



Universidad de Chile
Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas

VARIANTES GENÉTICAS EN PROTEINAS RELACIONADAS CON LA
FARMACOCINÉTICA DE ETOPÓSIDO Y SU INFLUENCIA EN LA RESPUESTA
TERAPÉUTICA DE PACIENTES CON CÁNCER TESTICULAR.

Memoria para optar al título de Químico-Farmacéutico
CÉSAR CELEDÓN AGUILERA

Directores de Tesis:

Dr. Luis A. Quiñones S., Laboratorio CQF, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Dr. Dante Cáceres L., Escuela de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Profesor Patrocinante:

Dra. María Nella Gai, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

2015

Agradecimientos

A Dios.

Al pensar en escribir esto la primera persona que se me vino a la mente...así como por instinto, es la imagen de un Ingeniero eléctrico que se forjó en la Chile, mi hermano, que no sé cómo agradecerle su presencia y tantos momentos que nunca olvidaré.

A mis padres que me brindaron todas las condiciones y apoyo para conseguir mis metas

Al profe Luis Quiñones por la paciencia depositada en mí, por su excelente calidad de persona y la oportunidad que me brindó.

A JP por ayudarme sin que fuera su obligación, por la buena onda que pone en el laboratorio y su compromiso con el trabajo.

Índice

Agradecimientos	2
Índice de ilustraciones	5
Índice de tablas.....	6
Abreviaturas	7
Resumen	8
1 Introducción.....	12
2 Marco teórico.....	13
2.1 Tratamiento del cáncer testicular	16
2.1.1 Seminoma	16
2.1.2 No Seminoma (NS).....	17
2.2 Quimioterapia	18
2.3 Etopósido	18
2.4 CYP 3A4 y CYP3A5	21
2.5 UGT1A1	22
2.6 Proteína de Resistencia Múltiple a Drogas (MDR1 o ABCB1)	22
2.7 MRP-3 (ABCC3).....	23
3 Hipótesis.....	24
4 Objetivo general.....	24
4.1 Objetivos específicos.....	25
5 Materiales y Métodos.....	26
5.1 Materiales.....	26
5.2 Pacientes.....	26
Criterios de Inclusión:	26
Criterios de exclusión:.....	26
5.3 Aspectos Éticos	27
5.4 Extracción del ADN.....	27
5.5 Genotipificación de MDR1 3435 C>T.....	27
5.6 Genotipificación de MDR1 1236 C>T.....	28
5.7 Genotipificación de CYP3A4*1B, CYP3A5*3 y ABCC3 -211C/T	29
5.8 Genotipificación de UGT1A1*28	30
5.9 Evaluación de la Respuesta Clínica.....	34
5.10 Marcadores tumorales	35
5.11 Plan de Análisis Bioestadístico	35

6	Resultados.....	38
6.1	Genotipos y frecuencias alélicas de UGT1A1*28, MDR1 3435, CYP3A4*1B, CYP3A5*3 en población general	38
6.1.1	Determinación de frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo UGT1A1*28 en la población de estudio.	38
6.1.2	Determinación de frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos MDR1 3435, CYP3A4*1B y CYP3A5*3 en la población de estudio.....	39
6.2	Respuesta terapéutica (eficacia y toxicidad) en pacientes con cáncer testicular (CaT) sometidos a terapia EP (Etopósido + Cisplatino).....	41
6.2.1	Población en estudio	41
6.2.2	Evaluación de la Eficacia terapéutica	41
6.2.3	Evaluación de la Toxicidad	43
6.2.4	Relación efectos adversos según el grado y los genotipos	45
6.3	Terapia EP vs PEB	58
7	Discusión	60
8	Conclusiones	68
9	Referencias Bibliográficas	70
10	ANEXOS	76
10.1	ANEXO N°1, APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA	76
10.2	ANEXO N°2, CONSENTIMIENTO INFORMADO	77
10.3	ANEXO N°3, FORMULARIO DE REPORTE DE CASO.....	80

Índice de ilustraciones

ILUSTRACIÓN 1. ALGORITMO DE TRATAMIENTO PARA CÁNCER TESTICULAR DE TIPO NO SEMINOMA.....	14
ILUSTRACIÓN 2. ALGORITMO DE TRATAMIENTO PARA CÁNCER TESTICULAR DE TIPO SEMINOMA.	15
ILUSTRACIÓN 3. ESTADÍOS II Y III, ENFERMEDAD AVANZADA, TRATAMIENTO A SEGUIR.....	17
ILUSTRACIÓN 4. VÍAS METABÓLICAS DE ETOPÓSIDO.	20
ILUSTRACIÓN 5. PATRÓN DE CORTE, POLIMORFISMO MDR1 3435.	28
ILUSTRACIÓN 6. PATRÓN DE CORTE, POLIMORFISMO MDR1 1236.	28
ILUSTRACIÓN 7. EJEMPLO DE CURVAS OBTENIDAS POR PCR TIEMPO REAL PARA ANÁLISIS GENOTÍPICO CON SONDAS TAQMAN.....	29
ILUSTRACIÓN 9. CURVA PARA 10 MICROLITROS POR POCILLO PARA UGT1A1*28.....	31
ILUSTRACIÓN 10. CURVA PARA 7,35 MICROLITROS POR POCILLO PARA UGT1A1*28.....	32

Índice de tablas

TABLA 1. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA PARA CÁNCER TESTICULAR SEGÚN DIXON Y MOORE. .	13
TABLA 2. ESTANDARIZACION DE PCR-RT PARA UGT1A1*28.	31
TABLA 3. COMPARACIÓN TÉCNICA PCR-SSCP Y TIEMPO REAL.....	33
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DEL GRUPO EN ESTUDIO POBLACIÓN GENERAL (VOLUNTARIOS SANOS).	38
TABLA 5. FRECUENCIAS GENOTÍPICA Y ALÉLICA PARA UGT1A1*28 EN POBLACIÓN ESTUDIO...	38
TABLA 6. TEST DE CHI-CUADRADO PARA EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG, VOLUNTARIOS SANOS UGT1A1*28.	39
TABLA 7. FRECUENCIA GENOTÍPICA DE LOS VOLUNTARIOS SANOS ANALIZADOS PARA LOS POLIMORFISMOS MDR1 3435, CYP3A4*1B Y CYP3A5*3.	40
TABLA 8. FRECUENCIA ALÉLICA DE LOS VOLUNTARIOS SANOS ANALIZADOS PARA LOS POLIMORFISMOS MDR1 3435, CYP3A4*1B Y CYP3A5*3.	40
TABLA 12. REACCIONES ADVERSAS SEGÚN EL GRADO, ESQUEMA EP.....	44
TABLA 13. REACCIONES ADVERSAS SEGÚN PRESENCIA O AUSENCIA DEL EFECTO, ESQUEMA EP.	55
TABLA 14. COMPARACIÓN TOXICIDAD ESQUEMA EP Y PEB.	58
TABLA 15. DOSIS PROMEDIO ADMINISTRADA POR CICLO PARA CADA ESQUEMA QUIMIOTERAPÉUTICO.	59
TABLA 9. FRECUENCIAS ALÉLICAS PARA MDR1 3435, CYP3A4*1B Y CYP3A5*3.	62
TABLA 10. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS PARA MDR1 3435, CYP3A4*1B Y CYP3A5*3.	62

Abreviaturas

AAQ	Agentes anticancerígenos quimioterápicos
ABCC	Gen de proteínas de resistencia a múltiples drogas.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AFP	Alfafetoproteína.
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer.</i>
B-HCG	Hormona gonadotrofina coriónica subunidad beta.
CaT	Cáncer testicular.
CEEC	Comité de ética.
Ct	Ciclo umbral.
CTCAE	<i>Common Terminology Criteria for Adverse Events.</i>
CYP-450	Citocromo P – 450.
DHL	Lactado deshidrogenasa.
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato.
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group.</i>
EORTC	Organización europea para investigación y tratamiento del cáncer.
EP	Etopósido-Cisplatino.
GCP	Buenas prácticas clínicas.
GES	Garantías explícitas en salud.
IGCCC	<i>International Germ Cell Cancer Consensus Classification.</i>
LALA	Linfadenectomía lumboaórtica laparoscópica.
MDR	Gen de resistencia a múltiples drogas.
MSKCC	<i>Memorial Sloan Kettering Cancer Center</i>
NS	No seminoma.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PEB	Bleomicina-Etopósido-Cisplatino.
P-gp	Glicoproteína P.
RAM	Reacción adversa a medicamento.
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.
SCCP	Polimorfismos de conformación de cadena simple.
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple.
SSMN	Servicio de salud metropolitano norte.
TC	Tomografía computarizada.
TCG	Tumor de células germinales.
TCGNS	Tumor de células germinales no seminomatosas.
UGT1A1	UDP-glucuronil transferasa 1A1
UICC	<i>Union for International Cancer Control.</i>
VIP	Vinblastina, ifosfamida, cisplatino.
Wt	Wild type.

Resumen

Variantes genéticas en proteínas relacionadas con la farmacocinética de etopósido y su influencia en la respuesta terapéutica de pacientes con cáncer testicular

A pesar que se sabe de la existencia de importantes diferencias interindividuales en la respuesta a la mayoría de los medicamentos que se utilizan en terapéutica humana, y que justifica los distintos esquemas posológicos utilizados en diferentes poblaciones de pacientes, todavía no es posible conocer completamente sus causas. Respecto a estas diferencias interindividuales se sabe que aproximadamente el 99,9% de la secuencia del ADN de dos individuos diferentes es la misma y que una proporción significativa de las diferencias encontradas en los individuos, es decir, sus diferencias fenotípicas y/o susceptibilidades a ciertas enfermedades, radica en el 0,1% de variación; a este tipo de variaciones genéticas se les conoce como polimorfismos genéticos, los cuales representan diferentes formas en las secuencias de ADN.

En el presente trabajo se analizaron seis polimorfismos de los cuales uno no fue posible llevar a cabo, de estos cinco polimorfismos restantes, se estudió la frecuencia de UGT1A1*28 (uno de los cinco mencionados) en un sub-grupo de la población general chilena, y los mismos cinco polimorfismos anteriores se analizaron en 15 pacientes con cáncer testicular que fueron tratados con el esquema Etopósido y Cisplatino (EP), mediante PCR-RFLP, SSCP y tiempo real. Los genotipos fueron estudiados en relación a toxicidad y efectividad en los pacientes con objeto de evaluar la respuesta terapéutica a la quimioterapia. Junto a esto, se analizó el perfil de toxicidad del esquema específico EP y se evaluó la existencia de relación entre genotipo y reacción adversa mediante chi-cuadrado. Finalmente, se realizó una comparación de toxicidad entre los esquemas EP y PEB (Etopósido, Cisplatino y Bleomicina) que corresponden a quince y diecinueve pacientes respectivamente.

El estudio fue realizado considerando todas las normativas éticas y clínicas aplicables, incluyendo las Buenas Prácticas Clínicas, la Ley de deberes y derechos de los pacientes y la Declaración de Helsinki. De acuerdo a lo anterior, los voluntarios de la población general y los pacientes debieron firmar un consentimiento informado de acuerdo al protocolo aprobado por los comités de ética del Servicio de Salud Metropolitano Norte (SSMN) y de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Los resultados mostraron que la población chilena posee semejanza a la población española o alemana en cuanto a frecuencias para el alelo (TA)₇ (31%) y (TA)₆ (68,9%). Estos valores son considerablemente diferentes comparado con población asiática.

En cuanto a la eficacia del tratamiento, todos los pacientes presentaron buena respuesta al tratamiento, a excepción de tres casos con DHL alta y uno con β -HCG alta en que costó llegar a valores clínicamente aceptables. Sólo un paciente presentó recidivas, diagnosticado con seminoma clásico, y que había sido sometido a cuatro ciclos de quimioterapia con buena respuesta y marcadores tumorales dentro de rangos normales, para el que finalmente se decidió realizar cuatro ciclos de cisplatino, vinblastina e ifosfamida.

La toxicidad del tratamiento Etopósido y Cisplatino (EP) mostró que las reacciones adversas (RAMs) más frecuentes fueron los vómitos, náuseas, neutropenia y anemia. Estas últimas dos RAMs junto con la leucopenia, linfocitopenia, trombocitopenia y toxicidad hematológica dejan de manifiesto a las reacciones de tipo hematológicas como las de mayor consideración tanto en frecuencia como en gravedad. En este respecto se encontró que el grado de náusea que puede presentar un paciente se relaciona con el genotipo presente para el alelo MDR1 3435.

Finalmente en la comparación del esquema EP vs PEB se observó que el esquema EP resulta ser más propenso a producir diarrea, cefalea, alopecia y reacciones dermatológicas que el esquema PEB. Por otra parte, el esquema EP presentó menor ocurrencia de efectos adversos tales como anemia, leucopenia, linfocitopenia, neutropenia, neutropenia febril, neurotoxicidad y trombocitopenia que el esquema PEB.

En conclusión se observó que no existe asociación estadísticamente significativa entre el grado de las reacciones adversas analizadas y los polimorfismos CYP3A4*1B, CY3A5*3, UGT1A1*28 y MDR1 3435, a excepción de náuseas que se observó se encontraron asociadas con MDR1 3435. Este estudio resulta una investigación preliminar para establecer la necesidad de aumentar el número de pacientes analizados para estudios futuros con el fin de apreciar relaciones que pudieran haber sido más sutiles.

Summary

Genetic variants in related proteins with etoposide pharmacokinetics and its influence in therapeutic response to patients with testicular cancer.

Despite to know the existence of important interindividual differences, in response to the drugs used in human therapeutic, the ones that justify different posologic schemes used in different patients, it is not yet possible to completely understand the causes of this. Regarding these interindividual differences, it is know that about 99,9% of the DNA sequence of two different individuals; a significant proportion of the found differences come from phenotype and/or susceptibilities to certain diseases. This variation lies in 0, 1%, known as genetic polymorphisms, which represents different shapes in the DNA sequence.

In this investigation, there were six polymorphisms analyzed, one of them was not possible to carry out. From the remaining five polymorphisms, the frequency of UGT1A1 * 28 was analyzed in a sub-group of the Chilean population. These five polymorphisms were analyzed in 15 patients with testicular cancer, who were treated with etoposide and cisplatin scheme (EP), using PCR-RFLP, SSCP in real time. The genotypes were studied in relation to toxicity and effectiveness in patients in order to assess the therapeutic response to chemotherapy. Alongside this, the toxicity profile of the specific scheme EP is analyzed and the existence of relationship between genotype and adverse reaction was assessed using chi-square. Finally, a comparison of toxicity between EP and PEB schemes (etoposide, cisplatin and bleomycin) corresponding to fifteen and nineteen patients was performed, respectively.

The study was conducted considering all applicable ethical standards and clinics, including Good Clinical Practices, the duties and rights of patients and the Declaration of Helsinki. In relation to the last, the volunteers from the general population and patients had to sign a consent form approved by the ethical committee from the North Metropolitan Health Service (SSMN) and the Medicine Faculty, University of Chile.

The results showed that the Chilean population has resemblance to Spanish or German population regarding frequencies for allele (TA) 7 (31%) and (TA) 6 (68.9%). These values are significantly different compared to Asian population.

As for the effectiveness of treatment, all patients had good response to treatment, except for three cases with high DHL and one high β -HCG in which cost reach clinically acceptable values. Only one patient had recurrences diagnosed with classic seminoma, and had been subjected to four cycles of chemotherapy with good response and tumor markers within

normal ranges, for which finally decided to four cycles of cisplatin, vinblastine and ifosfamide.

Treatment toxicity Etoposide and Cisplatin (EP) showed that the most common adverse reactions (ADRs) were: vomiting, nausea, neutropenia and anemia. These last two RAMs with leukopenia, lymphocytopenia, thrombocytopenia and hematologic toxicity leave apparent hematological reactions, such as further consideration both in frequency and severity. In this regard, it was found that the degree of nausea that a patient may present is related to the present MDR1 genotype for the 3435 allele.

Finally, in comparison to EP scheme PEB it was observed that EP scheme is more likely to produce: diarrhea, headache, alopecia and skin reactions scheme PEB. Moreover, the EP scheme had lower occurrence of adverse effects such as anemia, leukopenia, lymphopenia, neutropenia, febrile neutropenia, thrombocytopenia, neurotoxicity that scheme PEB.

In conclusion, it was found that there is no statistically significant association between the degree of adverse reactions analyzed and CYP3A4 * 1B, CY3A5 * 3, UGT1A1 * 28 and MDR1 3435 polymorphisms, except for nausea which was observed were found associated with MDR1 3435. This study is a preliminary investigation to establish the need to increase the number of patients analyzed for future studies in order to assess relationships that may have been more subtle.

1 Introducción

El cáncer testicular es una de las neoplasias sólidas curables con mayor morbilidad en pacientes jóvenes laboralmente activos y por ende, constituye un importante problema de Salud Pública. En Chile, esta patología se encuentra actualmente cubierta por el programa de Garantías Explícitas en Salud (GES), del Ministerio de Salud (Ministerio de salud, 2010).

Los intentos por mejorar la supervivencia en esta patología son resultado de la combinación de técnicas de diagnóstico eficaces, buenos marcadores tumorales, regímenes quimio-terapéuticos con multidrogas y modificaciones en la técnica quirúrgica que han conducido a una disminución de la mortalidad de más del 50% antes de 1970 a menos de 5% en 1997 (Schwaner *et al.*, 2005).

Dentro del objetivo por disminuir esta mortalidad se ha investigado con el fin de controlar las dosis quimioterapéuticas según requisitos individuales, es decir, a controlar la eficacia terapéutica y la posible toxicidad de los medicamentos. Para ello se decidió en el presente trabajo abordar este análisis desde el punto de vista de la farmacogenómica con el fin de caracterizar polimorfismos de determinados genes y correlacionarlos con los resultados del tratamiento para así predecir la respuesta terapéutica.

Como herramienta molecular de análisis para esta investigación las técnicas se utilizaron basadas en la reacción en cadena de la polimerasa con el objetivo de caracterizar los polimorfismos ABCC3-211C>T, CYP3A4*1B, CYP3A5*3, MDR13435, MDR1236 y UGT1A1*28 en casos (pacientes con quimioterapia Etopósido y Cisplatino) y controles. Junto con esto, se realizó la revisión de fichas clínicas para obtener el registro de toxicidad a la terapia y compararlo con el perfil genético obtenido del grupo respectivo.

Por otra parte, y para conseguir el objetivo anterior se realizó adicionalmente la determinación de frecuencia genotípica y alélica para el polimorfismo UGT1A1*28 en población chilena, no realizada hasta entonces para esta misma.

2 Marco teórico

En Chile el cáncer testicular afecta con mayor frecuencia a hombres entre los 15 y 35 años (Feldman, Bosl, Sheinfeld, & Motzer, 2008; Jemal *et al.*, 2007.) con una tasa de incidencia de 7,9 por cien mil varones con variaciones geográficas significativas y su frecuencia de mortalidad es el triple que en el resto del mundo.

Tabla 1. Clasificación histológica para cáncer testicular según Dixon y Moore.

I Seminoma	30-40% de los casos
II Carcinoma Embrionario	
III Teratoma, adulto	50-60% de todos los casos (no seminoma)
IV Tumor del saco Vitelino	
VI Mixto	

Fuente: Guía clínica Cáncer de Testículo en personas de 15 años y más, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile 2010.

Más del 90% de los tumores cancerosos de testículo se presentan en células especiales llamadas células germinales, las cuales producen los espermatozoides. Los dos tipos principales de tumores de las células germinales en los hombres son:

- Seminomas
- No seminomas

Estos dos tipos ocurren aproximadamente en una frecuencia similar. Muchos cánceres de testículo contienen células no seminomas y células seminomas. Estos tumores con células germinales mixtas se tratan como no seminomas debido a que crecen y se propagan como tales (American Cancer Society, 2015).

A modo general, el cáncer testicular usualmente se encuentra cuando una persona presenta síntomas (hinchazón del testículo, irritación o crecimiento de los senos, pubertad temprana en varones). También, puede descubrirse como resultado de pruebas que se realizan debido a otra afección. A menudo, el siguiente paso consiste en el examen físico y derivación al urólogo en caso de sospecha fundada (Ministerio de Salud, 2010). Posteriormente, el especialista procede a la confirmación diagnóstica, para la cual se toman exámenes de marcadores tumorales (lactato deshidrogenasa, alfafetoproteínas, hormona gonadotrofina coriónica subunidad β), en caso necesario, ecotomografía testicular y/u otras ecotomografías. Si el resultado de esos exámenes es positivo se procede a intervención

quirúrgica (orquiectomía radical, linfadenectomía lumboaórtica, resección quirúrgica según localización), luego se realiza histología positiva para tumor germinal gonadal o extragonadal para completar etapificación y derivar a centro autorizado para tratamiento con quimioterapia. (Ministerio de Salud, 2010)

A continuación, en las ilustraciones 1 y 2, se presentan los algoritmos de tratamiento de cáncer testicular para seminoma y no seminoma post-intervención quirúrgica en ambos casos.

