



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA
CENTRO DE INVESTIGACIONES FARMACOLÓGICAS Y TOXICOLOGÍA (IFT)

ESTUDIO FARMACOGENÉTICO EN PACIENTES CON CÁNCER
TESTICULAR TRATADOS CON CISPLATINO, ETOPÓSIDO Y BLEOMICINA.

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

JUAN PABLO CAYÚN PELLIZARIS

Patrocinante

Prof. Dra. QF. María Nella Gai

Director

Prof. QF. Iván Saavedra

Co-director

Prof. BQ. Ángela Roco

Santiago de Chile

2013

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mi familia y a mis amigos por el apoyo y comprensión que me han entregado.

Quiero agradecer al centro IFT y a todos sus integrantes por acogerme y hacer posible este trabajo. De manera especial agradezco el excelente trabajo de Silvia y Josefa, además del excelente apoyo analítico de Jaime y Alejandra.

Agradecer también al personal y a los pacientes que colaboraron en este estudio, tanto en el Hospital San Juan de Dios, como en el Instituto Nacional del Cáncer. En especial el apoyo de Dra. Cerda y Dra. Peña.

Agradezco también el apoyo logístico e instalaciones de los integrantes del laboratorio del profesor Toledo y del laboratorio de la profesora Nella.

A los profesores Iván, Luis, Nella y Ángela por el apoyo y confianza entregada desde un comienzo.

A Nicolle

A mis padres

A Dios.

TABLA DE CONTENIDOS

Agradecimientos	2
Tabla de contenidos	3
Índice de figuras	5
Índice de tablas	6
Abreviaturas	7
Resumen	8
Summary	10
INTRODUCCIÓN	12
1. Farmacogenética	12
2. Cáncer testicular	13
3. Quimioterapia etopósido, bleomicina y cisplatino	14
4. Glutación S-transferasas	17
5. Farmacocinética de cisplatino.....	19
II. HIPÓTESIS	21
III. OBJETIVO GENERAL	21
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
V. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS	22
1. Pacientes	22
2. Análisis de los registros clínicos	22
3. Análisis genético	23
4. Análisis farmacocinético	24

5. Análisis estadísticos.....	26
VI. RESULTADOS	27
1. Población en estudio.....	27
2. Perfil de toxicidad	28
3. Asociación entre la dosis y el genotipo en variantes genéticas en enzimas de biotransformación, con la presencia y riesgo de reacciones adversas.	30
4. Validación de la metodología analítica para cuantificar cisplatino.	33
5. Determinación de parámetros farmacocinéticos individuales y poblacionales, y efecto de las covariables.....	36
6. Asociación entre los parámetros farmacocinéticos y los genotipos	39
VII. DISCUSIÓN.....	40
VIII. CONCLUSIONES	45
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	46
X. MATERIAL ANEXO	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Cromatograma de cisplatino en plasma humano mediante HPLC con detección UV	34
Figura N °2A. Perfil farmacocinético de 8 pacientes con cáncer testicular tratados con cisplatino 100 mg/m ² en infusión de 2 horas.....	36
Figura N °2B. Perfil farmacocinético de 8 pacientes con cáncer testicular tratados con cisplatino 100 mg/m ² en infusión de 2 horas.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Características generales del grupo en estudio	27
Tabla N° 2. Frecuencias genóticas en pacientes con cáncer testicular	28
Tabla N° 3. Efectos adversos presentes en 63 pacientes de cáncer testicular sometidos a quimioterapia	29
Tabla N° 4. Frecuencia de vómitos, náuseas y toxicidad hematológica en 63 pacientes con cáncer testicular tratados con quimioterapia.....	29
Tabla N° 5. Asociaciones estadísticamente significativas entre edad, dosis, genotipos y toxicidad	31
Tabla N° 6: Asociaciones estadísticamente significativas entre covariables y riesgo	33
Tabla N° 7: Parámetros farmacocinéticos individuales.	37
Tabla N° 8: Parámetros farmacocinéticos poblacionales.	38
Tabla N° 9. Modelo de las covariables	38
Tabla N° 10. Asociación entre los parámetros farmacocinéticos y genotipos en GSTs.....	39

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

SNP: polimorfismo de nucleótido único

ARNm: ácido desoxirribonucleico

PK/PD: farmacocinética/farmacodinamia

ABC: área bajo la curva

C_{ss}: concentración en el estado estacionario

MTM: monitoreo terapéutico de medicamentos

RAMs: reacciones adversas a medicamentos

GCTs: tumores de células germinales

MINSAL: Ministerio de salud

PEB: Cisplatino, etopósido, bleomicina

PE: Cisplatino, etopósido

GSTs: Glutación s- transferasas

GSH: Glutación

ROS: Especies radicalarias de oxígeno

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

RESUMEN

ESTUDIO FARMACOGENÉTICO EN PACIENTES CON CÁNCER TESTICULAR TRATADOS CON CISPLATINO, ETOPÓSIDO Y BLEOMICINA.

En la práctica clínica se han observado grandes variaciones interindividuales, tanto en la respuesta como en la toxicidad asociadas con las terapias anticancerígenas. El presente trabajo tiene por objetivo estudiar la asociación entre polimorfismos genéticos en enzimas de biotransformación y la toxicidad del esquema cisplatino-etopósido-bleomicina (PEB) en pacientes con cáncer testicular y evaluar la influencia del polimorfismo genético en *GSTM1* en la farmacocinética de cisplatino.

Para el cumplimiento de los objetivos se realizó la genotipificación de los polimorfismos *CYP3A4*1B*, *GSTM1 nulo*, *GSTT1nulo* y *BLMH (A1450G)* realizadas mediante PCR-RFLP a partir del ADN genómico total obtenido de sangre periférica de sesenta y tres (63) pacientes con cáncer testicular. Adicionalmente, a ocho (8) pacientes reclutados se les realizó un estudio farmacocinético en donde recibieron una infusión intravenosa por 2 horas de cisplatino (100 mg/m²). Los niveles plasmáticos de cisplatino fueron medidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los resultados muestran que los pacientes con el genotipo *GSTM1* presente experimentan más leucopenia grado 3-4 (OR=0,2058; 95% IC 0,0405-1,0459, p=0,041chi², p=0,052 Fisher). Linfocitopenia severa fue más frecuente

en pacientes con el genotipo *GSTT1* nulo (OR=29, 95% IC 1,29-650,0, $p=0,002$ chi², $p=0,095$ Fisher). Los pacientes con el genotipo *BLMH A/G* experimentaron más toxicidad hematológica grado 3-4 (OR=7,67, 95% IC 2,14-27,35-, $p=0,001$ chi², $p=0,002$ Fisher) y leucopenia grado 3-4 (OR=29, 95% IC 1,2938-650,015, $p=0,002$ chi², $p=0,095$ Fisher). Los datos farmacocinéticos se ajustaron a un modelo de dos compartimentos, el promedio poblacional estimado para el aclaramiento (CL) fue de 9,97 L/hr y el volumen de distribución en el compartimento central (V1) fue 6,48 L. Ninguna covariable mejoró la variabilidad intersujeto asociada con los parámetros farmacocinéticos. No se observó ninguna asociación significativa entre la farmacocinética y *GSTM1*.

En conclusión, los polimorfismos *GSTM1 nulo*, *GSTT1 nulo* y *BMLH (A1450G)* están relacionados con la toxicidad luego del esquema de quimioterapia en pacientes con cáncer testicular. En el estudio farmacocinético preliminar de cisplatino, ningún parámetro se ve influenciado por el genotipo *GSTM1*.

Palabras claves: farmacogenética, polimorfismos, cáncer testicular.

SUMMARY

PHARMACOGENETICS STUDY IN TESTICULAR CANCER PATIENTS

TREATED WITH CISPLATIN, ETOPOSIDE AND BLEOMYCIN

In the clinical practice were observed large interindividual variations both the response and the toxicity in the anticancer therapy. The present work aimed to study the association among the genetics polymorphisms in the biotransformation enzymes and toxicity in cisplatin-etoposide-bleomycin (PEB) chemotherapy in testicular cancer patients and to evaluate the influence of genetic polymorphism in *GSTM1* on the pharmacokinetics of cisplatin.

Genotyping of *CYP3A4*1B*, *GSTM1 null*, *GSTT1 null* and *BLMH (A1450G)* polymorphisms was performed by PCR – RFLP of genomic DNA obtained from the peripheral blood of sixty three (63) testicular cancer patients. Additionally, the eight (8) patients recruited to the pharmacokinetics study received a 2 hours intravenous infusion of cisplatin (100 mg/m²). Plasma levels of cisplatin were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC).

Results showed that the patients *GSTM1* present genotype experienced more grade 3-4 leucopenia (OR=0,2058; 95% CI 0,0405-1,0459, p=0,041chi², p=0,052 fisher). Severe linfocitopenia was more frequent in patients *GSTT1* null genotype (OR=29, 95% CI 1,2938-650,015, p=0,002chi², p=0,095 fisher). Patients *BLMH A/G* genotype experienced more grade 3-4 hematological toxicity (OR=7,67, 95% CI 2,14-27,35-, p=0,001chi², p=0,002 fisher) and grade 3-4

leucopenia (OR=29, 95% CI 1,2938-650,015, $p=0,002\chi^2$, $p=0,095$ fisher). Dates pharmacokinetics were adjusted to a linear two-compartment model, the mean population estimates for clearance (CL) were 9,97 L/hr and central distribution volume (V1) were 6,48 L. No covariate improved the intersubject variability associated with pharmacokinetics parameters. No association among pharmacokinetics parameters and GSTM1 genotype were significant.

In conclusion, GSTM1 null, GSTT1 null and BLMH A1450G polymorphisms were related with toxicity from chemotherapy testicular cancer. In the pharmacokinetics preliminary study of cisplatin, no parameters were influenced for GSTM1 genotype.

Key words: Pharmacogenetics, polymorphisms, testicular cancer.

