

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“REDUCCIÓN DE LA CARDIOTOXICIDAD AGUDA POR
ANTRACICLINAS MEDIANTE LA DISMINUCIÓN DE LA
INJURIA OXIDATIVA EN PACIENTES CON CÁNCER DE
MAMA”**

RODRIGO ANDRÉS CARRASCO LOZA

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**

Director Clínico de Tesis: Prof. Dr. Fernando Florenzano Urzúa

Director Básico de Tesis: Prof. Dr. Ramón Rodrigo Salinas

2015

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas presentada por el candidato

RODRIGO ANDRÉS CARRASCO LOZA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Médicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 23 de Junio de 2015

Prof. Dr. Ramón Rodrigo S
Director Básico de Tesis
Laboratorio de Fisiopatología Renal
ICBM – Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Prof. Dr. Fernando Florenzano U
Director Clínico de Tesis
Departamento de Medicina Interna
Hospital del Salvador
Sede Oriente

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Héctor Gatica R.

Prof. Dr. Luis Michea A.

Prof. Dr. Eduardo Guarda S.

Prof. Dr. Juan Carlos Prieto D.
Presidente Comisión de Examen

Dedicatoria

“Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”.

Marie Curie

“El investigador independiente está desapareciendo y la búsqueda científica está siendo, cada vez más, una búsqueda planificada. La complejidad creciente de cada disciplina, la extraordinaria especialización que requiere cada investigación y el costo de los equipos hacen prácticamente irrealizable la actividad aislada. Ello significa, también, que puede estar en peligro la libertad de investigación, esa libertad que hizo posible el nivel científico actual. De ahí la necesidad de establecer condiciones para el trabajo científico que permitan asegurar la iniciativa y la crítica, indispensables para el progreso.”

Arturo Frondizi

Dedicado a los pacientes con cáncer, en la incansable búsqueda de reducir las duras secuelas de la batalla contra su enfermedad.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por haberme otorgado una familia maravillosa, quienes han creído en mi siempre, dándome ejemplo de que para alcanzar las metas debe existir sacrificio, espíritu superación, humildad y valorar lo que tenemos.

Es por esto que quisiera agradecer a todos los que hicieron posible completar este largo camino.

Mis agradecimientos sinceros,

A mis directores de tesis, Dr. Fernando Florenzano y Ramón Rodrigo por haber confiado en mí desde un principio y haberme apoyado en las dificultades.

A mi comisión revisora, por sus constructivos e importantes aportes para lograr el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Sawa Kostin por su ayuda en la discusión de mis resultados.

A mis padres por haberme forjado como persona, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos, este logro es para ustedes.

A mis hermanos Daniel, Ximena y Carolina, por estar presentes en cada paso.

A Sarah, por su amor y apoyo incondicional en todos mis desafíos.

A los amigos de la vida por su permanente motivación.

A Rodrigo Castillo, Jose Manuel y Rodrigo Fernandez por su tiempo durante las largas tardes de discusión.

A todo el grupo de trabajo del laboratorio, especialmente Diego, Juan y Juan Guillermo.

A todo el equipo del Hospital Salvador, especialmente Jaime, Pablo y la señora Celia, por su trabajo comprometido, sin el cual esta tesis no hubiera sido posible.

A todas las pacientes con cáncer de mama, que pese a su difícil situación quisieron participar con el fin de ayudar a otras futuras pacientes que pudieran beneficiarse de un potencial tratamiento protector.

A todos los que en su propia manera ayudaron a desarrollar esta tesis.

Y a mi abuelo por enseñarme a soñar.

Financiamiento

Esta tesis fue financiada mediante:

- Grant de Investigador Joven de la Sociedad Chilena de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, adjudicado el año académico 2010
- Beca de apoyo para la realización de Tesis Doctoral en Chile, CONICYT **Nº24110128**, adjudicado el año académico 2011

