoespecífica, en el grupo carbonilo del C13, por las aldoreductasas citoplasmáticas, en el grupo funcional aglicona, da como resultado 13-S-Dihidroderivados. Esta vía metabólica es la más importante, ya que estos metabolitos son farmacológicamente activos, además, su formación está relacionada con efectos adversos como la cardiotoxicidad.²¹

Esta droga es metabolizada por el hígado y es excretada principalmente por la bilis. Una pequeña fracción (<10%) es eliminada por la orina, se estima que el 22% de la dosis inyectada puede sufrir un reciclamiento enterohepático.

Estudios farmacocinéticos en pacientes con varios tipos de tumores que estaban recibiendo monoterapia (solo doxorrubicina) o multiterapia, han determinado que la Doxorrubicina sigue una disposición después de una administración intravenosa. En 4 pacientes, Doxorrubicina, se demostró una farmacocinética independiente de dosis, en un rango de dosis de 30 a 70 mg/m². La distribución inicial, con una vida media de aproximadamente 5 min sugiere una rápida captura tisular, mientras que su lenta eliminación de los tejidos está reflejada en su vida media terminal que va de las 20 a las 48 horas. El equilibrio dinámico de la distribución varía de los 809 a los 1214 L/m², lo cual también es indicativo de una alta recaptura tisular. La unión de Doxorrubicina a las proteínas plasmáticas es alta, alrededor de un 74 a 76% y es independiente de la concentración de Doxorrubicina en plasma, arriba de 1.1 mcg/mL.²⁵

Se han publicado varios métodos para la cuantificación de antraciclinas y sus metabolitos en suero o en orina, la mayoría de estos ensayos están

basados en el uso de cromatografía de alta resolución (HPLC) acoplada con detección de fluorescencia o espectroscopia de masas (MS). El límite de cuantificación más bajo (LLOQ) de doxorubicina y epirubicina fue fijado en 2.5ng/L en suero y 0.1 mg/L en orina.²⁶

1.6.2 Ciclofosfamida

La ciclofosfamida es un agente alquilante del ADN, es comúnmente usado en el tratamiento de varios cánceres. Es una prodroga que requiere activación metabólica por las monooxigenasas del citocromo p450 (principalmente la isoforma 2B6), dando como producto 4-hidroxiciclofosfamida, la cual luego es hidrolizada a una mostaza fosforamida y una acroleína. La mostaza fosforamida interactúa formando aductos con las guaninas del ADN.

Esta droga es absorbida correctamente después de su administración oral, con una biodisponibilidad de más del 75%. La droga sin biotransformar tiene una vida media de eliminación de 3 a 12 hrs. Ésta es eliminada principalmente en forma de sus metabolitos, pero de un 5 a un 25% de la dosis es excretada en orina como la droga sin cambios. Las concentraciones de los metabolitos alcanzan un máximo en plasma en 2 a 3 hrs después de su administración intravenosa. La unión a proteínas plasmáticas de la droga sin metabolizar es baja, sin embargo la unión de sus metabolitos es de más del 60%.²⁷

Muchas técnicas analíticas basadas en cromatografía se han desarrollado para medir ciclofosfamida y sus metabolitos en plasma humano, incluyendo cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV), cromatografía de gases con detector nitrógeno-fosforo (GC-NPD), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) y cromatografía de capa fina acoplado a un densitómetro. Todos teniendo resultado buenos, con un límite de detección alrededor de los 2.5ng/mL.²⁸

Existen varios estudios donde se hace la determinación de doxorubicina y ciclofosfamida, mediante distintos métodos cromatográficos, como se resume en la siguiente tabla, así como algunos de los genes asociados con la farmacocinética:

País	Autor	Año	Fármaco (s)	Muestra	Método	Genes asociados
Arabia Saudita	Ingolf Cascorbi	2011	CP	Plasma	HPLC-MS	CYP2C19, ALDH3A1 y GSTA1
Italia	Claudio Minoia	2008	CP- DOX- IFOS-	Orina	HPLC-MS	
EUA	Robert DiCenzo	2007	CP, DOX	Plasma	HPLC-MS	

Tabla 2. Antecedentes de trabajos realizados, en los cuales se ha desarrollado algún método para la determinación de éstos metabolitos en plasma, así como un único antecedente en el cual se realiza la farmacocinética y asociación de genes con respuesta al tratamiento.

2 JUSTIFICACIÓN

El CaMa es un problema de salud pública que afecta a mujeres alrededor del mundo. Aunque existen terapias dirigidas contra las células malignas del CaMa, debido al diagnóstico en etapas tardías, cada vez es más común la administración de quimioterapias sistémicas, que junto con el efecto deseado, acarrearán una serie de efectos adversos, muchas veces muy variables y más agresivos que la misma enfermedad a tratar. Por lo que es necesaria la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico y/o pronóstico que nos ayuden a entender los mecanismos de la respuesta al tratamiento, y tratar de ofrecer la opción de un *tratamiento personalizado* que mejore la respuesta individual y nos ayude a prevenir efectos secundarios.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar el resultado al tratamiento por quimioterapia en pacientes diagnosticadas clínicamente con Cáncer de mama, evaluando la farmacogenética, la farmacocinética.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Evaluar una población de 30 pacientes recibiendo el tratamiento AC y obtener datos clínicos y datos de morbilidad a los 21 días post tratamiento.
- 2) Desarrollar y validar un método de UFLC-MS para la determinación del perfil farmacocinético de las pacientes.
- 3) Determinar el perfil farmacogenético de las pacientes, mediante el uso de un microarreglo.
- 4) Correlacionar los datos de farmacogenética y farmacocinética y selección de marcadores que relacionen genotipo y fenotipo.

4 ESTRATEGIA GENERAL

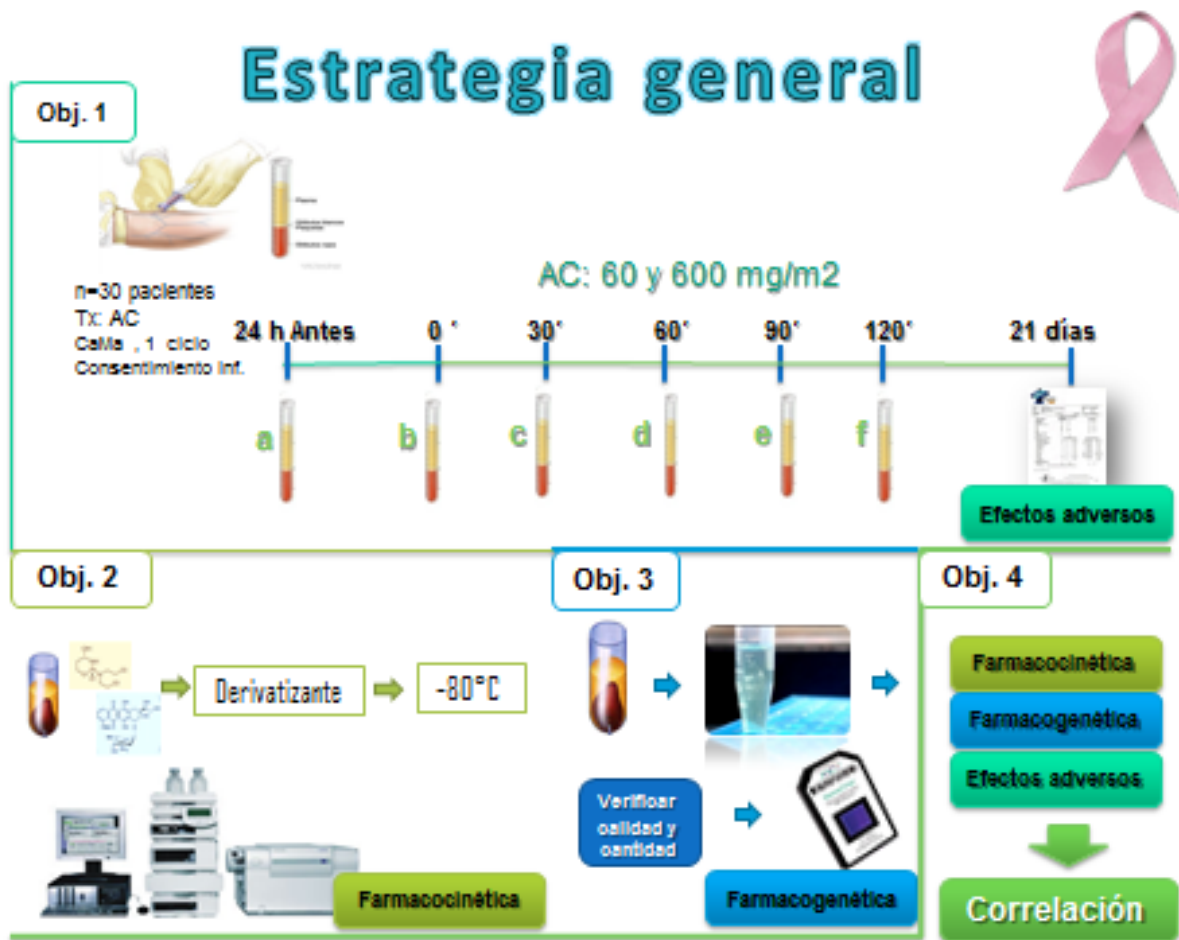


Figura 7. Estrategia General. Se incluyeron pacientes del servicio de oncología del Hospital Universitario “José Eleuterio González” que estaban recibiendo quimioterapia sistémica con el esquema de AC. Se recolectaron muestras de sangre periférica, utilizando Heparina de sodio (3 mL) como anticoagulante, 24 horas antes del ciclo de quimioterapia. Durante el ciclo de quimioterapia se recolectó muestra de sangre periférica, utilizando heparina de sodio como anticoagulante al tiempo 0', 30', 60', 90' y 120'.

- c) Plasma: Se separó el plasma inmediatamente después de la extracción, a los cuales se les agregó 50uL cloruro de dansilo 10mM como derivatizante. Se determinaron los metabolitos activos de los fármacos (4-Hidroxi Ciclofosfamida, Desoxirubicinol). Estos fueron determinados utilizando la técnica de UFLC-MS.
- d) Paquete globular: Se extrajo el ADN genómico, mediante el kit Maxwell el cual fue utilizado para llevar a cabo la genotipificación de los diversos genes implicados en la biotransformación del fármaco. El ADN fue hibridado en los microarreglos DMET 3.0 de Affymetrix, de donde se obtuvieron los datos para ser analizados.

Ya con los datos de la farmacocinética, se relacionaron con los datos de la genotipificación de los pacientes, para encontrar si existe relación entre las alteraciones del genotipo y el porcentaje de fármaco biotransformado. De ésta manera se encontraron biomarcadores que nos servirán para la predicción del resultado a este esquema de quimioterapia en pacientes con cáncer.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Consumibles

Farmacogenética

Puntillas de 10, 100, 1000 para micropipetas, marca Corning Incorporated, Puntillas con filtro de 10, 100, 1000 para micropipetas marca Eppendorf, Microtubos de 0.2, 0.6, 1.5 y 2.0 mL marca Sorensen, Jeringas 3 mL marca Plastipak BD, Agujas marca BD Vacutainer, Tubos con Heparina de Sodio como anticoagulante marca BD Vacutainer, Catéter marca Introcán Certo.

Farmacocinética

Matraces de aforación de 5 mL, Matraces de aforación de 10 mL, Matraces de aforación de 25 mL, Matraces de aforación de 50 mL, Matraces de aforación de 250 mL, Tubos de ensaye de 13x100 mm. Tubos de ensaye con rosca 13x100 mm, Pyrex. Frascos reservorios para la fase móvil de 500 mL con tapa rosca. Schott Duran.

5.1.2 Reactivos

Extracción de ADN genómico.

Kit Maxwell 16 Blood ADN Purification Kit de Promega Corporation.

Farmacogenética

DMET plus premier pack suficiente para 42 reacciones de Affymetrix, Multiplex PCR de QIAGEN, TITANIUM Taq ADN Polimerasa de Clontech, Agarosa grado molecular de BioRad, Marcador de peso molecular 100-1000, Marca Bio-Rad, Agua desionizada.

Farmacocinética

Cloruro de Dansilo y Clorhidrato de Semicarbazida de Sigma Aldrich, Columna UHPLC HILIC y C18 for 4.6 mm de Kinetex, Columna C18 ZORBAX ECLIPSE XDB, Estándares internos Doxorubicinol, 4-OH-ciclofosfamida de Toronto Research Chemicals, Extrán libre de fosfatos, Marca EMD, Agua bidestilada Marca Milli-Q, Etanol industrial Marca Crisol, Hipoclorito de sodio Marca Crisol, Metil Terbutil Eter Marca, Acetonitrilo grado HPLC, Metanol, Hidróxido de amonio, Ácido Acético Glacial , Acetato de amonio , Acetato de Etilo , Acido Fórmico, Carbonato de Sodio y Heptano Marca JT Baker, grado HPLC.

5.1.3 Material biológico.

Se utilizaron 216 muestras de sangre periférica (6 por cada paciente) provenientes de 36 pacientes diagnosticadas clínicamente con cáncer de mama. Se tomó una muestra de sangre periférica a las 24 hrs pre-tratamiento, 0, 30, 60, 90 y 120 minutos durante la administración del medicamento. De las cuales se extrajo ADN genómico (Farmacogenética) y plasma (Farmacocinética).

5.1.4 Equipo

Extracción de ADN genómico:

Equipo Maxwell, marca Promega.

Farmacogenética

Termociclador Mastercycler, Centrifuga refrigerada 5810R, Centrifuga refrigerada 5417R y micropipetas automáticas Eppendorf Research marca Eppendorf AG, Balanza analítica marca O´Haus , Placa de calentamiento Thermo Scientific, Cámara de electroforesis marca bio-Rad, Fuente de poder PowerPac HC, Gel Doc XR + System BioRad, GeneChip Fluidics Station 450,

GeneChip Hybridization Oven 645, GeneChip Scanner 3000 7Gmarca Affymetrix.

Farmacocinética

Detector ABSCIEX, MOdelo API 5000 Triple Q Marca Applied Biosystems Cromatografo Marca Shimadzu, Modelo UFLC Prominence, Balanza analítica Marca Ohaus, Potenciómetro Maraca Thermo Scientific, Ultracongelador Marca Thermo Scientific, Vortex Gene 2 Marca Scientific Industries, Purificador de Agua Marca Milli-Q.

5.1.5 Programas Computacionales

- GeneChip Command Console Software (AGCC).
- DMET Console Software.
- Integrador Analyst Intelliquan.

5.2 Métodos

5.2.1 Lugar de realización del estudio.

El presente estudio se llevó a cabo en la Unidad de Diagnóstico Molecular (UDM) del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la UANL en conjunto con las siguientes instituciones:

- Servicio de Oncología del Centro Universitario contra el Cáncer del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”
- Laboratorio de Química Analítica de la empresa DEBBIOM (Desarrollos Biomédicos y Biotecnológicos de México, S.A. de C.V.)

5.2.2 Grupo de estudio.

Se reclutaron 36 muestras de pacientes mujeres mayores de 18 años diagnosticadas clínicamente con cáncer de mama, con perfiles cardiaco, renal, y hepático normales y que recibieron el esquema Adriamicina/Ciclofosfamida, como quimioterapia sistémica, recibiendo el primer ciclo de quimioterapia y que aceptaron participar en el estudio, firmando la carta de consentimiento informado, aprobada por el comité de ética de la Facultad de Medicina “José Eleuterio González” de la UANL.

5.2.3 Recolección de muestras.

Las mujeres participantes en nuestro estudio fueron seleccionadas de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

INCLUSIÓN

- Mujeres mayores de 18 años.
- Perfiles cardiaco, renal, y hepático normales.
- Reciban AC.
- Acepten participar en el estudio.
- Firmen la carta del comité de ética: No. BI11-005

EXCLUSIÓN

- Embarazo.
- Otro régimen de tratamiento.
- Haber recibido quimioterapia previa, por alguna otra neoplasia.
- Que no quede tejido residual para el análisis post-tratamiento.

ELIMINACIÓN

- Material insuficiente para los estudios.
- Mal estado de la muestra.
- Falta de datos clínicos para el análisis estadístico.

Los datos adicionales que se colectaron fueron los efectos adversos agudos, es decir 21 días post tratamiento, estos efectos adversos fueron neutropenia, anemia, vómito y náuseas. Mientras que algunos efectos adversos leves que se registraron fueron alopecia y malestar general.

5.2.4 Extracción de ADN genómico.

La extracción de ADN se realizó a partir de sangre total, la cual se centrifugó a 12,000 g durante 15 minutos y se tomaron 400 uL de la capa mononuclear y se procesó por medio de los dos métodos siguientes:

a) Utilizando el kit Maxwell 16 Blood ADN de Promega, se utilizaron 500 uL y llevó a cabo la extracción en el equipo Maxwell® 16 Clinical Instrument System, siguiendo las instrucciones del proveedor.

b) Utilizando la otra parte del paquete globular se llevó a cabo la extracción de ADN por la técnica de TSNT que a continuación se especifica.