I. INTRODUCCIÓN

1. Farmacogenética

En la práctica clínica se han observado grandes variaciones interindividuales, tanto en la respuesta como en la toxicidad, asociadas con las terapias anticancerígenas. Si bien la etiología de estas variaciones es multifactorial (adherencia al tratamiento, interacciones fármaco-fármaco, dieta, etc.), las variaciones genéticas del paciente han cobrado mucho interés en el último tiempo (Huang *et al.*, 2009, Walko *et al.*, 2009, Evans *et al.*, 2003). Es así como surge y se desarrolla la disciplina llamada farmacogenética, definiéndola como el estudio del rol de la herencia en la variación individual en la respuesta a fármacos (Weinshilboum R., 2003, Pirmohamed *et al.*, 2011). Entre los polimorfismos genéticos existen distintas modificaciones genéticas (deleciones, inserciones o multiplicaciones) que pueden involucrar porciones extensas de ADN, aunque los más frecuentes y principales focos de estudio son los polimorfismos de nucleótido único (“*Single Nucleotide Polymorphism*” o SNP). Se considera que un gen es polimórfico cuando presenta variaciones en su secuencia con una frecuencia mayor al 1% en la población. De los más de 14 millones de SNPs identificados en el genoma humano, solo una minoría se ha observado que están asociados con cambios en los blancos terapéuticos, enzimas que metabolizan fármacos y transportadores de fármacos. A nivel molecular, las variaciones genéticas pueden cambiar la estructura de las proteínas, vía mutaciones en regiones codificantes de los genes o por

modulación de la regulación génica variando la cantidad de la proteína expresada. Los cambios estructurales de los receptores o enzimas pueden afectar las interacciones receptor-fármaco o enzima-fármaco y como consecuencia, la respuesta farmacológica. Por otro lado, los polimorfismos genéticos de las enzimas que metabolizan fármacos y transportadores pueden afectar la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los fármacos y modular las concentraciones plasmáticas y tisulares. Todas estas variaciones pueden alterar la eficacia de los fármacos, los efectos adversos o ambos, y así causar una respuesta farmacológica variable (Goldstein *et al.*, 2003, Evans *et al.*, 2003, Rodríguez-Antona *et al.*, 2006).

2. Cáncer testicular

La mayoría de los tipos de cáncer testicular (95%) son tumores de las células germinales (GCTs), los cuales se dividen en 2 grupos, seminomas y no seminomas, cada uno comprometiendo aproximadamente el 50% de los casos. En Chile desde el año 1988 al 2007, 64,33% pacientes fueron evaluados como no seminomas y 35,67 % como seminomas (MINSAL, 2010). El cáncer testicular principalmente se presenta en varones jóvenes de 15 a 40 años, en Chile el promedio de edad es 30 años, con rango de 16 a 69 años. Es un cáncer que cuenta con tratamiento exitoso con un porcentaje de curación que en algunos casos está cerca del 100%. La mortalidad internacional es de 1 a 1,5 por cien mil hombres, mientras que en Chile es de 1,3 por cien mil hombres.

La incidencia internacional es de 4,9 casos nuevos por cien mil habitantes y en Chile es de 6,8 casos nuevos por cien mil varones. Según los datos de 1998 a 2007 en la sobrevida a 5 años para los pacientes con histología No seminoma fue de 82,77% y de 83,88% para los con histología seminoma. Según la estadificación la sobrevida a 4 años para el riesgo bajo fue de 97%, para el riesgo intermedio 90,26% y para el riesgo alto 75,96% (MINSAL, 2010). El tratamiento del cáncer testicular varía según la estadificación del paciente y puede incluir cirugía, radioterapia y quimioterapia. La mayoría de los esquemas de quimioterapia incluyen Cisplatino y Etopósido, con o sin Bleomicina, PEB y PE, respectivamente. Ambos esquemas pueden ser administrados en 3 o 4 ciclos (MINSAL, 2010).

3. Quimioterapia etopósido, bleomicina y cisplatino

Etopósido es un fármaco anticancerígeno miembro de los inhibidores de la topoisomerasa II (TOP2), es una epipodofilotoxina que provoca daño al ADN rompiendo las uniones covalentes de las hebras de ADN y de las proteínas unidas al ADN (Nitiss JL, 2009). La principal vía del metabolismo de etopósido es la O-desmetilación por las enzimas CYP450, produciendo 3 – hidroxietopósido (catecol etopósido), el cual forma una semiquinona y quinona etopósido. La enzima CYP3A4 ha demostrado ser la principal isoforma comprometida en la O-desmetilación, mientras que CYP3A5, CYP2E1 y CYP1A2 han jugado un rol minoritario (Zhuo *et al.*, 2004). En el gen *CYP3A4* la

variante CYP3A4*1B presenta un cambio de una Adenina por una Guanina en la posición 392 (rs2740574) lo que produce a una actividad disminuida de la enzima (Roco *et al.*, 2012).

Bleomicina es un fármaco anticancerígeno del tipo antibiótico glicopéptido que tiene una potente actividad sobre linfomas, cáncer de cabeza y cuello y tumores de las células germinales. El efecto citotóxico y mutagénico de bleomicina es a través de su capacidad para mediar daño al ADN, necesitando de la presencia de cofactores (Chen *et al.*, 2005). Bleomicina hidrolasa es una enzima que inactiva bleomicina. Se ha reportado que la neumonitis inducida por bleomicina se presentan en aproximadamente un 10 % de los pacientes tratados, por lo que el uso se ve limitado por esta reacción adversa (de Haas *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2005). El gen *BLMH* que codifica para la enzima bleomicina hidrolasa (BLMH) presenta un sitio polimórfico *A1450G* (rs1050565), el SNP lleva a la presencia de una isoleucina o valina como aminoácido en el residuo 443. El SNP se localiza en la región C terminal que se piensa está comprometido en el control de la actividad enzimática. La variante homocigota GG del gen de la bleomicina hidrolasa, que provoca una disminución en la actividad catalítica, se ha asociado con una supervivencia reducida y una alta prevalencia de recidivas en pacientes que sobreviven a cáncer testicular tratados con bleomicina, mientras que no se ha observado toxicidad pulmonar (de Haas *et al.*, 2008).

Cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II) es un complejo que contiene un átomo central de platino rodeado de dos átomos de cloro y dos moléculas de amonio en posición cis. Aunque cisplatino y los otros complejos de platino no forman intermediarios de iones carbonios o formalmente alquilan ADN, ellos se unen covalentemente a sitios nucleofílicos en el ADN y comparte atributos farmacológicos con agentes alquilantes (Brunton *et al.*, 2008). Los átomos de cloro pueden ser desplazados directamente por grupos nucleófilos o indirectamente reemplazando los iones cloros por grupos hidroxilo a través de reacciones con agua. Las reacciones ocurren espontáneamente en medio donde hay bajas concentraciones de cloro, tales como el medio intracelular. Cisplatino y sus análogos reaccionan preferentemente en la posición N-7 de guanina y adenina para formar aductos con el ADN, resultando en uniones intra e inter-hebra. La presencia de aductos de ADN puede causar fallas en la reparación del ADN, resultando en acumulación de hebras de ADN quebradas y activación de vías apoptóticas. Cisplatino causa de forma severa náuseas y vómitos. Análogos de serotonina tales como ondansetron, junto a glucocorticoides, se utilizan para controlar estos problemas. La nefrotoxicidad que genera una progresiva disminución del aclaramiento de creatinina limita la dosis, pero esto podría ser prevenido por hidratación adecuada con soluciones que contienen cloro y diuresis inducida por manitol. El daño tubular renal puede resultar en hipomagnesemia (Kalant *et al.*, 2006). Cisplatino es inactivado por conjugación con glutatión y ha estado implicada en resistencia celular a la

quimioterapia del cáncer como resultado de la conjugación de metabolitos activos por glutatión, con la subsecuente excreción de los conjugados (Siddik *et al.*, 2003).

4. Glutatión S-Transferasas

La principal función de las Glutatión S-transferasas (GSTs) es desintoxicar compuestos contaminantes, carcinógenos y mutágenos, por conjugación con glutatión (GSH) (Quiñones *et al.*, 2006). Estas enzimas se encargan de generar compuestos menos tóxicos y más solubles en agua, los cuales son excretados por la orina o en la bilis y mediante esta acción desintoxican a las células y las protegen de posibles daños al ADN, a las proteínas y los lípidos (Strange *et al.*, 2000). Esta enzima de desintoxicación (fase II), cataliza la conjugación de metabolitos reactivos con moléculas hidrofílicas de carga negativa para su eliminación en procesos de excreción. Por lo tanto, es razonable pensar que la eficiencia en el funcionamiento de estas enzimas determinará la concentración de metabolitos reactivos que circulan en el organismo (Strange *et al.*, 2000). Las GSTs han estado relacionadas como posibles marcadores genéticos de cáncer (Lin *et al.*, 1994, Wang *et al.*, 2011) y como focos de estudio para la resistencia a la quimioterapia (Masaad-Massade *et al.*, 1997). Las GSTs son parte de una familia de enzimas de fase II que conjugan glutatión con electrófilos endógenos o xenobióticos, son una familia de multigenes de enzimas diméricas solubles,

que incluyen los tipos alfa (α), mu (μ), pi (π), zeta (ζ), sigma (σ), kappa (κ), omega (ω) y theta (τ). Su principal función es desintoxicar compuestos contaminantes, carcinógenos y mutágenos, por conjugación con glutatión (GSH) (Quiñones *et al.*, 2006). La pérdida de actividad enzimática de *GSTM1* y *GSTT1* resulta de las deleciones en los genes que codifican estas proteínas, esto da como resultado el *GSTM1* nulo y el genotipo *GSTT1* nulo, respectivamente. Existen cuatro alelos distintos para *GSTP1*, *GSTP1**A, *B, *C y *D, que resultan del cambio en el codón 105 de Ile a Val y el codón 114 de Ala a Val, las distintas proteínas difieren en su capacidad para metabolizar drogas antineoplásicas (Ekhart *et al.*, 2009). Las GSTs son altamente polimórficas, cerca del 50% y 25% de la población tiene una deleción completa homocigota en genes que codifican *GST-M1* y *GST-T1*, respectivamente (Relling *et al.*, 2001). En Chile, los estudios muestran que las frecuencias alélicas del alelo *GSTT1 nulo* varían entre 6% y un 10,9%, en individuos controles y pacientes con cáncer de próstata, respectivamente. También se observa que las frecuencias alélicas del alelo *GSTM1 nulo* varían entre 24% y 43%, en individuos controles y pacientes con cáncer de próstata, respectivamente (Cáceres *et al.*, 2004, Roco *et al.*, 2012). Varios estudios relacionan polimorfismos en *GST* con el riesgo de cáncer de *novo*, con el riesgo de cáncer secundario a la quimioterapia y con los resultados en la eficacia y toxicidad de los tratamientos quimioterapéuticos (Relling *et al.*, 2001, Oldenburg *et al.*, 2007-a). Las GSTs tienen como sustratos varios agentes quimioterapéuticos

como fármacos alquilantes y antraciclinas. Los estudios que relacionan polimorfismos en GSTs y la respuesta clínica se han realizado principalmente en leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, cáncer ovárico y cáncer colorectal. Se ha postulado que las diferencias en la desintoxicación de fármacos o la protección mediada por GSTs contra el daño oxidativo durante los tratamientos debido a polimorfismos en genes *GST* puede influir en la sobrevida. Si existen enzimas GSTs con actividad reducida, aumentaría la dosis efectiva del fármaco en el tejido tumoral. La terapia en estos pacientes sería más efectiva, pero con toxicidades más severas (Petros *et al.*, 2005, Romero *et al.*, 2012).