Índice general

	Página
Índice de figuras	11
Índice de tablas	14
Índice de anexos	15
Abreviaturas	16
Resumen	19
Abstract	21
I. Introducción	23
I.1. Características Generales	23
I.2 Características Farmacológicas de las Antraciclinas	23
I.3. Mecanismos de acción de las antraciclinas	26
I.3.1. Mecanismos de acción antineoplásicos	26
I.3.2. Mecanismos de acción de cardiotoxicidad	27
I.3.2.1. Rol del estrés oxidativo en la cardiotoxicidad por antraciclinas	30
I.3.2.1.1. Biomarcadores de estrés oxidativo en la Cardiotoxicidad por antraciclinas	31
I.4. Características generales del NT-ProBNP	33
I.4.1. Generalidades de Péptidos natriuréticos	33
I.4.2. Síntesis de NT-ProBNP en cardiomiocitos	33
I.4.3. Características Bioquímicas del NT-ProBNP circulante	33
I.4.4. Secreción de NT-ProBNP	34
I.4.5. NT-ProBNP como biomarcador de daño por antraciclinas	35
I.5. Estrategias terapéuticas de prevención	36
I.5.1. Carvedilol	37
I.5.2. Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3	38
II. Hipótesis	41
III. Objetivos	41
III.1. Generales	41
III.2. Específicos	41

IV. Metodología	42
IV.1. Diseño del estudio	42
IV.2 Variables de Desenlace evaluadas (Endpoints)	44
IV.2.1. Variable de desenlace primaria para Cardiotoxicidad Aguda: NT Pro-BNP	44
IV.2.2. Variables de desenlace secundario	45
IV.2.2.1. Otras variables de Cardiotoxicidad Aguda	45
IV.2.2.1.1. Marcadores séricos de injuria miocárdica	45
IV.2.2.1.2. Marcadores electrocardiográficos	45
IV.2.2.2. Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo	45
IV.2.2.3. Determinación de efectos sobre la FEVI a 10-12 Meses	46
IV.3. Procedimientos analíticos	46
IV.3.1. Procesamiento de las muestras	46
IV.3.2. Determinación de NT-ProBNP y Troponina cardiaca T	47
IV.3.3. Determinación de parámetros de estrés oxidativo	47
IV.3.3.1. Biomarcadores de daño oxidativo	47
IV.3.3.2. Mecanismos enzimáticos de defensa Antioxidante	48
IV.3.3.3. Mecanismos no enzimáticos de defensa Antioxidante	49
IV.3.4. Determinación de control ecocardiográfico	50
IV.3.5. Determinación de control electrocardiográfico	50
IV.3.6. Técnicas de recolección de la información	50
IV.4. Métodos Estadísticos	51
IV.4.1. Cálculo de tamaño muestral	51
IV.4.2. Análisis estadístico para comparación de los efectos	51
V. Resultados	53
V.1. Caracterización general de los pacientes	53
V.1.1. Línea de Base y factores de riesgo cardiovascular de los pacientes	53

V.2. Resultados según objetivos específicos	57
V.2.1. Determinación del efecto cardioprotector de omega-3 y carvedilol contra la cardiotoxicidad aguda inducida por antraciclinas, mediante determinación de marcadores de injuria miocárdica	57
V.2.1.1. Determinación de biomarcadores séricos de carditoxicidad aguda	57
V.2.1.1.1. Variable de desenlace primario: Determinación de NT-ProBNP	57
V.2.1.1.2. Variable de desenlace secundario: Determinación de Troponina Cardíaca T	60
V.2.1.2. Determinación de marcadores electrocardiográficos de cardiotoxicidad aguda	60
V.2.1.2.1. Determinación del intervalo QT corregido	60
V.2.1.2.2. Determinación de la dispersión del intervalo QT corregido	63
V.2.2. Evaluación del efecto de omega-3 y carvedilol en los biomarcadores de daño por estrés oxidativo durante el primer ciclo de quimioterapia con antraciclinas	64
V.2.3. Evaluación del efecto de omega-3 y carvedilol sobre el status antioxidante durante el primer ciclo de quimioterapia con antraciclinas	65
V.2.3.1. Evaluación de los mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante en eritrocito	65
V.2.3.1.1. Determinación de la actividad de SOD	65
V.2.3.1.2. Determinación de la actividad de CAT	67
V.2.3.1.3. Determinación de la actividad de GSH-Px	68
V.2.3.2. Evaluación de los mecanismos no enzimáticos de defensa antioxidante	69