1. Centrifugar la sangre a 2000 rcf por 15´.
2. Tomar 500 uL de la capa mononuclear en un tubo de 2mL.
3. Agregar 200 uL de TSNT, mezclar por inversión y vortex 3´.
4. Agregar 500 uL de Fenol saturado, mezclar por inversión y vortex 3´.
5. Agregar 100 uL SEVAG, mezclar por inversión y vortex 3´.
6. Agregar 200 uL TE 1x, mezclar por inversión y vortex 1´.
7. Centrifugar 10´ a 13500 rpm
8. Transferir la fase acuosa a un tubo ependorf.
9. Repetir los pasos del 5 al 8.
10. Precipitar el ADN agregando 1 mL Etanol al 100%, mezclar suavemente hasta observar una hebra blanca (ADN+ proteínas)
11. Centrifugar 10´ a 13500 rpm.
12. Decantar.
13. Agregar 500 uL Etanol al 70% mezclar.
14. Centrifugar 10´ a 13500 rpm.
15. Decantar, eliminar el exceso de etanol e invertir los tubos sobre papel absorbente, secar la pastilla a T° ambiente.
16. Resuspender la pastilla en 50-100 uL TE 1x.
17. Dejar en agitación al menos 4 hrs.

18. Cuantificar y checar integridad en un gel de agarosa al 1%.

5.2.5 Cuantificación de ADN por la técnica de PicoGreen.

El ADN obtenido mediante el uso del kit de Maxwell, fue cuantificado mediante el uso del kit: Quant-iT™ PicoGreen® dsADN. Siguiendo el protocolo que a continuación se describe:

1. Se Preparó una solución estándar de trabajo del reactivo Quant-iT haciendo una dilución de 200 veces de la solución concentrada del reactivo que contiene DMSO en TE. Preparado en un contenedor de plástico, preferente a uno de cristal, esto debido a que el reactivo se adhiere al cristal. Se protegió la solución de la luz, debido a que ésta es sensible a la foto degradación.

a. Preparación de la curva estándar de ADN.

A partir de una solución stock de 2 ug/mL de dsADN diluido en TE (proveniente del kit). La cual debió de ser tratada de la misma manera que las muestras a analizar para que sea un efectivo control de calidad. Se preparó una curva de concentración de 1ng/mL a 1 ug/mL. Según la siguiente tabla:

Volume (µL) of TE	Volume (µL) of 2 µg/mL DNA Stock	Volume (µL) of Diluted Quant-iT™ PicoGreen® Reagent	Final DNA Concentration in Quant-iT™ PicoGreen® Assay
0	1,000	1,000	1 µg/mL
900	100	1,000	100 ng/mL
990	10	1,000	10 ng/mL
999	1	1,000	1 ng/mL
1,000	0	1,000	blank

Tabla 3. Curva de concentración para PicoGreen.

2. A cada una de las soluciones anteriores se le agregó 100 uL se la solución estándar de trabajo (preparada en 1). Se incubó de 2-5 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz.

3. Después de la incubación, se midió la fluorescencia de la muestra utilizando un espectrofluorómetro con las longitudes de onda estándares (excitación ~ 480 nm, emisión ~520 nm). Para asegurar que las lecturas de las muestras recaen en el rango de detección del espectrofluorómetro, la ganancia del mismo se debe fijar de tal manera que la fluorescencia de la muestra más concentrada esté cerca del límite máximo de detección del espectrofluorómetro.
4. Se sustrajo la fluorescencia del “blanco” de cada una de las muestras. Utilizando los datos ya corregidos para generar la curva estándar de fluorescencia contra concentración de ADN.
 - b. Para la preparación de las muestras a cuantificar.
1. Se diluyó la solución de ADN en TE a un volumen final de 100 uL. La dilución puede variar teniendo en cuenta que una alta dilución de la muestra experimental puede disminuir el efecto de interferencia de ciertos contaminantes. Sin embargo, volúmenes muy pequeños de las muestras deben de ser evitados debido a que son difíciles de pipetear con exactitud. En nuestro caso se tomó 2 uL de cada muestra y 98uL de TE. Se añadió a cada una de las muestras 100 uL de la solución estándar de trabajo (preparada en 1). Se incubó de 2-5 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz.
2. Después de la incubación se midió la fluorescencia de cada una de las muestras con las condiciones ya establecidas que se utilizaron para llevar a cabo la curva estándar.
3. Se sustrajo la fluorescencia del blanco de cada una de las muestras. Se determinó la concentración de ADN de cada una de las muestras de acuerdo a la curva estándar generada.

5.2.6 Genotipificación de muestras mediante análisis de microarreglos (DMET Affymetrix)

Para llevar a cabo la parte de farmacogenética se utilizaron los microarreglos DMET de Affymetrix. Siguiendo el siguiente protocolo:

1. Preparación de muestra.

De acuerdo a la concentración de cada una de la muestras de ADN genómico previamente calculadas mediante el kit Quant-iT™ PicoGreen® dsADN. Se normalizaron a una concentración final de 60 ng/uL utilizando buffer 1X TE.

1.1. mPCR

- a) Se llevó a cabo una dilución del ADN genómico Stock: Se tomaron 10 uL de buffer TE1X y 2 uL del ADN stock a 60 ng/uL. Para obtener una concentración final de 10 ng/uL.
- b) Se agitó y se centrifugó brevemente.
- c) Se llevó a cabo la preparación del master mix, utilizando reactivos del kit QIAGEN Multiplex PCR Master Mix y del DMET plus Kit de acuerdo a la tabla siguiente:

Reactivo	1x
Multiplex MM	25
mPCR Primer	5
5x Q-solution	5
RNase water	10
Total	45

Tabla 4. Master Mix para mPCR.

- d) Se agregó 5 uL de la dilución de ADN, se mezcló por pipeteo 5 veces.
- e) Se corrió en el termociclador el programa DMET Plus mPCR.

<i>DMET Plus mPCR</i>	
94°	15'

35x	95°	30''
	60°	90''
	72°	45''
	72°	3'
	4°	Infinito

Tabla 5. Programa termociclador para mPCR.

1.2. Diluir productos de mPCR.

- a) Se sacó la placa del termociclador, se puso en hielo por 2 minutos, se centrifugó brevemente.
- b) Se mezcló el PCR Dilution Buffer por inversión 10 veces.
- c) Se agregaron 153 uL de PCR Dilution Buffer a un tubo de PCR de 200 uL, rotularlo como DP1.
- d) Se agregaron 5 uL del producto de la mPCR, mezclar por pipeteo. Vf=158uL.
- e) Se mezcló por pipeteo 10 veces.
- f) Se agregó 153 uL de PCR Dilution Buffer a un tubo de PCR de 200 uL, rotularlo como DP1.
- g) Se agregaron 5 uL del producto de la mPCR, se mezcló por pipeteo. Vf=158uL.
- h) Se mezcló por pipeteo 10 veces. Los productos de PCR se diluyeron 1000 veces.

1.3. Alineamiento.

- a) Se rotuló un tubo con Ann, se preparó la mezcla de alineamiento como se muestra en la siguiente tabla, se mezcló por pipeteo 5 veces.

Reactivo	1x
Pre-Amp Water	16.6
Buffer A	5
Enzima A	0.0625
	21.6625

Tabla 6. Master Mix Alineamiento.

- b) Se agregaron 13.4 uL del tubo GP1, se mezcló por pipeteo.
- c) Se agregaron 5 uL del producto diluido de la mPCR DP2 Vf= 40.1 uL
- d) Se mezcló por pipeteo.
- e) Se agitó y se centrifugó brevemente.
- f) Se inició el programa DMET Plus Anneal, cuando la T° alcanzó los 20°C, se cargó la placa.

DMET Plus Anneal		
20°	4´	
95°	5´	Añadir 5 uL DMET
		→ MIP Panel
95°	5´	
58°	16-18 hrs	

Tabla 7. Programa del termociclador de Alineamiento.

- g) Al final de los primeros 95°C, se presionó Pausa.
- h) Se quitó la placa y se puso en hielo por 2 min.
- i) Se añadieron 5 uL DMET MIP Panel, se pipeteó 3 veces para lavar las puntas. Vf= 45.1 uL.
- j) Se selló, vortexeó la placa, y se le dio spin 2000 rpm 30-60 seg.
- k) Se regresó al termociclador placa y se presionó continuar, se incubó durante 16-18hrs.

1.4. Gap Fill a través de amplificación.

- a) Se preparó el mix Gap Fill como se indica a continuación.
- b) Se agregaron 2.5 uL Gap Fill Mix, se selló, vortexeó la placa, y se le dio spin 2000 rpm 30-60 seg.
- c) Se transferirieron 12 uL de cada reacción a la placa ASY, Se selló, vortexeó la placa, y se le dio spin 2000 rpm 30-60 seg.

- d) Se empezó el programa DMET Plus Assay, se esperó a que llegara a 58°C, se cargó la placa.

DMET Plus Assay		
58°	11'	5 uL dNTP mix
58°	11'	5 uL Exo mix
37°	15'	
95°	5'	30 uL Univ Amp Mix
60°	5'	
95°	7 min	
23x	95°	15'' Vf= 52 uL
	64°	15''
	68°	30''
	68°	7''
4°	infinito	

Tabla 8. Programa termociclador Gap Fill.

- e) Al final de los primeros 58°C, se presionó Pausa.
 f) Se quitó la placa y se puso en hielo por 2 min.
 g) Se añadieron 5 uL dNTP mix, se pipeteó 3 veces para lavar las puntas.
 h) Se selló, vortexeó la placa, y se le dio spin 2000 rpm 30-60 seg.
 i) Se regresó al termociclador placa y se presionó continuar.
 j) Después de los segundos 58°C, se presionó Pausa.
 k) Se quitó la placa y se puso en hielo por 2 min.
 l) Se añadieron 5 uL Exo mix, se pipeteó 3 veces para lavar las puntas.
 m) Se selló, vortexeó la placa, y se le dio spin 2000 rpm 30-60 seg.
 n) Se regresó al termociclador placa y se presionó continuar.
 o) Después de los primeros 5' a 95°C, se presionó Pausa.
 p) Se quitó la placa y se puso en hielo por 2 min.
 q) Se añadió 30 Universal Amp mix, como se indica en la tabla siguiente, se pipeteó 3 veces para lavar las puntas.

Reactivo	uL
Claevage Ez	0.52

TITANIUM Ez.	1.5
Uni Amp Mix	28
	30

Tabla 9. Master Mix Universal Amp Mix.

- r) Se selló, vortexeó la placa, y se le dio spin 2000 rpm 30-60 seg.
- s) Se regresó al termociclador placa y se presionó continuar.

1.5. PCR Clean up.

- a) Se quitó el tubo de alineamiento del termociclador, se puso en hielo 2 min, se le dio spin 2000 rpm 30-60 seg.
- b) Se le dio spin 2000 rpm 30-60 seg al PCR Clean up Mix.
- c) Se agregó 2.5 uL a cada reacción. Vf= 54.5 uL
- d) Se selló, vortexeó la placa, y se le dio spin 2000 rpm 30-60 seg.
- e) Se puso la placa en el termociclador y se corrió el programa DMET Plus Cleanup.

<i>DMET Plus Cleanup.</i>	
37°	15´
80°	15´
4°	infinito

Tabla 10. Programa termociclador PCR Clean Up.

- f) Se quitó el tubo del termociclador, hielo 2 min, Spin.
- g) Se hizo un gel de agarosa al 3%.
- h) Se cargaron 2 uL (8 uL TE 1x+ 2 uL de Buffer de carga + 2 uL reacción).
- i) Se cargó el marcador de peso molecular 100-1000.
- j) Se corrió el gel a 120V por 20 min.
- k) La banda esperada estará entre 100-150 pb.

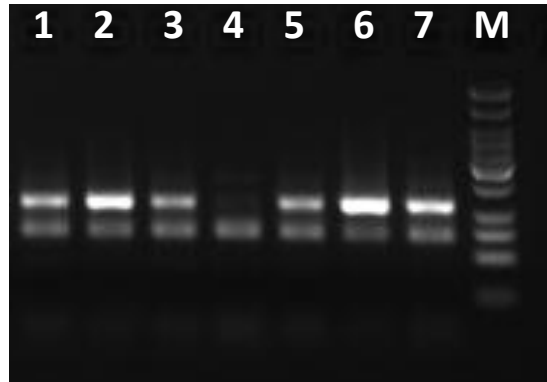


Figura 8. Gel de control de calidad 1, banda esperada, entre las 100 y 150 pares de bases. Carriles 1-7 muestras de pacientes, con la banda esperada, carril 4 muestra una muestra sin la banda esperada, carril M, marcador de peso molecular de 1000-50 pb.

1.6. Fragmentación.

- Se transfirieron 25 uL la reacción de PCR Clean up a un tubo marcado como frag.
- Se preparó el Fragmentation Master Mix como se indica a continuación. Siempre en hielo.
- Se agregó primero el agua y el buffer de fragmentación y se enfrió la mezcla en hielo por 5 minutos.

Reactivo	uL
Post-Amp Water	8.9
Frag. Buffer	1
Frag. Enzyme	0.0675
	10

Tabla 11. Fragmentation Master Mix.

- Se agregó la mezcla anterior al tubo marcado como fragmentación 25 uL. Vf= 35 uL.
- Se selló, vortexeó la placa, y se le dio spin 2000 rpm 30-60 seg.
- Se puso el tubo en el termociclador y se corrió el programa DMET Plus Frag.

DMET Plus Fragment	
37°	15'

95°	15´
4°	infinito

Tabla 12. Programa termociclador Fragmentation.

- g) Se quitó el tubo del termociclador, hielo 2 min, Spin.
- h) Se hizo un gel de agarosa al 3%.
- i) Se cargaron 10 uL de cada reacción+ 2 uL de Buffer de carga.
- j) Se corrió el gel a 120V por 24 min.
- k) Fragmentos <120pb, mancha predominante alrededor de las 50 pb.



Figura 9. Gel de control de calidad 2, Barrido esperado menor a 100 pb, con una mancha principal entre las 75 y 50 pb. Carriles 1-3 muestras de pacientes, mostrando el barrido esperado, carril M, marcador de peso molecular de 1000-50 pb.

1.7. Etiquetado.

- a) Se preparó la mezcla de etiquetado como se muestra en la siguiente tabla, se mezcló por pipeteo 5 veces.

Reactivo	1
Post-Amp Water	0.4
5x TdT Buffer	7
ADN Labeling Reagent	0.9
TdTEnzyme	1.7
	10

Tabla 13. Etiquetado Master Mix.

- b) Se agregaron 25 uL de la reacción de fragmentación y 10 uL de la mezcla recién preparada.
- c) Se selló, vortexeó la placa, y se le dio spin 2000 rpm 30-60 seg.
- d) Se inició el programa DMET Plus Label.

2. Hibridación de la muestra en un microarreglo.

Se llevó a cabo como indica el siguiente protocolo:

- a) Sacar los microarreglos a atemperar a T° ambiente.
- b) Precalentar el horno de hibridación a 49°C y 35rpm.
- c) Rotular los microarreglos
- d) Inserte una puntilla sin filtro y en el septum derecho.
- e) Preparar la mezcla de hibridación como se indica a continuación.

	1
Oligo Control reagent	0.78
Hybridization Solution	93
	93.78

Tabla 14. Hibridación Master Mix.

- f) Agregar 92 uL de la mezcla recién preparada y 8uL de cada reacción de la reacción de etiquetado.
- g) Sellar, vortexear el tubo, spin 2000 rpm 30-60 seg.
- h) Iniciar el programa DMET Denature (95°, 10min)
- i) Generar y cargar un archivo de la muestra y su lote de registro. "Sample Batch Registration File."
 - i. Generar un archivo de registro.
 - ii. Escanear los códigos de barras de los microarreglos.
 - iii. Subir la información de la muestra y el microarreglo a la "Affymetrix Genechip Command Console"
- j) Después de 10 min de desnaturalización de la muestra, spin 2000 rpm 30-60 seg.
- k) Aspire 95 uL de la muestra desnaturalizada en cada microarreglo.
- l) Cubra los septums con Tough-Spots.

m) Ponga los microarreglos en el horno de hibridación. Permita incubar a 49°C a 35rpm por 16 o 18 hrs máximo.

3. Lavado y teñido de microarreglos.

Se llevó a cabo como indica el siguiente protocolo:

- a) Descongele Stain buffer and Hold Buffer, mezclar por inversión 5 veces.
- b) Mantener en hielo hasta su uso.
- c) Realizar el “Prime” a la estación de fluidos.
 - i. Encienda la estación de fluidos, ponga el Buffer de lavado A y B, y el agua desionizada en los lugares designados.
 - ii. Ingrese al Affymetrix Launcher, AGCC Fluidics Control.
 - iii. Seleccione “PRIME_450” y cópielo a los módulos seleccionados.
 - iv. Seleccione Run All.
- d) Prepare la solución de teñido SAPE, Mezclar por pipeteo 5 veces, es sensible a la luz. Vial 1.

Reactivo	uL
Stain Buffer	299
SAPE	1.7
	300.7

Tabla 15. Solución de teñido de microarreglos.

- e) Reservar en hielo.
- f) Poner 300 uL del Hold Buffer en un tubo eppendorf. Vial 2.
- g) Cargar los viales 1 y 2 en la estación de fluidos.
- h) Seleccionar el programa DMET_Plus_169_v2.
- i) Quite los microarreglos del horno de hibridación, quite las Tough-Spots, introduzca los microarreglos en la estación de fluidos, inicie el programa.
- j) Verifique que los microarreglos no contengan burbujas, si no contienen pase al siguiente paso, si sí, contienen burbujas reintrodúzcalos en la estación de fluidos.