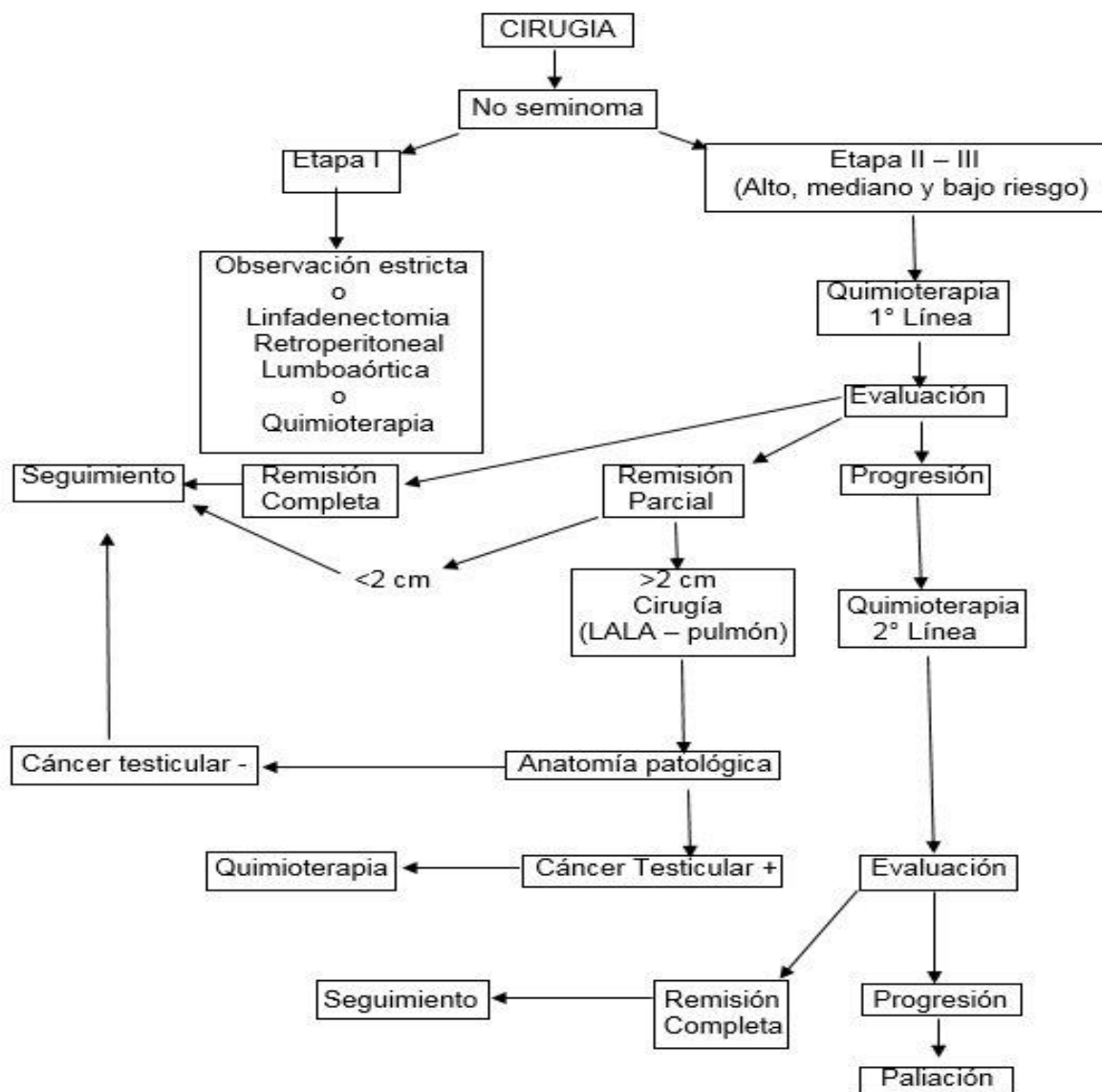


Ilustración 1. Algoritmo de tratamiento para cáncer testicular de tipo no seminoma.

Fuente: Guía clínica cáncer de testículo en personas de 15 años y más, 2010, Ministerio de salud, Gobierno de Chile. LALA: Linfadenectomía lumboaórtica laparoscópica.

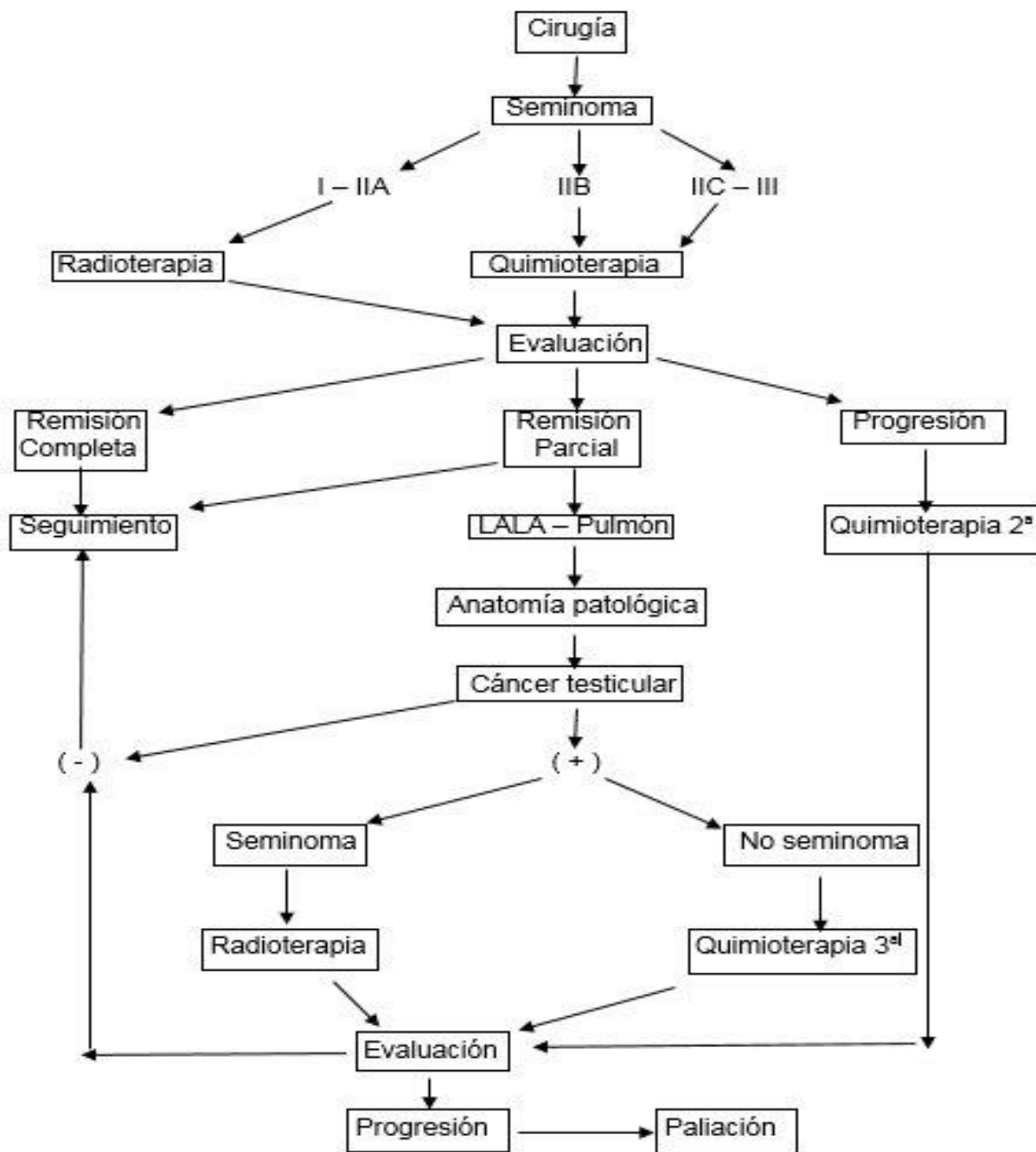


Ilustración 2. Algoritmo de tratamiento para cáncer testicular de tipo seminoma.

Fuente: Guía clínica cáncer de testículo en personas de 15 años y más, 2010, Ministerio de salud, Gobierno de Chile.). LALA: Linfadenectomía lumboaórtica laparoscópica.

2.1 Tratamiento del cáncer testicular

El tratamiento de esta patología depende del tipo (seminoma o no seminoma). Sin embargo, el procedimiento de regla estándar es la orquiectomía radical por vía inguinal con ligadura de cordón alta. Posterior a esto se procede al tratamiento diferencial según tipo y estadio (determinado con tomografía computarizada) que se describe a continuación:

2.1.1 Seminoma

Estadio I.

Después de orquiectomía, en no más de 3-4 semanas, los pacientes son tratados con radioterapia conformacional. En caso de contraindicación a radioterapia se aplica quimioterapia, con un ciclo de carboplatino.

Estadio II A / II B (masas ganglionares < 4 cms).

Después de orquiectomía y en no más de 3-4 semanas, los pacientes son tratados con radioterapia conformacional.

En casos de contraindicación a la radioterapia, se hará quimioterapia:

- 3 ciclos PEB (Etopósido + Cisplatino + Bleomicina) o
- 4 ciclos EP (Etopósido + Cisplatino)

Etapa II B (Masas ganglionares > 4cms), etapa II C y etapa III.

La decisión del esquema de quimioterapia está basado en el riesgo del paciente de acuerdo a la Clasificación de Consenso Internacional para tumores germinales, descrita previamente:

- Riesgo Bajo: 3 PEB o 4 EP
- Riesgo Intermedio: 4 PEB

Antes del inicio de la quimioterapia (en no más de 3 - 4 semanas post cirugía) se deben realizar los siguientes exámenes:

1. Electrolitos plasmáticos
2. LDH total
3. Gonadotrofina coriónica
4. Alfafetoproteínas
5. Hemograma
6. Clearance
7. Marcadores tumorales

Luego se evalúa los pacientes en la mitad de los ciclos programados. El 100% de los pacientes se hospitaliza durante el tratamiento con quimioterapia.

2.1.2 No Seminoma (NS)

Etapa I

Para los tumores germinales no seminomatosos, tanto de alto como bajo riesgo, la opción recomendada es la quimioterapia. Sin olvidar que existen las opciones de linfadenectomía lumboaórtica laparoscópica (LALA) y observación, que en todos los casos será planteada al paciente y tomada en conjunto. Sólo se puede evaluar la observación en los pacientes de Bajo Riesgo histológico en los centros que aseguren control médico, exámenes de laboratorio y radiografía de tórax (AP/ Lateral) mensual y TC de abdomen y pelvis cada dos meses por los dos primeros años; si estas condiciones no son factibles de cumplir, la mejor opción terapéutica es quimioterapia adyuvante. En casos que la biopsia testicular muestre predominio de teratoma la mejor opción es LALA.

Etapas II y III

En enfermedad avanzada (estadíos II y III)

Riesgo Bajo: 3 ciclos PEB.

Riesgo Intermedio y Alto: 4 ciclos de PEB y en casos de contraindicación a Bleomicina se recomienda 4 ciclos VIP (etopósido o vinblastina mas ifosfamida y cisplatino). (Ilustración N°3).

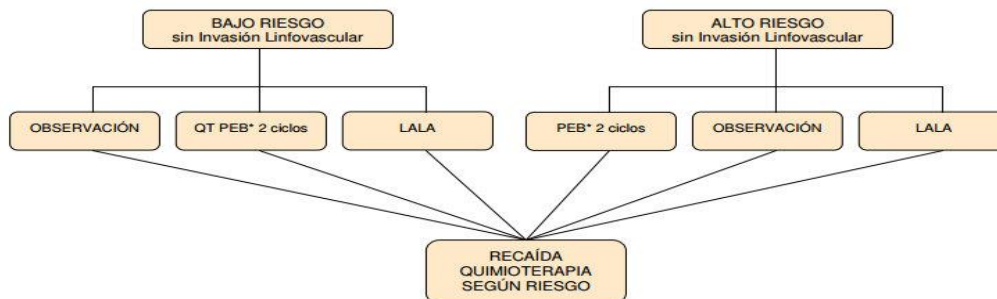


Ilustración 3. Estadíos II y III, enfermedad avanzada, tratamiento a seguir.

Fuente: Guía clínica cáncer de testículo en personas de 15 años y más, 2010, Ministerio de salud, Gobierno de Chile.). LALA: Linfadenectomía lumboaórtica laparoscópica; QT PEB: quimioterapia etopósido, cisplatino y bleomicina.

2.2 Quimioterapia

La quimioterapia estándar para tumores de células germinales metastásico de bajo riesgo (seminomas y no seminomas) se basa en 3 ciclos de BEP (etopósido + cisplatino + bleomicina), pero se han realizado estudios que han evaluado la utilidad de bleomicina debido a la neumonitis que ésta induce (Vaughn, 2007)

En un estudio realizado por el *Memorial Sloan Ketterign Cancer Center* (MSKCC) se analizó retrospectivamente el seguimiento a largo plazo de 289 pacientes con tumor de células germinales metastásico de bajo riesgo, estableció una supervivencia a los 5 años del 96% y una respuesta completa del 98% de los pacientes con 4 ciclos EP, con lo cual 4 ciclos de EP se consideran una alternativa a los 3 ciclos de PEB (Vaughn, 2007) para evitar los efectos adversos de bleomicina.

El tratamiento a elegir se determina según los pro y contra para cada paciente, esto es tomando en cuenta los factores de riesgo de neumonitis (edad superior a 40 años, disfunción renal, enfermedad pulmonar de base, consumo de tabaco y dosis acumulativa de bleomicina) que determinarían preferir sólo terapia EP.

De acuerdo con los argumentos anteriormente señalados, en el presente trabajo se incluyen solo a aquellos pacientes que hayan sido sometidos a terapia EP (etopósido + cisplatino). Por una parte, el utilizar pacientes sin bleomicina permitió definir de manera más limpia los potenciales efectos adversos del medicamento etopósido, al eliminar un interferente de análisis. Por otra parte, debido a que no existe tratamiento solamente con etopósido debido a la baja eficacia del mismo, ello es ciertamente una limitante para las conclusiones del estudio.

2.3 Etopósido

Etopósido es un derivado semisintético aislado de las raíces secas y rizomas de las plantas *Podophyllum peltatum* y *Podophyllum emodi*, inhibidor de la topoisomerasa II dependiente del ciclo celular y fase específico (afecta principalmente fase S y G₂). Su principal efecto es la ruptura de las hebras de DNA mediante inhibición de la topoisomerasa II y formación de especies reactivas a oxígeno (Drugbank, 2016).

Etopósido se encuentra dentro del arsenal de primera línea para el tratamiento de TCa (cáncer testicular) según la histología y riesgo que exista. Se utiliza en ciclos en conjunto con Bleomicina y Cisplatino.

Etopósido posee una farmacocinética errática, estrecho rango terapéutico, además la dosis debe ser individualizada para cada paciente. Sus parámetros farmacocinéticos varían y puede presentar una cinética de dos compartimentos y en algunos casos de tres (Shirazi *et al.*, 2001). Su vida media de eliminación esta entre 5 y 10 horas, posee un 97% de unión a proteínas por lo que es necesario controlar interacciones por posibles desplazamientos de fármaco; el *peak* de concentración plasmática se alcanza dentro de 1-1,5 hrs y su biodisponibilidad es del 50%. El *clearance* de etopósido es de 33-48 ml/min en administración IV y posee un rango de excreción urinaria de etopósido inalterado de 30-40%. (Kawashiro, 1998). Las enzimas que lo metabolizan son CYP3A4/5 (citocromo P-450 3A4 y 3A5) de fase I, GSTs (glutación S-transferasas) y UGT1A1 (UDP-Glucuronil transferasa 1A1) de fase II. Toda variante polimórfica en cualquiera de estas enzimas contribuye a la respuesta hepatoclínica frente a etopósido (Yang *et al.*, 2009).

La 3'-demetilación es la principal vía de metabolización de etopósido mediada por CYP3A4 generando 3-hidroxietopósido (etopósido catecol), lo cual es comprobado por la significativa correlación entre los valores individuales de V_{max} y K_m para la 3'-desmetilación y testosterona 6 β -hidroxilación (substrato marcador para CYP3A4) en microsomas hepáticos (Kawashiro *et al.*, 1998). Luego el etopósido catecol se somete a secuenciales oxidaciones mediante oxidasas para formar una semiquinona y luego un residuo de quinona (Zhuo *et al.*, 2004). Estos metabolitos tienen similar potencia para inhibir la topoisomerasa II y son más reactivos oxidativamente que el compuesto original. (Pharmgkb, 2001 - 2016).

La conjugación con glutatión y con glucurónido inactiva los metabolitos y a la molécula parental mediante las enzimas GSTT1, GSTP1 y UGT1A1, respectivamente. El eflujo de estos compuestos conjugados o no conjugados se realiza mediante los transportadores ABCC1, ABCC3 y ABCB1, lo que representa un mecanismo de resistencia a drogas (ilustración 4) (Pharmgkb, 2001 - 2016).

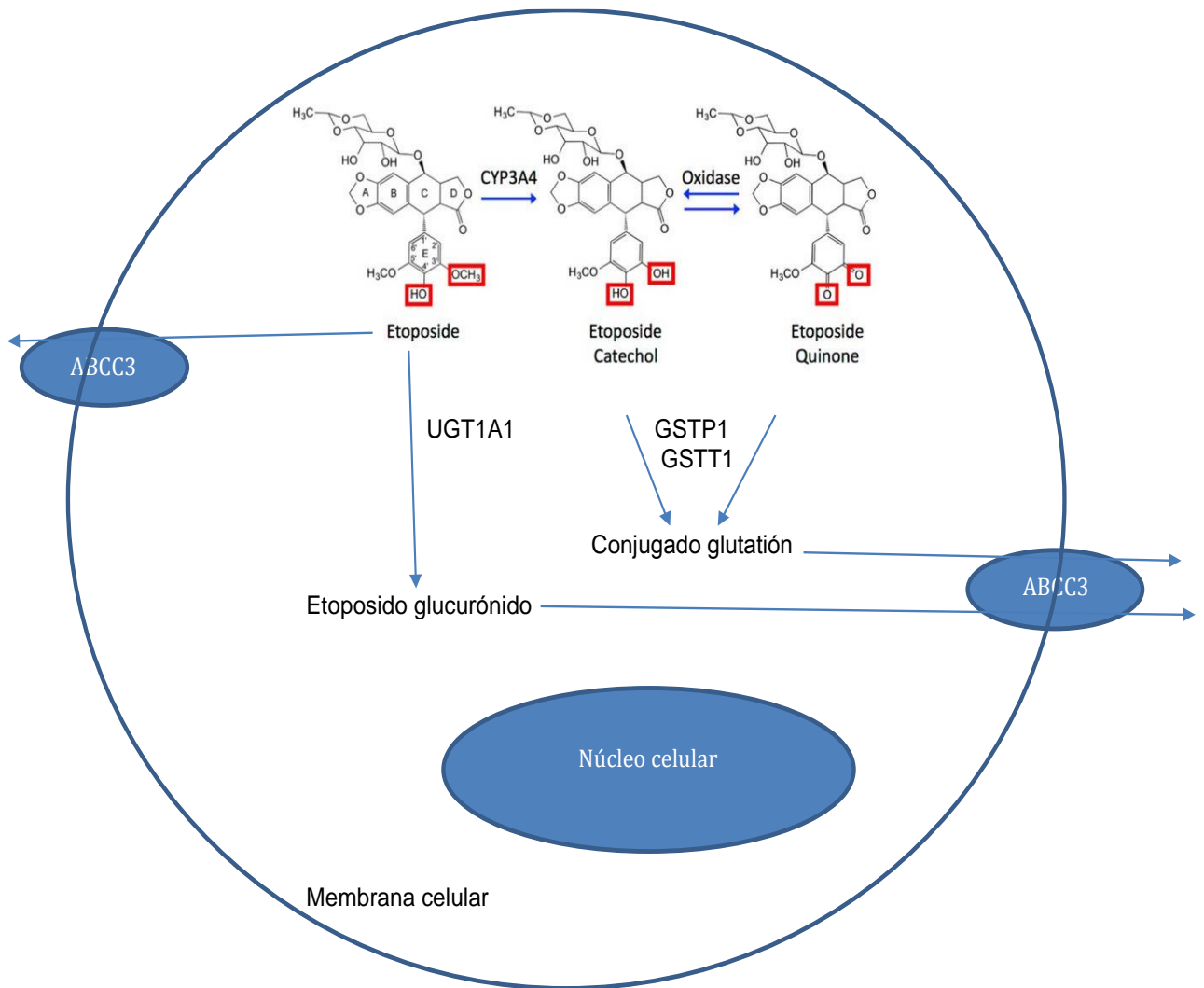


Ilustración 4. Vías metabólicas de Etopósido.