V.2.3.2.1. Determinación de la Capacidad antioxidante del Plasma	69
V.2.3.2.2. Determinación de la Capacidad antioxidante intracelular del eritrocito	70
V.2.4. Evaluación del efecto de de omega-3 y carvedilol sobre la Fracción de Eyección de Ventrículo Izquierdo evaluada mediante ecocardiografía, a mediano plazo	71
VI. Discusión	75
VI.1 Características clínicas de la población del estudio y factores de riesgo para el desarrollo de carditoxicidad por antraciclinas	75
VI.2. Efectos de las intervenciones sobre los desenlaces	76
VI.2.1. Efectos de las intervenciones en marcadores de carditoxicidad aguda	76
VI.2.1.1. Variable de desenlace primario: NT-ProBNP	76
VI.2.1.2. Variables de desenlace secundario	77
VI.2.1.2.1. Troponina Cardíaca T (cTnT)	77
VI.2.1.2.2. Marcadores Electrocardiográficos	77
VI.2.2. Biomarcadores de estrés oxidativo	77
VI.2.3. Control ecocardiográfico a mediano plazo	78
VI.2.4. Comentario general de las variables de desenlace evaluadas	79
VI.3. Comparación de nuestros resultados con otros estudios	80
VI.3.1. Estudios con intervenciones farmacológicas en carditoxicidad aguda	80
VI.3.2. Estudios previos con las mismas intervenciones y su efecto en biomarcadores de estrés oxidativo	80
VI.3.3. Estudios previos en carditoxicidad por antraciclinas con uso de BNP o NT-ProBNP	81
VI.3.4. Estudios previos con otras intervenciones preventivas de carditoxicidad por antraciclinas y rol del estrés oxidativo	82

VI.3.5. Estudios previos realizados con Betabloqueadores para prevención de cardiotoxicidad por antraciclinas	84
VI.3.6. Estudios previos realizados con omega-3 para prevención de cardiotoxicidad por antraciclinas y prevención cardiovascular general	87
VI.4. Potenciales limitaciones del estudio	88
VI.4.1. Potenciales limitaciones de la determinación del NT-ProBNP y biomarcadores de estrés oxidativo	88
VI.4.2. Limitaciones del estudio en la evaluación ecocardiográfica	89
VII. Conclusiones	91
VIII. Bibliografía	93

Índice de figuras

	Página
Figura 1A. Mecanismos de la injuria inducida por antraciclinas en células miocárdicas	29
Figura 1B. Esquema en que se visualiza la temporalidad de los potenciales biomarcadores tanto de estrés oxidativo como de cardiotoxicidad	32
Figura 2. Diagrama de flujo del seguimiento de las pacientes reclutadas	54
Figura 3. Niveles de NT-ProBNP (pg/mL) del total de pacientes en primer ciclo de quimioterapia	57
Figura 4. Determinaciones NT-ProBNP por grupos	58
Figura 4A. Comparación de niveles de NT-ProBNP (pg/mL) entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3	58
Figura 4B. Niveles de NT-ProBNP (pg/mL) en cada grupo por separado: (i) Placebo, (ii) Carvedilol y (iii) Omega-3	59
Figura 4C. Comparación de Δ NT-ProBNP (pg/mL) entre DIA+3 y BASAL entre grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3	59
Figura 5. Valores del intervalo QT corregido (QTc) en milisegundos del total de pacientes en primer ciclo de quimioterapia	61
Figura 6. Determinaciones de intervalo QT corregido (QTc) por grupos	61
Figura 6A. Comparación del intervalo (QTc) entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3	61
Figura 6B. Evaluación del QTc en cada grupo por separado: (i) Placebo, (ii) Carvedilol y (iii) Omega-3	62
Figura 6C. Comparación de Δ QT corregido (QTc) entre Grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3	62
(i) Δ QT corregido (QTc) entre DIA +1 y BASAL	62
(ii) Δ QT corregido (QTc) entre DIA +3 y BASAL	62
Figura 7. Determinación de la dispersión del intervalo QT corregido (QTDc) en milisegundos	63