4. Escaneo.

Se llevó a cabo como indica el siguiente protocolo:

- a) Encienda el escáner 10 minutos antes de iniciar el escaneo de los microarreglos.
- b) Cubra los septums con Tough-Spots.
- c) Escaneé el código de barras.
- d) Verifique que la ventana no tenga polvo, manchas, etc.
- e) Cargue el microarreglo en el escáner.

5. Análisis.

Una vez obtenida la imagen del microarreglo se procede con el análisis del mismo, el cual se realiza mediante el uso del DMET Console Software. Resultado del análisis se obtiene un puntaje de control de calidad, el cual debe de estar por encima del 98% para obtener resultados confiables.

5.2.7 Estandarización del método UFLC-MS y análisis de las muestras

Para iniciar el estudio farmacocinético de la pacientes, fue necesario preparar derivatizantes, con el objetivo de precipitar proteínas presentes en el plasma y hacer más estable el analito a estudiar, los derivatizantes se prepararon como a continuación se indica.

1. Preparación de derivatizantes.

Cloruro de Dansilo 10 mM

Soluble en: Acetonitrilo

Insoluble en: Agua

PM: 269.75 g/mol

1 M = 269.75 g en un litro

10 mM= 2.6975g

Clorhidrato de Semicarbazida 100 mM

Soluble en: Agua

PM=111.53 g/mol

$$1M = 111.53 \text{ g}$$

$$100 \text{ mM} = 11.153 \text{ g/mol}$$

Para iniciar con la validación del método para la determinación de 4-OH-ciclofosfamida y doxorubicinol, en plasma humano se inició con la preparación de soluciones madre de los metabolitos a determinar en nuestras pacientes.

2. Soluciones Madre

Solo se tomó en cuenta la base del compuesto, es decir no se tomó en cuenta si el reactivo está combinado con alguna sal. Por ejemplo en el caso de citrato de doxorubicinol, solo se tomará en cuenta la concentración de doxorubicinol y no del citrato, que es como viene combinado.

Del límite de cuantificación revisado en sus respectivas bibliografías se pesará 100 veces más.

Citrato de doxorubicinol (85% pureza, referente al citrato)

Soluble en DMSO y Agua

PM: 1828.73 g/mol

Peso del doxorubicinol: $(544.52 \times 3) = 1633.56$

10 mg \rightarrow 1633.56

X \rightarrow 1828.3

X = 11.1921 mg

Peso real: 11.20 mg

4-OH-ciclofosfamida

Se diluyeron 2 frascos de 5mg en 50 mL de solución de clorhidrato de semicarbazida 100mM.

3. Curvas de calibración

Las soluciones Madre se prepararon a una concentración final de 200 mg/uL. A partir de estas soluciones Madre se realizaron 7 puntos para construir la curva de concentración, estos 7 puntos fueron seleccionados tomando en

cuenta la Cmax previamente reportada en cada caso (Doxorrubicinol Cmax:42.70 ng/mL²⁹, 4-OH-Ciclofosfamida Cmax:67 ng/mL³⁰,) ésta será tomada como referencia y el 1% será el inicio de la curva: CC1(Curva concentración 1) y el doble de la misma será el término de la curva:CC7 (Curva concentración 7). Posteriormente se proponen otros 5 puntos adicionales dentro del intervalo de estas concentraciones, considerando que sean lineales en múltiplos de 10, de rango amplio y que abarquen 3 órdenes de magnitud según sea el caso, quedando como se muestra en la siguiente tabla:

	CP	DOL
	ng/mL	ng/mL
CC 1	50	4
CC 2	300	10
CC 3	600	20
CC 4	800	30
CC 5	1000	50
CC 6	1200	60
CC 7	1400	80

Tabla 16. Concentraciones utilizadas para las Curvas de calibración para 4-OH-Ciclofosfamida y Doxorrubicinol.

De la misma manera se determinaron 3 puntos de control de calidad, un punto de control bajo, es decir cercano al límite inferior de la curva de calibración, un punto de control medio, a la mitad de la curva de calibración y por último un punto de control alto, cerca del límite superior de la curva de calibración.

	CP	DOL
	ng/mL	ng/mL
PC1	150	12
PC2	700	40
PC3	1100	70

Tabla 17. Concentraciones utilizadas para los puntos de control de calidad para 4-OH-Ciclofosfamida y Doxorrubicinol.

4. Fase móvil (Tunning)

Para la elección de la fase móvil se hicieron varias pruebas y quedaron las fases móviles como a continuación se describen.

Acetato de Amonio 20 mM y Metanol para Doxorrubicinol.

50:50 volumen-volumen.

Acetato de Amonio 20 mM

PM: Acetato de Amonio 77.08 g/mol

1 Litro=1.516g

pH=3.5 ajustando con Ácido Acético concentrado.

Buffer de Formiato de Amonio 5 mM y Acetonitrilo para Ciclofosfamida

Formiato de amonio 5 mM

pH: 4 ajustando con Ácido Acético concentrado.

5. Técnicas de extracción Líquido-Líquido.

a. Para Doxorrubicinol:

- 1.- Agregar 350 uL de plasma a un tubo con rosca.
- 2.- Alcalinizar agregando 25 uL de hidróxido de amonio.
- 3.- Vortex durante 20 segundos.
- 4.- Agregar 6 mL de Acetato de Etilo.
- 5.- Vortex 1 minuto.
- 6.- Centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos, a 4°C.
7. - Congelar a -80°C durante 15 minutos.
- 8.- Decantar a tubos sin rosca.

- 9.- Secar a flujo de nitrógeno 45°C en baño maría durante 15 minutos.
- 10.-Reconstituir con 200 uL agua mili Q al 1% con ácido fórmico.
- 11.- Vortex 20 segundos.
- 12.-.Transferir a un vial de cristal.

b. Para Ciclofosfamida:

- 1.- Agregar 200 uL de plasma a un tubo con rosca.
2. - Alcalinizar agregando 100 uL de carbonato de sodio.
- 3.- Vortex durante 20 segundos.
- 4.-Agregar 7 mL de Heptano.
- 5.- Vortex 1 minuto.
- 6.- Centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos a 4°C..
- 7.- Congelar a -80°C durante 15 minutos.
- 8.- Decantar a tubos sin rosca.
- 9.- Secar a flujo de nitrógeno 45°C en baño maría durante 15 minutos.
- 10.-Reconstituir con 200 uL Acetato de amonio 20 mM..
- 11.- Vortex 20 segundos.
- 12.-.Transferir a un vial de cristal.

6. Parámetros de validación.

Los métodos desarrollados para los 2 analitos se validaron considerando las recomendaciones de la NOM SSA1-1998. Los parámetros evaluados fueron linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

El integrador Analyst Intelliquan, será utilizado para determinar el área de Doxorubicinol y 4-OH-Ciclofosfamida para obtener la relación de áreas (y) la cual será ajustada a la concentración de Doxorubicinol y 4-OH-Ciclofosfamida (x), por medio de un análisis de regresión $y = mx + b$, donde b es la ordenada y m es la pendiente de la curva de calibración, con ponderación $1/x$. La concentración experimental (recuperada) será obtenida introduciendo la relación de áreas (Doxorubicinol y 4-OH-Ciclofosfamida) en la ecuación de la línea recta generada.

Los criterios de aceptación para cada parámetro validado se muestran a continuación:

a) Desempeño del Sistema Cromatográfico.

- ⇒ La relación entre áreas de Doxorubicinol con un C.V. no mayor al 15%
- ⇒ Considerar $C.V \leq 5\%$ para el Tiempo de retención
- ⇒ Repetibilidad: Área del analito $C.V \leq 15\%$

b) Selectividad, Especificidad y Supresión Iónica del método.

- ⇒ No debe observarse interferencia iónica de los plasmas en los tiempos de retención de las sustancias probadas con los picos de interés.
- ⇒ Evaluar si alguna de las sustancias probadas incrementan o disminuyen la ionización de Doxorubicinol a través de la desviación absoluta, el cual no debe diferir del $\pm 15\%$
- ⇒ Un valor de efecto matriz cercano a cero representa efecto matriz bajo.

c) Para linealidad del método se emplearán los siguientes criterios.

- ⇒ Coeficiente de correlación ($r \geq 0.99$)
- ⇒ Coeficiente de determinación ($r^2 \geq 0.98$)
- ⇒ Pendiente de la regresión $\neq 0$
- ⇒ Establecer el Intervalo al 95% para el intercepto.
- ⇒ Desviación absoluta en cada nivel de concentración no debe ser mayor al 15% a excepción del LC que no debe ser mayor al 20%.

d) Para evaluar la Repetibilidad:

- ⇒ C.V. \leq 15% para cada nivel.
- ⇒ Desviación Absoluta \leq 15 % para cada nivel

e) Para evaluar la reproducibilidad de los datos de recobro entre días:

- ⇒ C.V. \leq 15% para cada nivel
- ⇒ Desviación Absoluta \leq 15 % para cada nivel

f) Recobro Absoluto:

- ⇒ Estadísticamente comparar los resultados de las áreas de las series de puntos control blanco y extraído, observando la diferencia en áreas para el analito de manera independiente.
- ⇒ El porcentaje de esta(s) razón(es) no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del rango.

g) Límite de Cuantificación:

- ⇒ El promedio debe estar dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal.
- ⇒ El C.V. \leq 20 %
- ⇒ La relación señal ruido debe ser \geq 10:1

h) Límite de Detección:

- ⇒ La relación señal ruido debe ser \geq 3:1

i) Estabilidad del método:

- ⇒ La concentración promedio evaluada debe estar dentro del $\pm 15\%$ del valor promedio obtenido al tiempo cero. (Desviación absoluta)

j) Estabilidad en solución:

- ⇒ La relación de Áreas entre analito y estándar Interno deben estar dentro del $\pm 15\%$ del valor promedio obtenido al tiempo cero. (Desviación absoluta)

k) Tolerancia al método:

Criterios de aceptación para analito:

- ⇒ C.V. \leq 15% para cada nivel individual conforme su valor nominal y en promedio
- ⇒ Desviación Absoluta \leq 15 % para cada nivel

l) Reproducibilidad entre analistas:

Para evaluar este punto se necesita cumplir con la corrida analítica para cada punto control evaluando precisión y exactitud conforme su valor nominal, evaluando esto se toma en cuenta para comparación entre los analistas. Donde se deben de cumplir los criterios siguientes:

- ⇒ C.V. \leq 20% para cada nivel.
- ⇒ Desviación Absoluta \leq 15 % para cada nivel

5.2.8 Análisis estadístico

Se llevó a cabo el análisis estadístico haciendo la comparación entre los distintos grupos de pacientes formados al final del análisis. Utilizando una comparación de proporciones entre las frecuencias alélicas de los grupos “control” (Pacientes con un metabolismo normal (EM) en el caso de la farmacocinetica y el grupo de pacientes sin efectos adversos) contra los grupos de “estudio” (Grupos de pacientes con metabolismo modificado (PM o UM) y grupo de pacientes que presentaron algún efecto adverso).

6 RESULTADOS

6.1 Descripción de la población de estudio

Se recolectaron muestras de 36 pacientes con diagnóstico clínico confirmado de CaMa, que estaban recibiendo el régimen de quimioterapia AC (Adriamicina/Ciclofosfamida), en cuanto a sus datos sociodemográficos, el 81% de ellas eran originarias del estado de Nuevo León (Figura 10). Mientras que la edad más frecuente fue entre 46 y 50 años de edad (Figura 11), el 56% de las pacientes mencionó estar casada (Figura 12).

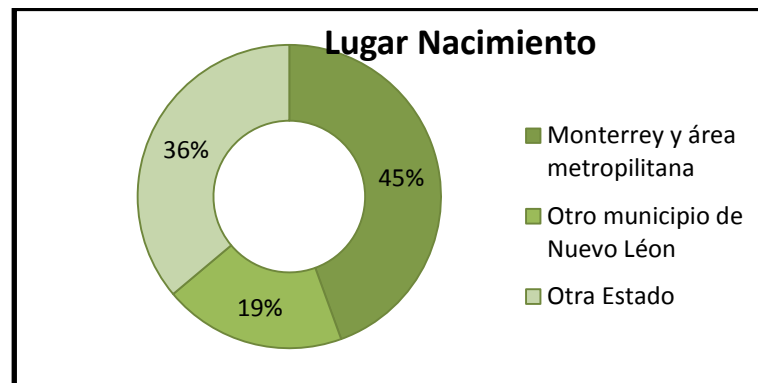


Figura 10. Gráfica que muestra el lugar de nacimiento más frecuente en nuestro grupo de estudio.

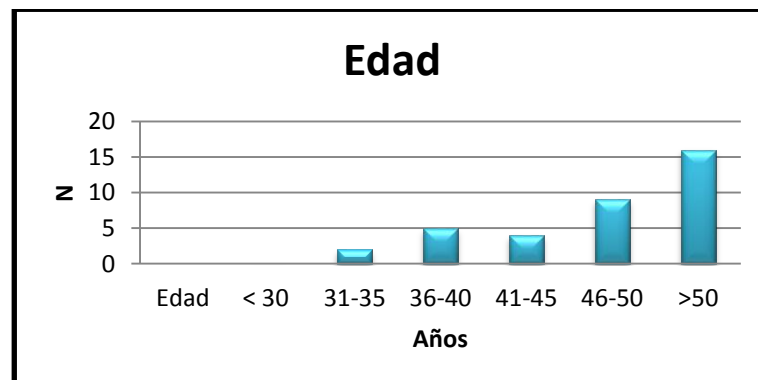


Figura 11. Gráfica que muestra la edad más frecuente en nuestro grupo de estudio.

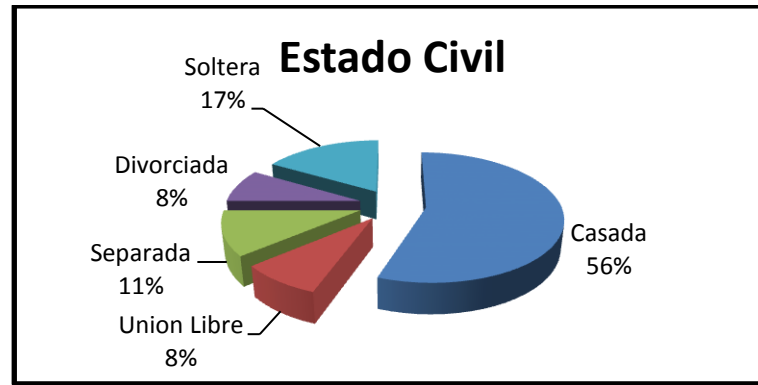


Figura 12. Gráfica que muestra el estado civil más frecuente en nuestro grupo de estudio.

En relación a los factores de riesgo, previamente reportados en la literatura, se observó que la mayoría de las pacientes reportó que la edad de la menarquía estaba entre los 10 y 15 años (Figura 13). Así como también la mayoría, 66%, reportó estar ya en la etapa de menopausia (Figura 14). En cuanto al uso de Anticonceptivos orales, la mayoría de las pacientes refirió no estar usando anticonceptivos orales, ya que el 63% refirió no estar bajo este régimen (Figura 15), en cuanto a nuliparidad, solamente el 14% reportó no haber estado embarazada (Figura 16). Por otra parte el 69% de las pacientes refirió haber lactado. (Figura 17) En cuanto a antecedentes heredo familiares de CaMa, el 39% refirió si tener antecedentes, mientras que el 61% no reportó antecedentes (Figura 18).

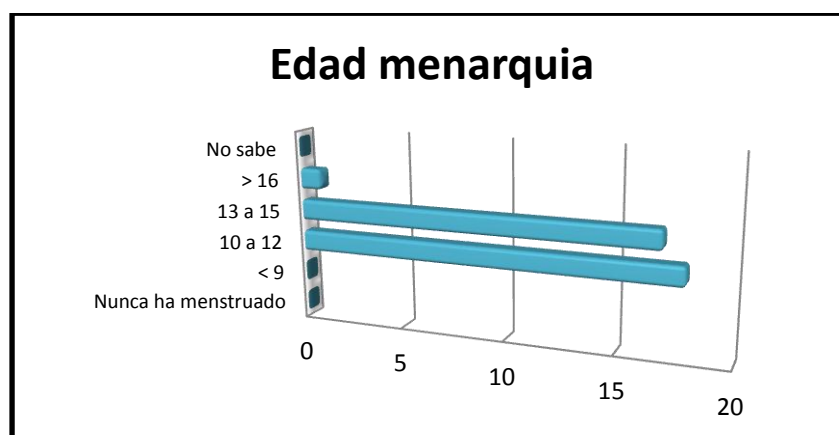


Figura 13. Gráfica que muestra la edad de menarquía más frecuente en nuestro grupo de estudio.