5. Farmacocinética de cisplatino

En monoterapia, cisplatino se administra en perfusión intravenosa de 2 a 7 horas con dosis de 50-100 mg/m² cada 3 semanas. En combinación las dosis son de 75-100 mg/m² cada 3 o 4 semanas. Cisplatino presenta un elevado volumen de distribución que en estado de equilibrio estacionario es de aproximadamente 63,7 L, en el compartimento central es de alrededor de 20 L con una variabilidad interindividual cercana al 50%. Presenta un aclaramiento renal de alrededor de 0,7 L/h, con una variabilidad interindividual entre el 16 y el 54 %. Cisplatino se une a diversas proteínas (glutati6n y albumina), aminoácidos (metionina y cisteína) y nucle6tidos, formando complejos de pesos moleculares superiores a 50 KDa. La uni6n a prote6nas es > 90% y la fase de

eliminación beta es prolongada. Tan solo entre el 27 y el 45 % de la dosis administrada se elimina en un periodo de 84 a 120 horas. (Ramón-López *et al.*, 2012, Urien *et al.*, 2004).

Estos antecedentes hacen pensar que las variaciones interindividuales en la inducción de toxicidad entre los pacientes, después de regímenes de quimioterapia similares, supone diferencias genéticas en las proteínas involucradas en la farmacocinética de las drogas quimioterapéuticas.

II. HIPÓTESIS

Variaciones genéticas en las enzimas GSTM1, GSTT1, CYP3A4 y BLMH, que biotransforman cisplatino, etopósido y bleomicina, afectan el perfil de toxicidad y los parámetros farmacocinéticos en pacientes con cáncer testicular.

III. OBJETIVO GENERAL

Identificar polimorfismos genéticos como predictores de toxicidad asociada con el esquema cisplatino-etopósido-bleomicina (PEB) y esquema cisplatino-etopósido (PE), en pacientes con cáncer testicular.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener y analizar el perfil de reacciones adversas a quimioterapia en pacientes con cáncer testicular tratados con etopósido, bleomicina, y cisplatino.
2. Realizar asociaciones entre la edad, la dosis y los genotipos según las variantes genéticas en las enzimas GSTM1, GSTT1, CYP3A4 y BLMH, con respecto a la presencia de reacciones adversas.
3. Desarrollar y validar un método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para el análisis cuantitativo de cisplatino en plasma humano.
4. Obtener y analizar los parámetros farmacocinéticos de cisplatino mediante un estudio farmacocinético piloto.
5. Realizar una asociación genotipo-farmacocinética que relacione los parámetros farmacocinéticos de cisplatino y variantes genéticas en las enzimas GSTM1 y GSTT1.
6. Establecer una población farmacocinética de cisplatino en el grupo de pacientes tratados con cisplatino y analizar los polimorfismos genéticos en las enzimas GSTM1 y GSTT1 como covariables.

V. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Pacientes

Los pacientes incluidos en el estudio fueron reclutados en Santiago de Chile y tratados en el Hospital San Juan de Dios y en el Instituto Nacional del Cáncer, entre el 12 de junio de 2010 y el 04 de Agosto de 2013. Como criterio de inclusión se determinó que los pacientes estuvieran diagnosticados histológicamente para cáncer testicular, fueran mayores de 18 años y consintieran participar libres e informados. Como criterio de exclusión se determinó que no podían participar pacientes con otras patologías descompensadas. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Metropolitano Norte y de la Universidad de Chile. El estudio se ejecutó cumpliendo con todas las exigencias de las buenas prácticas clínicas, la declaración de Helsinki (AMM, 2008) y la legislación vigente. El estudio de detección de reacciones adversas, estudio de toxicidad hematológica y genotipificación, se realizó en un grupo de 63 pacientes. Además en un grupo de 8 pacientes se realizó un estudio farmacocinético de cisplatino.

2. Análisis de los registros clínicos

Se realizó por el médico tratante un estudio retrospectivo de registros clínicos para obtener el perfil de toxicidad aguda y tardía del grupo en estudio. Los datos necesarios para la detección de reacciones adversas fueron

traspasados manualmente a un reporte de caso en un grupo de 63 pacientes. Para la clasificación de los grados de toxicidad se utilizaron los criterios terminológicos comunes para reacciones adversas del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI, 2010), donde cada reacción adversa se clasifica desde grado 0 (ausencia) hasta grado 5 (muerte).

3. Análisis genético

Se analizaron las variantes genéticas de las enzimas GST-M1, GST-T1, CYP3A4 y BLMH. Los análisis fueron realizados por el Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética del Centro de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas (IFT), Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Para la extracción de ADN se utilizaron kits comerciales para extracción desde una muestra de sangre periférica, lo cual permitió obtener ADN en forma simple, rápida, reproducible y con una pureza adecuada para realizar amplificaciones por PCR. El DNA aislado de sangre periférica, se amplificó mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando partidores específicos que permiten la detección de las variantes alélicas en las enzimas en estudio. El ADN amplificado se sometió a digestión con las enzimas de restricción apropiadas. Finalmente se determinaron las variantes alélicas a través del análisis de fragmentos de restricción por electroforesis en geles de

agarosa (2%) o poliacrilamida (16%) (Roco et al., 2012, Oldenburg et al., b-2007). El detalle de cada metodología se muestra en el Anexo N°1.

4. Análisis farmacocinético

Se realizó un estudio farmacocinético piloto en 8 pacientes tratados con el primer ciclo de quimioterapia PEB o PE. El diseño del estudio farmacocinético se realizó de acuerdo a las recomendaciones (FDA 1999, EMA 2007, EMA 2010). La toma de muestra se realizó el día de administración de cisplatino durante el ciclo 1 del esquema PEB o PE. Para esto se instaló una vía intravenosa exclusiva para la toma de muestras en el brazo contralateral a las vías de infusión de la quimioterapia. Los tiempos de toma fueron: antes del inicio de la infusión (blanco), y desde el inicio de la infusión a 2 horas (fin de infusión), 3 horas, 4 horas, 6 horas, y 24 horas. Las muestras dentro de la primera hora de extracción fueron centrifugadas y almacenadas a -80°C , hasta su procesamiento. Para la determinación de cisplatino se realizó la validación de la metodología analítica que permite la cuantificación de cisplatino en plasma humano mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC –UV). Los criterios utilizados fueron los descritos por las agencias reguladoras (EMA 2011, FDA 2001). La determinación de cisplatino se basó en la literatura biomédica (López-Flores *et al.*, 2005) mediante la técnica de HPLC con derivatización pre-columna. Una alícuota de

120 μL de cisplatino se agregó a un tubo eppendorf, se agregó 10 μL de estándar interno (cloruro de níquel) y 240 μL de metanol frío, se agitó en vortex por 10 segundos. Se almacenó por 20 minutos a -18°C , luego se agitó en vortex por 10 segundos y se centrifugó por 10 minutos a 13.200 rpm a 4°C . Se retiró el sobrenadante y se agregaron 12 μL del reactivo dietilditiocarbamato (DDTC) al 10% en NaOH 0,1 N. Se incubó por 1 hora a 40°C . Por último se agregaron 320 μL de cloroformo y se agitó por 10 minutos en agitador mecánico a 220 rpm. Se centrifugó por 5 minutos y 10 μL del sobrenadante se inyectaron directamente dentro del sistema cromatográfico. Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu LC -10AT con una columna Supelco 516 C18 de 25 cm x 4,6 mm x 5 μm y un detector UV Shimadzu CTO-10ADVP. La medición se realizó a 254 nm y una temperatura de elusión de 23°C . La fase móvil consta de agua/metanol/acetonitrilo (31:40:29) a una velocidad de flujo fijo de 1,2 mL/min. La curva de calibración se realizó agregando cantidades conocidas de cisplatino al plasma libre de droga. El rango de la curva de calibración fue de 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para obtener los parámetros individuales y poblacionales se utilizó un modelo farmacocinético de infusión intravenosa con dos compartimentos y eliminación lineal (Urien *et al.*, 2004, Ramón-López *et al.*, 2012). Para el análisis de las covariables se utilizó una distribución log-normal. Con una significancia de menos 6 puntos ($p < 0,01$) en el valor de la OFV (función valor objetivo) Zandvliet *et al.*, 2007, Joerger *et al.*, 2012).

5. Análisis estadísticos

Para caracterizar a la población se realizó un análisis de estadística descriptiva utilizando promedio y rango. Los análisis estadísticos de asociación entre la presencia de efectos adversos y los genotipos de cada paciente, se realizó mediante el test de *Chi-cuadrado* y el test exacto de *Fisher*. Las diferencias en los grupos en los parámetros farmacocinéticos de cisplatino en función del estado de las variantes genéticas fueron evaluadas usando el test *Mann-Whitney U*. Los análisis estadísticos del estudio piloto de farmacocinética se realizaron mediante el programa informático Monolix 4.2.2. Los análisis descriptivos se realizaron con el programa STATA 11.1. Para todos los análisis estadísticos se utilizó como criterio de significancia un p value de 0,05.