ABCC3, transportador de membrana.

Etopósido a etopósido catecol es mediado principalmente por CYP3A4 y en menor medida CYP3A5

A continuación se describen las principales características de las proteínas que afectan la farmacocinética de etopósido (Enzimas metabolizantes).

2.4 CYP 3A4 y CYP3A5

CYP1A1, CYP3A4/5 y CYP2B6 son las isoenzimas P450 que metabolizan la mayoría de los agentes antineoplásicos y son, además, altamente polimórficas. (Cavalli & Hirata, 2001)

CYP3A4, CYP3A5 y CYP3A7 residen en una región de 231-kb del cromosoma 7q21.1. La variación genética de CYP3A contribuye de manera importante a la variabilidad inter-individual en el metabolismo de drogas. Al respecto, se ha sugerido que más del 60% de la variabilidad en la actividad de CYP3A4 debe tener como causa algún componente genético. El polimorfismo de CYP3A4 más prevalente es **CYP3A4*1B**, de baja frecuencia en población caucásica (menor al 1%) (Lazalde, 2012). Este polimorfismo se produce por una transición A>G en la posición -293 en el sitio de inicio transcripcional, Su frecuencia alélica en hispanos, europeos y africanos es de 0,023, 0,04 y 0,02 (Yousef *et al.*, 2012), respectivamente. En Chile el grupo de trabajo donde se realizó esta tesis ha reportado una frecuencia alélica de 0,06 (Roco *et al.*, 2012).

Según los datos anteriores CYP3A4*1B es un polimorfismo de baja frecuencia alélica. A pesar de ello, este polimorfismo se considera relevante debido a que se ha encontrado asociado con una baja capacidad metabólica de CYP3A4 producto de una reducción de la expresión de CYP3A4. Ello ocurre debido a que la variante disminuye la afinidad de unión al factor de transcripción, resultando en baja actividad transcripcional y por tanto baja actividad enzimática. (Yousef *et al.*, 2012)

Por su parte, CYP3A5 es expresado de una manera polimórfica en el 10-29% de hígados adultos (Yousef *et al.*, 2012). Varios estudios muestran que diversas variantes polimórficas en CYP3A5 tienen un efecto funcional en la actividad de la enzima. El polimorfismo CYP3A5*3 existe en el intrón 3 de CYP3A5, generando un sitio de empalme que conduce a la inclusión de un nuevo exón y finalmente a un prematuro codón de término que conduce eventualmente a muy baja cantidad de proteína CYP3A5.

El alelo CYP3A5 6986A>G (**CYP3A5*3**) está asociado con disminuido clearance de drogas tales como simvastatina, lovastatina, midazolam, ciclosporina y tacrolimus (Yousef *et al.*, 2012). Éste polimorfismo presenta una frecuencia alélica en población caucásica por sobre el 81% (0,94 en europeos, 0,917 en alemanes, 0,813 en franceses). En Chile la frecuencia observada es de 0,76 (Roco *et al.*, 2012).

2.5 UGT1A1

Esta enzima de fase II del metabolismo de xenobióticos, posee alrededor de 60 polimorfismos conocidos del gen *UGT1A1*. Dentro de éstos, el más estudiado es el polimorfismo *UGT1A1*28*, el cual posee una frecuencia estimada de un 15% de homocigotos (*Margozzini et al., 2013a*) y una frecuencia alélica de 0,368 (National Center for Biotechnology, 2016a). La variante se produce por una inserción timina-adenina (TA) repetida en el promotor, y estaría asociada con la actividad enzimática de manera inversa a la longitud de la repetición. Este polimorfismo afecta la caja TATA río arriba del gen *UGT1A1*, que es responsable de la unión del factor de transcripción general IID el cual participa en la iniciación de la transcripción. Al respecto, se ha observado que individuos homocigotos con 7 repeticiones TA ((TA)₇, o *UGT1A1*28*) tienen un 70% de reducción en la expresión genética de *UGT1A1* comparado con aquellos que poseen el alelo (TA)₆. Por lo tanto, se cree que el alelo *UGT1A1*28* explicaría sobre el 40% de la variabilidad *in vitro* de la actividad enzimática de *UGT1A1* (*Perera et al, 2008*).

2.6 Proteína de Resistencia Múltiple a Drogas (MDR1 o ABCB1)

La Glicoproteína-P (P-gp) es producto del gen de Multi-resistencia a Drogas (MDR-1 o ABCB1 ATP-binding cassette 1), que constituye una gran familia de proteínas que transportan gran variedad de compuestos endógenos y exógenos a través de la membrana en contra de la gradiente de concentración mediante la utilización de ATP. Por lo tanto, reducen la carga de sustancias potencialmente dañinas en el cuerpo, causando resistencia a las drogas. La familia ABC está compuesta por subfamilias, las cuales son ABCB1 (MDR1/glicoproteína-P de la subfamilia ABCB), subfamilia ABCC (MRPs), y ABCG2 (BCRP de subfamilia ABCG), y que son expresados en varios órganos (*Lagas et al., 2009*)

La proteína de ABCB1 (MDR1 o P-gp), se encuentra en el epitelio del intestino, hígado, riñón, barrera hemato-encefálica, testículos, placenta y pulmones. La ciclosporina es un sustrato de ABCB1 por lo que P-gp intestinal puede ser responsable de la reducida absorción de diversos fármacos en el intestino (*Sakaeda et al, 2003*).

El polimorfismo silente 3435C>T (rs1045642) produce un cambio del nucleótido de citosina a timina el cual corresponde a un cambio sinónimo, es decir que no lleva a cambios en la secuencia aminoacídica de la proteína, sin embargo, puede reducir la estabilidad del ARNm de ABCB1 en la célula hepática, como también cambiar el doblamiento de la proteína y su actividad (*Shastry, 2009*). El homocigoto para el alelo T ha resultado en una reducción

de dos veces de la expresión de P-gp en el estómago (Hoffmeyer *et al.*, 2000). Las frecuencias alélicas en una población serbia fueron de 0,53 para timina y 0,47 para citosina, siendo el homocigoto el genotipo de mayor frecuencia. (Milojkovic *et al.*, 2011).

Otro polimorfismo silente del gen MDR1 es el 1236 C>T (exón 12, Gly 412 Gly), que estaría asociado con un desequilibrio parecido al que genera 3435C>T y por lo tanto, también influenciaría la función de P-gp. Su frecuencia alélica en población serbia fue de 0,54 para citosina y 0,46 para timina, presentándose en mayor frecuencia el genotipo homocigoto (0,61) (Milojkovic *et al.*, 2011). Para población europea fue de 0,523 C y 0,477 T, presentándose el genotipo heterocigoto C/T en mayor frecuencia; para población afroamericana las frecuencias fueron de 0,864 C y 0,136 T con un genotipo homocigoto C/C como el de mayor frecuencia.

En Chile no se conoce la frecuencia de la población sana para estos polimorfismos pero una tesis de grado reciente en el laboratorio de carcinogénesis química y farmacogenética (CQF), encontró una frecuencia alélica de 0,50 para la variante 1236 C>T, de 0,43 para el alelo raro del polimorfismo 3435C>T y de 0,44 para el alelo raro de 2677 G>T/A en un grupo de pacientes de trasplante renal (*Stephanía Contreras, 2015, datos no publicados*).

2.7 MRP-3 (ABCC3)

Esta proteína pertenece al grupo de transportadores de drogas del tipo (ABC) tales como la P-glicoproteína (P-gp o ABCB1) y otras proteínas de resistencia a múltiples drogas (MRP y ABCC2). Corresponden a bombas de eflujo con un amplio solapamiento de sustratos. P-gp y ABCC2 están en la membrana apical de barreras epiteliales del riñón, barrera sanguínea testicular, placentaria y cerebral, intestino y membrana canalicular de hepatocitos. ABCC3 está en la membrana basolateral de las células epiteliales del riñón, intestino y membrana sinusoidal de hepatocitos, sus típicos sustratos son glutatión, glucurónido, conjugados sulfato y sales biliares, los cuales serían bombeados al torrente sanguíneo (Sasaki *et al.*, 2011)

Estos transportadores afectarían entonces la farmacocinética de etopósido glucurónido (el principal metabolito de etopósido) (Lagas *et al.*, 2009). Sin embargo, el mecanismo responsable de esta variabilidad aun no es dilucidado (Sasaki *et al.*, 2011).

El polimorfismo ABCC3 -211C>T es el más conocido y relevante de esta proteína. Se encuentra asociado con disminuida expresión de ARNm ABCC3, por lo que afectaría la

farmacocinética de etopósido (Zou *et al.*, 2013) y sería responsable de alterada respuesta a terapia antitumoral especialmente en pacientes tratados con etopósido y drogas a base de platino (Sasaki *et al.*, 2011). Se han descrito frecuencias alélicas de 0,058 y 0,227 en europeos y afroamericanos, respectivamente para el alelo raro (T) (National Center for Biotechnology, 2016b). En Chile no existen estudios respecto de este polimorfismo.

Diferencias sustanciales en los pacientes tanto en la respuesta clínica como en la toxicidad son comunes en distintos esquemas quimioterapéuticos contra el cáncer; en la clínica aún hay pocas estrategias de monitoreo de drogas que sean logísticamente factibles. Por otra parte, la rapidez con que evoluciona el campo de la farmacogenética, mantiene la promesa de asistir la evaluación de dosis y regímenes de tratamiento individualizados según el paciente. Muchos son los polimorfismos de nucleótido simple que se han descubierto en genes que estarían involucrados en la regulación del metabolismo de drogas y pocos son los estudios que establezcan una relación entre genotipo, eficacia y seguridad del esquema quimioterapéutico. Es por esto, que en la presente memoria se plantea la siguiente hipótesis.

3 Hipótesis

Variantes genéticas de los transportadores MDR1 y MRP3, y las enzimas de biotransformación CYP3A4/5 y UGT1A1 influyen la respuesta clínica al tratamiento (eficacia y seguridad) con etopósido en pacientes con cáncer testicular.

4 Objetivo general

Estudiar la asociación entre las variantes genéticas 3435C>T de ABCB1, - 211C>T de ABCC3, CYP3A4*1B, CYP3A5*3 y UGT1A1*28, y la respuesta terapéutica (eficacia y toxicidad) en pacientes con cáncer testicular (CaT) sometidos a terapia EP (Etopósido + Cisplatino).

4.1 Objetivos específicos

1. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes polimórficas de ABCB1 1236>C/T (rs1128503), ABCB1 3435>C/T (rs1045642), ABCC3 -211C/T (rs4793665), CYP3A4*1B (rs2740574), CYP3A5*3 (rs776746) y UGT1A1*28 (rs8175347), en pacientes con cáncer testicular.
2. Implementar la técnica PCR-SSCP y posterior tinción con nitrato de plata para genotipificar UGT1A1*28, metodología considerada “gold standard” para su determinación, y compararla con la técnica PCR tiempo-real para el gen mencionado
3. Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de UGT1A1*28, MDR1 3435, CYP3A4*1B, CYP3A5*3 en población general.
4. Implementar la técnica PCR-SSCP y posterior tinción con nitrato de plata para genotipificar UGT1A1*28, metodología considerada “gold standard” para su determinación, y compararla con la técnica basada en PCR-tiempo real,
5. Identificar variables clínicas asociadas con la toxicidad en pacientes con cáncer testicular, sometidos a quimioterapia con etopósido (hemograma, ácido úrico, trastornos del metabolismo, diarrea-electrolitos, transaminasas).
6. Identificar variables clínicas relacionadas con la eficacia del tratamiento en pacientes con cáncer testicular sometidos a quimioterapia con etopósido (recidivas, marcadores tumorales y exámenes de imagenología).
7. Evaluar si existe asociación entre los diferentes genotipos y la respuesta clínica (eficacia y seguridad) a la quimioterapia con Etopósido.
8. Comparar los perfiles de toxicidad de los esquemas quimioterapéutico etopósido-cisplatino vs bleomicina-etoposido-cisplatino,

5 Materiales y Métodos

5.1 Materiales

Para la extracción de sangre periférica se utilizaron tubos con EDTA como anticoagulante (BD *vacutainer*, EE.UU.). Para la purificación del DNA se utilizó un sistema comercial de purificación de DNA genómico de sangre periférica (*High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania*).

Para las reacciones de PCRs se utilizaron partidores específicos para la amplificación del fragmento génico requerido (sintetizados por Invitrogen, Brasil), PCR *Water* (Bioline, Taunton, MA, EE.UU), dNTP Mix 100 mM (mezcla de dATP, dTTP, dGTP y dCTP) (Bioline, Taunton, MA, EE.UU), DNA polimerasa *Taq* recombinante (Biotools, Madrid, España) con tampón de reacción 10X (Tris-HCl 200 mM (pH 8), KCl 500 mM), MgCl₂ 500 mM.

5.2 Pacientes

Este estudio se realizó en pacientes con cáncer testicular del Instituto Nacional del Cáncer y del Hospital San Juan de Dios, bajo la supervisión de las Dras. Berta Cerda y Karina Peña, respectivamente, Jefas de las Unidades de Oncología.

El grupo en estudio se caracterizó demográficamente en cuanto a: edad, estatura y peso. Clínicamente considerando las siguientes variables: histología del cáncer: seminoma, no seminoma, germinoma extragonadal, y terapéuticamente en cuanto a tipo de quimioterapia: PE (etopósido + cisplatino).

Teniendo en cuenta las anteriores características se establecieron los siguientes criterios de inclusión y exclusión para el presente estudio:

Criterios de Inclusión: Pacientes de 15 años y más con cáncer testicular del tipo seminoma o no seminoma, en etapa I – II, con parámetros hepáticos y renales normales, apellidos hispanoamericanos que hayan recibido quimioterapia con Etopósido y Cisplatino (EP).

Criterios de exclusión: Pacientes que hayan sido sometidos al protocolo de quimioterapia con bleomicina, etopósido y cisplatino (BEP) o presentan patología descompensada, multi-sistémica u otros cánceres activos y/o rechazo del paciente a la terapia.

5.3 Aspectos Éticos

El protocolo de este estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Evaluación Ético Científico de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y cuenta con la autorización del Comité de Ética (CEEC) del Servicio de Salud Metropolitano Norte (SSMN), en el marco del proyecto Fondecyt en el que se desarrolló esta tesis. Sin perjuicio de lo anterior, el trabajo de tesis ha sido sometido a modo de protocolo específico al CEEC del SSMN.

En todos los procedimientos se han respetado rigurosamente las normativas nacionales e internacionales, que incluyen la Ley 20.120 que versa sobre la investigación científica en el ser humano y su genoma, las buenas prácticas clínica (GCP) y la Ley de derechos y deberes del paciente (Ley 20.584).

5.4 Extracción del ADN

Se aisló el ADN mediante un sistema comercial de purificación de ADN genómico (kit *Blood genomic DNA Extraction mini kit, ADN Favorgen*[®]), se utilizaron 3 mL de sangre periférica (colectada en EDTA como anticoagulante) para realizar posteriormente el procedimiento de PCR-RFLP para el estudio de los polimorfismos propuestos.

5.5 Genotipificación de MDR1 3435 C>T

Se llevó a cabo mediante una adaptación del método propuesto por Samar *et al.* (2002) en el cual se amplifica un fragmento de 231 pb del exón 26, que contiene un cambio de nucleótido en la posición 3435 de citosina a timina. La reacción se realizó en un volumen total de 22 μ L compuesto por 2 μ L de DNA, 0,25 μ L de cada partidor, 0,4 μ L de DNA Polimerasa y 2,5 μ L tampón 10x, 2,5 μ L dNTP, 3 μ L de MgCl₂ y 11,1 μ L de agua.

Los patrones de corte fueron visualizados en un transluminador UV (Vilbert-Loumart, Deutschland, Alemania), estos son: para el genotipo homocigoto silvestre (C/C) se obtiene un patrón de restricción bandas de 163 y 68 pb; para el genotipo heterocigoto (C/T), bandas de 231, 163 y 68 pb, y para el genotipo homocigoto mutado (T/T), bandas de 231 pb (ilustración 5).

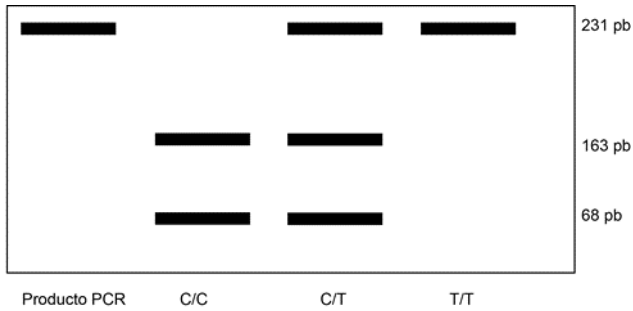


Ilustración 5. Patrón de corte, polimorfismo MDR1 3435.

Enzima de restricción: Sau3AI

5.6 Genotipificación de MDR1 1236 C>T

Se realizó una adaptación de la técnica descrita por Youssef *et al*, (2013), reacción en cadena de la polimerasa con fragmentos de restricción de longitud polimórfica. El fragmento amplificado es de 370pb y los patrones de corte son los siguientes: para el genotipo homocigoto silvestre (C/C) se obtiene un patrón de restricción de bandas de 272, 63 y 35 pb; para el genotipo heterocigoto (C/T), bandas de 272, 98, 63 y 35 pb, y para el genotipo homocigoto mutado (T/T), bandas de 272 y 98 pb.

Posteriormente el producto PCR fue sometido a digestión con 0,5µL de enzima *BsuRI* (*HaeIII*), 9,5µL de agua nanopura y 1µL de Buffer R por 2 horas a 37°C. Finalmente los fragmentos fueron sometidos a electroforesis en poliacrilamida al 18%.

	wt/wt	het	mut/mut
272	_____	_____	_____
98		_____	_____
63	_____	_____	
35	_____	_____	

Ilustración 6. Patrón de corte, polimorfismo MDR1 1236.

Enzima de restricción: HaeII

5.7 Genotipificación de CYP3A4*1B, CYP3A5*3 y ABCC3 -211C/T

Estos polimorfismos fueron analizados según el protocolo de análisis RT-PCR con Sondas *TaqMan*® (*TaqMan*® Drug Metabolism Genotyping Assays for basic and clinical research). El cual es un ensayo de genotipificación realizado por *Applied Biosystems* para enzimas del metabolismo de drogas basado en la reacción en cadena de la polimerasa clásica, en donde la detección de los productos amplificados se realiza con reporteros fluorescentes específicos, cuya transferencia de energía del reportero fluorescente hacia el aceptor (*quencher*) es mediante hidrólisis entre la sonda y su secuencia blanco. Posterior a la detección de la amplificación en tiempo real y captura de la fluorescencia de cada muestra se analizan los resultados con el software del equipo el cual genera una serie de gráficas de amplificación (progreso de la reacción) y curva de *melting* (especificidad de la reacción) (*Sensorn et al.*, 2013).

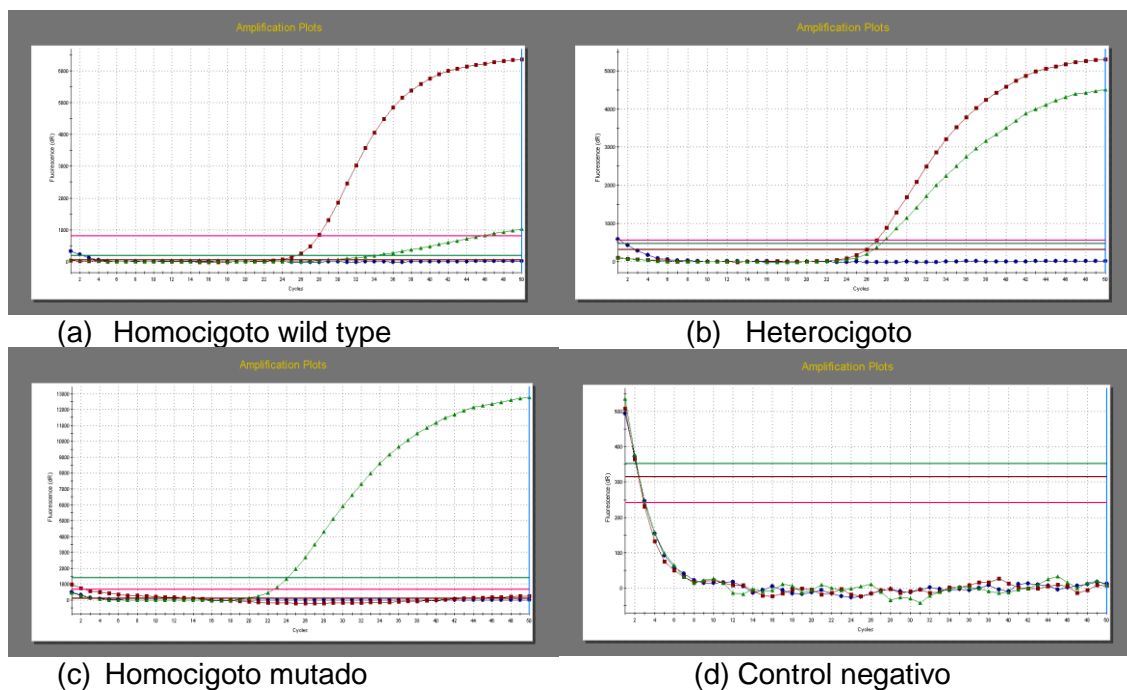


Ilustración 7. Ejemplo de curvas obtenidas por PCR tiempo real para análisis genotípico con sondas taqman.