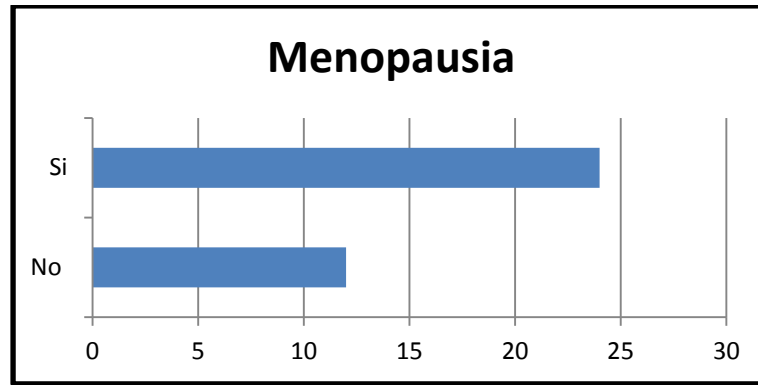


Figura 14. Gráfica que muestra la frecuencia de mujeres en menopausia en nuestro grupo de estudio.

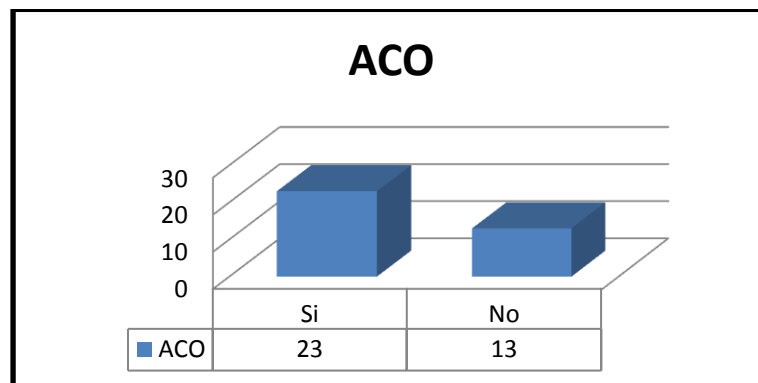


Figura 15. Gráfica que muestra el uso de Anticonceptivos Orales más frecuente en nuestro grupo de estudio.

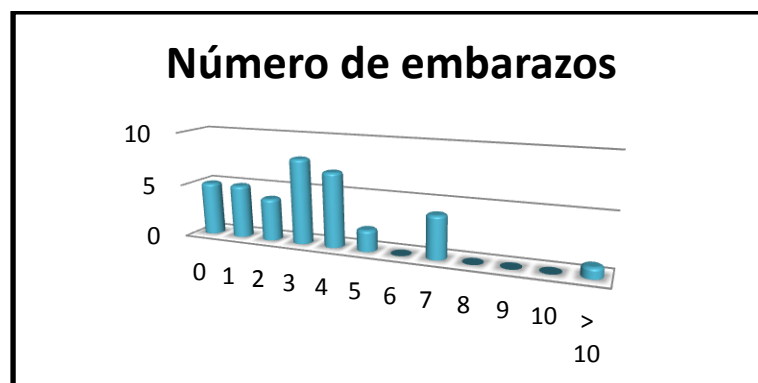


Figura 16. Gráfica que muestra el número de embarazos más frecuente en nuestro grupo de estudio.

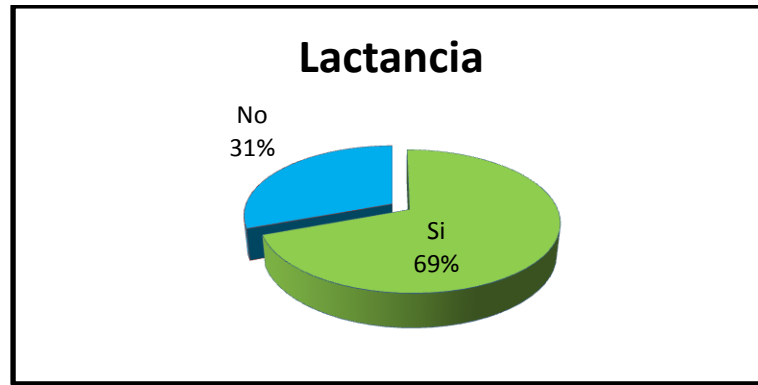


Figura 17. Gráfica que muestra el porcentaje de mujeres que lactaron en nuestro grupo de estudio.

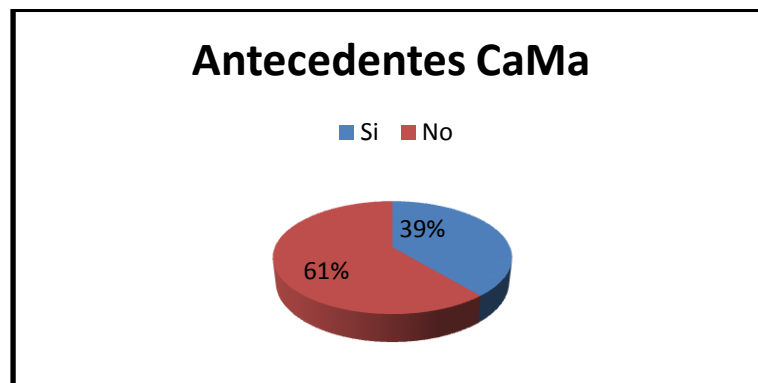


Figura 18. Gráfica que muestra la frecuencia de antecedentes familiares de cáncer de mama en nuestro grupo de estudio.

En cuanto a otros factores de riesgo analizados y que previamente habían sido reportados en la literatura, fueron el consumo de alcohol, para el cual la mayoría de las pacientes dentro de nuestro grupo no consumían 92% (Figura 19). Mientras que para el consumo de tabaco también el 80.5% refirieron no consumirlo (Figura 20). En cuanto al índice de Masa Corporal solamente, el 19 % de las pacientes se encontraban dentro del peso normal, el 81% tenía sobrepeso o algún grado de obesidad (Figura 21)

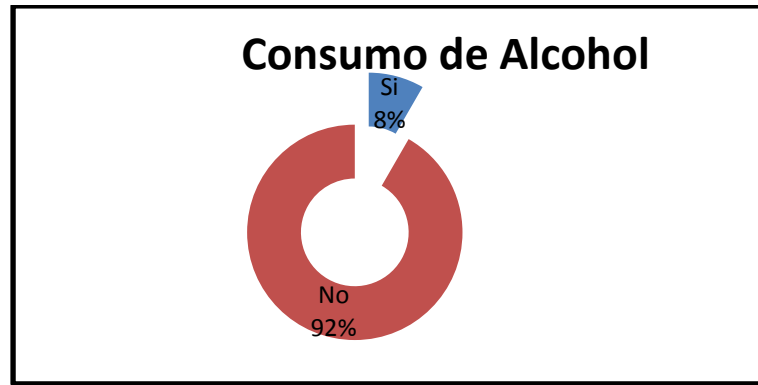


Figura 19. Gráfica que muestra el porcentaje de consumo de alcohol en nuestro grupo de estudio.

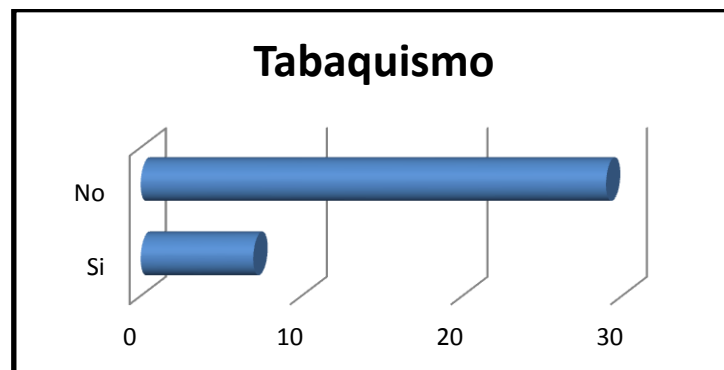


Figura 20. Gráfica que muestra el porcentaje de consumo de tabaco en nuestro grupo de estudio.

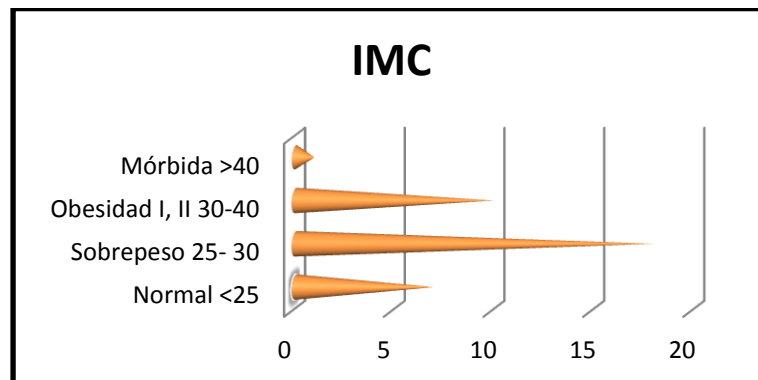


Figura 21. Gráfica que muestra el índice de masa corporal más frecuente en nuestro grupo de estudio.

En el grupo de pacientes reclutadas, el lado más frecuente de aparición de cáncer fue el lado derecho con un 45%, sin embargo el lado izquierdo tuvo un 44%, por lo que aproximadamente estuvieron balanceadas (Figura 22).

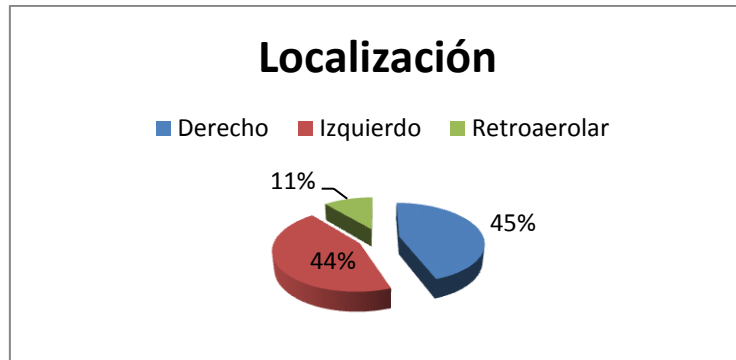


Figura 22. Gráfica que muestra la localización del tumor en la mama más frecuente en nuestro grupo de estudio.

Las frecuencias de los estadios clínicos, resultando los más frecuentes los estadios II y III con el 80.5 % de nuestras pacientes (Figura 23).



Figura 23. Gráfica que muestra el estadio clínico del tumor más frecuente en nuestro grupo de estudio.

En relación al tamaño del tumor, encontramos que la mayoría de las pacientes presentaron tamaños de tumor por arriba de los 2 cm con un 72.2%. (Figura 24).

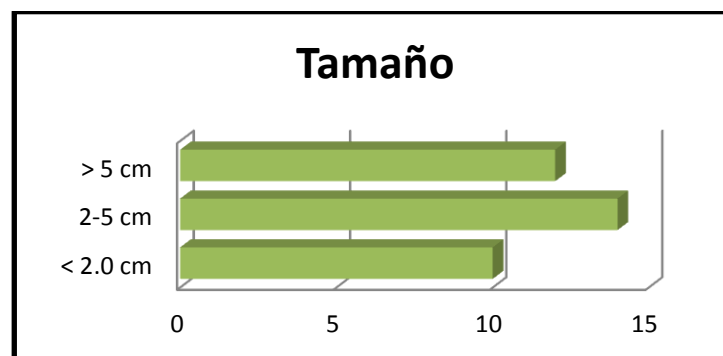


Figura 24. Gráfica que muestra el tamaño del tumor más frecuente en nuestro grupo de estudio.

Se evaluaron también la presencia de receptores histológicos en las células cancerosas, la mayoría de las pacientes presentaban la expresión de al menos un receptor histológico (Receptor de estrógenos, receptor de progesterona y receptor Her2neu) 72%, mientras que el 28% de las pacientes en nuestro grupo presentaban Cáncer de mama triple negativo, es decir ninguno de los marcadores histológicos se expresaba en sus células. (Figura 25)

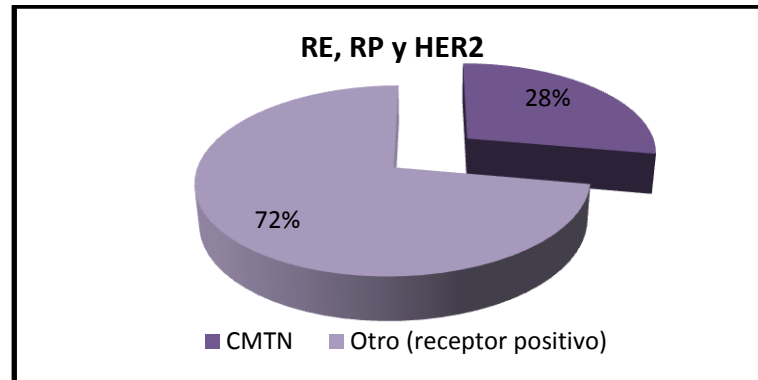


Figura 25. Gráfica que muestra la frecuencia de receptores histológicos presentes en el tumor en nuestro grupo de estudio.

En cuanto a los efectos adversos evaluados 21 días posteriores a la administración del primer ciclo de quimioterapia AC, se evaluó anemia (hemoglobina <10 mg/mL) con un 8% de pacientes que la presentó, por otra parte se evaluó la neutropenia (PMN <1500 /mm³) la cual la presentaron el 14% de mujeres en nuestro grupo de estudio, la presencia de náuseas y vómito fue de 47% y 33% respectivamente.

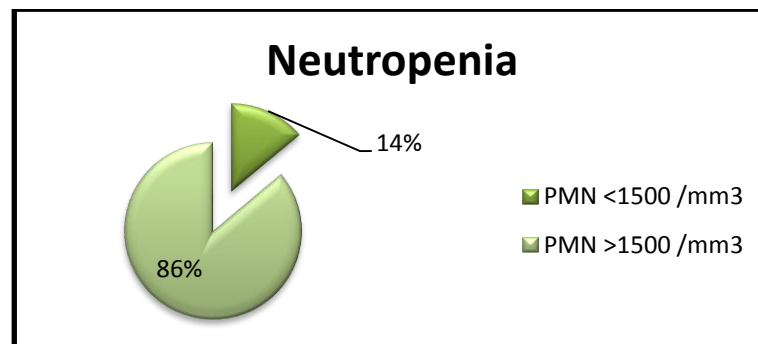


Figura 26. Gráfica que muestra la presencia de neutropenia 21 días post tratamiento en nuestro grupo de estudio.

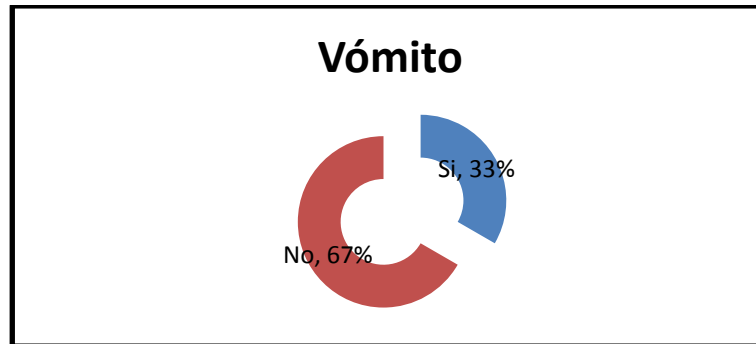


Figura 27. Gráfica que muestra la presencia de vómito 21 días post tratamiento en nuestro grupo de estudio.

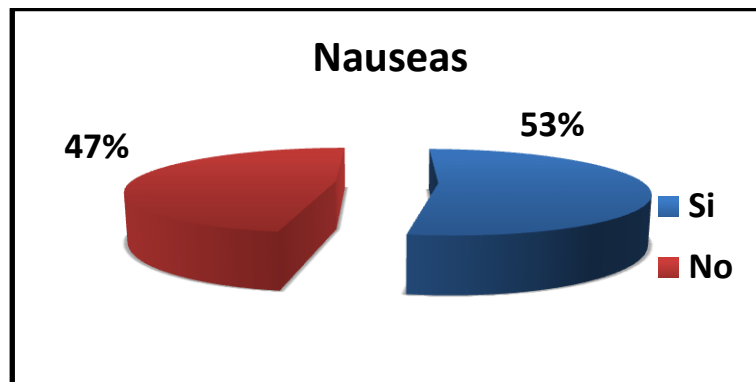


Figura 28. Gráfica que muestra la presencia de náuseas 21 días post tratamiento en nuestro grupo de estudio.

6.2 Perfiles farmacocinéticos.

6.2.1 Validación del método UFLC-MS

Primero se llevó a cabo la validación del método de UFLC-MS para la determinación de doxorrubicinol y 4-OH-Ciclofosfamida en plasma humano. Primero se llevó a cabo la elección de la fase móvil, así como también las condiciones del cromatógrafo de líquidos, las cuales se resumen en la siguiente tabla:

	DOXol	4-OH-CP
Fase Móvil	Isocrática.	Gradiente
Buffer	Acetato de amonio 20 mM pH	Formiato de Amonio 5 mM pH4/ACN/MeOH (60:40) (67:33)
Flujo	1 mL/ min	300 µL/min
Vol. inyección muestra	5 uL	2 uL
Columna	C18 Kinetex	C18 ZORBAX ECLIPSE XDB
Tamaño de partícula	2.6 µM	3.5 Micron
Longitud	50 x 4.6mm	2.1 x 100 mm

Tabla 18. Condiciones del cromatógrafo de líquidos para 4-OH-ciclofosfamida y Doxorubicinol.