VI. RESULTADOS

1. Población en estudio

Se incluyeron un total de sesenta y tres (63) pacientes con cáncer testicular tratados con el esquema cisplatino, etopósido, con o sin bleomicina, PEB y PE, respectivamente. Las características de la población en estudio se muestran en la Tabla N°1. La edad promedio de los pacientes fue de 30 años (rango etario entre 18 y 63 años) y diagnosticados principalmente con cáncer testicular del tipo no seminoma. Además, se observa que la mayoría recibió el esquema que incluye bleomicina (PEB). Las frecuencias genotípicas de las mutaciones en las enzimas CYP3A4, GSTM1, GSTT1 y BLMH, se muestran en la Tabla N°2.

Tabla N°1: Características generales del grupo en estudio

Característica	Ca. Testicular
Total muestra	63
Edad (años) ±D.E *	30,5 ± 9,5
SC (m²) ±D.E**	1,89 ± 0,21
Tipo Histológico	n (%)
Seminoma	14 (22,2%)
No Seminoma	48 (72,2 %)
Germinoma extragonadal	1 (1,6 %)
Tipo de Quimioterapia	(%)
PE (cisplatino y etopósido)	8 (12,7 %)
PEB (cisplatino, etopósido, y bleomicina)	52 (82,5 %)
Cisplatino, etopósido, bleomicina, vinblastina, ifosfamida, Gemox***	1 (1,6 %)
* SC, área de superficie corporal. ** D.E Desviación estándar *** GEMOX: gemcitabina, oxaliplatino	

Tabla N°2: Frecuencias genotípicas y alélicas para los genotipos *CYP3A4*1B*, *GSTM1 (-)*, *GSTT1 (-)* y *BLMH (A1450G)* en pacientes con cáncer testicular.

CYP3A4*1B					
Genotípica			Alélica		
Frecuencia	wt/wt	wt/*1B	*1B/*1B	f wt	f *1B
No.	56	5	0	0.959	0.041
%	91.8 %	8.2 %	0 %		
Total	61 (100 %)				
GSTM1(-)					
Genotípica			Alélica		
Frecuencia	wt/wt	(-)/(-)		f wt	f (-)
No.	34	29		0.540	0.460
%	54 %	46 %			
Total	63 (100 %)				
GSTT1(-)					
Genotípica			Alélica		
Frecuencia	wt/wt	(-)/(-)		f wt	f (-)
No.	60	2		0.968	0.032
%	96.8 %	3.2 %			
Total	62 (100 %)				
BLMH (A1450G)					
Genotípica			Alélica		
Frecuencia	A/A	A/G	G/G	f A	f G
No.	28	24	0	0.769	0.231
%	53.8 %	46.2 %	0 %		
Total	52 (100%)				

2. Perfil de toxicidad

Las reacciones adversas más frecuentes fueron las náuseas, los vómitos y la alopecia con un 87,3%, 76,2% y 87,3% respectivamente. Las reacciones del tipo hematológica, aunque con una menor frecuencia fueron; anemia, 66,7%; leucopenia, 36,5; neutropenia, 36,5%; trombocitopenia, 20,6% y linfocitopenia, 20,6%. Por último, se presentaron reacciones con menor

frecuencia pero con un alto grado de severidad, como la nefrotoxicidad, la neurotoxicidad y la neutropenia febril con un 4,8%, 11,1% y 7,9%, respectivamente (Tabla N°3). El perfil de toxicidad de eventos de emesis y hematológicos según grado de severidad se muestra en la Tabla N° 4. Al observar la toxicidad severa (grado 3-4) se puede apreciar que el mayor porcentaje lo alcanza la neutropenia y la leucopenia, con un 30,2% y un 17,5%, respectivamente.

Tabla N°3: Efectos adversos presentes en 63 pacientes de cáncer testicular sometidos a

Gástricos	n	%
Diarrea	4	6,3
Mucositis	5	7,9
Náuseas	48	76,2
Vómitos	55	87,3
Hematológicos	n	%
Anemia	42	66,7
Leucopenia	23	36,5
Linfocitopenia	13	20,6
Neutropenia	23	36,5
Neutropenia febril	5	7,9
Trombocitopenia	13	20,6
Neurológicos	n	%
Cefalea	3	4,8
Neurotoxicidad	7	11,1
Otros	n	%
Alopecia	55	87,3
Alteraciones dermatológicas	6	9,5
Infecciones	8	12,7
Nefrotoxicidad	3	4,8
Ototoxicidad	3	4,8

Tabla N°4: Frecuencia de vómitos, náuseas y toxicidad hematológica en 63 pacientes con cáncer testicular tratados con quimioterapia

Efecto Adverso	Grado 0-II (Toxicidad moderada)		Grado III-IV (Toxicidad severa)	
	n	%	n	%
Vómitos	59	93,7	4	6,3
Nauseas	61	96,8	2	3,2
Neutropenia	44	69,8	19	30,2
Anemia	61	96,8	2	3,2
Leucopenia	52	82,5	11	17,5
Trombocitopenia	61	96,8	2	3,2
Linfocitopenia	60	95,2	3	4,8

3. Asociación entre la dosis y el genotipo en variantes genéticas en enzimas de biotransformación, con la presencia y riesgo de reacciones adversas.

La asociación y el riesgo entre la dosis del esquema de quimioterapia y los genotipos en variantes genéticas en *GSTM1nulo*, *GSTT1nulo*, *CYP3A4*1B* y *BLMH (A1450G)*, con reacciones adversas hematológicas y eméticas, se muestran en las Tabla N°5 y N°6.

La aparición de reacciones adversas del tipo eméticas no se relacionó con ninguna de las covariables analizadas. En relación a la presencia de anemia severa, se observó que fue más frecuente con dosis altas de etopósido ($p_{\text{fisher}}=0,012$), dosis altas de bleomicina ($p_{\text{chi2}}=0,047$) y a mayor edad ($p_{\text{fisher}}=0,026$).

Leucopenia severa se presentó con más frecuencia en los pacientes con el genotipo *GSTM1* silvestre ($p_{\text{chi2}} = 0,041$, OR=0,2058 (0,0405-1,0459)) y en los pacientes con el genotipo *BLMH A/A* ($p_{\text{chi2}} = 0,036$, OR=5,3529 (0,9915-28,900)). Linfocitopenia severa se presentó con más frecuencia en los pacientes con el genotipo *GSTT1 nulo* ($p_{\text{chi2}} =0,002$, OR=29,00 (1,2938-650,0153)) y en pacientes tratados con dosis altas de bleomicina ($p_{\text{Fisher}} =0,037$). La presencia de toxicidad hematológica de cualquier grado de severidad, fue más frecuente en los pacientes con dosis más altas de cisplatino ($p_{\text{Fisher}}= 0,014$, OR=6,15 (1,50-25,14)), de etopósido ($p_{\text{Fisher}}= 0,043$), y bleomicina ($p_{\text{Fisher}} = 0,021$, OR=9,27 (1,09-78,49)). En relación a la presencia

de toxicidad hematológica severa, fue más frecuente en pacientes con el genotipo *BLMH A/G* ($p_{\text{fisher}} = 0,002$, $OR=7,67$ (2,14-27,35)), tratados con dosis altas de etopósido ($p_{\text{Fisher}} = 0,010$, $OR=11,67$ (1,30-104,45)) y dosis altas de bleomicina ($p_{\text{Fisher}} = 0,008$, $OR=5,56$ (1,60-19,22)).

Tabla N°5: Asociaciones estadísticamente significativas entre edad, dosis, genotipos y toxicidad

Efecto adverso	Grado 0-II		Grado III-IV		P value (test χ^2)	P value (test exacto de Fisher)
	n	%	N	%		
Anemia						
Dosis etopósido						
≤1080 mg/m ²	34	100	0	0	<0,001	0,012
1400-1500 mg/m ²	19	100	0	0		
>1920 mg/m ²	5	71,4	2	28,6		
Dosis bleomicina						
≤ 270 UI	34	100	0	0	0,047	0,115
>270 UI	16	88,9	2	11,1		
Edad						
18-30 años	36	100	0	0	0,000	0,026
31-49 años	24	96	1	4		
>50 años	1	50	1	50		
Leucopenia						
<i>GSTM1</i>						
<i>Silvestre</i>	25	73,5	9	26,5	0,041	0,052
<i>Nulo</i>	27	93,1	2	6,9		
<i>BLMH</i>						
<i>A/A</i>	26	92,9	2	7,1	0,036	0,064
<i>A/G</i>	17	70,8	7	29,2		
Linfocitopenia						
<i>GSTT1</i>						
<i>Silvestre</i>	58	96,7	2	3,3	0,002	0,095
<i>Nulo</i>	1	50	1	50		
Dosis de bleomicina						
≤ 270 UI	34	100	0	0	0,014	0,037
>270 UI	15	83,3	3	16,7		

Efecto adverso	Grado 0-II		Grado III-IV		P value (test chi ²)	P value (test exacto de Fisher)
Toxicidad hematológica por grado *						
BLMH						
A/A	23	82,1	5	17,9	0,001	0,002
A/G	9	37,5	15	62,5		
Dosis etopósido						
≤1080 mg/m ²	25	73,5	9	26,5	0,010	0,010
1400-1500 mg/m ²	10	52,6	9	47,4		
>1920 mg/m ²	1	14,3	6	85,7		
Dosis bleomicina						
≤ 270 UI	25	73,5 3	9	26,47	0,005	0,008
>270 UI	6	3,33	12	66,67		
Toxicidad hematológica por presencia **						
Dosis cisplatino						
≤200 mg/m ²	6	54,5 5	5	45,45	0,007	0,014
>200 mg/m ²	8	16,3 3	41	83,67		
Dosis etopósido						
≤1080 mg/m ²	12	35,2 9	22	64,71	0,037	0,043
1400-1500 mg/m ²	2	10,5 3	17	89,47		
>1920 mg/m ²	0	0,00	7	100,00		
Dosis bleomicina						
≤ 270 UI	12	35,2 9	22	64,71	0,018	0,021
>270 UI	1	5,56	17	94,44		
*grado 0-2 o grado 3-4 de cualquier toxicidad hematológica **ausencia o presencia de cualquier toxicidad hematológica						

Tabla N° 6: Asociaciones estadísticamente significativas entre covariables y riesgo

Característica	Grado		Odds ratio	(95% IC)	P* (test chi ²)	P** (test exacto de Fisher)
	0-II	III-IV				
Leucopenia	0-II	III-IV				
GSTM1	N	N				
Presente	25	9	0,2058	0,0405-1,0459	0,041	0,052
Nulo	27	2				
BLMH						
A/A	26	2	5,3529	0,9915-28,9006	0,036	0,064
A/G	17	7				
Toxicidad Hematológica por grado**						
BLMH						
A/A	23	5	7,6667	2,1485-27,3579	0,001	0,002
A/G	9	15				
Dosis etopósido						
<1500 mg/m ²	35	18	11,6667	1,303-104,4573	0,007	0,013
>1920mg/m ²	1	6				
Dosis bleomicina						
≤ 270 UI	25	9	5,5556	1,6055-19,2235	0,005	0,008
>270 UI	6	12				
* ausencia o presencia de cualquier toxicidad hematológica						
**grado 0-2 o grado 3-4 de cualquier toxicidad hematológica						

4. Validación de la metodología analítica para cuantificar cisplatino en plasma humano.

Los tiempos de retención de cisplatino y cloruro de níquel fueron de 8 y 10 minutos, respectivamente. En relación a la selectividad, de cuatro (4) plasmas obtenidos de voluntarios sanos, ninguno presentó interferencias con los tiempos de retención de cisplatino ni de cloruro de níquel (Figura N°1).