5.8 Genotipificación de UGT1A1*28

La genotipificación fue realizada por adaptación de la técnica PCR-SSCP (polimorfismos de conformación de cadena simple) de acuerdo al método de Bogataj, (2009). Para este análisis se realizó la amplificación del promotor mediante la reacción en cadena de la polimerasa (partidores Forward: TGA AATTCCAGCCAGTTCAA y Reverse: AGAGGTTCCGCCCTCTCCTAC). El análisis SSCP se realizó luego de la amplificación en donde el producto PCR (2 μ L) se mezcló con solución (5 μ L) formamida 95%, EDTA 20mM y azul de bromofenol 0,05% para favorecer el proceso de denaturado. La mezcla fue calentada a 95-97°C por 3 minutos y luego inmediatamente transferida al hielo. El volumen total fue cargado en gel de poliacrilamida 12%. La electroforesis fue corrida en una cámara BioRad Mini-PROTEAN II a 20W por 3 horas.

El proceso de tinción con plata se llevó a cabo por adaptación del método descrito por Bassam *et al* (1991) en donde se siguió la secuencia de fijación con ácido acético, lavado con agua, impregnación con nitrato de plata, lavado con agua, revelado con formaldehído y detención de la reacción de reducción con ácido acético.

El genotipo se determinó según la posición de las bandas de las muestras relativo al estándar que indica la presencia de genotipo homocigoto silvestre UGT1A1 *1/*1 (TA 6/6), un heterocigoto UGT1A1 *28/*1 o UGT1A1 *1/*28 (TA 6/7) o un homocigoto polimórfico UGT1A1*28/*28 (TA 7/7).

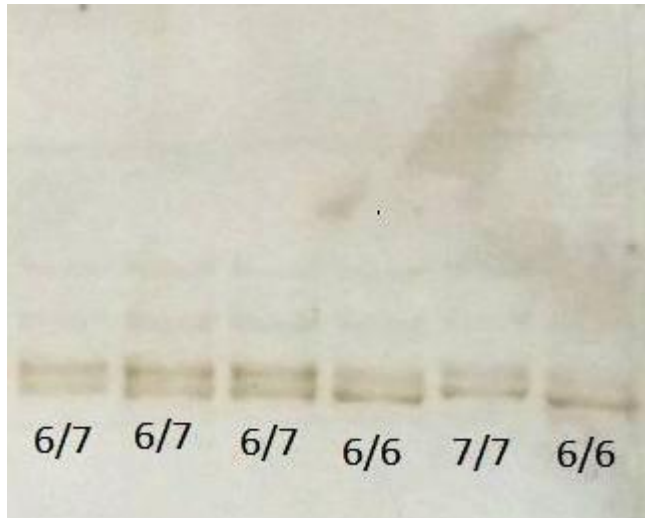


Ilustración 8. Patrón de bandas para UGT1A1*28 mediante PCR-SSCP.

Paralelamente también se genotipificó UGT1A1*28 mediante PCR-tiempo real con Sondas *TaqMan*®. La presencia del alelo UGT1A1*28 (TA)₇ se determinó indirectamente analizando la variante rs6742078 (G>T) ubicada en el intrón 1 del gen UGT1A1, que se encuentra en fuerte desequilibrio de unión ($r^2 = 0,88$) con las variantes (TA)₆/(TA)₇.

La técnica se estandarizó evaluando las cantidades de reactivos tanto de sonda, master mix y ADN con muestras de genotipo ya conocido llegando a los siguientes volúmenes:

Tabla 2. Estandarización de PCR-RT para UGT1A1*28.

Reactivo	Volumen para 7,35 µL por pocillo	Volumen para 10 µL por pocillo
Master Mix 2X	3,672 µL	5,0 µL
Sonda 20X	0,367 µL	0,5 µL
ADN (30ng)	3,31 µL	4,5 µL

Las curvas obtenidas según estos volúmenes para treinta nano-gramos de una sola muestra de genotipo conocido fueron:

- a) Curva para 10 µL de mezcla para reacción por pocillo, en esta se logra un ciclo umbral (Ct) de 28, lo cual es indicativo de abundante ácido nucleico en la muestra (reacción positiva).

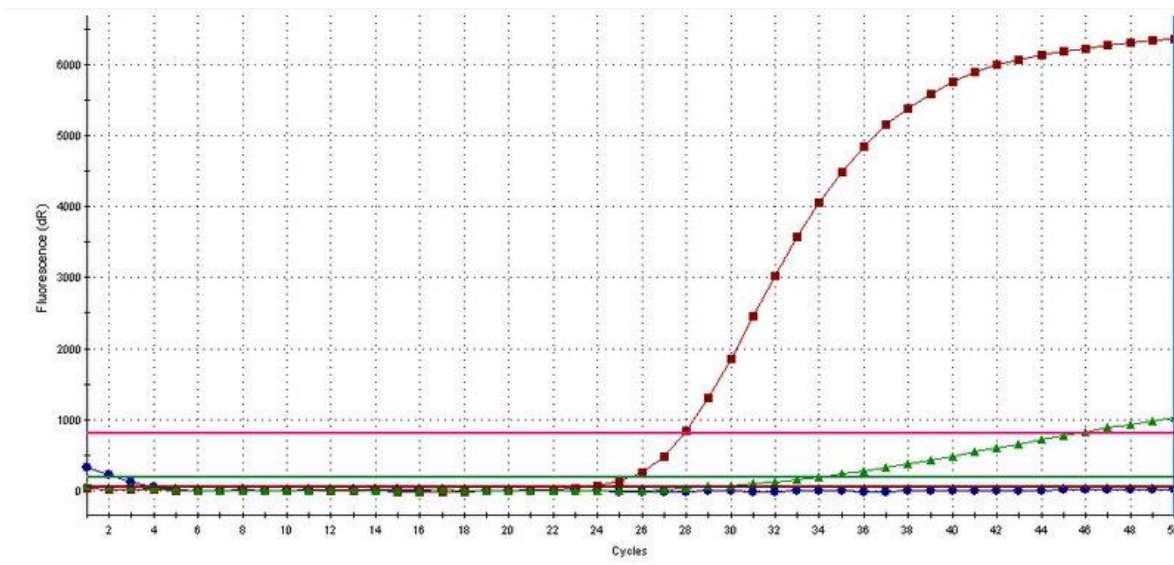
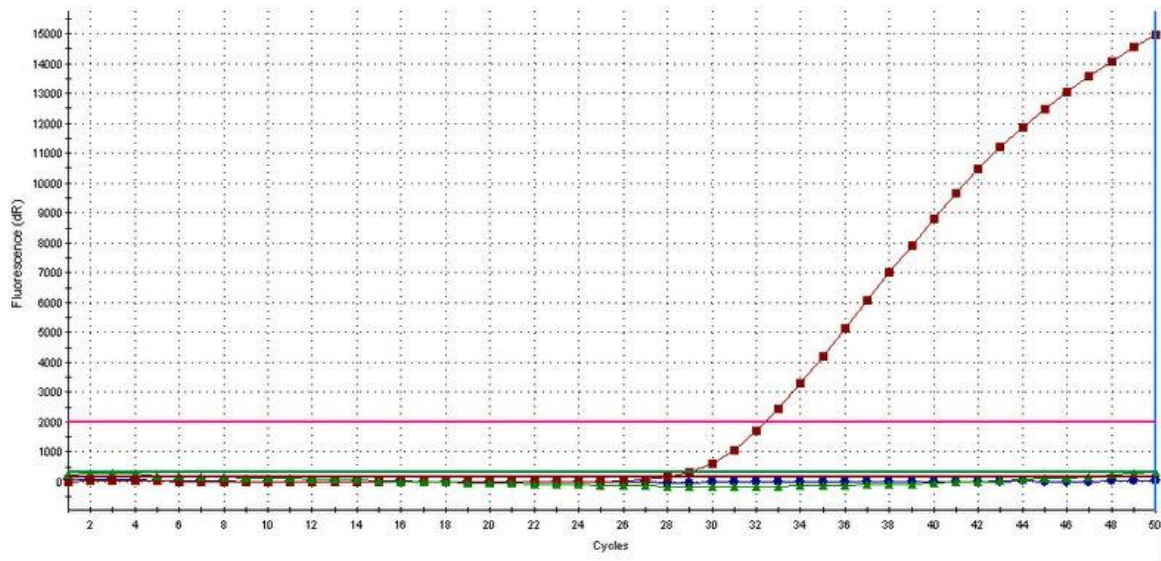


Ilustración 9. Curva para 10 microlitros por pocillo para UGT1A1*28.

- b) Curva para 7,35 µL de mezcla para reacción por pocillo, en esta el Ct es de 32, valor que es indicativo de moderada cantidad de ácido nucleico en la muestra.



*Ilustración 10. Curva para 7,35 microlitros por pocillo para UGT1A1*28.*

Se decidió entonces por el protocolo de 10 μ L por pocillo ya que se obtiene el valor de Ct óptimo que ha sido evaluado por el proveedor y permite estar seguro que ocurre la unión entre el ADN y la sonda *TaqMan*[®].

Tabla 3. Comparación técnica PCR-SSCP y Tiempo Real.

Reactivos	PCR – SSCP	PCR - RT
PCR 25 µL	ADN genómico 5 µL (100ng)	Master mix 2X, 5µL
	Buffer NH ₄ 1X	Sonda 20X, 0,5µL
	0,2mM c/u deoxirribonucleótido	ADN 30 ng, 4,5µL
	2 mM MgCl ₂	-----
	0,42 µM c/u Primers	-----
	0,6 U Amplitaq	-----
S.D para amplicón (5µL)	*Formamida 95%	-----
	*Azul de bromofenol 0,05%	-----
	*NaOH 20 mM	-----
	*EDTA 20 mM	-----
	Calentar 97°C, 3 min	-----
	Transferir a hielo (inmediato)	-----
Tinción	EtOH 10%, 20 min.	-----
	H ₂ O, 2 min, 3 veces	-----
Impregnado	*AgNO ₃ (1g/L)	-----
	*1,5ml HCOH 37% x litro 30 min	-----
Revelado	*Na ₂ CO ₃ (30g/L)	-----
	*1,5ml HCOH 37% x litro 30 min	-----
	*Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O (2mg/L), 2 min	-----
Detencion reducción	Ácido acético 10%, 5 min	-----
Numero de muestras	24	96
Horas trabajo	5	3
Equipos	Termociclador y cámara electroforética	Termociclador, Detector de fluorescencia, hardware y software

S.D = solución desnaturalizante

Min = minutos

Numero de muestras, es el máximo de muestras que se pueden obtener por experimento.

*Los reactivos son mezclados en cada paso.

Comparando ambas técnicas se aprecia a primera vista el mayor rendimiento en número de muestras genotipificadas que posee el método PCR- tiempo real (metodología *TaqMan*®) y menor tiempo en horas para obtenerlas. La PCR-tiempo real se basa en mezclar solo tres reactivos, el master mix que contiene los componentes de una PCR normal y un fluoróforo como estándar interno, la sonda de hidrólisis que contiene los primers (oligonucleótidos) de 20 pb aproximadamente marcados con fluoróforos que son activados mediante la acción exonucleasa de la ADN polimerasa al trabajar en cada ciclo de PCR; y finalmente el ADN genómico. En contraste, el método SSCP supone una ardua labor al requerir muchos pasos y baños para el proceso de tinción con nitrato de plata.

Sin embargo, abordando ambas técnicas desde el punto de vista de sensibilidad, la metodología *Taqman* depende de valor de Ct y la eficacia de reacción (a mayor eficacia de reacción el valor Ct ocurre en un ciclo de PCR más temprano), por su parte el valor de Ct dependerá de la cantidad de ADN, que para los análisis realizados en el presente trabajo fue de 20 – 40 ng de ADN. Por su parte, la sensibilidad para el método SSCP está dada por más pasos limitantes, pero en particular el proceso de tinción con nitrato de plata es considerado el más sensible (límite de detección 1,5 pg/mm² (*Bassam et al., 1991*)) pudiendo detectar diferencias de hasta un nucleótido entre amplicones de 100 a 500 pares de bases (*Gasser et al., 2006*). Esto le ha llevado al método de tinción por nitrato de plata a ser el estándar de oro para genotipificar las repeticiones de la caja (TA) del gen UGT1A1 que van de cinco a ocho repeticiones posibles. Esto último permite considerar a la técnica SSCP para la detección de mutaciones que impliquen a más de un solo nucleótido, mientras que el sistema de sondas de hidrólisis *TaqMan* es útil solo para SNPs.

5.9 Evaluación de la Respuesta Clínica

La respuesta a la terapia fue evaluada de acuerdo a la carga tumoral (marcadores tumorales, nodos linfáticos de gran tamaño, enfermedad extrapulmonar), características histológicas del tumor primario, niveles iniciales de alfa fetoproteína, hormona gonadotrofina coriónica y lactato deshidrogenasa en suero. (*Piva et al, 1985*). Por tanto, de acuerdo a esos parámetros y sus valores aceptados como normales dentro de la terapia se establecerá una “respuesta óptima”.

La respuesta terapéutica óptima al tratamiento será la resolución de las anomalías bioquímicas.

5.10 Marcadores tumorales

Los marcadores tumorales de utilidad clínica para estos tumores son la AFP (α -feto proteína), β -hCG (Hormona gonadotrofina coriónica fracción beta) y DHL (Lactato deshidrogenasa) ya que tienen interés de cara al diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. De esta manera en tumores no seminomas se encuentran incrementadas las concentraciones séricas de AFP preoperatoria (>10 kU/L) o β -HCG (>5 U/L) en el 57% de los estadios I y en el 80% de los casos de enfermedad metastásica (Campuzano, 2010). En el 30% de los seminomas se presenta una concentración elevada de β -hCG durante la evolución de la enfermedad. Finalmente en pacientes con enfermedad metastásica se recomienda determinar la DHL como marcador de destrucción tisular, sin embargo, esta es un marcador menos específico y su concentración es proporcional al volumen tumoral. Su concentración puede estar elevada en el 80% de los casos de cáncer de testículo avanzado. Se debe destacar que las concentraciones negativas de marcadores no descartan el diagnóstico de un tumor de células germinativas (Albers *et al.*, 2010).

Por otra parte, en los casos en que los marcadores tumorales están altos, el análisis de sus valores séricos post-operatorios permite evaluar la eficacia de la resección tumoral, ya que la vida media de la AFP es de 4-6 días y la de la β -hCG es de uno o dos días (Campuzano, 2010). Estos marcadores post-operatorios (que deberían haber disminuido) son importantes para la posterior clasificación de riesgo.

Al momento de aplicar la quimioterapia estos mismos marcadores deberían estar disminuidos o normales atribuyéndose un significado adverso al caso contrario. Entonces para efectos del presente trabajo se tomaron valores de AFP, β -Hcg y DHL según estudios realizados en pacientes con quimioterapia en base a etopósido y cisplatino con el fin de establecer una respuesta completa al tratamiento. (Mezvrishvili & Managadze, 2006)

5.11 Plan de Análisis Bioestadístico

El objetivo general de este estudio fue evaluar si existe una asociación entre la presencia de variates polimórficas de diferentes genes y la respuesta terapéutica y de seguridad. La respuesta tóxica y de eficacia son variables que se trabajaron en forma dicotómica, es decir presencia o ausencia de estos eventos. Se describe el plan de análisis estadístico:

En primer lugar se describió cada variable, (tanto las de respuesta y explicativas) con estadística descriptiva de posición y dispersión para el caso de variables continuas y con estadísticas de frecuencia para el caso de variables cualitativas. Las asociaciones entre las variables explicativas y de respuesta se hicieron en primer lugar en forma bi-variada y posteriormente en forma multivariada. El riesgo de tener el evento en caso de variables dicotómicas fué evaluado con el estimador del riesgo relativo “Odds Ratio” a través del uso de regresión logística simple y múltiple. En el caso de variables de efecto continuas, se utilizó regresión lineal y el efecto en la respuesta fue evaluado por el cambio en los coeficientes de regresión por unidad de cambio en las variables predictoras, a nivel lineal y/o múltiple según corresponda.

Como el objetivo consistió en evaluar si la presencia de las variantes genotípicas son factores de riesgo para las respuestas ya definidas, el tamaño de muestra se calculó considerando la estructura del modelo de regresión logística simple a usar. En general, el tamaño de muestra para un análisis de este tipo está dado por la siguiente fórmula, $[n = 10 * (k + 1)]$ o lo que es lo mismo, en términos generales, el tamaño de muestra será unas diez veces el número de variables independientes a estimar más uno (Freeman, 1987).

Si asumimos 3-4 variables explicativas, se espera tener a lo menos un n de 30-40 individuos. Para este estudio se cuenta con alrededor de 30 pacientes sometidos a quimioterapia EP, por lo que ello clasifica el estudio como un análisis exploratorio (Freeman, 1987).

Por su parte, el análisis estadístico para evaluar asociación en cada tabla de contingencia para la búsqueda de relación entre efecto adverso según el grado y los genotipos se realizó mediante el estadístico Chi-cuadrado, en donde:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^q \frac{(t_{ij} - n_{ij})^2}{t_{ij}} \quad \text{con} \quad t_{ij} = \frac{n_{i*} \cdot n_{*j}}{N}$$

t_{ij} = valor de la frecuencia que teóricamente se observaría si las variables genotipo y grado de reacción adversa fueran independientes.

n_{i*} = frecuencia marginal para el genotipo

n_{*j} = frecuencia marginal para el grado de reacción adversa.

N = número total de pacientes que presentaron la reacción adversa independiente del grado.

La frecuencia marginal es la sumatoria de cada genotipo y grado de reacción adversa por separado.

Obtenido el valor de la ecuación para chi-cuadrado (observado), se compara este valor con el que está tabulado en la tabla de chi-cuadrado para un nivel de confianza de $(\text{genotipos} - 1) \times (\text{grados de reacción adversa} - 1)$ grados de libertad. Si este valor observado es mayor al obtenido en la tabla de chi-cuadrado, se puede asumir con determinado nivel de confianza que las diferencias entre las frecuencias observadas y teóricas son muy elevadas, y por ende existe dependencia entre las variables analizadas.

6 Resultados

6.1 Genotipos y frecuencias alélicas de UGT1A1*28, MDR1 3435, CYP3A4*1B, CYP3A5*3 en población general

La población en estudio consistió en voluntarios sanos hombres y mujeres, de la Región Metropolitana de Chile, reclutados por el laboratorio CQF de la Universidad de Chile durante el año 2012 a diciembre de 2015. La composición genética descrita para esta región es de un 40,55% origen Americano, 54,91% origen Europeo y 4,53% de origen africano (*Fuentes et al., 2014*)

Tabla 4. Características del grupo en estudio población general (voluntarios sanos).

Características	
Muestra total	224
Mujeres (%)	78 (34,8%)
Hombres (%)	146 (65,2%)
Edad (años) ±D.E	27,7 ± 8,01
IMC (kg/m²) ± D.E.	25,7 ± 3,59

D.E. Desviación estándar

6.1.1 Determinación de frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo UGT1A1*28 en la población de estudio.

Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron obtenidas por conteo directo de los genotipos obtenidos. En la Tabla N°5 se muestra la distribución genotípica de la muestra de población general, en donde se analizó a 224 voluntarios de los cuales 78 son mujeres y 146 son hombres

*Tabla 5. Frecuencias genotípica y alélica para UGT1A1*28 en población estudio.*

Genotipo	Alelo		Frecuencia		
	(TA) ₆	(TA) ₇	Genotípica	Alélica	
(TA) _{6/6}	214	-----	0,477	(TA) ₆	(TA) ₇
(TA) _{6/7}	95	95	0,424	0,689	0,310
(TA) _{7/7}	-----	44	0,098		

Equilibrio Hardy-Weinberg:

Para determinar si la presencia de los polimorfismos estudiados se distribuye en la población chilena sana de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg, se sumaron directamente las cantidades de alelos silvestres (G ó wt) y/o alelos mutados (A) y se reemplazaron en la siguiente ecuación:

$$p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 = 1$$

Donde p es igual a (TA)₆ y q es igual a (TA)₇. Si la ecuación se cumple, es decir, el cuadrado de los binomios de las frecuencias alélicas es uno y si los genotipos (TA)_{6/6}, (TA)_{6/7} y (TA)_{7/7} se encuentran en una relación p²: 2pq: q², se considera que los alelos se encuentran en equilibrio genético. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla N°6.