De la misma manera se determinaron las condiciones en el cromatógrafo de masas con el objetivo de tener una mejor selección del ion a analizar, la fuente de ionización: Electrospray, el modo ionización fue positivo, y el modo de adquisición: MRM (Modo de Resolución Múltiple).

Molécula	PM ion	Transc	DP	EP	CE	CXP
Dox- OH	546.9	486.7	28	13	10	30
CP-OH	388.3	371.4	150	7	10	5

Tabla 19. Condiciones de voltaje para el cromatógrafo de masas para 4-OH-ciclofosfamida y Doxorubicinol.

Parámetro	Medida
Curtain Gas CUR	50 V
Collision Gas CAD	5 V
Ion Spray Voltaje IS	+5500 V
T°	500 °C
Ion source G1	30 °C
Ion source G2	50 °C
Tiempo corrida	1.5 min

Tabla 20. Condiciones de la fuente de ionización para 4-OH-ciclofosfamida y Doxorubicinol.

Ya establecidos dichos parámetros se llevó a cabo la determinación de cada uno de los metabolitos a analizar, dando como resultado los siguientes cromatogramas (Figuras 29 y 30)con tiempos de retención de 0.75 y 0.74 min para doxorubicinol y 4-OH-ciclofosfamida, respectivamente.

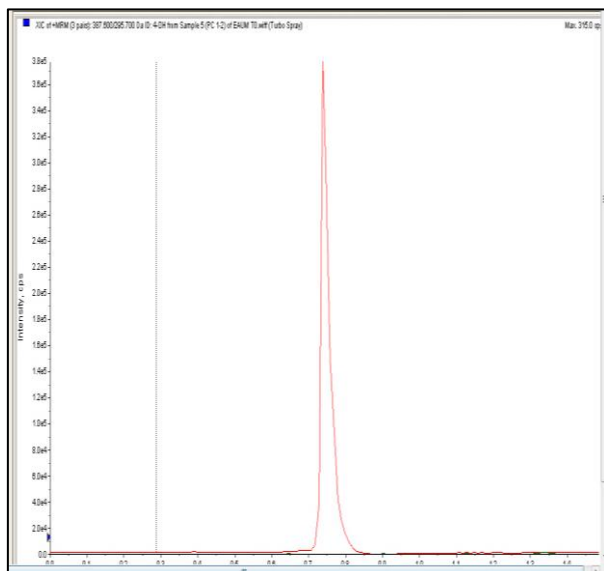


Figura 29. Cromatograma para doxorubicinol con un tiempo de retención de 0.75 min.

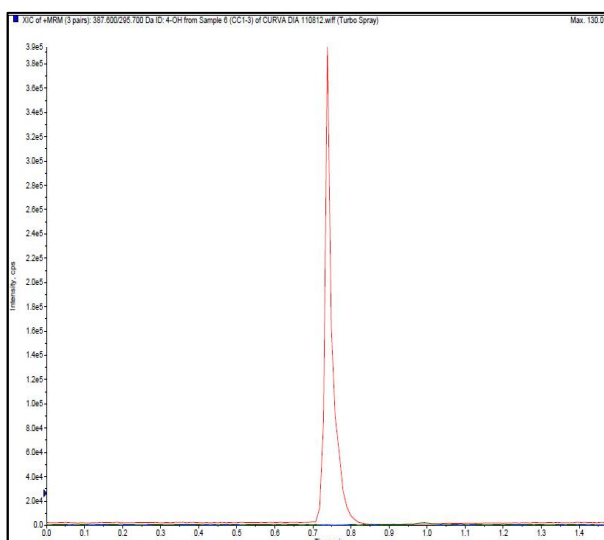


Figura 30. Cromatograma para 4-OH-ciclofosfamida con un tiempo de retención de 0.74 min.

Una vez que todos los parámetros del cromatográfico de líquidos y el detector de masas quedaron establecidos, se llevaron a cabo la determinación de las curvas de calibración para obtener a partir de ellas la ecuación de la

recta, con la cual se determinarán las concentraciones de las muestras problema.

Para doxorubicinol se obtuvo la siguiente curva de calibración:

	Sample Name	Sample Type	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Concentration (ng/ml)	Analyte Retention Time (min)	Calculated Concentration (ng/ml)	Accuracy (%)
1	CC1-1	Standard	122289.	4.00	0.741	4.16	104.
2	CC1-2	Standard	147679.	10.0	0.741	9.16	91.6
3	CC1-3	Standard	190902.	20.0	0.741	17.7	88.3
4	CC1-4	Standard	268173.	30.0	0.742	32.9	110.
5	CC1-5	Standard	370828.	50.0	0.742	53.1	106.
6	CC1-6	Standard	392911.	60.0	0.742	57.4	95.7
7	CC1-7	Standard	527228.	80.0	0.741	83.8	105.

Tabla 21. Concentraciones obtenidas experimentalmente para la curva de calibración para doxorubicinol.

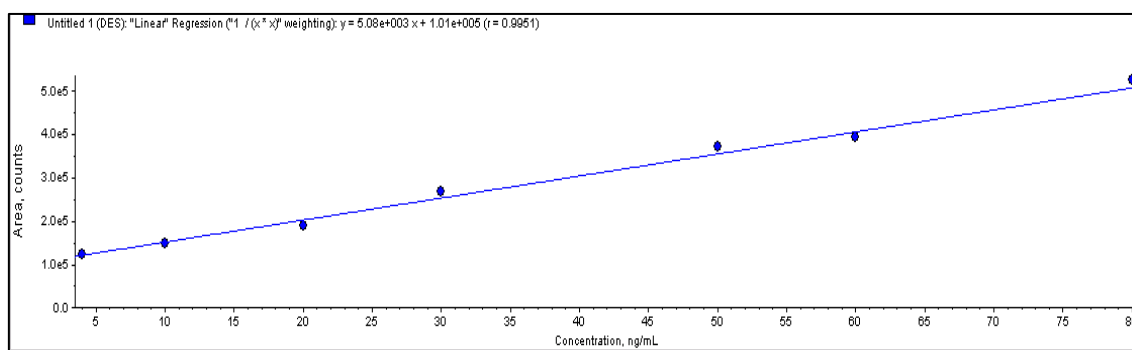


Figura 31. Curva de calibración para doxorubicinol, con una regresión lineal $y=5.08e+003x+1.01e+005$ con una $r=0.9951$.

Para 4-OH-Ciclofosfamida se obtuvo la siguiente curva de calibración:

	Sample Name	Sample Type	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Concentration (ng/ml)	Analyte Retention Time (min)	Calculated Concentration (ng/ml)	Accuracy (%)
1	CC1-1	Standard	116090.	50.0	0.741	50.0	99.9
2	CC1-2	Standard	181694.	300.	0.741	304.	101.
3	CC1-3	Standard	247932.	600.	0.741	561.	93.5
4	CC1-4	Standard	317747.	800.	0.742	832.	104.
5	CC1-5	Standard	377004.	1000.	0.742	1060.	106.
6	CC1-6	Standard	416526.	1200.	0.742	1220.	101.
7	CC1-7	Standard	441354.	1400.	0.741	1310.	93.7

Tabla 22. Concentraciones obtenidas experimentalmente para la curva de calibración para 4-OH-ciclofosfamida.

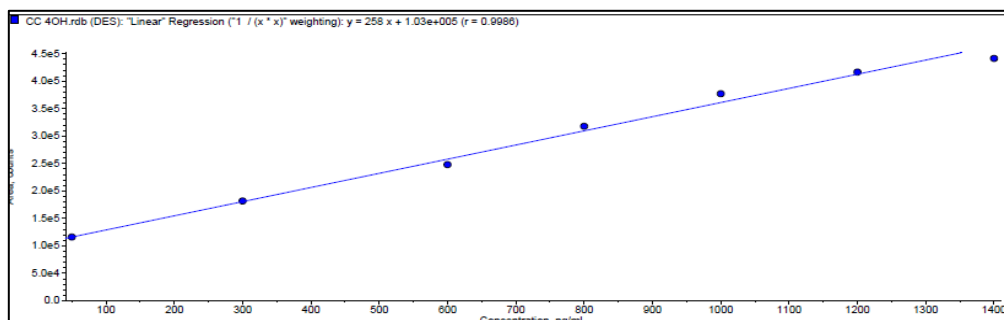


Figura 32. Curva de calibración para 4-OH-ciclofosfamida, con una regresión lineal $y=258x+1.03e+005$ con una $r=0.9986$.

De la misma manera se evaluaron algunos otros parámetros que establece la NOM 177 SSA1-1998, entre los que se encuentran: linealidad, recobro, Efecto de matriz, Límite de cuantificación, límite de detección y estabilidad.

Tabla 23. Resultados de la validación los cuales están dentro de las normas que marca la NOM 177 SSA-1998-1.

Estabilidad	Resultado DOX	Resultado 4-OH-CP	NOM 177 SSA-1998 1
En solución	3.786%	5.6 %	± 15% desv. Absoluta.
Sobre la mesa (24h,7°C)	3.438 %	4.9 %	± 15% desv. Absoluta
Auto muestreador (8h, 8°)	8.676 %	5.6%	± 15% desv. Absoluta
A largo plazo (-70°C)	Estable	Estable	± 15 % del valor nominal
Ciclos de congelación	Estable	Estable	± 15 % del valor nominal
Linealidad	Coef. Corr. (r)=0.999	Coef. Corr. (r)= 0.9989	(r) ≥ 0.99
	Coef Deter. (r2) = 0.998	Coef. Deter. (r2)= 0.999	(r2) ≥ 0.98
Recobro	3.638	5.70	Desv. Absoluta ≤ 15 %
Recobro absoluto	Constante (65.769%)	68.46%	Debe de ser reproducible
Efecto de matriz	13.6 %	12.5%	Lo más cercano a 0.
Límite cuantificación	5.736 ng/mL	50 ng/mL	Rel. señal:ruido ≥ 10:1
Límite detección	1.912 ng/mL	0.033 ng/mL	Rel. señal:ruido ≥ 3:1

6.2.2 Resultados en las muestras de las pacientes.

Una vez que el método se validó para los 2 metabolitos a determinar (doxorrubicinol y 4-OH-Ciclofosfamida) se llevó a cabo la determinación en el plasma de las pacientes, tomados 24 hrs antes de su primer ciclo de quimioterapia, a los 0, 30, 60, 90 y 120´ durante la infusión del tratamiento.

Los resultados obtenidos fueron los que se muestran en la siguiente tabla para doxorrubicinol, las concentraciones están reportadas en ng/mL:

Tabla 24. Concentraciones obtenidas para Doxorrubicinol

Paciente	-24 h	0 hrs	0.5 hrs	1 h	1.5 h	2.0 h
1	0	0	0	15.1	28.0	44.0
2	0	0	0	37.4	63.8	67.1
3	0	0	0	24.3	40.2	46.1
5	0	0	0	31.7	40.1	48.7
6	0	0	0	30.8	52	54.4
7	0	0	0	20.0	38.4	43.3
8	0	0	0	21.2	51.2	57.9
10	0	0	0	28.5	55.5	69.3
12	0	0	0	24.4	35.6	45.1
13	0	0	0	21.9	30.8	37.9
14	0	0	0	20.6	36.7	50.4
15	0	0	0	23.8	37.9	19.23
16	0	0	0	22.1	54.1	45.8
17	0	0	0	24.2	49.7	54.8
18	0	0	0	24.2	54.6	70.6
19	0	0	0	20.5	34.0	47.4
20	0	0	0	23.1	30.8	32.5
21	0	0	0	25.5	43.5	47.3
22	0	0	0	27.8	45.8	57.4
23	0	0	0	33.5	55.6	71.7
24	0	0	0	30.6	49.5	62.7
25	0	0	0	38.2	50	47.8
26	0	0	0	54.0	71.8	71.8
27	0	0	0	19.1	29	36.1
28	0	0	0	11.7	35.1	37.0
29	0	0	0	17.1	37.7	40.0
30	0	0	0	20	37.3	46.2
31	0	0	0	16.2	26.2	29.2
32	0	0	0	25.2	36.7	55.2
33	0	0	0	39.7	71.9	85.6
34	0	0	0	17.607	31.693	35.214

Para 4-OH-ciclofosfamida, los resultados fueron los los que se muestran en la siguiente tabla y están reportados en ng/mL:

Tabla 25. Concentraciones obtenidas para 4-OH-ciclofosfamida

Paciente	-24h	0h	0.5h	1 h	1.5h	2h
1	0	0	23	39.4	1190	1590
2	0	0	207	286	322	638
3	0	0	63.7	417	835	861
5	0	0	105	237	161	196
6	0	0	25.4	156	393	565
7	0	0	11.3	86.3	315	398
8	0	0	46.3	66.2	71.9	73.8
10	0	0	130	305	431	699
12	0	0	58.5	158	312	437
13	0	0	21.2	49.2	196	219
14	0	0	13.2	67	276	267
15	0	0	48.5	206	204	310
16	0	0	214	617	950	1130
17	0	0	15.6	165	195	360
18	0	0	84.4	398	943	1220
19	0	0	15.9	82.6	215	342
20	0	0	83.9	300	521	587
21	0	0	7.86	35.6	248	402
22	0	0	35.1	389	770	907
23	0	0	8.78	39.2	161	220
24	0	0	53.8	88.4	135	245
25	0	0	66	204	219	336
26	0	0	1.02	42.6	72.4	97.4
27	0	0	31.8	143	141	639
28	0	0	55.9	80.6	85.2	81.3
29	0	0	12	69.2	341	439
30	0	0	15.2	93.5	300	455
31	0	0	No peak	35.1	40	44.6
32	0	0	55.5	119	190	260
33	0	0	27.8	17.5	111	153
34	0	0	20.6	51.8	78.4	148
35	0	0	17	29.6	254	291
36	0	0	76.7	161	341	456
37	0	0	66.9	236	357	460
38	0	0	62.6	157	158	287
39	0	0	44.6	514	814	1750

Los datos se acomodaron por tiempo y se convirtieron a logaritmos con el fin de normalizarlos, es importante mencionar que a partir de éste punto solo se tomarán en cuenta a 30 pacientes que son las pacientes que son las que se logró determinar su curva completa. En la siguiente gráfica se muestran los resultados para el tiempo 60, 90 y 120 min para Doxorubicinol

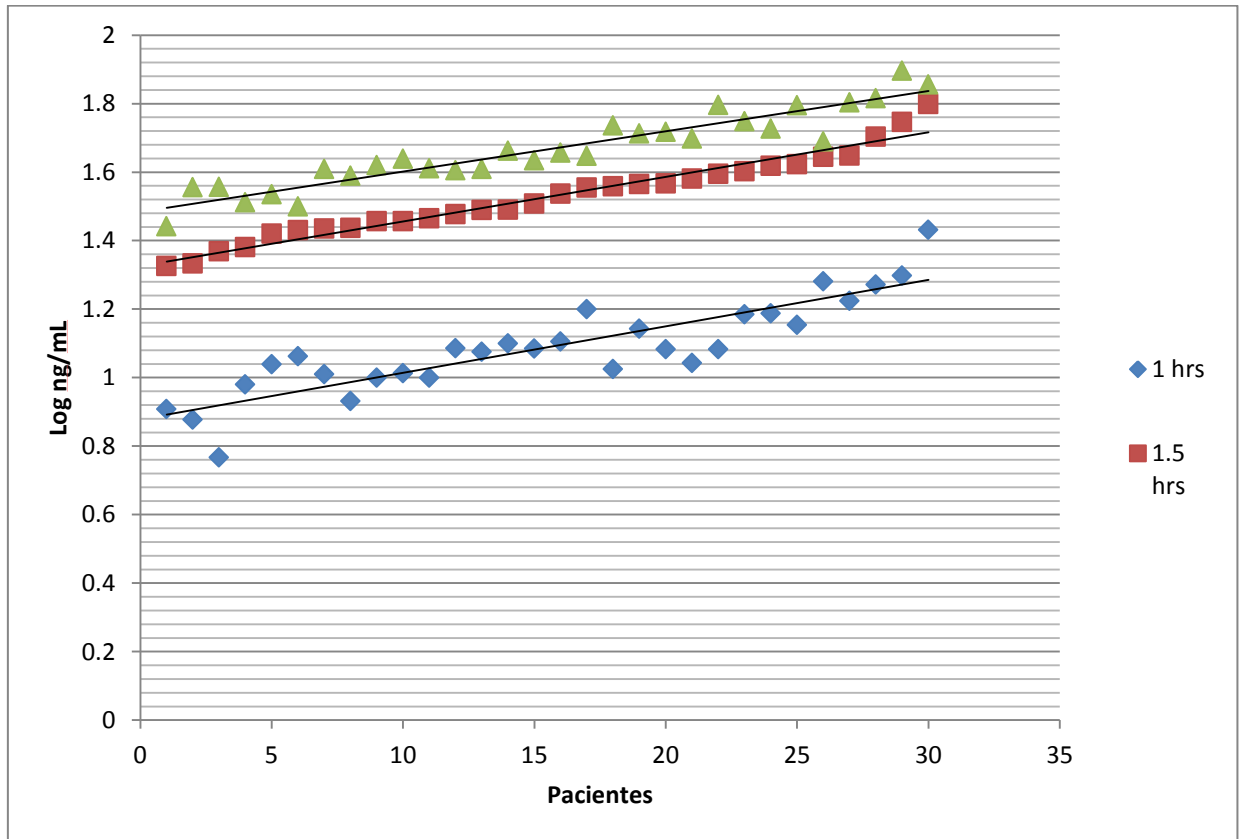


Figura 33. Gráfica que muestra el logaritmo de la concentración de doxorubicinol en plasma en las 30 pacientes a 3 distintos tiempos, 1, 1,5 y 2 hrs.