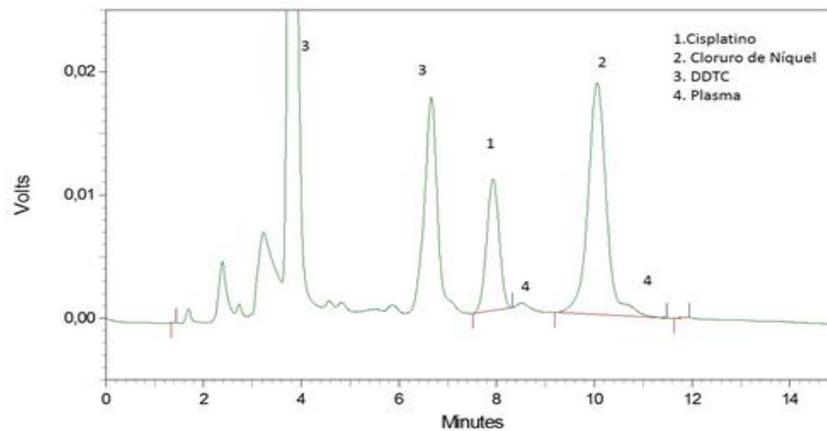


Figura N° 1. Cromatograma de cisplatino en plasma humano mediante HPLC con detección UV.

Para linealidad se obtuvo un coeficiente de correlación mayor a 0,980 ($R^2 = 0,9996$) entre la relación de área (RA) (Cisplatino/Níquel) y los niveles de concentración. El coeficiente de variación para los niveles 0,3; 1; 1,5; 2; 3,75, 5, 7,5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ fue 17,2%; 8,77%; 12,59%; 8,24%; 14,64%, 5,28%, 5,23% y 8,67% respectivamente. Los valores cumplen con lo exigido por la FDA, ya que el coeficiente de variación del nivel más bajo es menor al 20 % y el resto son menores al 15%. Los datos obtenidos muestran que la metodología utilizada es lineal para el rango de concentración utilizado.

El error relativo intradía (%) para los niveles 0,3, 1, 5 y 7,5 $\mu\text{g/ml}$ fue de 4,8 %; 13,2%, 4,18 y 2,54% respectivamente. Los valores son menores al 15% de error relativo y 20% para la concentración más baja. Para la precisión intradía el coeficiente de variación obtenido para los niveles 0,3, 1, 5 y 7,5 $\mu\text{g/ml}$ fue de 11,9%; 6,32%; 13,2% y 6,49% respectivamente. Los CV (%) fueron menores al 15%.

El error relativo interdía (%) para los niveles 0,3, 1, 5 y 7,5 µg/ml fue de 1,59 %; 6,59%; 7,59% y 2,73% respectivamente. Los valores son menores al 15% de error relativo y 20% para la concentración más baja. Para la precisión interdía el coeficiente de variación obtenido para los niveles 0,3, 1, 5 y 7,5 µg/ml fue de 5,77%; 8,16%; 11,06% y 14,85% respectivamente. Los CV (%) fueron menores al 15%.

El límite de cuantificación (LOQ) corresponde 0,3 µg/mL. El CV fue para la muestra 1 fue de 7,15 %, y para la muestra 2 fue de 5,44%, menor al 20% que es lo exigido. El error relativo fue 0,85 %, y 13,7% respectivamente, lo cual se encuentra dentro del rango ± 20 %. Los resultados nos indican que se puede cuantificar 0,3 µg/mL de cisplatino (que corresponde al menor punto del rango de concentración utilizado en la linealidad) de manera precisa y exacta. El límite de detección teórico (LOD) aproximado corresponde a 0,1 µg/mL. Analíticamente la relación de área obtenida para esta concentración corresponde a más de 3 veces la señal del ruido de una muestra blanco cero.

Las soluciones estándares mostraron ser estables al menos por un mes. Al comparar las curvas de calibración en plasma y evaluar la concentración del Qc bajo y Qc alto, las soluciones estándares se pueden utilizar hasta durante 1 mes congeladas a -30°C. Cisplatino en plasma es estable hasta 5 horas almacenadas a -30 °C. Luego de 18 horas, 3 días y hasta 14 días, las muestras pierden la estabilidad. El almacenamiento a -80° C mejora la estabilidad a 20 días.

5. Determinación de parámetros farmacocinéticos individuales y poblacionales, y efecto de las covariables.

Los perfiles farmacocinéticos mostrados en la Figura N °2, muestran un decaimiento rápido en su primera fase. Como no se logró cuantificar cisplatino a las 24 horas post-infusión no se observó la segunda fase de eliminación esperada según la literatura. Los parámetros individuales y poblacionales se muestran en las Tablas N °7 y N °8, respectivamente. El efecto de la covariable genotipo se muestra en la Tabla N ° 9. No se logró mejorar el modelo básico con ninguna variable testada (peso, dosis, superficie corporal, edad, genotipo GSTM1).

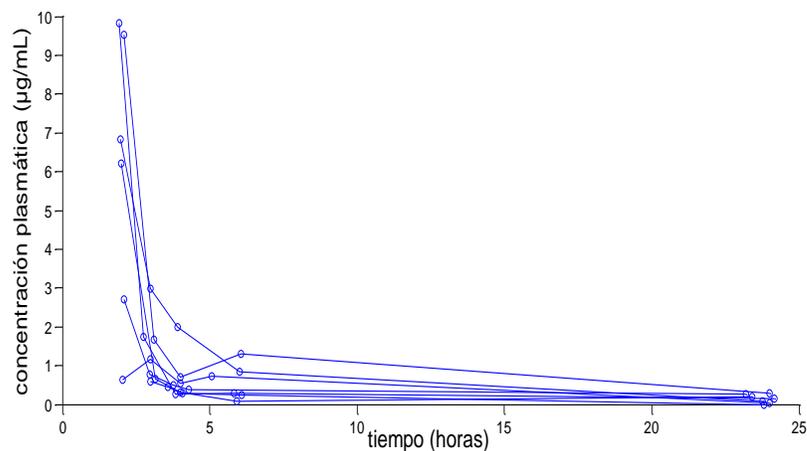


Figura N °2A. Perfil farmacocinético de 8 pacientes con cáncer testicular tratados con cisplatino 100 mg/m^2 en infusión de 2 horas. A. escala lineal, B. escala logarítmica

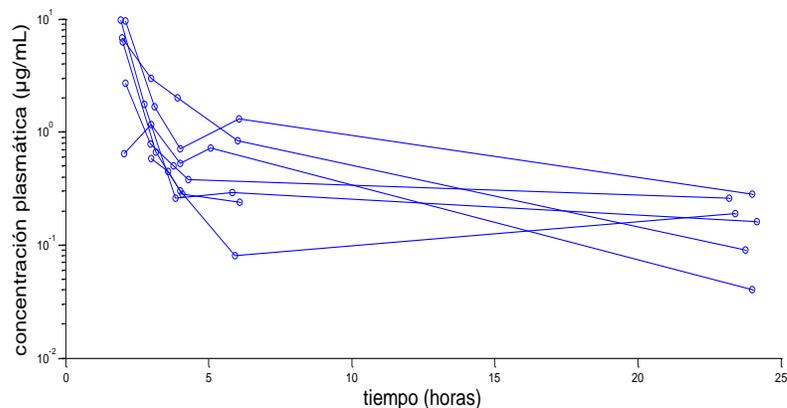


Figura N °2B. Perfil farmacocinético de 8 pacientes con cáncer testicular tratados con cisplatino 100 mg/m² en infusión de 2 horas. A. escala lineal, B. escala logarítmica

Tabla N° 7: Parámetros farmacocinéticos individuales.