*Tabla 6. Test de chi-cuadrado para equilibrio Hardy-Weinberg, voluntarios sanos UGT1A1*28.*

Genotipo	GG (p²)	GA (2pq)	AA (q²)	TOTAL
N° Observado	107	95	22	224
N° Esperado	106,17	95,64	21,50	223,21
Cálculo de χ²	0,006488	0,004282	0,01162	0,0223

Para evaluar la significancia de estos resultados se aplica el test de chi cuadrado con 1 grado de libertad (3 genotipos – 2 alelos) y un valor P de 0,05 con lo que el valor chi cuadrado crítico es de 3,841. El valor chi cuadrado observado en la población analizada es de 0,0223, con lo cual se acepta la hipótesis nula y se puede decir que los resultados observados son independientes de los teóricos y por consiguiente se cumple el equilibrio Hardy-Weinberg (la muestra de voluntarios analizados es representativa para la población en estudio).

6.1.2 Determinación de frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos MDR1 3435, CYP3A4*1B y CYP3A5*3 en la población de estudio.

Junto con el polimorfismo anteriormente analizado en población chilena, se seleccionaron 35 pacientes voluntarios sanos para analizar el polimorfismo MDR1 3435 y dos grupos de 68 pacientes voluntarios sanos para analizar CYP3A4*1B y CYP3A5*3 respectivamente, con el fin de obtener un análisis genético más completo de la población chilena.

Tabla 7. Frecuencia genotípica de los voluntarios sanos analizados para los polimorfismos MDR1 3435, CYP3A4*1B y CYP3A5*3.

Polimorfismo	Frecuencia Genotípica Observada			Frecuencia Genotípica Teórica			Chi-cuadrado
MDR1 3435	18 (CC) (51,4%)	15 (CT) (42,8%)	2 (TT) (5,7%)	18 (CC)	15 (CT)	2 (TT)	0
CYP3A4*1B	61 (AA) (89,7%)	7 (AG) (10,3%)	0 (GG) (0%)	61 (AA)	7 (AG)	0 (GG)	0
CYP3A5*3	4 (AA) (5,9%)	22 (AG) (32,4%)	42 (GG) (61,7%)	3 (AA)	23 (AG)	21 (GG)	0,237

MDR1 3435 (C = alelo silvestre, T= alelo mutado), CYP3A4*1B (A = alelo silvestre, G = alelo mutado), CYP3A5*3 (A=alelo silvestre, G= alelo mutado).

Para comprobar la representatividad de la muestra se usó el test de chi-cuadrado al igual que con UGT1A1*28, con un grado de libertad y un valor P de 0,05, se obtuvo un valor chi-cuadrado observado menor a su valor crítico, con lo cual se asume que la muestra es representativa para la población en estudio.

Con los resultados de frecuencia genotípica anteriores, se procedió al cálculo de frecuencia alélica para cada polimorfismo presentados en la tabla 8.

Tabla 8. Frecuencia alélica de los voluntarios sanos analizados para los polimorfismos MDR1 3435, CYP3A4*1B y CYP3A5*3.

Polimorfismo	Frecuencia Alélica	
MDR1 3435	72,8% C	27,1% T
CYP3A4*1B	94,9% A	5,1% G
CYP3A5*3	22,1% T	77,9% C

MDR1 3435 (C = alelo silvestre, T = alelo mutado), CYP3A4*1B (A = alelo silvestre, G = alelo mutado), CYP3A5*3 (T=alelo silvestre, C= alelo mutado).

6.2 Respuesta terapéutica (eficacia y toxicidad) en pacientes con cáncer testicular (CaT) sometidos a terapia EP (Etopósido + Cisplatino).

6.2.1 Población en estudio

En el presente trabajo se han logrado reclutar quince pacientes desde el Instituto Nacional del Cáncer y Hospital San Juan de Dios, tratados con el esquema de cuatro ciclos Etopósido y cisplatino. La edad promedio alcanzó los 38 años con un rango entre 18 y 63 años de edad; en cuanto a histología, 14 de los pacientes fueron seminoma clásico y uno no seminoma. Este protocolo de quimioterapia (EP) es altamente infrecuente, con una tasa de ingreso de alrededor de 10 pacientes al año a dicho esquema de tratamiento. La mayoría de los pacientes son sometidos al esquema BEP (bleomicina + etopósido + cisplatino).

6.2.2 Evaluación de la Eficacia terapéutica

Se estableció un punto base según el estado inicial del grupo de pacientes. Para eso se tomaron en cuenta los valores de marcadores tumorales, también se tomó nota de las fechas en que empezaron el tratamiento y fechas de controles hasta donde fue factible y había registro. A partir de ese “estado basal” se analizó la terapia en función de los parámetros antes citados y se definió como respuesta completa la mantención de estos mismos en valores normales y la ausencia de recidivas (Mezvrishvili & Managadze, 2006). Los rangos de marcadores tumorales considerados para este análisis fueron:

AFP ng/ml

Valor anormal > **15**
Valor medio elevado 6,5
Rango encontrado 15 – 47,3

β -hCG U/L

Valor anormal > **5**
Valor medio elevado 17,1
Rango elevado 5,8 – 42,8

DHL U/L

Valor anormal > **200**
Valor medio elevado 306
Rango elevado 250 – 358

Fuente: (Mezvrishvili & Managadze, 2006)

Las características de los pacientes y marcadores tumorales post-tratamiento son listadas en la tabla N°11.

Tabla 9. Características de los pacientes con terapia EP.

<u>Características</u>		
Edad (años)		
Media	38	
Rango	18-63	
	n	%
Histología		
Seminoma	14	93
No seminoma (Carcinoma embrionario)	1	7
Marcadores tumorales anormales		
AFP (>15ng/ml)	0	0
β -hCG	2	13
DHL	3	20

Todos los pacientes incluidos en este estudio presentaron respuesta óptima al tratamiento, cabe mencionar la presencia de DHL alta en 3 pacientes las cuales disminuyeron al tercer ciclo de tratamiento en dos pacientes, estos mismos después evolucionaron favorablemente y sin anomalías durante los años de registro de seguimiento que presentan. El último caso restante de DHL alta corresponde un paciente que presentó neutropenia de grado 1 por la cual fue necesario postergar el cuarto ciclo de quimioterapia hasta estabilizarlo. Ya tratada la neutropenia se retomó la quimioterapia y la DHL bajó a valores normales, la cual se mantuvo en valores cercanos al límite superior permitido al año de seguimiento.

Uno de los pacientes al diagnóstico presentaba múltiples nódulos entre 3-4mm en ambos pulmones y adenopatías en el retroperitoneo que al segundo ciclo de quimioterapia fueron estabilizados y logró remisión completa de marcadores tumorales sin mayores complicaciones.

El paciente que presentó β -HCG alta logró su retorno a valores normales al segundo ciclo de quimioterapia, correspondió a un caso de seminoma que además presentaba masas retroperitoneales por lo cual se decidió LALA a los 10 días posterior al tercer ciclo de quimioterapia. Durante el tratamiento además presentó decaimiento severo y edema de

extremidades detectándose anemia por lo que se postergó el cuarto ciclo de quimioterapia. Ya tratada la anemia se procedió al cuarto ciclo lográndose regresión del volumen tumoral ganglionar retroperitoneal y buen estado en general durante el seguimiento post-quimioterápico.

Sólo un paciente con seminoma clásico sometido a cuatro ciclos de quimioterapia con buena respuesta y marcadores tumorales dentro de rangos normales presentó a los tres meses de seguimiento adenopatías retroperitoneales que serían recidivas por lo cual se deciden cuatro ciclos de cisplatino, vinblastina e ifosfamida.

6.2.3 Evaluación de la Toxicidad

Para este efecto se revisaron 141 fichas clínicas de pacientes con tratamiento PEB y EP de los cuales se rescataron los datos de reacciones adversas para pacientes EP. El tipo de reacciones adversas a analizar para evaluar la toxicidad fueron reacciones de tipo A, las cuales consisten en una respuesta exagerada, farmacológicamente predecible y dosis dependiente. Este tipo de reacciones tiene una incidencia y morbilidad elevadas, baja mortalidad y su tratamiento se basa en un ajuste de dosis. (Velázquez, 2004)

Entre los efectos tóxicos que son comunes a muchos agentes anticancerígenos quimioterápicos (AAQ) incluyen náuseas y vómitos, pérdida de pelo, estomatitis y leucopenia.

Las náuseas y vómitos son mucho más frecuentes para cisplatino, mostazas nitrogenadas, ciclofosfamida, dacarbazina, altas dosis de citarabina y actinomicina D. Los síntomas de náusea y vómito asociado a AAQ normalmente comienzan por lo general 2 horas después del tratamiento y pueden ser breves a prolongados y desaparecen dentro de 24 a 48 horas.

La pérdida de cabello ocurre por el efecto citotóxico en la población celular proliferante del cuero cabelludo. Esta pérdida de pelo ocurre por drogas como doxorubicina, daunorubicina, epirubicina y etopósido (Plenderleith, 1990).

La estomatitis e irritación o ulceración de las membranas mucosas es común ya que también son tejidos que están proliferando y principalmente ocurren por fármacos como doxorubicina, metotrexato, fluorouracilo y antraciclinas. Por eso, las membranas mucosas deben ser revisadas constantemente en búsqueda de placas blancas cremosas o manchas de moniliasis (*Candida albicans*) (Plenderleith, 1990).

La toxicidad a la médula ósea se refleja en leucopenias o en casos de pancitopenia que ocurre al usar AAQ. Aunque la mayoría de estos fármacos puede producir leucopenia, unos pocos pueden ser relativamente protectores de la medula ósea tales como Vincristina, Bleomicina y cisplatino, Debido a esto las dosis deben ser calculadas según el conteo de células sanguíneas antes del tratamiento (Plenderleith, 1990).

En el presente trabajo los 15 pacientes presentaron las siguientes reacciones adversas que fueron clasificadas en la tabla N°12 según la “Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)”

Tabla 10. Reacciones adversas según el grado, esquema EP.

Reacción adversa	N según el grado			
	Grado I	Grado II	Grado III	Grado IV
Alopecia	1	4		
Anemia	1	7	1	
Constipación	1			
Diarrea *	3			
Disnea	1			
Disuria		1		
Dolor abdominal	2			
Edema de extremidades *	1			
Fatiga			1	
Leucopenia	7	1	1	
Linfocitopenia	6	1		
Mucositis	2			
Nauseas	4	9		1
Nefrotoxicidad	1			
Neurotoxicidad	1			
Neutropenia	6	1		3
Neutropenia febril			3	
Ototoxicidad*	1			
Reacción dermatológica*	2			
Tinnitus	1			
Toxicidad hematológica	3	2	2	1
Trombocitopenia	5	2	1	
Vómitos	5	9		1

N = número de pacientes que presentan la reacción,

*Estas reacciones adversas se evaluaron según su presencia o ausencia.

Las reacciones adversas (RAMs) más frecuentes fueron los vómitos, náuseas, neutropenia y anemia con un 14,7%, 12,7%, 9,8% y 8,8% respectivamente. Estas últimas dos RAMs junto con la leucopenia (7,8%), linfocitopenia (6,8%), trombocitopenia (6,8%) y

toxicidad hematológica (6,8%) dejan de manifiesto a las reacciones de tipo hematológicas como las de mayor consideración tanto en frecuencia como en gravedad debido a que por reacciones como anemia, neutropenia y neutropenia febril (tres casos) fue necesario postergar algún ciclo de quimioterapia hasta lograr estabilizar al paciente.

El resto de RAMs ya con mucha menor frecuencia fueron diarreas, dolor abdominal, mucositis, reacciones dermatológicas, ototoxicidad, tinnitus, constipación, disnea, disuria, fatiga, edema de extremidades, nefrotoxicidad y neurotoxicidad.

6.2.4 Relación efectos adversos según el grado y los genotipos

a) Náuseas:

- CYP3A4

CYP3A4	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
*1/*1	13	1	14
*1/*1B	1	0	1
<i>f</i> marginal	14	1	15

De la muestra analizada catorce pacientes presentaron el genotipo *wild type* (*1/*1) y uno el heterocigoto (*1/*1B). Con un valor P de 0,05 y un grado de libertad para el test de chi-cuadrado se obtiene un valor de chi-cuadrado observado de 0,0764, que es mucho menor al valor crítico (3,8415) por lo que se asume que en la muestra estudiada no existe relación entre el grado del efecto adverso y el genotipo.

- ABCC3 -211C>T

ABCC3	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
CC	1	0	1
CT	6	0	6
TT	7	1	8
<i>f</i> marginal	14	1	15

Los genotipos heterocigoto y homocigoto mutado gradualmente aumentan en número en cuanto a la presencia del efecto adverso. El valor chi-cuadrado observado con un valor P de 0,05 y 2 grados de libertad es de 0,937, menor al valor crítico chi-cuadrado, por lo cual se asume que en la muestra estudiada no existe relación entre el genotipo y el grado de las náuseas.

- MDR1 3435

MDR1 3435	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
CC	8	0	8
CT	5	0	5
TT	1	1	2
<i>f</i> marginal	14	1	15

Presentando el efecto adverso en su mayoría los *wild type*, el test chi-cuadrado con dos grados de libertad y P value de 0,05 da un valor de chi-cuadrado observado de 6,96, mayor que el valor chi-cuadrado crítico. Con esto se asume que sí existe relación entre el grado de náuseas y el genotipo.

- UGT1A1

UGT1A1	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
*1/*1	7	1	8
*1/*28	7	0	7
<i>f</i> marginal	14	1	15

Con un grado de libertad y un valor P de 0,05 se obtiene un valor chi-cuadrado mucho menor del valor chi-cuadrado crítico asumiéndose que para UGT1A1 no existe relación entre el grado de náuseas y el genotipo.

b) Vómitos

- CYP3A4

CYP3A4	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
*1/*1	14	0	14
*1/*1B	1	0	1
<i>f</i> marginal	15	0	15

Como casi todos los pacientes son *wild type* para CYP3A4, el sentido de variable se pierde para este gen, por otra parte, los valores chi-cuadrado crítico y observado son casi idénticos por lo que no hay relación entre el genotipo y el grado del efecto adverso.

- ABCC3 -211C>T

ABCC3	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
CC	1	0	1
CT	5	0	5
TT	9	0	9
<i>f</i> marginal	15	0	15

Para ABCC3 no existe vómito grado III – IV por lo que no existe diferencia entre el valor observado en cada variable y lo calculado, por lo que se asume que no existe relación entre el grado del efecto adverso y el genotipo

- MDR1 3435

MDR1 3435	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
CC	8	0	8
CT	5	0	5
TT	2	0	2
<i>f</i> marginal	15	0	15

Al igual que en todos los genes, para la variable vómito no se presentaron casos de grado III – IV por lo que el valor e chi-cuadrado observado será mucho menor al de su valor crítico. Para MDR1 3435 de acuerdo a chi-cuadrado no existe relación entre genotipos y grado de vómitos.

- UGT1A1

UGT1A1	0 - II	III – IV	<i>f</i> marginal
*1/*1	8	0	8
*1/*28	7	0	7
<i>f</i> marginal	15	0	15

Finalmente, y según la distribución que presentaron los pacientes en cuanto a la variable cualitativa, se asume que no existe relación entre el genotipo y grado del efecto adverso.

c) Anemia

- CYP3A4

Como se dijo antes, para CYP3A4 hay 14 pacientes con el genotipo *wild type*, de los cuales ocho presentaron anemia grado 0 – II y uno grado III – IV. El paciente de genotipo *1/*1B no presentó anemia.

- ABCC3

ABCC3	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
CC	1	0	1
CT	3	0	3
TT	3	1	4
<i>f</i> marginal	7	1	8

Presentando una distribución mayoritariamente de efecto grado 0 – II, el valor chi cuadrado observado es menor a su valor crítico con lo que se asume que no existe relación entre genotipo y grado de anemia.

- MDR1 3435

MDR1 3435	0 – II	III - IV	<i>f</i> marginal
CC	4	0	4
CT	3	1	4
<i>f</i> marginal	7	1	8

Con los resultados obtenidos y solo ocho pacientes que presentaron el efecto adverso, el valor chi-cuadrado crítico es mayor al observado con lo cual no existe relación entre genotipo y grado de reacción adversa. Los pacientes con genotipo homocigoto mutado (TT) no presentaron anemia, por lo que ahora son dos grados de libertad para la tabla de contingencia y un valor P de 0,05.

- UGT1A1

UGT1A1	0 – II	III - IV	<i>f</i> marginal
*1/*1	5	0	5
*1/*28	3	1	4
<i>f</i> marginal	8	1	9

Según los valores se ve que no existe relación que pudiera sugerir asociaciones entre el efecto adverso y la mutación. Con un grado de libertad y valor P de 0,05 se asume que no existe relación entre genotipo y grado del efecto adverso.

d) Leucopenia

- CYP3A4

De los catorce catorce *wild type*, ocho presentaron leucopenia grado 0 – II y uno grado III – IV. El paciente heterocigoto no presentaba registro de anemia de ningún grado.

- ABCC3

ABCC3	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
CC	1	0	1
CT	4	0	4
TT	3	1	4
<i>f</i> marginal	8	1	9

Todos los pacientes, excepto uno, presentaron leucopenia grado 0 – II y el genotipo predominante fue el heterocigoto. Con dos grados de libertad y *P value* de 0,05 se obtiene un valor chi-cuadrado observado menor a su valor crítico por lo que se asume no hay relación entre genotipo y grado de reacción adversa.

- MDR1 3435

MDR1 3435	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
CC	5	1	6
CT	3	0	3
<i>f</i> marginal	8	1	9

Con solo nueve pacientes que presentan la reacción adversa, no se aprecia tendencia de la RAM por algún genotipo en específico, con un grado de libertad y valor P de 0,05 se asume que no hay relación entre genotipo y grado de la reacción adversa. Pacientes de genotipo TT no presentan la reacción adversa.

- UGT1A1

UGT1A1	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
*1/*1	4	1	5
*1/*28	4	0	4
<i>f</i> marginal	8	1	9

Cinco pacientes *wild type* y cuatro heterocigotos respectivamente presentaron el efecto adverso. Con un grado de libertad y *P value* de 0,05, no hay relación entre genotipo y grado de reacción adversa.

e) Neutropenia

- CYP3A4

De los catorce pacientes *wild type*, seis presentaron neutropenia grado 0 – II y tres de grado III – IV. El paciente heterocigoto no presentó neutropenia.

- ABCC3

ABCC3	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
CC	0	1	1
CT	3	1	4
TT	3	1	4
<i>f</i> marginal	6	3	9

Seis y tres pacientes presentaron RAMs grado 0 – II y III – IV respectivamente. Con dos grados de libertad y un valor *P* de 0,05 se asume que no hay relación entre genotipo y grado de efecto adverso, ya que el valor de chi-cuadrado crítico resultó ser mayor al observado.

- MDR1 3435

MDR1 3435	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
CC	3	2	5
CT	2	1	3
<i>f</i> marginal	5	3	8

Cada genotipo presentó al menos con un paciente la reacción adversa sin poder obtener mayores conclusiones. Ya que los pacientes de genotipo TT no presentan la reacción adversa, el test de chi-cuadrado queda con un grado de libertad y un valor *P* de 0,05, siendo el valor de chi-cuadrado observado menor a su valor crítico. Se asume la no existencia de relación entre genotipo y grado de reacción adversa.

- UGT1A1

UGT1A1	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
*1/*1	3	2	5
*1/*28	3	1	4
<i>f</i> marginal	6	3	9

De los quince pacientes solo nueve padecieron el efecto adverso, de estos 6 fueron de grado 0 – II y 3 de grado III – IV. Como caso parecido al de MDR1 3435 y asumiendo un valor P de 0,05 y un grado de libertad, se ve que no hay relación entre genotipo y grado de efecto adverso.

f) Trombocitopenia

- CYP3A4

De los catorce *wild type* solo siete pacientes sufrieron trombocitopenia grado 0 – II y uno de grado III – IV. El paciente de genotipo heterocigoto no registra datos de trombocitopenia.

- ABCC3

ABCC3	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
CC	1	0	1
CT	3	0	3
TT	3	1	4
<i>f</i> marginal	7	1	8

De los ocho pacientes que presentan la RAM, siete son de grado 0 – II y 1 de grado III – IV, según estos valores, con un grado de libertad y valor P de 0,05, el valor chi-cuadrado observado resultó ser menor a su valor crítico, con lo que se asume que no hay relación entre genotipo y grado de reacción adversa.

- MDR1 3435

MDR1 3435	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
CC	4	1	5
CT	3	0	3
<i>f</i> marginal	7	1	8

De los genotipos *wild type*, cuatro presentaron RAM grado 0 – II y uno grado III – IV; de los heterocigotos, solo 3 presentaron RAM grado 0 – III, mientras que los homocigotos mutados no presentaron trombocitopenia.