Se llevó a cabo una normalización de los datos, con el objetivo de ver cuales datos eran atípicos, se llevó a cabo la siguiente gráfica, donde podemos observar que tres de las 30 pacientes tienen un comportamiento atípico a las demás, se observa que tienen un metabolismo más acelerado de lo normal, por lo que se les denominó como metabolizadoras aceleradas (UM).

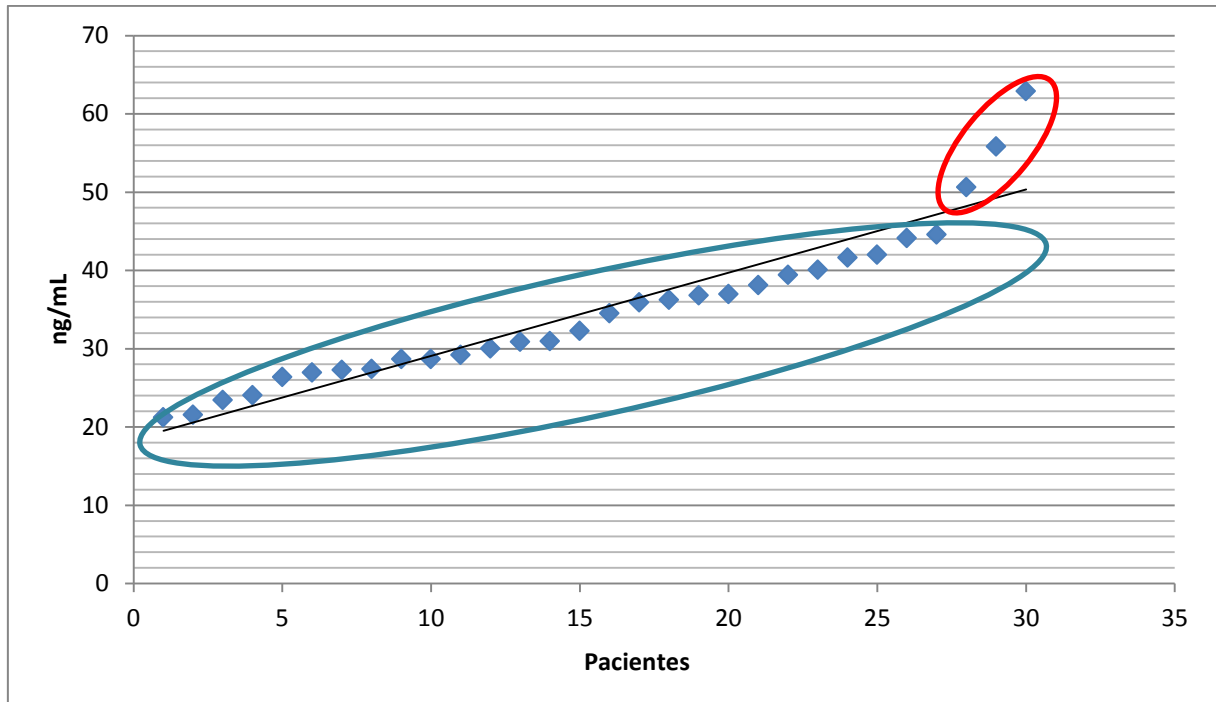


Figura 34. Gráfica que muestra la concentración de doxorubicinol en plasma en las 30 pacientes y se destaca el grupo de metabolizadoras que mostraron tener un contenido más alto de doxorubicinol en plasma, las cuales se definieron como UM.

Se llevó a cabo una prueba estadística de comparación de medias para saber si el grupo UM ($n=3$) era significativamente distinto al resto de las pacientes EM ($n=27$) y con una $p= 0.0143$ (<0.05) resultaron ser distintos, como se muestra en la siguiente tabla de resultados.

En cuanto a 4-OH-ciclofosfamida los resultados fueron los siguientes:

Los datos se acomodaron por tiempo y se convirtieron a logaritmos con el fin de normalizarlos, es importante mencionar que a partir de éste punto solo se tomarán en cuenta a 30 pacientes que son las pacientes que son las que se logró determinar su curva completa. En la siguiente gráfica se muestran los resultados para el tiempo 30, 60, 90 y 120 min para 4-OH-Ciclofosfamida.

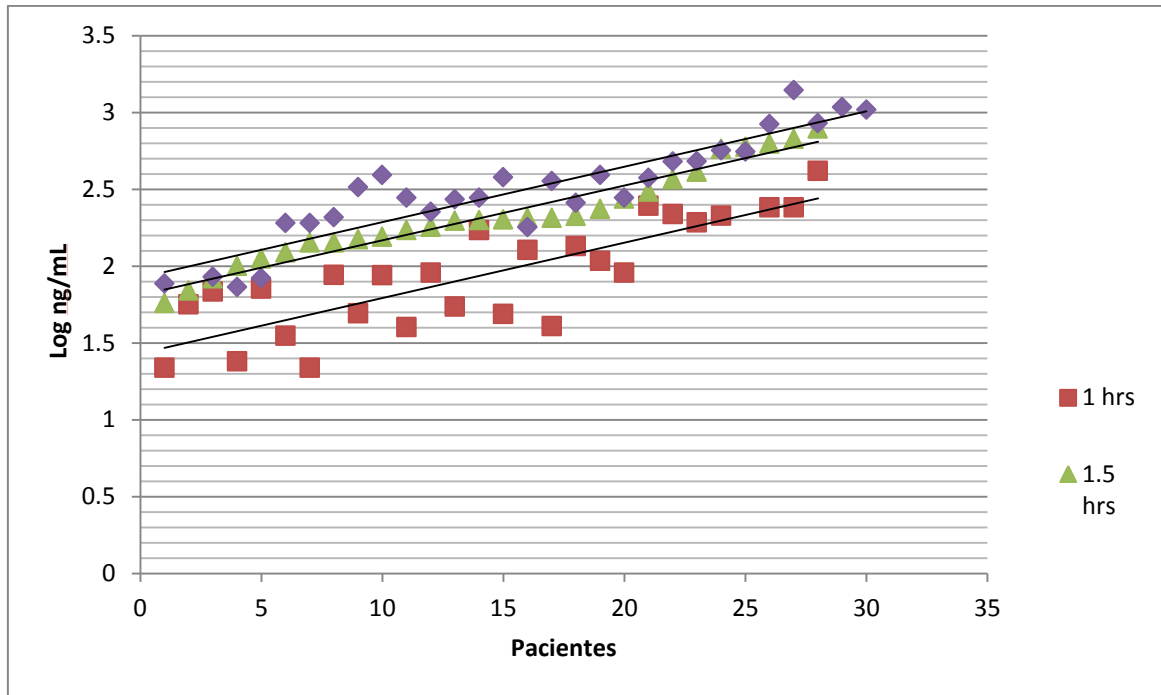


Figura 34. Gráfica que muestra el logaritmo de la concentración de 4-OH-ciclofosfamida en plasma en las 30 pacientes a 3 distintos tiempos, 1, 1,5 y 2 hrs.

Se llevó a cabo una normalización de los datos, con el objetivo de ver cuales datos eran atípicos, se llevó a cabo la siguiente gráfica, donde podemos observar que de las 30 pacientes, se forman 3 grupos, 2 de los cuales tienen un comportamiento atípico a las demás, se observa que por una parte 5 pacientes tienen un metabolismo más acelerado de lo normal, por lo que se les denominó como metabolizadoras aceleradas (UM), por otra parte existe un segundo grupo integrado por 4 pacientes que tiene un metabolismo lento (PM). Estos dos grupos se compararon con el grupo de metabolizadoras promedio (EM) y mediante una comparación de medias se determinó que eran estadísticamente distintas. ($p=1.7780E-05$ y 0.0001 respectivamente)

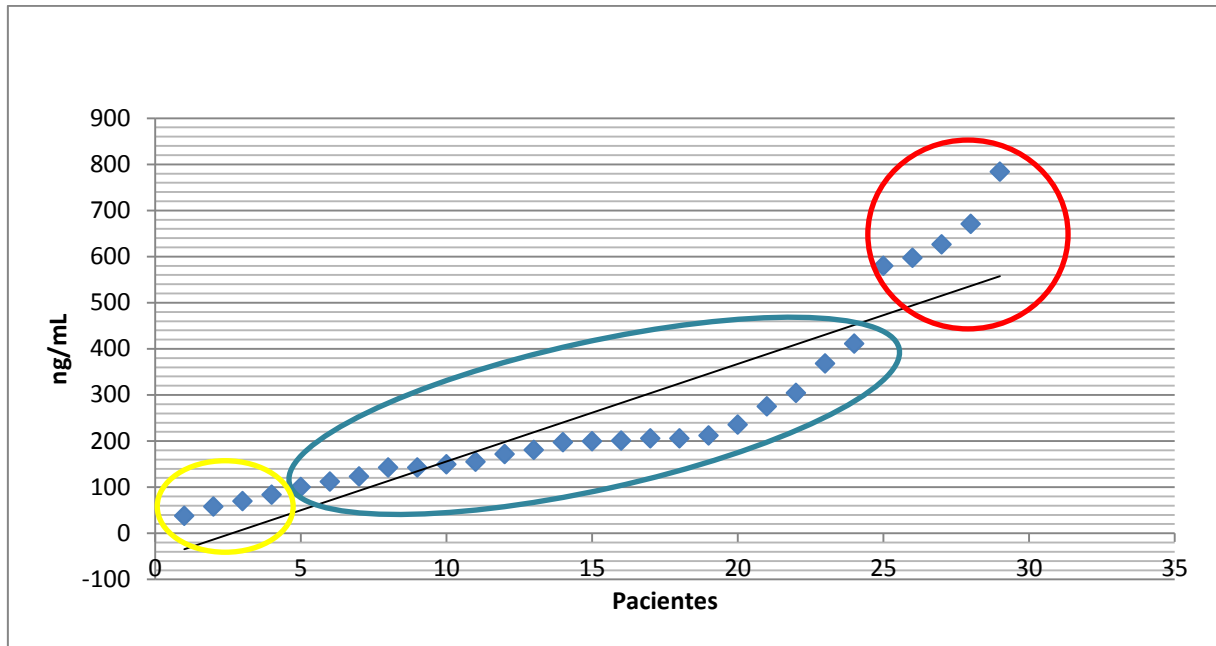


Figura 36. Gráfica que muestra la concentración de doxorrubicinol en plasma en las 30 pacientes y se destaca los 2 grupos de metabolizadoras que mostraron tener un contenido más alto de 4-OH-ciclofosfamida en plasma, las cuales se definieron como UM, mientras que el grupo de pacientes que tuvieron una concentración más baja se les denominó PM.

6.3. Perfiles Farmacogenéticos

A partir del paquete globular de las muestras de las pacientes se extrajo el ADN genómico, utilizando el kit Maxwell 16 Blood ADN de Promega. Posteriormente se cuantificó utilizando el kit Quant-iT™ PicoGreen®. Para ésta cuantificación se llevó a cabo una curva de calibración, a partir de la ecuación de la recta obtenida de ésta curva de calibración se calcularon las concentraciones de las muestras problema, las concentraciones de las muestras se muestran en la tabla siguiente.

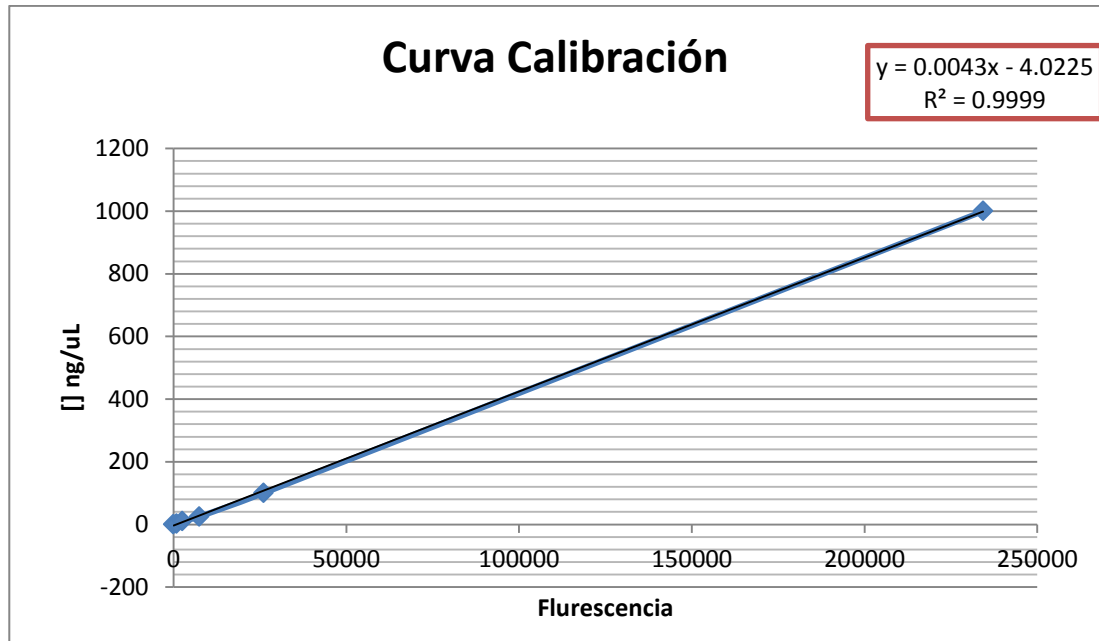


Figura 37. Curva de calibración obtenida de las diluciones de estándares de Picogreen, a partir de la cual se obtuvo la regresión lineal $y = 0.0043x - 4.0225$, con una $r = 0.9999$, con la cual se calculará la concentración de las muestras.

P	Conc ng/uL	P	Conc ng/uL	P	Conc ng/uL	P	Conc ng/uL
1	101.10	13	135.68	22	82.97	31	137.43
2	85.44	14	78.94	23	119.06	32	159.27
3	107.00	15	83.2	24	212.28	33	88.01
5	76.94	16	117.8	25	151.44	34	123.28
6	65.91	17	349.3	26	169.23	35	304.09
7	65.40	18	245.3	27	111.65	36	101.36
8	69.67	19	112.87	28	140.39	37	120.75
10	75.05	20	157.1	29	224.78	38	73.78
12	79.89	21	95.87	30	162.49	39	52.09

Tabla 26. Concentraciones de ADN genómico obtenidas para cada una de las pacientes.

Se realizaron diluciones de las muestras a 60 ng/uL. Estas diluciones se utilizarán para llevar a cabo los microarreglos DMET 3.0 de Affymetrix.

Se llevaron a cabo las etapas necesarias para llevar a cabo los microarreglos, las cuales implican varias etapas, dentro de las cuales implican 2 geles de control de calidad. Las primeras etapas incluyen mPCR, Alineamiento, Gap Fill y PCR Clean up. Después de las etapas anteriores viene

el primer gel de control de calidad, en el cual se espera una banda de entre 100 y 150 pb. (Figura 37)

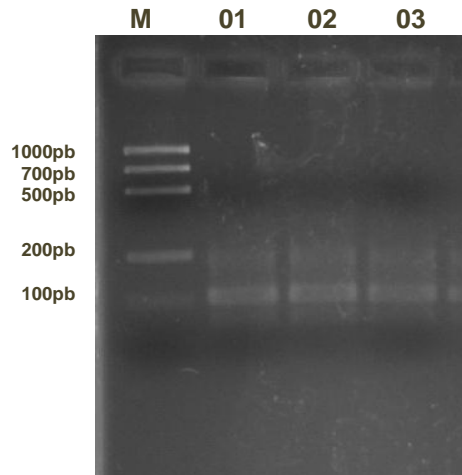


Figura 38. Gel de agarosa al 3%. En el carril M se encuentra el marcador de peso molecular de 1000pb-100pb, carril 01, 02, 03 muestras de pacientes con con la banda de nuestro interés de 100-150 pb.

Posteriormente se lleva a cabo la etapa de fragmentación, seguida del segundo gel de control de calidad, en el cual se espera un barrido menor a 100 pb, encontrando una mancha predominante alrededor de los 50-75 pb.

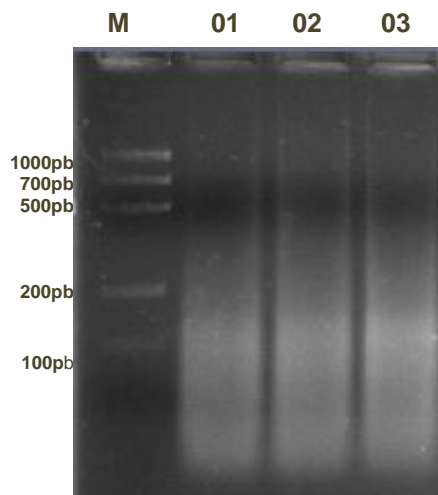


Figura 39. Gel de agarosa al 3%. En el carril M se encuentra el marcador de peso molecular de 1000pb-100pb, carril 01, 02, 03 muestras de pacientes con un barrido de nuestro interés menor a 100 pb.