Paciente	Cl (l/h)	V1 (l)	Q (l/h)	V2 (l)	C _{máx} (µg/ml)	ABC (µg h /mL) 0-24hrs	ABC (µg h /mL) 0-Inf	GSTM1/ GSTT1
ID1	13,47	5,44	2,64	14,312	2,7100	11,1500	17,9960	+/+
ID2	11,412	*	2,54	14,142	**1,1700	**10,2300	**10,5000	+/+
ID3	11,048	6,22	2,55	14,53	0,5800	4,0000	3,9980	+/+
ID4	15,795	22,1	2,57	14,506	3,7700	15,5300	86,0720	SD ***
ID5	13,912	4,58	2,613	14,207	6,2100	13,3300	20,8100	-/+
ID6	9,06	14,16	2,63	14,037	6,8300	22,6300	23,3750	-/+
ID7	5,76	2,98	2,66	14,387	9,5200	33,0300	36,9400	+/+
ID8	8,1882	3,69	2,42	14,731	9,8300	20,0100	22,4700	-/+
Promedio	11,080	8,452	2,57	14,35	5,72	17,98	31,16	
DE.	3,312	7,077	0,0	0,22	3,32	8,02	25,46	
CV %	29,89	83,72	2,99	1,59	58,14	44,62	81,72	
Promedio GSTM1 +	10,214				4,466667	18,13667	21,812	
Promedio GSTM1 -	10,38673				7,623333	18,65667	22,21833	

CL: aclaramiento
V1:volumen de distribución en el compartimento central
V2: volumen de distribución en el compartimento periférico
Q:aclaramiento intercompartimental
ABC: área bajo la curva concentración versus tiempo
DE: desviación estándar

Tabla N°8: Parámetros farmacocinéticos poblacionales

Parámetro	Media Poblacional		Variabilidad omega (ω)	
	Modelo Básico	DE	Modelo Básico	DE
Cl cis (l/h)	9,97	1,5	0,336	0,1
V1cis (l)	6,48	5,9	1,75	0,5
Q cis (l/h)	2,53	0,46	0,123	0,16
V2 cis (l)	14,2	-	0,129	-
OFV	69,64		-	-

CL: aclaramiento
V1: volumen de distribución en el compartimento central
V2: volumen de distribución en el compartimento periférico
Q: aclaramiento intercompartimental
DE: desviación estándar

Tabla N°9. Modelo de las covariables

Parámetro	Media Poblacional		Variabilidad omega		Media Poblacional		Variabilidad Omega	
	Modelo Básico Efecto covariable	DE	Modelo Básico Efecto covariable	DE	Modelo covariable GSTM1	DE	Modelo Final	DE
Cl cis (l/h)	11,1	1,6	0,279	0,11	10,9	2	0,316	0,12
V1cis(l)	0,00472	4,4	0,888	3,7e+005	0,286	0,36	1,8	0,95
Q cis (l/h)	15,4	13	0,961	0,54	6,58	2,7	0,843	0,32
V2 cis (l)	7,49	5,2	0,789	0,31	11	4,7	0,849	0,34
OFV	66,69				53,41	-	-	-
β Cl (GSTM1)					-0,179	2	P=0,57	

CL: aclaramiento
V1: volumen de distribución en el compartimento central
V2: volumen de distribución en el compartimento periférico
Q: aclaramiento intercompartimental
DE: desviación estándar
OFV: función valor objetivo, objective function value.

6. Asociación parámetro farmacocinéticos y genotipos

Los resultados de la asociación de los parámetros farmacocinéticos y genotipos se muestran en la Tabla N °10. No se encontró asociación significativa entre los parámetros farmacocinéticos concentración máxima, área bajo la curva concentración versus tiempo (ABC) y aclaramiento” de cisplatino.

Tabla N ° 10. Asociación entre los parámetros farmacocinéticos y genotipos en GSTs

	C _{máx} (µg/ml)	ABC (µg h /L) 0-24hrs	Aclaramiento (l/h)	GST M1 / GSTT1
Promedio	4,466	18136	10,214	+/+ n=3
Promedio	7,623	18656	10,386	-/+ n=3
P value (*)	0,2752	0,5127	0,8273	
*Prueba U de Mann-Whitney ABC: área bajo la curva concentración versus tiempo				

VII. DISCUSIÓN

Dentro del último tiempo se ha desarrollado en el campo de la investigación biomédica la disciplina llamada farmacogenética o farmacogenómica. Este desarrollo ha sido bastante importante en áreas como la oncología. El principal objetivo es lograr que el tratamiento sea individualizado para cada paciente, observando cuáles son sus características genéticas, de manera que la droga sea útil y que la dosis sea la correcta. Lo ideal es lograr la mayor eficacia con la menor toxicidad, para así poder modular el margen terapéutico estrecho que caracteriza a las drogas quimioterapéuticas.

Esta memoria muestra un estudio farmacogenético preliminar en un grupo de pacientes con cáncer testicular. Principalmente son pacientes jóvenes (promedio de edad de 30 años), con un tipo histológico no seminoma (72,2 %) y que recibieron en su mayoría el esquema PEB (82,5%). Esta población en estudio es similar a estudios anteriores respecto a estas características. La presencia de alguna de las variantes genéticas en las enzimas que metabolizan los fármacos del esquema de quimioterapia, teóricamente lleva a variaciones en los niveles de expresión de las enzimas. En este caso las variaciones en los genes estudiados se espera que disminuyan la capacidad metabólica y por ende de desintoxicación, lo que generaría mayor presencia de efectos adversos. Pero no solo las características genéticas están involucradas en este proceso, sino que también, variables como la dosis y la edad. El efecto del

esquema sobre la toxicidad, ya se ha descrito a partir de los ensayos clínicos para cáncer testicular. Culine *et al.*, en el año 2007 muestran que los pacientes tratados con el esquema PEB por 3 ciclos presentan un 72% de neutropenia grado 3-4, versus los pacientes con el esquema PE por 4 ciclos, que presentan un 90%. Albers *et al.*, el año 2008 muestran que los pacientes con un ciclo de PEB, presentan un 2,3 % de neutropenia febril grado 3, mientras que Culine muestra un 7% grado 3-4 y un 5% grado 3-4 para el esquema PEB por 3 ciclos y el esquema PE por 4 ciclos, respectivamente. Albers *et al.*, muestra un 3,4% y un 0,6% de trombocitopenia grado 3 y 4, respectivamente. Por su lado Culine *et al.*, muestra un 6% y un 8% para el esquema PEB por 3 ciclos y PE por 4 ciclos, respectivamente. Rimmer *et al.*, el año 2011 muestran un esquema PEB acelerado (cada 14 días *versus* 21 días tradicionales) por 4 ciclos, se observó una toxicidad grado 3-4 mayor a los esquemas anteriores, trombocitopenia 56%, neutropenia 63% y neutropenia febril 38%. (Culine *et al.*, 2007, Albers *et al.*, 2008, Rimmer *et al.*, 2011). En esta memoria se encontró que la presencia de anemia severa fue más frecuente con dosis altas de etopósido y bleomicina. Además se observó que linfocitopenia fue más frecuente con dosis altas de bleomicina. Mientras que la toxicidad hematológica total por presencia fue más frecuente en pacientes con dosis altas de cisplatino, etopósido y bleomicina. Si se analiza la toxicidad hematológica por grado de severidad, se observó que la toxicidad hematológica total grado 3-4 fue más frecuente en pacientes con dosis altas de etopósido y bleomicina. En relación a la toxicidad relacionada con las

variantes genéticas en las GSTs, se ha reportado que el genotipo *GSTM1* ausente está asociado con un aumento en la trombocitopenia grado 3-4 (Cho *et al.*, 2010), aumento en la toxicidad total mayor o igual a grado 3 y neurotoxicidad mayor o igual a 3 (Barahmani *et al.*, 2009). Por otro lado, el genotipo *GSTT1* ausente está asociado con nefrotoxicidad y emésis severa (Khrunin *et al.*, 2010), aumento en la trombocitopenia grado 3-4 (Li *et al.*, 2013, Cho *et al.*, 2010) y aumento en la toxicidad gastrointestinal (Romero *et al.*, 2012). En este trabajo se observó que los dos pacientes con el genotipo *GSTT1* nulo presentaron más linfocitopenia grado 3-4 que los *GSTT1* silvestre. Se encontraron asociaciones que indican una asociación contraria a la hipótesis anteriormente descrita, por ejemplo, leucopenia severa se presentó con más frecuencia en pacientes con el genotipo *GSTM1* silvestre, esto último también está descrito por Oldenburg el año 2007, que muestra el genotipo *GSTM1* nulo como factor protector para el daño auditivo. Además, Khrunin reportó el año 2010 que el genotipo *GSTM1* tiene un bajo riesgo de trombocitopenia y anemia. Monteiro reportó un aumento en el riesgo de toxicidad hepática por drogas antituberculosas en pacientes *GSTM1* presente y Khrunin 2010 muestra que el genotipo *GSTM1* nulo tiene un menor riesgo de trombocitopenia, anemia y neuropatía (Oldenburg *et al.*, 2007, Khrunin *et al.*, 2010). Si se analiza la toxicidad hematológica total por severidad, se observó que la toxicidad grado 3-4 fue más frecuente en los pacientes con el genotipo *BLMH A/G*. Mientras que leucopenia severa se presentó con más frecuencia en pacientes con el genotipo

BLMH A/G. La presencia de una guanina por una adenina en la posición 1450 provoca una disminuida capacidad enzimática. Aunque Nuver y sus colaboradores en el año 2005 reportaron un estudio de asociación entre esta variante genética y toxicidad pulmonar en pacientes con cáncer testicular, no se encontraron resultados significativos (Nuver *et al.*, 2005). Sin embargo hay una fuerte asociación entre la toxicidad hematológica y esta variante genética en *BLMH*, mostrada en esta memoria. Esta es la primera evidencia de una asociación genotipo-toxicidad en el tratamiento con bleomicina.

El estudio de la farmacocinética de cisplatino con 8 pacientes muestra parámetros farmacocinéticos con una alta variabilidad interpaciente ($\omega_{Cl}=0,336$, $\omega_{V1}=1,75$, $\omega_{Q}=0,123$, $\omega_{V2}=0,129$). Ninguna covariable mostró mejorar esta variabilidad al ser introducida en el modelo farmacocinético poblacional básico. Los datos obtenidos se ajustan a un modelo con decaimiento biexponencial con un aclaramiento poblacional en el compartimento central de 9,97 l/hr y 2,53 l/hr en el compartimento periférico, un volumen de distribución de 6,48 L en el compartimento central y un volumen de 14,2 L en el compartimento periférico. Estos parámetros son similares a los reportados en la literatura para cisplatino libre (Urien *et al.*, 2004, Bonetti *et al.*, 1994). El efecto de los polimorfismos genéticos en las enzimas glutatión S-transferasas y el metabolismo de algunos fármacos esta descrita para busulfan, melfalán, tiotepa, y análogos de tioguanina (Elhasid *et al.*, 2010). Para cisplatino existen pocos estudios al respecto. Filipski *et al.*, no encontró asociación entre

la farmacocinética de cisplatino y polimorfismos genéticos en *OCT2* (Filipski *et al.*, 2009). Por otro lado, Joerger *et al.*, no encontró asociación con los polimorfismos en *GSTM1* y *GSTP1* al aplicar un modelo poblacional en pacientes con cáncer pulmonar tratados con cisplatino 75 mg/m² en infusión de 4 horas (Joerger *et al.*, 2012). En el estudio piloto farmacocinético piloto de cisplatino realizado en esta memoria en pacientes con cáncer testicular tratados con 100 mg/m² en infusiones de 2 horas, ningún parámetro farmacocinético se correlacionó con las variantes genéticas en *GSTM1*, ni en *GSTT1*. Si bien este estudio contempló un número bajo de pacientes y no se incluyó el análisis genotípico de *GSTP1*, soporta al menos la idea de ausencia de asociación entre la delección en *GSTM1* y los parámetros farmacocinéticos de cisplatino. Sin embargo, se propone aumentar el número de pacientes en este estudio y aumentar el número de genes candidatos que posiblemente influyan en la farmacocinética de cisplatino y expliquen la alta variabilidad (*GSTP1*, *GSTA1*, *ABCB1* y *OCT2*).