- UGT1A1

UGT1A1	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
*1/*1	4	1	5
*1/*28	3	0	3
<i>f</i> marginal	7	1	8

Cinco genotipos *wild type* presentan la RAM, cuatro son grado 0 – II y uno es grado III – IV. Solo tres heterocigotos presentaron la RAM. Con estos datos, un grado de libertad y un P value de 0,05, el valor chi-cuadrado crítico es mayor al observado con lo que se asume que no hay relación entre genotipo y grado de reacción adversa.

g) Linfocitopenia

- CYP3A4

De los catorce pacientes *wild type*, solo siete sufrieron linfocitopenia, siendo ésta de grado 0 – II. El paciente heterocigoto no presentó linfocitopenia.

- ABCC3

ABCC3	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
CC	1	0	1
CT	3	0	3
TT	4	0	4
<i>f</i> marginal	8	0	8

Solo ocho pacientes presentaron linfocitopenia y todos de grado 0 – II. De éstos, los más afectados fueron los de genotipo heterocigoto y homocigoto mutado. Sin embargo, con dos grados de libertad y valor P de 0,05, no hay relación entre genotipo y grado de linfocitopenia según el test de chi-cuadrado.

- MDR1 3435

MDR1 3435	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
CC	5	0	5
CT	3	0	3
<i>f</i> marginal	8	0	8

Pacientes de genotipo TT no presentan la reacción adversa, mientras que solo hay cinco y tres pacientes *wild type* y heterocigotos respectivamente que presentan la RAM en grado 0 – II. Con un grado de libertad y un valor P de 0,05, el chi-cuadrado crítico resulta ser mayor al observado con lo que se asume no existe relación entre genotipo y grado de RAM.

- UGT1A1

UGT1A1	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
*1/*1	5	0	5
*1/*28	3	0	3
<i>f</i> marginal	8	0	8

Los ocho pacientes mencionados resultan ser cinco *wild type* y tres heterocigotos para UGT1A1 con lo cual para un grado de libertad y valor P de 0,05, no hay relación entre genotipo y grado de linfocitopenia.

h) Toxicidad hematológica total

- CYP3A4

De los catorce catorce genotipos *wild type*, cinco pacientes presentaron toxicidad hematológica grado 0 – 2 y tres grado III – IV. El paciente heterocigoto no registra este efecto adverso en ficha.

- ABCC3

ABCC3	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
CC	0	1	1
CT	2	1	3
TT	3	1	4
<i>f</i> marginal	5	3	8

Con una distribución más o menos homogénea, solo ocho pacientes presentan la RAM y de estos, cinco son de grado 0 – II y tres de grado III – IV. Con dos grados de libertad y un valor P de 0,05, el chi-cuadrado crítico resulta ser mayor al observado con lo cual se asume que no hay relación entre genotipo y grado de efecto adverso.

- MDR1 3435

MDR1 3435	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
CC	3	2	5
CT	2	1	3
<i>f</i> marginal	5	3	8

Pacientes de genotipo TT no presentan la reacción adversa, quedando solo pacientes *wild type* y heterocigotos que se reparten entre RAM grado 0 – II y III – IV. Sin embargo, no existe relación de acuerdo a los cálculos entre el genotipo y grado de reacción adversa.

- UGT1A1

UGT1A1	0 - II	III - IV	<i>f</i> marginal
*1/*1	3	2	5
*1/*28	2	1	3
<i>f</i> marginal	5	3	8

Con una distribución más o menos homogénea de los ocho pacientes que presentaron la RAM, el test de chi-cuadrado arroja que no hay relación entre genotipo y grado de reacción adversa.

- En la siguiente tabla se muestran reacciones adversas asignadas por números y mostrando la frecuencia de genotipos que presentan y no presentan cada una de las reacciones adversas.

Tabla 11. Reacciones adversas según presencia o ausencia del efecto, esquema EP.

Gen	Reacción adversa									
	a		b		c		d		e	
	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
CYP3A4										
*1/*1	1	13	2	12	1	13	0	14	3	11
*1/*1B	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
CYP3A5*3	1	14	2	13	1	14	0	15	3	12
ABCC3										
CC	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0
CT	0	5	2	3	1	4	0	5	1	4
TT	1	8	0	9	0	9	0	9	1	8
MDR1 3435										
CC	1	7	1	7	0	8	0	8	2	6
CT	0	5	1	4	1	4	0	5	1	4
TT	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2
UGT1A1										
*1/*1	1	7	0	8	1	7	0	8	3	5
*1/*28	0	7	2	5	0	7	0	7	0	7

Gen	Reacción adversa									
	f		g		h		i		j	
	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
CYP3A4										
*1/*1	1	13	3	11	7	7	1	13	1	13
*1/*1B	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1
CYP3A5*3	1	14	3	12	8	7	1	14	1	14
ABCC3										
CC	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
CT	0	5	2	3	1	4	1	4	0	5
TT	1	8	1	8	6	3	0	9	1	8
MDR1 3435										
CC	1	7	1	7	5	3	0	8	1	7
CT	0	5	2	3	1	4	1	4	0	5
TT	0	2	0	2	1	1	0	2	0	2
UGT1A1										
*1/*1	1	7	2	6	3	5	1	7	1	7
*1/*28	0	7	1	6	4	3	0	7	0	7

a = Neurotoxicidad
 b = Ototoxicidad
 c = Neutropenia febril
 d = Infecciones
 e = Reacción dermatológica
 f = Nefrotoxicidad
 g = Diarrea
 h = Alopecia
 i = Cefalea
 j = Mucositis

Según los resultados presentados, solamente existe relación entre el polimorfismo MDR1 3435 y las náuseas, mientras que para todas las demás reacciones adversas no existe relación o no logra ser significativa estadísticamente.

Para CYP3A4 y CYP3A5 no es posible establecer asociación debido a que todos los pacientes presentan solo un genotipo (CYP3A5*3 y CYP3A4*1/*1, a excepción de un paciente que presenta el genotipo heterocigoto). Debido a esto solo se puede decir que de catorce pacientes presentan el genotipo CYP3A4*1/*1 y uno CYP3A4*1/*1B pero que no presentó reacciones adversas más allá de las náuseas, vómitos y alopecia en su ficha clínica (tampoco se vio hojas de enfermería con RAMs atribuibles a la quimioterapia). Por su parte CYP3A5 presenta su variante polimórfica CYP3A5*3 homocigota para los quince pacientes analizados por lo que pierde su carácter de variable.

En cuanto al perfil de toxicidad para este grupo de pacientes, la mayoría de los que sufrieron de náuseas, no presentan el polimorfismo MDR1 3435 homocigoto mutado y podría dar esto indicios del beneficio que tienen polimorfismos como MDR1 3435 en el metabolismo de la terapia antiemética.

En cuanto al caso de la anemia, se observa una distribución más o menos pareja en cuanto a los genotipos para ABCC3 y UGT1A1 mientras que para MDR1 no se observa el efecto adverso en los pacientes de genotipo homocigoto mutado. En general la mayoría de los pacientes sufrieron anemia de grado 0 – II sin notarse alguna inclinación en algún polimorfismo.

Este mismo patrón de distribución también lo presenta la leucopenia, neutropenia, trombocitopenia, linfocitopenia y toxicidad hematológica. Difieren sólo un poco la neutropenia y toxicidad hematológica total en que presentan más casos de efecto adverso grado III – IV.

De la tabla N°12 en que figuran reacciones adversas agrupadas no por grado, se ve que la mayoría de las RAMs desde la a - j para el gen CYP3A4 no la presentan más de tres pacientes *wild type* a excepción de la alopecia que la presentaron siete pacientes *wild type*.

La frecuencia en que se presentan estas reacciones adversas para este grupo analizado de mayor a menor es:

Alopecia > reacciones dermatológicas = diarrea > ototoxicidad > neurotoxicidad = neutropenia febril = nefrotoxicidad = cefalea = mucositis > infecciones.

La tabla muestra también que la distribución de genotipos para ABCC3 está inclinada hacia los heterocigotos y homocigotos mutados, en general no hay más de tres pacientes ya sea heterocigoto u homocigoto mutado que presenten algunas de las reacciones

adversas listadas de la 1 a 10, a excepción de la alopecia nuevamente que los que más la presentan son los pacientes con genotipo homocigoto mutado.

Para MDR1 los genotipos wild type son ocho y los otros siete se reparten entre heterocigotos y homocigotos mutados. La mayor particularidad es que pacientes con el genotipo TT no presentan ninguna de las RAM (excepción la alopecia).

En el caso de UGT1A1 se ve una distribución más o menos homogénea entre genotipos *1/*1 y *1/*28 sin una conclusión concreta respecto a las RAM.

6.3 Terapia EP vs PEB

En la tabla N°14 se comparó la toxicidad del esquema EP versus esquema PEB mediante odds ratios entre diecinueve pacientes sometidos a cuatro ciclos PEB y los quince pacientes sometidos a cuatro ciclos EP. Aquí los efectos adversos fueron contabilizados según su ocurrencia o no para cada paciente a lo largo de la quimioterapia.

Tabla 12. Comparación toxicidad esquema EP y PEB.

Reacción adversa	Pts EP	Odds EP	Pts PEB	Odds PEB	OR _{EP/PEB}	IC 95%
Gástricas						
Diarrea	3	0,25	1	0,0555	4,5	1,06 - 18,9
Mucositis	1	0,071	0	-----	-----	-----
Nauseas	15	-----	19	-----	-----	-----
Vómitos	15	-----	19	-----	-----	-----
Hematológicas						
Anemia	9	1,5	19	-----	-----	-----
Leucopenia	9	1,5	19	-----	-----	-----
Linfocitopenia	8	1,14	19	-----	-----	-----
Neutropenia	9	1,5	19	-----	-----	-----
Neutropenia febril	1	0,071	4	0,267	0,265	0,0285 – 2,495
Trombocitopenia	8	1,14	19	----	-----	-----
Neurológicos						
Cefalea	1	0,071	1	0,055	1,29	0,0714 – 23,09
Neurotoxicidad	1	0,071	2	0,117	0,606	0,0482 – 7,603
Otros						
Alopecia	7	0,875	4	0,266	3,289	0,738 – 14,57
Dermatológicas	3	0,25	3	0,187	1,333	0,223 – 7,97
Infecciones	0	-----	3	0,187	-----	-----
Nefrotoxicidad	1	0,071	0	-----	-----	-----
Ototoxicidad	2	0,153	0	-----	-----	-----

Pts = pacientes

Las dosis promedio por ciclo administradas en cada esquema quimioterapéutico fueron:

Tabla 13. Dosis promedio administrada por ciclo para cada esquema quimioterapéutico.

	EP	PEB
Medicamento	Dosis	Dosis
Etopósido	547 mg	927,3 mg
Cisplatino	184,4 mg	185,4 mg
Bleomicina	-----	90 UI

Dosis = dosis promedio por ciclo para el conjunto de pacientes

Según los resultados obtenidos se puede ver que el esquema EP resulta 4,5 - 1,29 – 3,29 y 1,33 veces más propenso a presentar diarrea, cefalea, alopecia y reacciones dermatológicas respectivamente que el esquema PEB. Por otra parte, el esquema EP presentó menor ocurrencia de efectos adversos como anemia, leucopenia, linfocitopenia, neutropenia, neutropenia febril, neurotoxicidad y trombocitopenia que el esquema PEB.

Si bien los resultados no permiten definir con claridad que esquema es menos tóxico, se puede decir que la quimioterapia sin bleomicina parece presentar menor toxicidad hematológica, neurológica (a excepción de las cefaleas) e infecciosa.

Estos resultados se asemejan a los de estudios realizados como el de Mezvrishvili & Managadze, (2006) en que se considera al esquema EP como el menos tóxico al presentar menos reacciones hematológicas, náuseas, vómitos, estomatitis, diarreas, parestesia y renales. Este estudio podría complementar la presente memoria ya que trabajó con quince pacientes al igual que en esta memoria, pero no seminomatosos (la presente memoria utilizó catorce pacientes con seminoma y uno con no seminoma). Otros estudios, como el de Collette L, (1997), han concluido que la toxicidad pulmonar ya sea aguda o tardía es significativamente mayor en el esquema PEB que en el esquema EP. Esto último permitió llegar al acuerdo en que quimioterapias sin Bleomicina están asociadas con menor toxicidad (Mezvrishvili & Managadze, 2006).

Sin embargo, la omisión de Bleomicina genera controversias en cuanto a la eficacia ya que en algunos estudios se ha observado compromiso de los resultados. Un estudio realizado por la Organización Europea para investigación y tratamiento del cáncer (EORTC) comparó ambos regímenes (EP y PEB) llegando a la misma conclusión respecto a la importancia de la bleomicina en cuanto a la eficacia de la quimioterapia (Collette L, 1997). Por otra parte, el esquema EP es considerado como una disminución de la intensidad de la quimioterapia comparada con el esquema PEB y se lo considera inaceptable desde que el

Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) demostrara resultados inferiores comparados con el tratamiento estándar.

Finalmente, otro punto a tener en cuenta es la comparación de tres ciclos EP versus tres ciclos PEB, el único estudio randomizado que compara esos regímenes dirigido por ECOG, mostró que más pacientes en PEB que en EP experimentaron leucopenia grado IV, aunque la diferencia no alcanza a ser estadísticamente significativa (Mezvrishvili & Managadze, 2006) Los resultados son difíciles de interpretar en este respecto y se hacen necesarios más estudios para determinar el uso o no de bleomicina y en cuantos ciclos para pacientes con mínimo a moderado estado de la enfermedad.

7 Discusión

En 1731 fue la primera descripción que se hizo de Etopósido con respecto a su notorio poder emético. Posteriormente en 1862, Bentley se percató que el extracto resinoso alcohólico de la planta, conocido como podofilina, tenía capacidad para tratar tópicamente algunos crecimientos cancerosos (Sinkule, 1984). Su estudio detallado comenzó en 1942 cuando Kaplan informó que la aplicación tópica de podofilina cura las verrugas venéreas (*Condiloma acuminatum*), pero en los ensayos clínicos pasó con poco éxito por su pobre respuesta y excesiva toxicidad. Fueron los científicos del laboratorio Sandoz en Basel quienes modificaron el compuesto natural obtenido de *Podophyllum emodi Wallich* o *Podophyllum peltatum Linnaeus* y sintetizaron Etopósido (Sinkule, 1984)

Los estudios pre-clínicos toxicológicos fueron difíciles de evaluar debido a la inherente toxicidad del solvente requerido para solubilizar la droga que *per se* es muy insoluble en agua. Problemas hematopoyéticos, linfáticos (leucopenia, trombocitopenia y anemia) y cambios patológicos en el tracto gastrointestinal y hepatocitos ocurrieron a dosis altas, pero no hubo animales muertos (Sinkule, 1984)

Por el lado de la farmacología, etopósido es probablemente uno de los agentes más activos usado en monoterapia para el tratamiento de cáncer pulmonar de pequeñas células, cáncer testicular, linfomas malignos y leucemia aguda no linfocítica. Debido a su buena actividad en monoterapia, la toxicidad manejable y a un único modo de acción, se ha evaluado etopósido en combinación con otros agentes en una variedad de neoplasmas. En esos estudios se encontró que etopósido presenta sinergia terapéutica con cisplatino, esa sinergia se ha encontrado también en clínica al usar etopósido y tenipósido en combinación

con cisplatino en cáncer pulmonar de pequeñas y no pequeñas células, linfoma maligno, cáncer testicular y neuroblastoma pediátrico (Sinkule, 1984).

La mielosupresión que genera limita el tratamiento con etopósido, evidenciándose en los días 7 – 10 en que ocurre leucopenia y la trombocitopenia que sucede 2 – 3 días después. La recuperación de esta leucopenia ocurre entre el día 20 y el 24. La toxicidad gastrointestinal es manifestada como náuseas y vómitos, estomatitis y diarrea ocurren con menor frecuencia (menos de la mitad de los pacientes) y son fáciles de manejar (Sinkule, 1984). También se produce alopecia reversible, pero el grado de alopecia parece ser menos severa que la producida por agentes tales como ciclofosfamida, vincristina o doxorubicina. Fiebre, reacciones de hipersensibilidad, hipotensión si la droga se administra en menos de 30 minutos y palpitations han sido reportados, pero esos efectos se pueden evitar al aumentar el tiempo de administración (Sinkule, 1984). Debido a esto último, se han realizado esquemas de administración y dosis recomendada con el fin de aminorar estos efectos adversos y mejorar la respuesta terapéutica. Para etopósido la dosis recomendada es de 50 – 100 mg/m² por día vía intravenosa por cinco días consecutivos o 100 mg/m²/día en días 1, 3 y 5 (Sinkule, 1984).

Ya en 1970 con el desarrollo de la quimioterapia sistémica (post-operatoria) a base de cisplatino y su constante mejora a través de ensayos clínicos aleatorios y bien diseñados se ha logrado dar cura a casi el 90% de pacientes que tienen tumor de células germinales con enfermedad metastásica de buen pronóstico. Un objetivo en la actualidad en cuanto a estos pacientes de buen pronóstico es reducir el tratamiento y optimizar la terapia, pero no se considera aceptable comprometer la excelente tasa de curación con tal de disminuir la toxicidad en este grupo de pacientes (Vaughn, 2007).

El abordaje para reducir el tratamiento ha sido determinar el número mínimo de ciclos de quimioterapia para maximizar la curación o adaptar la quimioterapia según las características genéticas que determinan la farmacocinética y/o farmacodinamia de las drogas usadas. La mayoría de las drogas anticancerígenas son metabolizadas para ser detoxificadas o también activadas. Los polimorfismos genéticos pueden inducir cambios profundos en la actividad enzimática lo que conduce a individual variabilidad en la eficacia y/o toxicidad de la droga (Roco et al., 2012).

En estudios realizados en Chile se han determinado frecuencias de polimorfismos que afectarían el metabolismo de estas drogas antineoplásicas y entre estos están CP3A4, CYP2E1, CYP1A2, GSTM, GSTT, MTHFR, entre otros (Roco et al., 2012). Estas enzimas metabolizan fármacos como etopósido, cisplatino, metotrexato, ifosfamida, etc.

En el presente trabajo se abordó esta adaptabilidad de la quimioterapia desde el enfoque farmacogenético y para ello se analizaron polimorfismos de enzimas citocromo P-450, glucuronosiltransferasas, proteínas de resistencia a drogas y transportadores como la P-glicoproteína. Sin embargo, de los seis polimorfismos propuestos, el MDR1 1236, no fue posible llevar a cabo debido a problemas de la técnica. Por otra parte en estudios en que comparan la distribución de este alelo en niños con síndrome nefrótico y voluntarios sanos, muestran que no hay una diferencia significativa entre ambos grupos de estudio, lo que sugiere que este SNP no debe ser un factor patogénico importante en niños con síndrome nefrótico (Youssef *et al.*, 2013); y podría indicar un comportamiento semejante entre MDR1 1236 y MDR1 3435.

En cuanto a los polimorfismos analizados, en específico, a los analizados en voluntarios sanos, se recopiló información de la frecuencia alélica y genética de estos mismos en otras poblaciones con el fin de establecer comparaciones (Tabla 9).

Tabla 14. Frecuencias alélicas para MDR1 3435, CYP3A4*1B y CYP3A5*3.

Polimorfismo	Frecuencias alélicas					
	Caucásicos*		Afroamericanos		Asiáticos	
MDR1 3435	0,480 (C)	0,52 (T)	0,840 (C)	0,160 (T)	0,570 (C)	0,430 (T)
CYP3A4*1B	0,977 (A)	0,023 (G)	0,321 (A)	0,679 (G)	1,00 (A)	0 (G)
CYP3A5*3	0,250 (A)	0,750 (G)	0,633 (A)	0,367 (G)	0,262 (A)	0,738 (G)

*Población caucásica se consideró europeos.

Asiáticos para MDR1 3435 se consideró japoneses.

Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

Tabla 15. Frecuencias genotípicas para MDR1 3435, CYP3A4*1B y CYP3A5*3.

Polimorfismo	Frecuencias genotípicas								
	Caucásicos			Afroamericanos			Asiáticos		
	wt	het	mut	wt	het	mut	wt	het	mut
MDR1 3435	0,240	0,480	0,280	0,680	0,310	0,01	0,340	0,460	0,200
CYP3A4*1B	1	0	0	0,071	0,500	0,428	1	0	0
CYP3A5*3	0	0,072	0,928	0,400	0,467	0,133	0,075	0,375	0,550

*Población caucásica se consideró Europeos.

Asiáticos para MDR1 3435 se consideró Japoneses.

wt: *wild type*; het: genotipo heterocigoto; mut: genotipo homocigoto mutado.

Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

Las tablas anteriores presentan las frecuencias genotípicas y alélicas (TABLA N° 7 y 8) para la población analizada, mostrando que los genotipos predominantes son *wild type* para MDR1 3435 y CYP3A4*1B, mientras que para CYP3A5*3 es el homocigoto mutado el

que presenta mayor frecuencia. Estos valores difieren con respecto a los presentados por otras poblaciones (TABLAS N° 9 y 10) como es en el caso de MDR1 3435 para caucásicos y asiáticos, en que predomina el genotipo heterocigoto, CYP3A4*1B y CYP3A5*3 para afroamericanos, en que predomina el genotipo heterocigoto.