Posterior a ésta etapa se etiqueta el ADN fragmentado y se hibrida en el microarreglo DMET 3.0, éste se lava, se tiñe y se escanea, para obtener los archivos .cel, .chp, los cuales son analizados por el software DMET Console. Nos genera una imagen como la que se muestra en la Figura, en ésta se

muestra uno de los controles de calidad con los que se asegura la veracidad de los resultados.

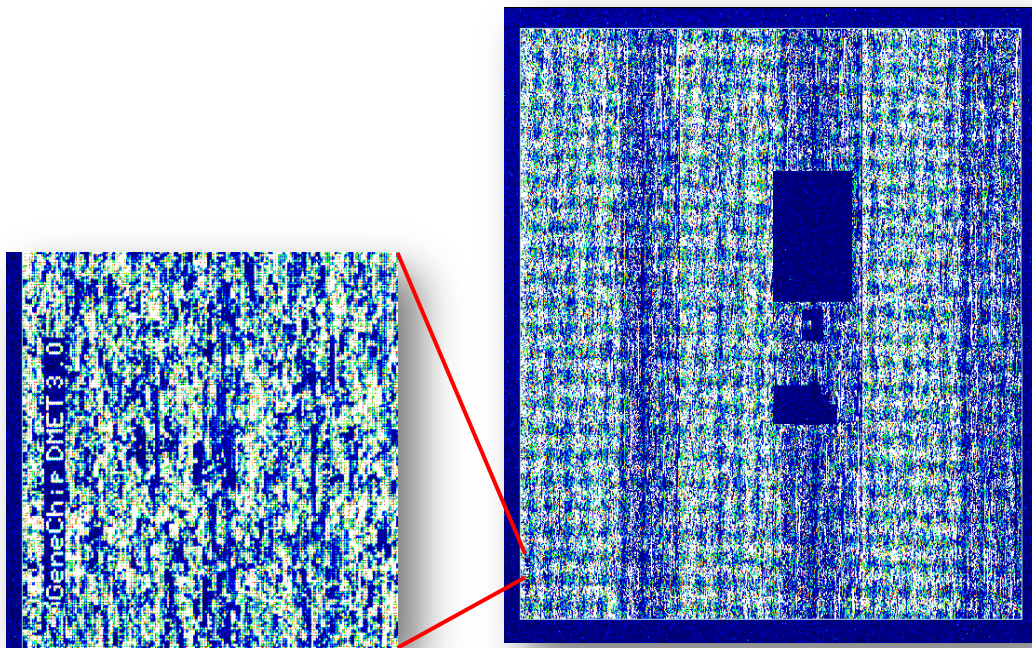


Figura 40. Imagen resultado del escaneo del microarreglo donde se muestra uno de los controles de calidad que tiene éste microarreglo.

De la misma manera se generan las siguientes gráficas donde se muestra la discriminación alélica o bien el análisis de la presencia o no de copias de algún gen, como se muestra a continuación, esto para cada uno de los 1936 marcadores que analiza el microarreglo.

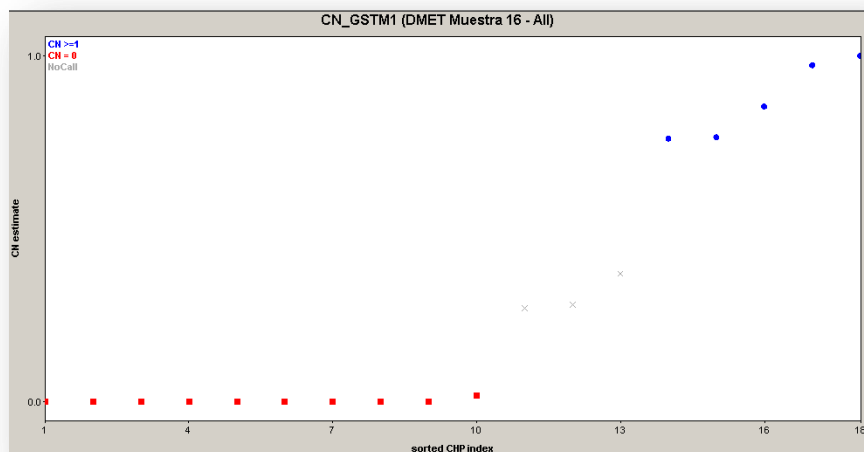


Figura 41. Gráfica que muestra el resultado de 18 pacientes para el número de copias para el gen GSTM1. Obteniendo 10 pacientes con 0 copias, 5 pacientes con más de una copia y 3 pacientes indeterminadas.

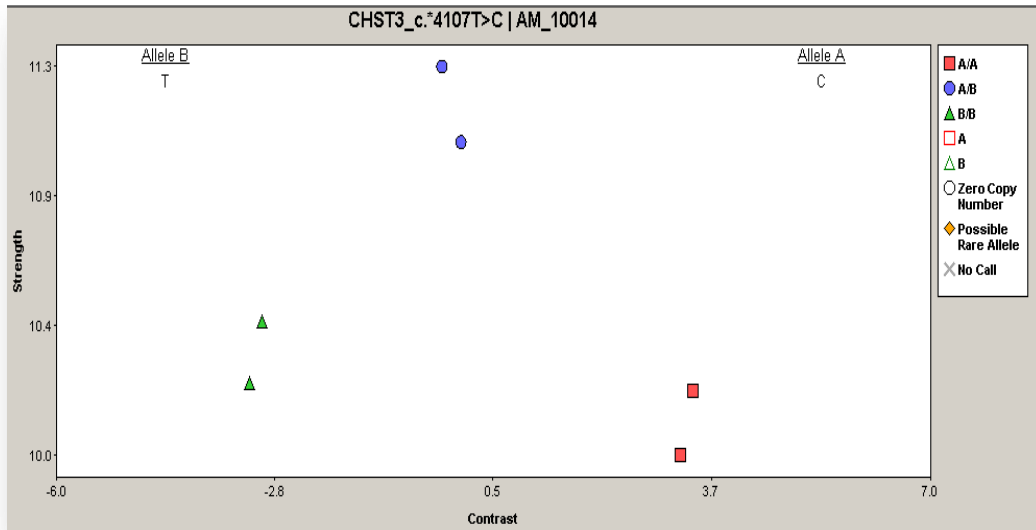


Figura 42. Gráfica que muestra el resultado de 6 pacientes mostrando la discriminación alélica para el gen CHST3 *4107T>C. Obteniendo 2 pacientes homocigotas wild type, 2 pacientes heterocigotas y 2 pacientes homocigotas para la mutación.

6.3.1 Frecuencia de alelos en genes previamente asociados al metabolismo de Doxorrubicina.

En la literatura ya se han reportado algunos genes que están involucrados en el metabolismo de la Doxorrubicina, los cuales se enlistan en la tabla siguiente, así como también se reportan las frecuencias alélicas que obtuvimos en nuestra población de estudio (36 pacientes).

Gen o alelo alterado	Frecuencia alélica	Proporción	Medicamento
ABCC2_c.3563T>A(V1188E)	2	0.02777778	DOX
SETD4_c.262C>T(V88I)	0	0	DOX
CBR1_c.391G>A(P131S)	0	0	DOX
CBR3_c.277G>A(V93I)	0	0	DOX
CBR3_c.730G>A(V244M)	19	0.26388889	DOX
ABCC2_c.4544G>A(C1515Y)	2	0.02777778	DOX
CYP2C19*2_19154G>A(P227P)	10	0.13888889	CP, DOX
GSTP1*B_c.313A>G(I105V)	40	0.55555556	CP, DOX
GSTP1*C_c.341C>T(A114V)	15	0.20833333	CP, DOX
NQO1_c.559C>T(P187S)	20	0.27777778	CP, DOX
CYP2B6*8_13072A>G(K139E)	8	0.11111111	CP, DOX
CYP2B6*6_15631G>T(Q172H)	15	0.20833333	CP, DOX
ABCB1_c.3435C>T(I1145I)	26	0.36111111	CP, DOX
ABCB1_c.2677G>T>A(A893SorT)	30	0.41666667	CP, DOX
CYP2B6*5_25505C>T(R487C)	1	0.01388889	CP, DOX
CYP2C19*3_17948G>A(W212X)	0	0	CP

CYP2E1*5_-1053C>T(Promoter)	6	0.08333333	CP
CYP2B6*2_64C>T(R22C)	9	0.125	CP
CYP2B6*4_18053A>G(K262R)	34	0.47222222	CP
GSTM3_c.670G>A(V224I)	26	0.36111111	CP
GSTM3_c.468+24_26delIAGG	10	0.13888889	CP

Tabla 27. Frecuencia alélica y proporción de genes que habían sido reportados previamente involucrados en el metabolismo de Doxorubicina y 4-OH-ciclofosfamida.

6.4 Análisis y relaciones entre genotipo y fenotipo.

Se llevaron a cabo varias asociaciones entre el genotipo y los grupos formados de acuerdo a la farmacocinética (UM, EM y PM), así como también en un grupo de pacientes que presentó diversos efectos adversos, se encontraron varios genotipos asociados.

6.4.1 Farmacocinética vs Farmacogenética.

Se realizó la comparación entre los grupos que resultaron con un metabolismo diferente en cuanto a la farmacocinética, de acuerdo a esto, se hizo una asociación entre el genotipo y su fenotipo metabolizador. Se encontraron las asociaciones que se muestran en la tabla siguiente.

En este caso se compararon los pacientes que eran metabolizadores normales para Doxorubicina, contra el grupo de pacientes que presentaban un metabolismo acelerado.



Polimorfismo	Gen	Lim. Inf (IC 95%)	Lim. Sup. (IC 95%)	Prop. Obs.
NR112_c.795-93G>A	PXR nuclear receptor subfamily 1	0.329	0.671	1.000 (3/3)
SLC22A12_c.426T>C(H142H)	Solute carrier family 22	0.241	0.577	0.833 (3/3)
SLC15A1_c.350G>A(S117N)	Solute carrier family 15	0.256	0.593	0.833 (3/3)
SLC7A7_c.660T>C(G220G)	solute carrier family 15	0.270	0.609	0.833 (3/3)
ABCC6_c.1890C>G(T630T)	ATP-binding cassette, sub-family C (MRP4)	0.159	0.477	0.833 (3/3)
CYP2B6_18273G>A	Citocromo p450 Familia 2B6	0.593	0.892	1.000 (3/3)
CBR3_c.398-12G>A	Carbonil Reductasa 3	0.050	0.313	0.833 (3/3)

Tabla 28. Genes encontrados en correlación con el metabolismo acelerado UM para Doxorubicina, así como la proporción encontrada y los límites de confianza encontrados en el grupo EM.

En este caso se compararon los pacientes que eran metabolizadores normales para Ciclofosfamida, contra el grupo de pacientes que presentaban un metabolismo lento.



Polimorfismo	Gen	Lim. Inf (IC 95%)	Lim. Sup. (IC 95%)	Prop. Obs.
CHST11_c.*4024C>T	Carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11	0.427	0.795	0.900(5/5)
SLC7A7_c.660T>C(G220G)	Solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, y+L system), member 7	0.172	0.532	0.800 (5/5)
CYP1A2*1C_-3860G>A(Promoter)	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2	0.188	0.553	0.800 (5/5)
CHST13_c.97+3926A>T	Carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 13	0.293	0.670	0.800 (5/5)
SLC15A1_c.350G>A(S117N)	Solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, y+L system), member 7	0.256	0.593	0.800 (5/5)
CYP3A43_14956C>T	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 43	0.349	0.725	0.800 (5/5)

Tabla 29. Genes encontrados en correlación con el metabolismo acelerado UM para Ciclofosfamida, así como la proporción encontrada y los límites de confianza encontrados en el grupo EM.

En este caso se compararon los pacientes que eran metabolizadores normales para Ciclofosfamida, contra el grupo de pacientes que presentaban un metabolismo acelerado.



Polimorfismo	Gen	Lim. Inf (IC 95%)	Lim. Sup. (IC 95%)	Prop. Obs.
MAT1A_c.*67C>T	Methionine adenosyltransferase I, alpha	0.109	0.447	0.875(4/4)
ATP7B_c.3419T>C(V1140A)	ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide	0.407	0.778	0.875(4/4)
SLC15A1_c.350G>A(S117N)	solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1	0.188	0.553	0.875 (4/4)
SLC7A7_c.660T>C(G220G)	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, y+L system), member 7	0.172	0.532	0.875 (4/4)
GSTA2_c.335G>C(S112T)	Glutathione S-transferase alpha 2	0.531	0.876	1.000 (4/4)

Tabla 30. Genes encontrados en correlación con el metabolismo acelerado PM para Ciclofosfamida, así como la proporción encontrada y los límites de confianza encontrados en el grupo EM.

6.4.2 Farmacogenética vs Efectos adversos

En este caso comparamos al grupo de mujeres que presentaban efectos adversos, entre los que tomamos en cuenta fueron anemia, neutropenia, vómito y náuseas. Se hizo una comparación de proporciones alélicas entre los dos grupos, primeramente se estableció el límite de confianza inferior y superior con un índice de confianza superior al 95%, esto con el grupo de mujeres sin efectos adversos, Luego se calculó la proporción de nuestro grupo problema (mujeres que presentaban efectos adversos).



Polimorfismo	Gen	Lim. Inf (IC 95%)	Lim. Sup. (IC 95%)	Prop. Obs.
ABCC4_c.*311G>A	ATP-binding cassette, sub-family C (MRP4)	0.118	0.453	0.5 (7/8)
NQO1_c.559C>T(P187S)	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	0.049	0.344	0.5 (7/8)
CYP2B6_18273G>A	Citocromo p450 Familia 2B6	0.547	0.882	0.938 (8/8)
FMO2_c.585A>G(S195S)	flavin containing monooxygenase 2	0.388	0.755	1.000 (8/8)
ABCB11_c.3084A>G(A1028A)	ATP-binding cassette, sub-family B	0.228	0.593	0.750 (7/8)
ABCB11_c.-5543C>T	ATP-binding cassette, sub-family B	0.212	0.574	0.688 (8/8)
AOX1_T>C(rs7563682)	aldehyde oxidase 1	0.262	0.631	0.750 (7/8)

Tabla 31. Genes encontrados en correlación con el grupo de pacientes que mostraban efectos adversos la proporción encontrada en éste grupo y los límites de confianza encontrados en el grupo sin efectos adversos.

7 Discusión

Se recolectaron muestras de 36 pacientes con diagnóstico clínico confirmado de CaMa, que estaban recibiendo por primera vez el régimen de quimioterapia AC (Adriamicina/Ciclofosfamida). A éstas pacientes se les determinó el perfil farmacocinético y el perfil farmacogenético, así como también se recolectaron datos clínicos relacionados con los efectos adversos al término del primer ciclo de quimioterapia.

Para éste grupo de estudio observamos que la mayoría (23/36) de las mujeres provenían del estado de Nuevo León, que la mayoría (28/36) se encontraban en el rango de 46-50 años de edad.

En el caso de los estadios clínicos presentados al diagnóstico de la enfermedad, los que presentaron mayor frecuencia, fueron los estadios clínicos II y III, lo que muestra que hay una tendencia a detectar cánceres más agresivos al momento del diagnóstico, los cuales necesitarán tratamientos más prolongados y agresivos con pronósticos menos favorables, esto tal vez debido a la falta de campañas de prevención que alienten a las mujeres a realizarse más a menudo la autoexploración mamaria.

En el caso de los factores de riesgo asociados a padecer CaMa, la asociación con el exceso de estrógenos circulantes asociados a diversos factores de riesgo, las frecuencias observadas en nuestra población de estudio fueron las siguientes: menarquía temprana (n=0), nuliparidad (n=5), obesidad (n=29).

Uno de los parámetros que llamó la atención es la obesidad, el 81% de nuestras pacientes tenía algún grado de obesidad, lo cual ya ha sido asociado en algunos reportes en los cuales asocian hormonas vinculadas con el tejido graso que predisponen a la aparición de CaMa.^{31, 32}

Al evaluar los antecedentes heredo familiares, tenemos que el 61% de nuestra población no refirió tener antecedentes de CaMa, lo cual coincide con

lo ya reportado en la literatura, donde se refiere que la mayoría de los casos de cáncer no tienen un antecedente de familiar directo con CaMa, convirtiéndolos en CaMa esporádicos.³³

De los efectos adversos al tratamiento que presentaron estas pacientes observamos que solamente 8/36 pacientes presentaron efectos adversos agudos, es decir 21 días post tratamiento, estos efectos adversos fueron neutropenia, anemia, vómito y náuseas.

7.1 Perfiles farmacocinéticos.

En el estudio de farmacocinética se pudo identificar a distintos grupos metabolizadores, de acuerdo a la velocidad de biotransformación del fármaco.

Se encontraron pacientes que tuvieron un metabolismo un poco más lento para Ciclofosfamida (PM=4), un grupo que metabolizaba de manera normal a las cuales se les denominó (EM=21) y un grupo de metabolizadoras rápidas (UM=5).

De la misma manera evaluando la manera de metabolizar la Doxorubicina a doxorubicinol, se encontraron, un grupo de pacientes que metaboliza de manera normal (EM=27) y un grupo de pacientes que metaboliza de forma rápida la doxorubicina (UM=3).