Como futuros estudios, se puede plantear la idea de observar cual es el efecto farmacodinámico de las variantes genéticas que influyen en el metabolismo de cisplatino. Esto mediante modelaciones poblacionales en el conteo de neutrófilos, leucocitos y plaquetas y observando cual es el efecto de estas mutaciones. Otro posible estudio es observar cuales son las concentraciones de cisplatino en cada ciclo y tener oportunidades de monitoreo terapéutico, idealmente guiado por covariables como características genéticas.

VIII. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de memoria se concluye que:

1. Se logró caracterizar el perfil de toxicidad del esquema PEB-PE en 63 pacientes chilenos con cáncer testicular.
2. Se encontró que los polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo y *BLMH A1450G*, están relacionados con la toxicidad luego del esquema PEB –PE.
4. Los pacientes con el genotipo *GSTM1 presente* experimentan de manera significativa, más leucopenia grado 3-4 que los pacientes *GSTM1 nulo*. Linfocitopenia severa fue más frecuente en pacientes con el genotipo *GSTT1* nulo que en los pacientes con el genotipo *GSTT1 presente*. Los pacientes con el genotipo *BLMH A/G* experimentaron más toxicidad hematológica grado 3-4 y leucopenia grado 3-4 que los pacientes con el genotipo *BLMH G/G*.
5. Se logró establecer un modelo poblacional de la farmacocinética de cisplatino en pacientes chilenos con cáncer testicular.
6. No se encontró asociación entre los parámetros farmacocinéticos y el genotipo *GSTM1*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. ALBERS P, SIENER R, KREGE S, SCHMELZ HU, DIECKMANN KP, HEIDENREICH A, KWASNY P, PECHOEL M, LEHMANN J, KLIESCH S, KÖHRMANN KU, FIMMERS R, WEISSBACH L, LOY V, WITTEKIND C, HARTMANN M; German Testicular Cancer Study Group. Randomized phase III trial comparing retroperitoneal lymph node dissection with one course of bleomycin and etoposide plus cisplatin chemotherapy in the adjuvant treatment of clinical stage I Nonseminomatous testicular germ cell tumors: AUO trial AH 01/94 by the German Testicular Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 20;26 (18):2966-72.
2. ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL (AMM). Declaración de Helsinki, realizada por la asociación médica del mundo, principios éticos que involucran las investigaciones médicas en seres humanos. 59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008. [en línea] < <http://www.wma.net/es/30publications/10policias/b3/> > [consulta: 18 Agosto 2013].
3. BARAHMANI N, CARPENTIERI S, LI XN, WANG T, CAO Y, HOWE L, KILBURN L, CHINTAGUMPALA M, LAU C, OKCU MF. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms may predict adverse effects after therapy in children with medulloblastoma. *Neuro Oncol*. 2009 Jun;11(3):292-300.
4. BONETTI A, FRANCESCHI T, APOSTOLI P, CETTO GL, RECALDIN E, MOLINO A, LEONE R. Cisplatin pharmacokinetics in elderly patients. *Ther Drug Monit*. 1994 Oct;16(5):477-82.
5. BRUNTON L., PARKER K., BLUMENTHAL D., BUXTON I. Goodman and Gilman's manual of pharmacology and therapeutics, McGraw-hill, 1° ed. mcgraw-hill. 2008, pp 889-892.
6. CÁCERES D, ITURRIETA J, ACEVEDO C, HUIDOBRO C, VARELA N, ESCALA M, QUIÑONES L. Gene-gene and gene environment

interactions as modifier factors of prostatic cancer risk: «a case-only» design study. *Rev Méd Chil* 2004; 132: 961-70.

7. CHEN J, STUBBE J. Bleomycins: towards better therapeutics *Nat Rev Cancer*. 2005 Feb;5(2):102-12.
8. CHO HJ, EOM HS, KIM HJ, KIM IS, LEE GW, KONG SY. Glutathione-S-transferase genotypes influence the risk of chemotherapy-related toxicities and prognosis in Korean patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 Apr 1;198 (1):40-6.
9. CULINE S, KERBRAT P, KRAMAR A, THÉODORE C, CHEVREAU C, GEOFFROIS L, BUI NB, PÉNY J, CATY A, DELVA R, BIRON P, FIZAZI K, BOUZY J, DROZ JP; Genito-Urinary Group of the French Federation of Cancer Center (GETUG T93BP). Refining the optimal chemotherapy regimen for good-risk metastatic nonseminomatous germ-cell tumors: a randomized trial of the Genito-Urinary Group of the French Federation of Cancer Centers (GETUG T93BP). *Ann Oncol*. 2007 May;18(5):917-24. Epub 2007 Mar 9.
10. DE HAAS EC, ZWART N, MEIJER C, ET AL. Variation in bleomycin hydrolase gene is associated with reduced survival after chemotherapy for testicular germ cell cancer. *J Clin Oncol*. 2008, 26(11):1817–1823.
11. EKHART C., RODENHUIS S., SMITS P., BEIJNEN J., HUITEMA A. An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment. *Cancer Treatment Reviews* (2009) 35, 18– 31.
12. ELHASID R, KRIVOY N, ROWE JM, SPRECHER E, ADLER L, ELKIN H, EFRATI E. Influence of glutathione S-transferase A1, P1, M1, T1 polymorphisms on oral busulfan pharmacokinetics in children with congenital hemoglobinopathies undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 Dec 1;55(6):1172-9.
13. EMA (European medicines agency), Guideline on reporting the results of population pharmacokinetic analyses, 2007.

14. EMA (European medicines agency), Guideline on the use of pharmacogenetic methodologies in the pharmacokinetic evaluation of medicinal products, 2010.
15. EVANS WE, MCLEOD HL. Pharmacogenomics Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects, *New England Journal of Medicine* 2003, 348(6):538-549.
16. FDA (Food and drug administration), Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2001.
17. FDA (Food and drug administration), Guidance for Industry Population Pharmacokinetics, 1999.FDA, Guideline for industry Bioanalytical method validation, 2011.
18. FILIPSKI KK, MATHIJSEN RH, MIKKELSEN TS, SCHINKEL AH, SPARREBOOM A. Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Clin Pharmacol Ther.* 2009 Oct;86(4):396-402. doi: 10.1038/clpt.2009.139. Epub 2009 Jul 22.GOLDSTEIN DB, Pharmacogenetics goes genomic, *Nat Rev Genet.* 2003, 4(12):937-947.
19. HUANG RS, RATAIN MJ. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of anticancer agents, *CA Cancer J Clin* 2009, 59(1):42-55.
20. JOERGER M, BURGERS JA, BAAS P, DOODEMAN VD, SMITS PH, JANSEN RS, VAINCHTEIN LD, ROSING H, HUIITEMA AD, BEIJNEN JH, SCHELLENS JH. Gene polymorphisms, pharmacokinetics, and hematological toxicity in advanced non-small-cell lung cancer patients receiving cisplatin/gemcitabine. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012 Jan;69(1):25-33.
21. KALANT H, W.H.E. ROSCHLAU, Principles of Medical Pharmacology, pp. 782 part IX, Elsevier Health Sciences, 7° ed. 2006.
22. KHRUNIN AV, MOISSEEV A, GORBUNOVA V, LIMBORSKA S. Genetic polymorphisms and the efficacy and toxicity of cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients. *Pharmacogenomics J.* 2010 Feb;10(1):54-61.

23. MINISTERIO DE SALUD, GOBIERNO DE CHILE (MINSAL). Protocolos cáncer del adulto ministerio de salud 2009-2010, Cáncer testicular y tumores germinales Extragonadales. [en línea] <<http://www.minsal.cl/portal/url/item/7220fdc4340044a9e04001011f0113b9.pdf>> [consulta: 18 Agosto 2013].
24. NATIONAL INSTITUTE OF CANCER, USA. [en línea] <http://www.acrin.org/Portals/0/Administration/Regulatory/CTCAE_4.02_2009-09-15_QuickReference_5x7.pdf> [consulta: 18 Agosto de 2013].
25. NITISS JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2009 May;9(5):338-50. doi: 10.1038/nrc2607. Epub 2009 Apr 20.
26. NUVER J, LUTKE HOLZIK MF, VAN ZWEEDEN M, HOEKSTRA HJ, MEIJER C, SUURMEIJER AJ, GROEN HJ, HOFSTRA RM, SLUITER WJ, GROEN H, SLEIJFER DT, GIETEMA JA. Genetic variation in the bleomycin hydrolase gene and bleomycin-induced pulmonary toxicity in germ cell cancer patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2005 Jun;15(6):399-405.
27. OLDENBURG J (a), KRAGGERUD SM, CVANCAROVA M, LOTHE RA, FOSSA SD. Cisplatin-induced long-term hearing impairment is associated with specific glutathione s-transferase genotypes in testicular cancer survivors. *J Clin Oncol*. 2007, 25(6):708-714.
28. OLDENBURG J (b), KRAGGERUD SM, BRYDØY M, CVANCAROVA M, LOTHE RA, FOSSA SD. Association between long-term neurotoxicities in testicular cancer survivors and polymorphisms in glutathione-s-transferase-P1 and -M1, a retrospective cross sectional study. *J Transl Med*. 2007 , 27: 5:70.
29. PETROS WP, HOPKINS PJ, SPRUILL S, BROADWATER G, VREDENBURGH JJ, COLVIN OM, PETERS WP, JONES RB, HALL J, MARKS JR. Associations between drug metabolism genotype,

chemotherapy pharmacokinetics, and overall survival in patients with breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005, 23(25):6117-6125.