Por otra parte, se observan particularidades de la población chilena con respecto a las demás que si bien pueden significar una diferencia en la farmacocinética, farmacodinámica y finalmente la respuesta terapéutica no son netamente las determinantes a tener en cuenta para modular la respuesta terapéutica con el fin de obtener menos daños colaterales. Entre estas particularidades cabe mencionar:

MDR1 3435, se ve que difiere en cuanto a frecuencias genotípicas y alélicas con el resto de poblaciones y presenta una distribución genética particular ya que los genotipos wild type y heterocigoto son los que están en mayor cantidad (51 y 43% respectivamente) en la población estudiada, mientras que en poblaciones de origen arabe por ejemplo esa frecuencia no supera el 34%, o en caucásicos y asiáticos, los cuales presentan en menor proporción ambos genotipos. Comparado con caucásicos y asiáticos la frecuencia alélica de la población estudio varía notoriamente, siendo mas parecida a la frecuencia de afroamericanos pero con mayor frecuencia del alelo mutado.

Para CYP3A4*1B, se aprecia solo genotipos *wild type* o heterocigotos a excepción de la población de afroamericanos que presenta el genotipo mutado homocigoto. Sin embargo, esta diferencia en actividad metabólica que conlleva esta mutación (disminución de la actividad de CYP3A4) es modesta y no implica una diferencia clínica importante entre afroamericanos y europeos. (Wandel *et al.*, 2000).

CYP3A5*3, presenta semejanza en cuanto al perfil chileno y asiático y varia ampliamente entre blancos canadienses y tribus africanas por ejemplo, pero se presentan alelos que pueden compensar la baja frecuencia de CYP3A5*3 en africanos y así entonces semejar la actividad metabólica que presentan los blancos. Esto sumado a la inespecificidad de sustratos y menor expresión de CYP3A5 comparado a CYP3A4 dificultan el poder explicar las diferencias interindividuales e interraciales que presentan la respuesta y *clearance* de drogas mediadas por CYP3A5 (Roy *et al.*, 2005).

En esta memoria, además del estudio en pacientes, se implementó la metodología de determinación del polimorfismo UGT1A1*28 en población chilena para lo cual se analizó a 224 voluntarios sanos (población chilena) de los cuales 78 son mujeres y 146 son

hombres. Estos arrojaron una frecuencia para el alelo (TA)₇ de 31% y 68,9% para el alelo (TA)₆, mientras que las frecuencias genéticas fueron 0,477, 0,424 y 0,098 para los genotipos (TA)_{6/6}, (TA)_{6/7} y (TA)_{7/7} respectivamente. Estos valores son muy parecidos a frecuencias como la de la población española o alemana, pero considerablemente diferentes comparado con población china la cual posee una frecuencia alélica de 88% para el alelo (TA)₆ y 12% para el (TA)₇ (Margozzini et al., 2013). Estos valores explican la prevalencia del síndrome de Gilbert que está asociado al alelo (TA)_{7/7}, y que se considera una condición frecuente en nuestra población (2,6%) (Margozzini et al., 2013), pero notoriamente menor comparado con africanos en donde el síndrome se presenta en alrededor de un 23% de la población (Burchell et al., 2000). Los resultados obtenidos concuerdan con otros estudios realizados en Chile como el de “Prevalencia de síndrome de Gilbert y sus determinantes genéticas en población chilena” (Margozzini et al., 2013) en que se obtienen las mismas frecuencias alélicas ((TA)₆ 69% y (TA)₇ 31%), variando un poco las frecuencias genotípicas ya que para el estudio citado fueron 50,5%, 37,8% y 11,7% para (TA)_{6/6}, (TA)_{6/7} y (TA)_{7/7} respectivamente.

El foco de mayor interés de este trabajo fue el análisis de respuesta terapéutica para el esquema de quimioterapia EP y la asociación de reacciones adversas con etopósido. A este respecto se han realizado estudios con el fin de medir la eficacia del esquema etopósido y cisplatino. Entre estos estudios, al tratar de hacer mediciones se han encontrado con la primera dificultad de establecer un sistema de clasificación pronóstica universal que ayude a valorar y comparar los resultados obtenidos por cada institución, entre estas: *Indiana University* y el *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (Vaughn, 2007). El *International Germ Cell Cancer Collaborative Group*, en 1970 desarrolló y publicó la *International Germ Cell Cancer Consensus Clasification* (IGCCC) (Soler, Muñoz, Y, & Mavrich, 2000), este sistema es ampliamente utilizado hoy en día y según éste consenso los pacientes que tienen un tumor de células germinales (TCG) metastásico de bajo riesgo tienen una supervivencia global a los 5 años del 85% para los pacientes con seminoma y del 92% para los tumores de células germinales no seminoma (TCGNS) (Vaughn, 2007). La supervivencia en el presente estudio fue del 100% para los quince pacientes que fueron reclutados entre los años 2003 a 2011, los cuales están en seguimiento a excepción de uno que dejó de asistir. Sin embargo, no es posible hacer una conclusión en base a este resultado debido a la pequeña muestra con que se trabajó a pesar de contar con la participación del Instituto Nacional del Cáncer que es institución de referencia para esta patología. Estos pacientes están clasificados como seminoma en etapa II o III y uno como

carcinoma embrionario, trece de los quince pacientes son clasificados como buen pronóstico mientras que los dos restantes son de pronóstico intermedio (ambos seminoma) por la presencia de metástasis viscerales. Esta clasificación es según el sistema de estadificación TNM creado por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la *International Union Against Cancer* (UICC).

La eficacia en el presente estudio se pretendió evaluar en primera instancia según la clasificación de la Universidad de Indiana que ha sido muy utilizada en otros estudios por el prestigio de la institución y su fácil utilización clínica, pero se descartó porque no considera el valor pronóstico de los marcadores tumorales que desarrolló el *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* de Nueva York (Soler et al., 2000). El uso de los marcadores tumorales supone algo de dificultad metodológica ya que su determinación es una variable continua de distribución no normal y suele requerir la conversión logarítmica o de raíz cuadrada de los valores para que sean manejables en una distribución normal (Soler et al., 2000). Utilizando entonces los marcadores para medir la eficacia, se debe tener en cuenta que como la mayoría de los pacientes son seminoma, la AFP (Alfafetoproteína) debería ser negativa (Velasco, Danitza, Antonio, & Boris, 2011) y para éstos, por otra parte, no existe evidencia concluyente sobre la utilidad de los marcadores tumorales en la vigilancia post-tratamiento, aún así fueron utilizados ya que cualquier aumento de éstos sería indicativo de algún relapso y los pacientes que han sido diagnosticados con seminoma puro, en la práctica suelen presentar tumor de células germinales mixto y deben tener elevada la AFP para relapsos después de la quimioterapia en enfermedad avanzada (Gilligan *et al.*, 2010). Tomando en cuenta las anteriores consideraciones se analizaron los marcadores tumorales y se observó en todos los pacientes la presencia de respuesta óptima al tratamiento, a excepción de DHL (Lactato deshidrogenasa) alta en 3 pacientes las cuales disminuyeron al tercer ciclo de tratamiento en dos pacientes y en el último caso restante de DHL alta, disminuyó a valores normales después de tratar la neutropenia sufrida y reincorporación a la quimioterapia.

El paciente que presentó β -Hcg alta logró su retorno a valores normales al segundo ciclo de quimioterapia, correspondió a un caso de seminoma que se le practicó LALA presentando masas retroperitoneales (10 días posteriores al tercer ciclo de quimioterapia). Durante el tratamiento se le detectó anemia por lo que se postergó el cuarto ciclo de quimioterapia y ya tratada la anemia se procedió al cuarto ciclo lográndose regresión del volumen tumoral ganglionar retroperitoneal y buen estado en general durante el seguimiento post-quimioterápico. Sólo un paciente con seminoma clásico sometido a cuatro

ciclos de quimioterapia con buena respuesta y marcadores tumorales dentro de rangos normales presentó a los tres meses de seguimiento adenopatías retroperitoneales que serían recidivas por lo cual se deciden cuatro ciclos de cisplatino, vinblastina e ifosfamida. Uno de los pacientes al diagnóstico presentaba múltiples nódulos entre 3-4 mm en ambos pulmones y adenopatías en el retroperitoneo que al segundo ciclo de quimioterapia fueron estabilizados y logró remisión completa de marcadores tumorales sin mayores complicaciones.

Los casos en que se debió postergar algún ciclo de quimioterapia fueron por neutropenia febril y anemia. Estas reacciones adversas están consideradas dentro de las normales en toda quimioterapia a base de cisplatino. Mientras tanto para etopósido se ha establecido leukopenia como la toxicidad hematológica más propia de este fármaco (Sinkule, 1984). Mediciones plasmáticas de etopósido libre y total han sido estudiadas en pacientes adultos con tumores sólidos, los cuales han recibido etopósido y cisplatino como quimioterapia. Los resultados han mostrado que los pacientes con mayor concentración plasmática libre de etopósido han experimentado mayor toxicidad hematológica (Clinton & Susan, 1991). Por otra parte hay estudios realizados en pacientes con cáncer pulmonar de células pequeñas, tratados con etopósido y cisplatino en donde se evalúan polimorfismos en el gen MDR1. Este gen codifica la P-glicoproteína, una bomba de eflujo de membrana dependiente de energía que actúa sobre una variedad compuestos lipofílicos y se ha determinado que pacientes con el genotipo TT para el polimorfismo MDR1 3435 presentan baja expresión duodenal de P-glicoproteína y por lo tanto mala respuesta a la quimioterapia mientras que pacientes con el genotipo *wild type* presentan buena respuesta a la terapia (población de estudio: caucásicos) (Sohn et al., 2006). Para el presente estudio se esperaba entonces que los pacientes TT fueran los más afectados en cuanto a la toxicidad hematológica sin embargo no fue el caso. Por un lado la razón a esto está en que solo se presentaron dos pacientes con este genotipo, pero por otro lado hay estudios con digoxina en que no se ha reportado diferencia en los niveles plasmáticos entre sujetos sanos caucásicos que portan el alelo 3435C y los 3435T (Sohn et al., 2006)

Otros estudios realizados con respecto al polimorfismo MDR1 3435 se han realizado evaluando la resistencia a ondansetron en terapias antieméticas. El problema de la emesis aumentó notoriamente con la aparición de cisplatino y aún más con el aumento de dosis de este mismo para el tratamiento del carcinoma epitelial de ovario y para los tumores de cabeza-cuello y de pulmón (Rubio y Sanchez, 1999).

El descubrimiento de las propiedades antiserotoninérgicas de altas dosis de metoclopramida y su eficacia en el control del vómito inducido por cisplatino condujo a la aparición de los antagonistas de la serotonina (antagonistas 5-HT3) (Sánchez, 1999). Ondansetrón es uno de los fármacos más utilizados para combatir las náuseas y vómitos posteriores a la quimioterapia y se han descrito polimorfismos que podrían influir en su acción (Farhat *et al.*, 2013)

En particular para este estudio, la mayoría de los pacientes que sufrieron de náuseas no presentan el polimorfismo MDR1 3435 homocigoto mutado, esto es concordante con estudios como el de Chio *et al.* 2010 que demostró una significativa asociación entre el polimorfismo de ABCB1 y la respuesta a ondansetrón en pacientes post-operatorios o el de Siddiqui *et al.* en 2003 que demostró que pacientes epilépticos con el genotipo TT para ABCB1 3435 exhibieron mejor respuesta a ondansetrón (Farhat *et al.*, 2013).

Continuando el análisis desde el punto de vista de polimorfismos, se observó que para CYP3A4 y CYP3A5 casi todos los pacientes presentaron el genotipo *wild type* y homocigoto mutado respectivamente, a excepción de un heterocigoto para CYP3A4. Se sabe que la enzima CYP3A4 es el principal, representando el 30% del total del citocromo P-450 en el hígado. Las isoenzimas CYP3A4 y CYP3A5 contribuyen al metabolismo de la mayor cantidad y más variados grupos de medicamentos de uso en la actualidad, aunque la 3A5 se expresa mucho menos que la 3A4 y carece de sustratos específicos (Andrés Arribas, 2010). Algunos estudios que evalúan los polimorfismos -392G y 6986G para CYP3A4 y CYP3A5 respectivamente se han relacionado con un mayor riesgo de presentar cáncer de células germinales testiculares debido al alto nivel circulante de estrógenos maternos durante el embarazo (Starr *et al.*, 2005).

Se sabe también de la facilidad con que puede ser modulada la actividad enzimática de CYP3A4, pero contrasta esto con el hecho de que no se han demostrado correlaciones genotipo-fenotipo farmacológico y no existe evidencia de una contribución significativa de los polimorfismos genéticos en la actividad de la enzima (Arribas, 2010). En este contexto, se ha estudiado el funcionamiento concertado de CYP3A4 con P-glicoproteína para reducir la concentración intracelular de xenobióticos, específicamente un estudio analizó el efecto modulador de los glucocorticoides sobre CYP3A4 y P-glicoproteína en la farmacocinética de etopósido y su metabolito catecol en niños con leucemia linfoblástica aguda observándose que cuando ocurre la inducción generada por el glucocorticoide sobre CYP3A4 y CYP3A5 ocurre también un aumento del *clearance* de etopósido, sin embargo, el efecto observado no es concluyente. Al mismo tiempo, los pacientes con genotipo CC

par MDR1 3435 tendrían aumentado el *clearance* de etopósido cuando se los ha tratado con glucocorticoide (Kishi *et al.*, 2010).

8 Conclusiones

- En el presente estudio se logró implementar con éxito la técnica PCR-SSCP y posterior tinción con nitrato de plata para genotipificar UGT1A1*28, metodología considerada “gold standard” para su determinación, y compararla con los resultados obtenidos por PCR-tiempo real, determinando de este modo, su frecuencia en voluntarios sanos chilenos. La comparación de ambas técnicas permitió definir que si bien la tinción por nitrato de plata es más compleja, posee más pasos susceptibles a cometer errores y demora más tiempo, es una técnica que presenta mejor especificidad y resulta más económica, a diferencia de la metodología *Taqman* que en particular su fundamento de *primers* marcados con fluoróforos es muy susceptible al ensanchamiento del rango de fusión y la compresión de la temperatura de fusión entre genotipos diferentes, lo cual puede dar resultados ambiguos.
- Se logró genotipificar y determinar con éxito las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes polimórficas de ABCB1 3435>C/T (rs1045642) mediante PCR-RFLP, ABCC3 -211C/T (rs4793665), CYP3A4*1B (rs2740574), CYP3A5*3 (rs776746) mediante PCR-RT y UGT1A1*28 (rs8175347) mediante PCR-RT y SSCP, en pacientes con CaT. Mostrando que:
 - El genotipo wild type para MDR1 3435 es el predominante en pacientes con CaT.
 - El genotipo wild type para CYP3A4*1B es el predominante en pacientes con CaT.
 - El genotipo homocigoto mutado para CYP3A5*3 es el predominante en pacientes con CaT.
 - Los genotipos wild type y heterocigoto para UGT1A1*28 presentan frecuencias semejantes en pacientes con CaT.
 - El genotipo homocigoto mutado para ABCC3 -211 es el predominante en pacientes con CaT.
- Se identificaron con éxito las variables clínicas asociadas con la toxicidad en pacientes con CaT sometidos a quimioterapia con etopósido. Los exámenes más importantes fueron el hemograma y el de química sanguínea. Con estos exámenes se pudo definir que el perfil toxicológico para este esquema quimioterapéutico consiste en vómitos, náuseas y reacciones de tipo hematológicas.

- Se identificaron con éxito las variables clínicas relacionadas con la eficacia del tratamiento en pacientes con cáncer testicular sometidos a quimioterapia con etopósido. Todos los pacientes presentaron respuesta óptima al tratamiento a excepción de 3 de ellos que tardaron en lograr estabilizarse sus marcadores tumorales.
Solo un paciente presentó recidivas por lo cual fue necesario aplicar 4 ciclos VIP.
- No se encontró asociación entre reacciones adversas y genotipos, a excepción de MDR1 3435 y náuseas.
- Se comparó el esquema quimioterapéutico etopósido-cisplatino vs bleomicina-etoposido-cisplatino, mostrando que el esquema EP presentó menor ocurrencia de efectos adversos como anemia, leucopenia, linfocitopenia, neutropenia, neutropenia febril, neurotoxicidad y trombocitopenia que el esquema PEB.

9 Referencias Bibliográficas

- American Cancer Society* (s.f). Cáncer de testículo. Atlanta, Georgia, Estados Unidos.
Recuperado de:<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002323-pdf.pdf>
- Albers, P., Albrecht, W., Algaba, F., Bokemeyer, C., Cedermark, G. C., Fizazi, K., y Laguna, M. P. (2010). Guía clínica sobre el cáncer de testículo. © European Association of Urology 2010,
- Arribas, A. (2010). Farmacogenética y variabilidad interindividual en la respuesta a los medicamentos. Discurso de contestación del académico de número y presidente EXCMO. SR. DR. D. Manuel José López Pérez
- Bassam, B. J., Caetano-Anollés, G., & Gresshoff, P. M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196(1), 80–83
- Burchell, B., Soars, M., Monaghan, G., Cassidy, A., Smith, D., & Ethell, B. (2000). Drug-mediated toxicity caused by genetic deficiency of UDP-glucuronosyltransferases. *Toxicology Letters*, 112-113, 333–340
- Campuzano. (2010). Utilidad clínica de los marcadores tumorales. *Revista Médica de Jaén*, 16(4), 2–12
- Cavalli, S. A., Hirata, M. H., & Hirata, R. D. (2001). Detection of MbolI polymorphism at the 5' promoter region of CYP3A4. *Clinical Chemistry*, 47(2), 348–51
- Clinton, F., & Susan, G. (1991). Relation of systemic exposure to unbound etoposide and hematologic toxicity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 50(4), 385 - 393
- Collette, L., Wit, R., Stoter, G., Sleijfer, D., Jones, W., Huinink, W., Rea, L., y Sylvester, R. (1997). Importance of bleomycin in combination chemotherapy for good-prognosis testicular nonseminoma: a randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group. *Journal of Clinical Oncology*, 15(5), 1837 - 1843
- Drugbank Version 4.5. (2016, 24 de mayo). Etoposide. Recuperado de:
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00773#transporters>
- Farhat, K., Ismail, M., Ali, S., y Pasha, A. K. (2013). Resistance to ondansetron: Role of pharmacogenetics in post-operative nausea and vomiting. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 14(4), 331–336
- Feldman, D. R., Bosl, G. J., Sheinfeld, J., y Motzer, R. J. (2008). Medical treatment of advanced testicular cancer. *JAMA*, 299(6), 672–84
- Fuentes, M., Pulgar, I., Gallo, C., Bortolini, M. C., Canizales-Quinteros, S., Bedoya, G., ...