7.2 Perfiles farmacogenéticos.

Se llevó a cabo la genotipificación de las 36 pacientes utilizando el microarreglo DMET 3.0 de Affymetrix. El microarreglo contiene 1936 marcadores ubicados en 222 genes, asociados al metabolismo de Fase I, Fase II, y algunas otras enzimas y promotores de alguno de los genes encargados del metabolismo.

En cuanto al metabolismo de Fase I, el microarreglo contiene principalmente enzimas del citocromo p450 que se encargan de la

biotransformación del profármaco al fármaco. Y de la Fase 2, los genes que se incluyeron son las bombas extractoras de los fármacos de las células, así como también enzimas encargadas de la conjugación de los fármacos con otras moléculas para facilitar su eliminación.

Existen ya varios reportes donde se han asociados diversos SNPs con el metabolismo de Ciclofosfamida y Doxorrubicina. Se buscó la frecuencia de esos SNPs en nuestras pacientes, por ejemplo **SETD4_c.262C>T (V88I)**³⁴, **CBR1_c.391G>A (P131S)**³⁵, **CBR3_c.277G>A (V93I)**, **CYP2C19*3_17948G>A (W212X)**³⁶ y no encontró presencia de estos polimorfismos en nuestra población. Esto puede ser debido a que la mayoría de los estudios que se han reportado han sido en poblaciones de distinto origen étnico al de nuestra población.

Por otro lado, observamos que algunos otros genes en los cuales encontramos una alta frecuencia en la población de estudio, sin embargo no se encontró relación con los niveles de los fármacos encontrados en plasma, ni con los efectos adversos agudos reportados con las pacientes, es decir, los genes que previamente se habían reportados en correlación con la respuesta a los fármacos, no fueron encontrados en correlación en nuestro estudio, solamente en frecuencia.

7.2.1 Correlación de Doxorrubicina con el perfil farmacogenético.

Una vez teniendo el perfil farmacogenético de cada una de las pacientes se llevó a cabo una correlación con los perfiles farmacocinético que ya se habían obtenido.

Se hizo una comparación entre las pacientes que eran metabolizadoras normales (EM) para Doxorrubicina, contra el grupo de pacientes que presentaban un metabolismo acelerado (UM).

Se encontraron algunas variantes genéticas que no han sido reportadas y que nosotros encontramos en correlación con el perfil farmacocinético de las pacientes.

Se encontró que para el caso de las mujeres que tenían un metabolismo acelerado (UM) para Doxorubicina, la variante (**NR1I2_c.795-93G>A**) fue encontrada en forma homocigota para la mutación (A/A) en las 3 pacientes que mostraron el metabolismo acelerado. Este gen **NR1I2 (Receptor nuclear PXR, subfamilia 1)** se ha asociado con un incremento en la producción de enzimas de fase I y II, en especial CYP's, por ejemplo es un importante regulador de la expresión de la enzima CYP3A4³⁷. A pesar de que ya algunas variantes han sido asociadas con el metabolismo de algunos fármacos, la variante encontrada en nuestro trabajo (**NR1I2_c.795-93G>A**) asociada a niveles altos de DOXol (UM) no había sido reportada.

De la misma manera es sabido que la **carbonil reductasa 3 (CBR3)** interviene en el metabolismo de Doxorubicina y que variaciones interindividuales en los genes que codifican para esta enzima causan alteraciones en la farmacocinética de éste fármaco. Se han reportado ya algunas variantes que afectan el metabolismo de éstos medicamentos, por ejemplo CBR3_c.391C>T(P131S), CBR3_c.11G>A(C4Y), CBR3_c.730G>A(V244M), sin embargo la variante que nosotros encontramos en correlación con los niveles de doxorubicinol en plasma no ha sido reportada **CBR3_c.398-12G>A**.³⁶

Otro polimorfismo que encontramos asociado a altos niveles de doxorubicinol en plasma fue el **SLC22A12_c.426T>C (H142H)**. El gen **SCL22A12** está implicado en el transporte de fármacos al exterior de la célula, por lo que mutaciones en este gen podrían elevar las concentraciones del fármaco en plasma. Variaciones en éste gen solo han sido asociadas con niveles séricos de ácido úrico en una población Japonesa.³⁸

7.2.2 Correlación de Ciclofosfamida con el perfil farmacogenético.

En este caso se llevó a cabo una comparación entre los 3 grupos que se encontraron para Ciclofosfamida (PM, EM y UM).

Primero se hizo una comparación entre las pacientes que eran metabolizadoras normales (EM) para Ciclofosfamida, contra el grupo de pacientes que presentaban un metabolismo lento (PM).

La conjugación del glutatión con la Ciclofosfamida está catalizada por la enzima GSTA, variantes en esta enzima están asociadas con diferentes niveles de los metabolitos de CP en plasma.³⁹ Sin embargo la variante **GSTA2 335G>C(S112T)** encontrada en asociación en nuestro trabajo, no ha sido reportada, se observó la presencia de la mutación en forma homocigota en las 4 pacientes que mostraron una disminución de los niveles de 4-OH-ciclofosfamida en plasma.

De la misma manera se hizo una comparación entre las pacientes que eran metabolizadoras normales (EM) para Ciclofosfamida, contra el grupo de pacientes que presentaban un metabolismo acelerado (UM).

Se encontró que para el caso de las mujeres que tenían un metabolismo acelerado (UM) para ciclofosfamida, la variante (**CYP3A43_14956C>T**) fue encontrada en las 5 pacientes que mostraron el metabolismo acelerado. Este gen **CYP3A43** se ha asociado con el aclaramiento de Olanzapina, un fármaco antipsicótico. Sin embargo, la variante encontrada en nuestro trabajo asociada a niveles altos de 4-OH-CP (UM) no ha sido reportada.⁴⁰

7.3 Farmacogenética vs efectos adversos.

Después de tener el perfil farmacogenético de las pacientes, así como también el registro de los efectos adversos se clasificaron a las pacientes en 2

grupos, un grupo que mostraba efectos adversos agudos y otro grupo que no mostró tener efectos adversos.

Se llevó a cabo la comparación entre estos 2 grupos encontrándose algunos genes relacionados.

Es interesante señalar el caso del gen **ABCC4** que contiene el polimorfismo 311G>A cuya presencia muestra un decremento en la actividad de ésta enzima, lo que podría limitar el eflujo de la droga de la célula y podría incrementar los efectos adversos. Variantes en éste gen ya han sido asociadas con la presencia de efectos adversos más severos en estudios anteriores, sin embargo, la variante que nosotros encontramos no ha sido reportada. Nosotros encontramos ésta variante presente en 7 de las 8 pacientes que mostraron tener efectos adversos más severos.⁴¹

Otro hallazgo interesante fue la identificación de algunas mutaciones en el gen NOQ que interviene en la eliminación de radicales libres de la célula, recordando que uno de los mecanismo de acción del tratamiento con Doxorubicina consiste en generar radicales libres que causan daño al ADN, por lo que mutaciones en este gen han sido asociadas con una mayor presencia de efectos adversos en las pacientes bajo el régimen AC, sin embargo la mutación en el gen NOQ Pro153Ser 559 C>T, no había sido reportada, y en este estudio se encontró en asociación a algunos efectos adversos, ya que 7 de las 8 pacientes que presentaron efectos adversos severos presentaban la mutación antes mencionada.

Es importante mencionar que una paciente tuvo un metabolismo reducido para doxorubicina y ciclofosfamida, aparte de presentar efectos adversos y una agresividad alta del tumor (CMTN, estadio IV).

8 CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo fue evaluar la farmacogenética y la farmacocinética del tratamiento por quimioterapia en pacientes con CaMa, evaluando. Para ambos fármacos se lograron identificar diferentes grupos de pacientes de acuerdo a la farmacocinética, a los cuales se les otorgó una probable clasificación a la manera de metabolizar los fármacos. (PM, EM, UM).

Se encontraron variantes polimórficas asociadas al fenotipo que no habían sido asociadas antes, principalmente enzimas de la Fase 2 y Fase 3.

Es el primer trabajo que involucra 3 aspectos, lo cual se representa en la siguiente tabla:

1.- Análisis farmacocinético de los fármacos del esquema AC.

2.- Perfil farmacogenético, con un análisis masivo de genes y no solamente de genes candidatos.

3.- **Asociación con efectos adversos**

	Efectos Adversos	Niveles de CP	Niveles de DOX
Cascorbi et al 2011	GSTA -69/-52 1 *A/*B	CYP2C19 (*1/*2), ALDH3A1 (*1/*2)	
Mechetner et al, 1998			ABCB1
Okabe et al, 2005	-		SLC22A16
Lakhman et al, 2005			CBR
AV Boddy 2010		CYP2B6 *2, *8, *4 y *9	
Ekhart et al, 2008		CYP2C19*2	
AV Boddy 2010	SLC22A16 T1226C		
Deepa Agrawal 2011	GSTM1 y GSTT1		
YX Pérez Páramo 2012	ABCB11 3084A>G, 5543C>T NQO1 559C>T(P187S) ABCC4 311G>A	CYP3A4 14956C>T ATP7B 3419T>C(V1140A) GSTA2 335G>C(S112T)	NR1I2 795-93G>A CBR3 398-12G>A

Tabla 32. Estudios de farmacogenética, farmacocinética y genes asociados. Resaltando nuestra aportación.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Turashvili, G., Bouchal, J., Burkadze, G. & Kolár, Z. Differentiation of tumours of ductal and lobular origin: I. Proteomics of invasive ductal and lobular breast carcinomas. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia* **149**, 57–62 (2005).
2. María Ester Brandan y Yolanda Villaseñor Navarro Detección del Cáncer de Mama: Estado de la Mamografía en México. *Cancerología* **1**, 147–162 (2006).
3. Secretaría de Salud *Programas de Acción específica 2007-2012 Cáncer de mama*. (México DF, 2006).
4. OMS Cáncer de mama prevención y control.
5. López-carrillo, L., Suárez-lópez, L., Soc, D. & Torres-sánchez, L. Detección del cáncer de mama en México : síntesis de los resultados de la Encuesta Nacional de Salud Reproductiva. *Salud Publica de Mexico* **51**, 345–349 (2009).
6. López-carrillo, L., Torres-sánchez, L. & Sc, M. Identificación de lesiones mamarias malignas en México. **43**, 199–202 (2001).
7. Guzmán, E. J. O. Cáncer de mama triple negativo, estado actual. *Especialidades Médico-Quirúrgicas* **15**, (2010).
8. Boekhout, A. H., Beijnen, J. H. & Schellens, J. H. M. Trastuzumab. *The oncologist* **16**, 800–10 (2011).
9. Han, H. S. *et al.* Racial differences in acute toxicities of neoadjuvant or adjuvant chemotherapy in patients with early-stage breast cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **1–9** (2011).doi:10.1016/j.ejca.2011.06.027
10. Stratton, M. R., Campbell, P. J. & Futreal, P. A. The cancer genome. **458**, (2010).
11. Gianni, L. *et al.* Role of anthracyclines in the treatment of early breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 4798–808 (2009).
12. Tan, S.-H., Lee, S.-C., Goh, B.-C. & Wong, J. Pharmacogenetics in breast cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**, 8027–41 (2008).

13. R. Stephanie Huang, PhD and Mark J. Ratain, M. Pharmacogenetics and Pharmacogenomics of Anticancer Agents. *Cancer Journal, The* **59**, 42–55 (2009).
14. Fisher B, Brown AM, Dimitrov NV, Poisson R, Redmond C, Margolese RG, Bowman D, Wolmark N, Wickerham DL, Kardinal CG, et al. Two months of doxorubicin-cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors: results from t. *J Clin Oncol.* **8**, 1483–96 (1990).
15. A. Llerena, J. Cobaleda, C. M. and J. B. Interethnic differences in drug metabolism: influence of genetic and enviromental factors on desbrisoquine hydroxylation phenotype. *European Journal of Drug Metabolism and pharmacokinetics* **21**, 129–138 (1996).
16. Lips, E. H. *et al.* Neoadjuvant chemotherapy in ER+ HER2- breast cancer: response prediction based on immunohistochemical and molecular characteristics. *Breast cancer research and treatment* (2011).doi:10.1007/s10549-011-1488-0
17. Lee, K. *et al.* Prognostic significance of bcl-2 expression in stage III breast cancer patients who had received doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel as adjuvant chemotherapy. *BMC Cancer* **9**, 1–9 (2007).
18. Bray, J. *et al.* Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *British journal of cancer* **102**, 1003–9 (2010).
19. Arnold, R. D., Slack, J. E. & Straubinger, R. M. Quantification of Doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy. *Journal of Chromatography B* **808**, 1141–152 (2004).
20. RB, W. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol* **19**, 670–86 (1992).
21. Maudens, K. E., Stove, C. P., Cocquyt, V. F. J., Denys, H. & Lambert, W. E. Development and validation of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of four anthracyclines and their respective 13-S-dihydro metabolites in plasma and saliva. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **877**, 3907–15 (2009).
22. Bai, F. *et al.* Simultaneous Determination of Cyclophosphamide and Carboxyethylphosphoramidate Mustard in Human Plasma Using Online Extraction and Electrospray Tandem Mass Spectrometry (HTLC-ESI-MS/MS). *Journal of Chromatography B* **877**, 1709–1715 (2009).

23. Navin Pinto, Susan M Ludeman, M. E. D. Pharmacogenetic studies related to cyclophosphamide-based therapy. *Pharmacogenomics* **10**, 1–11 (2009).
24. Evans, W. E. & McLeod, H. L. Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *The New England journal of medicine* **348**, 538–49 (2003).
25. Drugs.com Doxorubicin Official FDA information, side effects and uses. (2012).
26. Sottani, C. *et al.* Simultaneous determination of cyclophosphamide , ifosfamide , doxorubicin , epirubicin and daunorubicin in human urine using high-performance liquid chromatography / electrospray ionization tandem mass spectrometry : bioanalytical method validation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2645–2659 (2008).doi:10.1002/rcm
27. Drugs.com Cyclophosphamide Official FDA information, side effects and uses. (2012).
28. Fernandes, T. *et al.* Determination of Cyclophosphamide Enantiomers in Plasma by LC-MS / MS : Application to Pharmacokinetics in Breast Cancer and Lupus Nephritis Patients. *Contract* **389**, 383–389 (2009).
29. DiFrancesco, R., Griggs, J. J., Donnelly, J. & DiCenzo, R. Simultaneous analysis of cyclophosphamide, doxorubicin and doxorubicinol by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **852**, 545–53 (2007).
30. Afsar, N. A. *et al.* Relationship of drug metabolizing enzyme genotype to plasma levels as well as myelotoxicity of cyclophosphamide in breast cancer patients. *European Journal of Clinical Pharmacology* (2011).doi:10.1007/s00228-011-1134-0
31. Lahmann, P. H. *et al.* Long-term weight change and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *British journal of cancer* **93**, 582–9 (2005).
32. Wu, M.-H. *et al.* Circulating levels of leptin, adiposity and breast cancer risk. *British journal of cancer* **100**, 578–82 (2009).
33. Ton, C., Guenthoer, J. & Porter, P. L. *The Role of Genetics in Breast and Reproductive Cancers. ADN Repair* (Springer New York: New York, NY, 2010).doi:10.1007/978-1-4419-0477-5
34. Lal, S. *et al.* CBR1 and CBR3 pharmacogenetics and their influence on doxorubicin disposition in Asian breast cancer patients. *Cancer science* **99**, 2045–54 (2008).

35. Bains, O. S., Karkling, M. J., Grigliatti, T. A., Reid, R. E. & Riggs, K. W. Two Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphisms of Human Carbonyl Reductase 1 Demonstrate Reduced in Vitro Metabolism of Daunorubicin and Doxorubicin ABSTRACT : **37**, 1107–1114 (2009).
36. Bains, O. S. *et al.* Naturally Occurring Variants of Human CBR3 Alter Anthracycline In Vitro Metabolism □. 755–763 (2010).doi:10.1124/jpet.109.160614.
37. Ekroos, M. & Sjögren, T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 13682–7 (2006).
38. NAOHARU IWAI, YUKARIMINO, MAKOTOHOSOYAMADA, NAOMI TAGO, YOSHIHIRO KOKUBO, and H. E. A high prevalence of renal hypouricemia caused by inactive SLC22A12 in Japanese. *GENETIC DISORDERS – DEVELOPMENT* **66**, 935–944 (2004).
39. Dirven, H. A. A. M., Ommen, B. Van, Bladeren, P. J. Van & Dirven, A. A. M. Involvement of Human Glutathione S -Transferase Isoenzymes in the Conjugation of Cyclophosphamide Metabolites with Glutathione Involvement of Human Glutathione STransferase Isoenzymes in the Conjugation of aand enzymes T enhanced the formation ofmonochlor. 6215–6220 (1994).
40. Bigos, K. L. *et al.* Genetic Variation in CYP3A43 Explains Racial Difference in Olanzapine Clearance. **16**, 620–625 (2011).
41. Low SK, Kiyotani K, Mushiroda T, Daigo Y, Nakamura Y, Z. H. Association study of genetic polymorphism in ABCC4 with cyclophosphamide-induced adverse drug reactions in breast cancer patients. *J Hum Genet* **54**, 564–71 (2009).