30. PIRMOHAMED M. Pharmacogenetics: past, present and future, *Drug discovery today*, Vol 16, N 19/29, Oct 2011.
31. QUIÑONES L, LEE K, VARELA F N, ESCALA M, GARCÍA K, GODOY L, CASTRO A, SOTO J, SAAVEDRA I, CÁCERES D. Cancer pharmacogenetics: study of genetically determined variations on cancer susceptibility due to xenobiotic exposure. *Rev Med Chil.* 2006,134(4):499-515.
32. RAMÓN-LÓPEZ A, ESCUDERO-ORTIZ V, CARBONELL V, PÉREZ-RUIXO JJ, VALENZUELA B. Population pharmacokinetics applied to optimising cisplatin doses in cancer patients. *Farm Hosp.* 2012 Sep-Oct;36(5):392-402. doi: 10.1016/j.farma.2011.08.004. Epub 2012 Mar 7.
33. RELLING MV, DERVIEUX T. Pharmacogenetics and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2001, 1(2):99-108.
34. RIMMER Y, CHESTER J, JOFFE J, STARK D, SHAMASH J, POWLES T, WHITE J, WASON J, PARASHAR D, ARMSTRONG G, MAZHAR D, WILLIAMS MV. Accelerated BEP: a phase I trial of dose-dense BEP for intermediate and poor prognosis metastatic germ cell tumour. *Br J Cancer.* 2011 Sep 6;105(6):766-72.
35. ROCO A, QUIÑONES L, AGÜNDEZ JA, GARCÍA-MARTÍN E, SQUICCIARINI V, MIRANDA C, GARAY J, FARFÁN N, SAAVEDRA I, CÁCERES D, IBARRA C, VARELA N. Frequencies of 23 functionally significant variant alleles related with metabolism of antineoplastic drugs in the chilean population: comparison with caucasian and asian populations. *Front Genet.* 2012;3:229.
36. ROMERO A., MARTÍN M., OLIVA B., DE LA TORRE J., FURIO V., DE LA HOYA M., J. A. GARCÍA-SÁENZ, A. MORENO, J. M. ROMÁN, E. DIAZ-RUBIO & T. Caldés. Glutathione S-transferase P1 c.313A > G

polymorphism could be useful in the prediction of doxorubicin response in breast cancer patients, *Ann Oncol.* 2012 Jul;23(7):1750-6.

37. SIDDIK ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003, 22(47):7265-7279.
38. STRANGE RC, JONES PW, FRYER AA. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett.* 2000 Mar 15;112-113:357-63.
39. URIEN S, LOKIEC F. Population pharmacokinetics of total and unbound plasma cisplatin in adult patients. *Br J Clin Pharmacol*, 2004 Jun;57(6):756-63. .
40. WALKO CM, MCLEOD H., Pharmacogenomic progress in individualized dosing of key drugs for cancer patients, *Nature clinical practice oncology*, 2009, 6(3):153-162.
41. WANG L, MCLEOD HL, WEINSHILBOUM RM. Genomics and drug response, Review article, *The New England Journal Of Medicine* 2011, 364(12):1144-1153.
42. WEINSHILBOUM R. Inheritance and Drug Response. *The New England Journal of Medicine* 2003, 348(6):529-537.
43. ZANDVLIET AS, SIEGEL-LAKHAI WS, BEIJNEN JH, COPALU W, ETIENNE-GRIMALDI MC, MILANO G, SCHELLENS JH, HUITEMA AD. PK/PD model of indisulam and capecitabine: interaction causes excessive myelosuppression. *Clin Pharmacol Ther.* 2008 Jun;83(6):829-39.
44. ZHUO X, ZHENG N, FELIX CA, BLAIR IA. Kinetics and regulation of cytochrome P450-mediated etoposide metabolism. *Drug Metab Dispos.* 2004 Sep;32(9):993-1000.

X. MATERIAL ANEXO

Anexo N°1. Metodología empleada para determinación de variantes genéticas en *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP3A4*, *BLMH*.

***CYP1A1*2A* y *GSTM1*(-)**

El ADN aislado desde sangre periférica fue amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basado en la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), utilizando partidores específicos para la amplificación de los genes *CYP1A1* y *GSTM1*, en duplicado. La amplificación del gen *CYP1A1* fue llevada a cabo utilizando los partidores reverse C47: 5' CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT 3' (*Msp1-1*) y forward C44: 5' TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT 3' (*Msp1-2*) que amplifican fragmentos de 340 pb en el extremo 3' no codificante del gen en la zona de poliadenilación. Para la amplificación de gen *GSTM1* se utilizaron las secuencias de partidores 5' CTGCCCCACTTGATTGATGGG 3' (*GSTM1-1*) y 5' CTGGATTGTAGCAGATCATGC 3' (*GSTM1-2*) que reconocen e hibridan en la región codificante del gen y amplifican fragmentos de 273 pb, la presencia del genotipo nulo [*GSTM1* (-)] fue determinada por la ausencia de dicho fragmento. Ambos genes fueron amplificados simultáneamente debido a que sus partidores presentan temperaturas de alineamiento similares y se utilizaron como control interno los partidores *Msp1* con la amplificación del gen *CYP1A1* (Quiñones *et al.*, 2001). La PCR tiene lugar en un volumen final de 25µL (5µL de ADN más una solución de reacción con las siguientes concentraciones finales: 200mM Tris-HCl, pH 8,4; 500mM KCl; 3Mm MgCl₂; 0,8 µM dNTPs y 0,6 µM de cada primer. El programa de PCR consta de una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos, cada uno compuesto de tres fases: de desnaturalización a 94 °C por 60 segundos, alineamiento a 64 °C por 50 segundos y de extensión a 72 °C por 50 segundos. Por último una extensión final a 72 °C por 7 minutos. Finalmente el ADN amplificado fue sometido a electroforesis a 90 volts por 45 minutos en gel de agarosa al 2%.

***GSTT1*(-)**

El ADN aislado de linfocitos periféricos se amplificó en duplicado utilizando oligonucleótidos partidores específicos del gen *GSTT1* y para el control de amplificación β-globina (Elexpuru-Camiruaga *et al.*, 1995). Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron los partidores *GSTT1-1*: 5'TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3'; *GSTT1-2*: 5'TCACCGGATCATGGCCAG CA3' y β-globina 1: 5'CAACTTCATCCACGTTACC 3'; β-globina 2: 5'GAAGAGCCAAGGACAGTTAC 3', produciendo amplicones de 459 pb para *GSTT1* y de 268 pb para β-globina. La PCR se realizó en un volumen de 25µL (200mM Tris-HCl pH 8,4; 500mM KCl; 3Mm MgCl₂; 0,8 µM dNTPs y 0,6 µM de cada primer y 5µL de ADN). El protocolo de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C por 1 minuto, seguido por 34 ciclos, cada uno compuesto de tres fases: de desnaturalización a 94 °C por 1 minutos, alineamiento a 62 °C por 50 segundos y de extensión a 72 °C por 1 minuto. Por último un ciclo final a 72 °C por 7 minutos.

Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1,2%, el genotipo silvestre muestra una banda a 459 pb y la mutante *GSTT1* (-) o *GSTT1 nulo* no presenta banda a 459 pb. Como control de amplificación se utilizó el gen de la β -globina que presenta una banda a 268 pb.

CYP3A4*1B

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en duplicado se utilizaron los partidores forward (5'-GGAATGAGGACAGCCATAGAGACAAGGGGA-3') y reverse (5'-CCTTTCAGCTCTGTGTTGCTCTTTGCTG-3') que amplifican la región promotora 5' del gen humano CYP3A4 (nucleótidos -318 a +67) produciendo un amplicón de 385 pares de bases (pb) de longitud que contiene sitios de corte polimórfico (posición 41) y constitutivo (posición 210) para la enzima de restricción *MbolI*. La PCR tiene lugar en un volumen final de 25 μ L (1,5 μ L de ADN más una solución de reacción con las siguientes concentraciones finales: 200Mm Tris-HCl pH 8,4; 500Mm KCl; 6Mm MgCl₂; 4Mm dNTPs y 0,01Mm de cada primer). El programa de PCR consta de una desnaturalización inicial a 95 °C por 10 minutos, seguido por 30 ciclos, cada uno compuesto de tres fases: de desnaturalización a 95 °C por 60 segundos, alineamiento a 63 °C por 60 segundos y de extensión a 72 °C por 60 segundos. Por último una extensión final a 72 °C por 7 minutos. El amplicón obtenido se somete a digestión durante 1,5 horas con 5U de la enzima *MbolI* en una mezcla con 5 μ L de producto de PCR. Los fragmentos de restricción fueron analizados por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 16%. Los patrones de digestión obtenidos para los voluntarios homocigotos para el tipo silvestre o wild type (*1/*1) son dos fragmentos de 175pb y 169pb; para los voluntarios homocigotos recesivos del polimorfismo (*1B/*1B), dos fragmentos de 210pb y 175 pb y para el genotipo heterocigoto (*1/*1B), tres fragmentos de 210pb, 175pb y 169 pb.

BLEOMICINA HIDROLASA (A1450G)

En la PCR en duplicado se utilizaron los siguientes partidores reverse 5' GCT GTG TTA GAG CAG GAA CCC AAT 3' y forward: 5' CCT GGA TCT GTC CTT TGC AGC TAC G 3' que amplifican un fragmento de 130 pb. La PCR se realizó en un volumen de 25 μ L (5 μ L de ADN más una solución de reacción con las siguientes concentraciones finales: 200mM Tris-HCl pH 8,4; 500mM KCl; 3Mm MgCl₂; 0,8 μ M dNTPs y 0,6 μ M de cada primer). El protocolo de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos, cada uno compuesto de tres fases: de desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, alineamiento a 64 °C por 30 segundos y de extensión a 72 °C por 90 segundos. Por último un ciclo final a 72 °C por 5 minutos. Luego, el amplicón se digirió por 3 horas con la enzima de restricción *Mun I*, observándose las siguientes variantes alélicas a través del análisis de fragmentos de restricción por electroforesis en geles de poliacrilamida (18%), homocigoto silvestre (A/A) una banda a 130 pb, heterocigoto (A/G): tres bandas a 130, 106 y 24 pb, y homocigoto para el mutado (G/G): bandas a 106 y 24 pb.