- Rothhammer, F. (2014). Geografía genética de Chile. Distribución regional de los aportes genéticos Americanos, Europeos y Africanos. *Revista Médica de Chile*, 142(3), 281–289
- Gasser, R. B., Hu, M., Chilton, N. B., Campbell, B. E., Jex, A. J., Otranto, D., ... Zhu, X. (2006). Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nature Protocols*, 1(6), 3121–3128
- Gilligan, T. D., Seidenfeld, J., Basch, E. M., Einhorn, L. H., Fancher, T., Smith, D. C., ... Hayes, D. F. (2010). American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline on uses of serum tumor markers in adult males with germ cell tumors. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(20), 3388–404
- Hamdy, S. I., Hiratsuka, M., Narahara, K., Endo, N., El-Enany, M., Moursi, N., ... Mizugaki, M. (2003). Genotype and allele frequencies of TPMT, NAT2, GST, SULT1A1 and MDR-1 in the Egyptian population. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 55(6), 560–569
- Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H. P., Brockmüller, J., Johne, a, ... Brinkmann, U. (2000). Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3473–3478
- Incaici, M. D., Rossi, C., Zucchetti, M., Urso, R., Cavalli, F., Mangioni, C., ... Sessa, C. (1986). Pharmacokinetics of Etoposide in Patients with Abnormal Renal and Hepatic. *Cancer research*, 46, 2566–2571
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., y Thun, M. J. (2007). Cancer statistics, 2007. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 57(1), 43–66
- Kawashiro, T., Yamashita, K., Zhao, X.J., Koyama, E., Tani, M., Chiba, K., e Ishizaki, T.(1998). A Study on the Metabolism of Etoposide and Possible Interactions with Antitumor or Supporting Agents by Human. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 286(3), 1294–1300.
- Kishi, S., Yang, W., Boureau, B., Morand, S., Das, S., Chen, P., ... Cook, E. H. (2010). Effects of prednisone and genetic polymorphisms on etoposide disposition in children with acute lymphoblastic leukemia Effects of prednisone and genetic polymorphisms on etoposide disposition in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 103(1), 67–72

- Lagas, J. S., Fan, L., Wagenaar, E., Vlaming, M. L. H., Telling, O. Van, Beijnen, J. H., y Schinkel, A. H. (2009). P-glycoprotein (P-gp/Abcb1), Abcc2, and Abcc3 Determine the Pharmacokinetics of Etoposide. *Clinical Cancer Research*, 16(1), 130–141.
- Lazalde. (2012). Polimorfismos de relevancia farmacocinética de las familias 1A2, 2C y 3A en población indígena del noroeste de México (Tesis doctoral). Universidad de Extremadura. Badajoz
- Margozzini, P., Azócar, L., Molina, H. R., Vera, A., Villarroel, L., Arrese, M., ... Miquel, J. F. (2013a). Prevalencia de síndrome de Gilbert y sus determinantes genéticas en población chilena. *Revista Médica de Chile*, 141(10), 1266–1274
- Margozzini, P., Azócar, L., Molina, H. R., Vera, A., Villarroel, L., Arrese, M., ... Miquel, J. F. (2013b). Prevalencia de síndrome de Gilbert y sus determinantes genéticas en población chilena. *Revista Médica de Chile*, 141(10), 1266–1274.
- Mezvrishvili, Z., y Managadze, L. (2006). Three cycles of etoposide and cisplatin chemotherapy in clinical stage IS nonseminomatous testicular cancer. *International Urology and Nephrology*, 38(3-4), 621–624
- Milojkovic, M., Stojnev, S., Jovanovic, I., Ljubisavljevic, S., Stefanovic, V., y Sunder-Plassman, R. (2011). Frequency of the C1236T, G2677T/A and C3435T MDR1 gene polymorphisms in the Serbian population. *Pharmacological Reports*, 63(3), 808–814
- Ministerio De Salud. (2010). Cáncer de Testículo en personas de 15 años y más. *Ministerio de Salud, Gobierno de Chile*. Santiago
- National Center for Biotechnology. (2016a). Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs8175347. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=8175347
- National Center for Biotechnology. (2016b). Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs4793665. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4793665
- Perera, MA., Innocenti, F., y Ratain, MJ. (2008). Pharmacogenetic testing for uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 polymorphisms: are we there yet? *Pharmacotherapy*, 28(6), 755–68
- PharmGKB®. (2001 - 2016). Etoposide Pathway, Pharmacokinetics/Pharmacodynamics. Recuperado de: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA2025>
- Plenderleith, I. H. (1990). Treating the treatment: toxicity of cancer chemotherapy. *Canadian Family Physician*, 36, 1827–1830.
- Roco, A., Quiñones, L., Agundez, J. A. G., Garcia-Martin, E., Squicciarini, V., Miranda, C.,

- ... Varela, N. (2012). Frequencies of 23 functionally significant variant alleles related with metabolism of antineoplastic drugs in the Chilean population: Comparison with caucasian and Asian populations. *Frontiers in Genetics*, 3(229), 1–9
- Roy, J., Lajoie, J., Zijenah, L., Barama, A., Poirier, C., Ward, B., y Roger, M. (2005). CYP3A5 genetic polymorphisms in different ethnic populations. *Pharmacology*, 33(7), 884–887
- Sakaeda, T., Nakamura, T., & Okumura, K. (2003). Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Pharmacogenomics*, 4(4), 397–410
- Sanchez, A., & Ginez, J. (1999). Antieméticos y quimioterapia: evolución histórica y estudio comparativo de los antagonistas de la serotonina. recomendaciones actuales. *Servicio de farmacia. Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca (Baleares)*, 24(4), 187 - 214
- Sasaki, T., Hirota, T., Ryokai, Y., Kobayashi, D., Kimura, M., Irie, S., ... Ieiri, I. (2011). Systematic Screening of Human ABCB1 Polymorphisms and Their Effects on MRP3 Expression and Function. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 26(4), 374–386
- Madariaga B, J. (2005). Cancer Testicular: Estudio De Extensión Con Tc De Cuerpo Entero. *Revista Chilena de Radiología*, 11(4), 193 - 200
- Sensorn, I., Sirachainan, E., Chamnanphon, M., Pasomsub, E., Trachu, N., Supavilai, P., ... Pinthong, D. (2013). Association of CYP3A4/5, ABCB1 and ABCB2 polymorphisms and clinical outcomes of Thai breast cancer patients treated with tamoxifen. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 6(1), 93–98
- Shastri, B. S. (2009). SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods in Molecular Biology*, 578, 3–22
- Shirazi, F., Bahrami, G., Stewart, D., Tomiak, E., Delorme, F., Noel, D., & Goel, R. (2001). A rapid reversed phase high performance liquid chromatographic method for determination of etoposide (VP-16) in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25(3-4), 353–356
- Sinkule, J. a. (1984). Etoposide: a semisynthetic epipodophyllotoxin. Chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, adverse effects and use as an antineoplastic agent. *Pharmacotherapy*, 4(2), 61–73.
- Sohn, J. W., Lee, S. Y., Lee, S. J., Kim, E. J., Cha, S. I., Kim, C. H., ... Park, J. Y. (2006). MDR1 polymorphisms predict the response to etoposide-cisplatin combination chemotherapy in small cell lung cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 36(3)

- Soler, R., Muñoz, J., Maroto, P., & Villavicencio, H. (2000). Decisión terapéutica en tumores de células germinales testiculares avanzados. *Monográfico cáncer de testículo*, 53(6), 522–533
- Starr, J. R., Chen, C., Doody, D. R., Hsu, L., Ricks, S., Weiss, N. S., & Schwartz, S. M. (2005). Risk of testicular germ cell cancer in relation to variation in maternal and offspring cytochrome P450 genes involved in catechol estrogen metabolism. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 14(9), 2183–2190
- Trontelj, J., Marc, J., Zavratnik, A., Bogataj, M., & Mrhar, A. (2009). Effects of UGT1A1*28 polymorphism on raloxifene pharmacokinetics and pharmacodynamics. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 67(4), 437–444
- Vaughn, D. J. (2007). Quimioterapia para los tumores de células germinales de bajo riesgo : conceptos y controversias actuales, 34, 171–177
- Velasco, L., Danitza, P., Antonio, L., y Boris, M. A. (2011). Tumor canceroso testicular : Seminoma clásico, 14(1), 43–44
- Velázquez, P., (2004). Farmacología básica y clínica. Buenos aires; Madrid: Médica Panamerica.
- Wandel, C., Witte, J. S., Hall, J. M., Stein, C. M., Wood, A. J. J. and W. (2000). CYP3A activity in African American and European American men: Population differences and functional effect of the CYP3A4*1B 5'-promoter region polymorphism. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 68(1), 82 - 91
- Yang, J., Bogni, A., Schuetz, E. G., Ratain, M., Dolan, M. E., McLeod, H., ... Altman, R. B. (2009). Etoposide pathway. *Pharmacogenetics and Genomics*, 19(7), 552–3
- Yousef, A.-M., Bulatova, N. R., Newman, W., Hakooz, N., Ismail, S., Qusa, H., ... Al-Diab, O. (2012). Allele and genotype frequencies of the polymorphic cytochrome P450 genes (CYP1A1, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19) in the Jordanian population. *Molecular Biology Reports*, 39(10), 9423–33
- Youssef, D. M., Attia, T. A., y El-Shal, A. S. (2013). Multi-drug resistance-1 gene polymorphisms in nephrotic syndrome: Impact on susceptibility and response to steroids. *Gene*, 530(2), 201–207
- Zhuo, X., Zheng, N., Felix, C. A., & Blair, I. A. (2004). Kinetics and regulation of cytochrome P450-mediated etoposide metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(9), 993–1000.
- Zou, JJ., Chen, SL., Tan, J. (2013). Effect of the ABCC3 -211C/T polymorphism on clopidogrel responsiveness in patients with percutaneous coronary intervention.

10 ANEXOS

10.1 ANEXO N°1, APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA



Dirección
Comité de Ética de la Investigación
Dr. CNC/lcc

Santiago, agosto 16 de 2013

De: CEI SSMN

A: Prof. Luis Quiñones, PhD.
Investigador Principal
Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

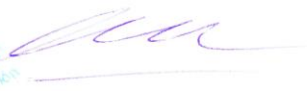
Ref.: Proyecto FONDECYT: "Mejorando la evaluación de riesgo de cáncer testicular y su farmacoterapia mediante la farmacogenómica (Improving testicular cancer risk evaluation and pharmacotherapy through pharmacogenomics)".

Estimado Prof. Quiñones:

Acuso recibo de su carta de fecha 8 de julio de 2013 por la cual solicita aprobación de este Comité del proyecto de la referencia.

Este proyecto es observacional (sin intervención sobre los sujetos) por lo que de acuerdo a nuestro Reglamento le doy Aprobación Ejecutiva.

Lo saluda atentamente,


Organismo Asesor de la Dirección
Servicio de Salud Metropolitano Norte
DR. CARLOS NAVARRO COX
PRESIDENTE CEI-S.S.M.N.

Calle San José 1053,
Independencia, Santiago, Chile
Fono: (56-2) 575 8506
www.ssmn.cl

10.2 ANEXO N°2, CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

El objetivo de este documento es entregar la información necesaria para que Usted decida voluntariamente si desea participar en esta investigación.

Estimado Señor(a)

Nos dirigimos a usted con el propósito de solicitar su colaboración en el proyecto de investigación "Mejorando la evaluación del riesgo de cáncer testicular y su farmacoterapia a través de la farmacogenómica (Improving testicular cancer risk evaluation and pharmacotherapy through pharmacogenomics)"

OBJETIVO

Este estudio tiene como objetivo obtener información que en un futuro permitirá diseñar un perfil genético que facilite el diagnóstico de la susceptibilidad de la población a presentar cáncer testicular y que permita optimizar las dosis de los medicamentos utilizados en la quimioterapia de modo que se observen menores efectos secundarios y mejor respuesta clínica.

PROCEDIMIENTOS

Su colaboración en este proyecto consiste en la donación voluntaria de una muestra sanguínea, de aproximadamente 5 cc, o de una muestra de células de mucosa oral que se encuentran en la saliva (hisopado bucal), las cual serán extraídas con un sistema estéril y por personal calificado, de tal manera de evitar cualquier riesgo. Esta muestra será utilizada para obtener DNA (material genético) para estudiar los genes de las enzimas que participan en la respuesta a cisplatino, bleomicina, etopósido.

Para oficializar su colaboración voluntaria en este tipo de estudio, usted deberá llenar una breve ficha clínica de la investigación que incluye datos de identificación personal y médica a la cual el equipo investigador tendrá acceso.

Estos estudios genéticos serán realizados en el laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQP) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

RIESGOS/BENEFICIOS

La única molestia eventual puede ser la aparición de un pequeño hematoma (moretón) en la zona de toma de muestra sanguínea lo cual es infrecuente y no representa un riesgo relevante.

No existirá un beneficio directo a su persona, sin embargo, los resultados obtenidos con su muestra a futuro podrían permitir en pacientes en tratamiento de quimioterapia utilizar esquemas terapéuticos más personalizados, con menos reacciones adversas y más efectivos.

CEI-SSM.NORTE
Organismo Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte

19 NOV. 2014

COSTOS

Este estudio no tiene costo alguno para Ud. Todo análisis o examen propio del proyecto y que no son necesarias para el estudio o tratamiento habitual de su enfermedad serán financiados por el presente proyecto de investigación.

CONFIDENCIALIDAD

Se le asegura que tanto el investigador principal como los demás integrantes del grupo de investigación garantizarán la privacidad de la información que surja de su examen científico.

La muestra será almacenada mediante un código, el cual no revelará información personal y a la cual sólo tendrá acceso los investigadores del mencionado proyecto. Los resultados obtenidos en este estudio pueden ser dados a conocer a usted, solamente una vez que estos se encuentren disponibles y en la forma y formato que el comité de ética pertinente lo establezca.

Además es necesario extraer datos clínicos relevantes desde su ficha clínica, para esto, su identidad será codificada igual que sus muestras sanguíneas. Sólo su equipo tratante tendrá acceso a su ficha clínica.

Sus muestras serán almacenadas por un periodo de 5 años en el laboratorio CQF, bajo la responsabilidad del Dr. Luis Quiñones y serán utilizadas exclusivamente para los fines de este estudio.

VOLUNTARIEDAD

Su decisión de participar en el estudio es absolutamente voluntaria, Ud. tiene el derecho de negarse a participar en el estudio o solicitar la destrucción de su muestra de ADN, sin expresar razón ni causa y sin que esto signifique perjuicio alguno para usted.

DERECHOS DEL PARTICIPANTE

Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con el Dr. Luis Quiñones S, investigador científico (F: 02-26817756, e-mail: lquinone@med.uchile.cl) o la Dra. Berta Cerda, investigador Clínico (F: 09-98896106, e-mail: bertacerda@gmail.com).

Nota: Este consentimiento informado puede contener palabras que usted no comprenda. Por favor, consulte al médico responsable o a cualquiera de los colaboradores, cualquier palabra o información que usted no comprenda claramente, antes o durante el estudio

CEI-SSM NORTE
Organismo Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte

19 NOV. 2014

2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Fecha:

Yo..... RUT:.....

He sido invitado(a) a participar como voluntario(a) en el proyecto de investigación titulado "Mejorando la evaluación del riesgo de cáncer testicular y su farmacoterapia a través de la farmacogenómica (Improving testicular cancer risk evaluation and pharmacotherapy through pharmacogenomics)", dirigido por los Doctores. Luis Quiñones y Berta Cerda.

He leído y comprendido la información entregada para mi consentimiento informado, y se me han explicado todas mis dudas, por lo tanto:

Indique: SI o NO	Aspectos o ámbitos
	Conozco y entiendo el OBJETIVO del estudio.
	Comprendo y acepto los PROCEDIMIENTOS a los cuales debo someterme.
	Conozco los posibles RIESGOS y BENEFICIOS asociados a mi participación en este estudio.
	Acepto los resguardos sobre la CONFIDENCIALIDAD de mis datos personales, resultados médicos, análisis clínicos de laboratorio.
	Estoy totalmente informado sobre la VOLUNTARIEDAD de mi participación en este estudio, y completamente consciente de la posibilidad de retirarme del estudio si yo así lo determino.
	He sido instruido sobre mi DERECHO a consultar cualquier duda referente al presente estudio y de retirarme del estudio si yo así lo determino.

Leído y entendido el presente consentimiento, accedo a participar como voluntario en este estudio, firmando el presente documento.

RUT y Firma Voluntario	RUT Y Firma Investigador Responsable o Delegado	RUT y Firma Responsable de la toma del C.I.

**Esta investigación fue evaluada y aprobada por el comité de ética en investigación en seres humanos (CEISH), en caso de dudas sobre sus derechos favor consultar al Fono: 29786923 o vía email: mvidela@med.uchile.cl*

CEI-SSM.NORTE
Organismo Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte

19 de ... 2014

3

10.3 ANEXO N°3, FORMULARIO DE REPORTE DE CASO

Proyecto de Investigación Cáncer Testicular Fondoeyt Regular #1140434

ANEXO V FORMULARIO DE REPORTE DE CASO

Iniciales Página de

HOJA DE INGRESO PACIENTES (CRF1)

GRUPO SANGUINEO: N° Ingreso: CT-

I. IDENTIFICACIÓN:

FECHA MUESTRA R.U.T.: Fecha de Nacimiento:

APPELLIDO PATERNO	APPELLIDO MATERNO	NOMBRES
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

DIRECCION TELEFONOS Email

OCCUPACION

PESO: TALLA:

II.- ANTECEDENTES DE LA ENFERMEDAD:

Diagnóstico:

Tiempo que lleva la enfermedad años meses

Resultado de biopsia:

III.- FAMILIARES CON CÁNCER:

Padre, enfermedad:	SI <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No sabe <input type="checkbox"/>	Tipo: <input type="text"/>
Absoluc. paternos, enfermedad:	SI <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No sabe <input type="checkbox"/>	Tipo: <input type="text"/>
Madre, enfermedad:	SI <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No sabe <input type="checkbox"/>	Tipo: <input type="text"/>
Abuelos Maternos, enfermedad:	SI <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No sabe <input type="checkbox"/>	Tipo: <input type="text"/>
Terninas, enfermedad:	SI <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No sabe <input type="checkbox"/>	Tipo: <input type="text"/>
Hija, enfermedad:	SI <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No sabe <input type="checkbox"/>	Tipo: <input type="text"/>

IV. EXPOSICIÓN A AGENTES TÓXICOS:

Fumador SI No Cigarrillos/día Tiempo

Ex-Fumador Cigarrillos/día Tiempo

Alcohol SI No Copas/día Copas/d. de semana Tiempo

Ex-Bebedor Copas/día Copas/d. de semana Tiempo

Consumo de drogas SI No Indique droga

TRATAMIENTO

Esquema

Cisplatino mg/m² Etoposido mg/m² Bleomicina U

CEL-SSM NORTE
 Organismo Asesor de la Dirección
 Servicio de Salud
 Metropolitana Norte
 04 DIC 2015

HOJA DE EVENTOS ADVERSOS (CRF2)

Fecha / /201 Ciclo N° Iniciales Página de

Ciclo N° Día Fecha comienza / / Fecha término / /

Fecha de reporte / / Reporte

Fecha de suceso / / Frecuencia, N° de veces p.

Descripción Evento Adverso

Acción Tomada:

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Ninguna | <input type="checkbox"/> Diminución de dosis medicamento |
| <input type="checkbox"/> Tratamiento farmacológico | <input type="checkbox"/> Discontinuidad temporal medicamento |
| <input type="checkbox"/> Tratamiento no farmacológico | <input type="checkbox"/> Discontinuidad definitiva medicamento |
| <input type="checkbox"/> Hospitalización | <input type="checkbox"/> Desconocida u otra |

Descripción Acción Tomada

Resultado (outcome):

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Fatal/defuete | <input type="checkbox"/> Recuperado/ Resuelto sin secuelas |
| <input type="checkbox"/> No recuperado/no resuelto | <input type="checkbox"/> Recuperándose/ Resolviéndose |
| <input type="checkbox"/> Recuperado/ Resuelto con secuelas | <input type="checkbox"/> Desconocido u otro |

Clasificación GRA:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Fatal (resultado de suceso) | <input type="checkbox"/> Discapacidad persistente o significativa/ Incapacidad |
| <input type="checkbox"/> Amenaza la vida | <input type="checkbox"/> Requiere intervención quirúrgica |
| <input type="checkbox"/> Requiere hospitalización o prolonga hospitalización existente | <input type="checkbox"/> Ninguna de las anteriores (no serio) |

Relacionado con quimioterapia

- | | | |
|--|--|---|
| <input type="checkbox"/> Definitivamente relacionado | <input type="checkbox"/> Probablemente relacionado | <input type="checkbox"/> No relacionado |
|--|--|---|

EA esperado:

- Sí No

EA serio:

- No

CEL-SSM.NORTE
Comisario Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte

04 DIC 2015

HOJA DE SEGUIMIENTO EVENTOS ADVERSOS (CRF3)

Fecha control médico / /201 Iniciales Página de

Complete la siguiente información refiriéndose:

Frecuencia (F) o duración (D) de Evento Adverso (EA) en la casilla cuadrada.
 Fecha del primer registro del EA indicado día/mes/año.
 Gravedad del EA: I-II-III-IV.
 Frecuencia del EA indicando N° de veces por día, semanas, meses u años.
 Duración del EA indicando N° de días, semanas, meses u años.
 Acción tomada: Ninguna (1); Tratamiento Farmacológico (2); Tratamiento No Farmacológico (3); Hospitalización (4); Reducción de Dosis de Quimioterapia (5) Indicado el fármaco: cisplatino (P), etopósido (E), bleomicina (B), Docetaxel (D) Carboplatino (C) Indicado el fármaco: cisplatino (P), etopósido (E), bleomicina (B).
 En caso de EA mayor o igual a III, complete reporte de evento adverso. Para EA* complete el reporte de evento adverso, independientemente del grado.

Evento Adverso	Fecha EA	Grado	Frecuencia	Duración	Acción tomada
*Diarrea					
Náuseas/vómitos					
Exantema					
Eosinofilia					
Hematuria					
Otitomedia					
Neuropatía					
Síndrome de Raynaud					
Neuritis óptica					
Bronquitis					
Neumonía intersticial					
Fibrosis pulmonar					
Leucopenia					
Trombocitopenia					
Anemia					
Neutropenia					
Leucemia Secundaria					
Infecciones					
Mutación					
Infertilidad					
Hépatitis					
Hiperparatiroidismo					
Hiperpigmentación					
Alpecia					
rash cutáneo					
Deseñación					
Otro					
Otro					
Otro					
Otro					
Otro					

[Handwritten Signature]
 CEI-SSM NORTE
 Comisario Asesor de la Dirección
 Servicio de Salud
 Metropolitana Norte
 01 DIC. 2015