Figura 7A. Evaluación del QTDC en la totalidad de pacientes en primer ciclo de quimioterapia	63
Figura 7B. Comparación de QTDC entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3	63
Figura 8. Lipoperoxidación <i>in vivo</i> a través de la determinación de niveles de F2-isoprostanos (pg/mL) en plasma de pacientes	64
Figura 8A. Niveles de F2-isoprostanos al evaluar la totalidad de pacientes	64
Figura 8B. Comparación de niveles de F2-isoprostanos entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3	65
Figura 8C. Evaluación niveles de F2-isoprostanos en cada grupo por separado: (i)Placebo, (ii)Carvedilol y (iii)Omega-3	65
Figura 9. Actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) en eritrocito (U/mg Hb)	66
Figura 9A. Comparación de la actividad de SOD entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3	66
Figura 9B. Evaluación de la actividad de SOD en cada grupo por separado: (i) Placebo, (ii) Carvedilol y (iii) Omega-3	66
Figura 10. Actividad de la enzima Catalasa (CAT) en eritrocito (k/ mg Hb)	67
Figura 10A. Comparación de la actividad de CAT entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3	67
Figura 10B. Evaluación de la actividad de CAT en cada grupo por separado: (i) Placebo, (ii) Carvedilol y (iii) Omega-3	68
Figura 11. Actividad de la enzima Glutation Peroxidasa (GSH-Px) en eritrocito (U/ mg Hb)	68
Figura 11A. Comparación de la actividad de GSH-Px entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3	68
Figura 11B. Evaluación de la actividad de GSH-Px en cada grupo por separado: (i)Placebo, (ii)Carvedilol, (iii)Omega-3	69

Figura 12. Determinación de la Capacidad Antioxidante del Plasma, mediante el “Ferric Reducing Ability of Plasma” (FRAP) en umoles Fe+2/L	69
Figura 13. Determinación de la relación GSH/GSSG (Indice Thiolico) en eritrocito	70
Figura 13A. Comparación de la relación GSH/GSSG entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3	70
Figura 13B. Evaluación de la relación GSH/GSSG en cada grupo por separado: (i) Placebo, (ii) Carvedilol y (iii) Omega-3	71
Figura 14. Determinación de Fracción de Eyección de Ventrículo Izquierdo (FEVI) en control BASAL y a los 10-12 meses post inicio de quimioterapia con antraciclinas	72
Figura 14A. Evaluación de FEVI de la totalidad de los pacientes	72
Figura 14B. Evaluación de FEVI en cada grupo por separado: (i) Placebo, (ii) Carvedilol y (iii) Omega-3	72
Figura 14C. Comparación de la FEVI entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3	73
Figura 14D. Comparación del diferencial (Δ) de FEVI entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3	74

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Características clínicas de las pacientes incluidas en el estudio	55
Tabla 2. Características clínicas de las pacientes incluidas en el análisis primario por grupo de intervención	56

Índice de anexos

	Página
Anexo 1. Acta de aprobación de comité de ética	113
Anexo 2. Consentimiento informado	115
Anexo 3. Ficha de registro clínico	121
Anexo 4. Ficha de registro Ecocardiograma	127

Abreviaturas

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ANP:** Péptido natriurético auricular
- ARAI:** antagonistas de los receptores de la angiotensina II
- BHT:** Hidroxitolueno butilado
- BNP:** péptido natriurético tipo B
- CAT:** Catalasa
- CNP:** Péptido natriurético tipo C
- cTnT:** Troponina Cardíaca T
- CV:** Cardiovascular
- DHA:** Ácido docosahexaenoico
- DSVI:** Disfunción sistólica de ventrículo izquierdo
- ELFA:** Enzyme-Linked Fluorescent Assay
- ELISA:** Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- EPA:** Ácido eicosapentaenoico
- EROS:** Especies reactivas de oxígeno
- FC:** Frecuencia cardíaca
- FEVI:** Fracción de Eyección de Ventrículo Izquierdo
- FRAP:** Ferric reducing ability of plasma
- GSH:** Glutación reducido
- GSH/GSSG:** Índice Thiolico
- GSH-Px:** Glutación peroxidasa
- GSSG:** Glutación oxidado
- H2O2 :** Peróxido de hidrogeno

IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

IMC: Índice de masa corporal

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

NPR-A: atrionatriuretic peptide receptor A

NPR-B: atrionatriuretic peptide receptor B

NPR-C: atrionatriuretic peptide receptor C

NT-ProBNP: fragmento N-terminal de la prohormona del péptido natriurético tipo B

PAD: Presión arterial diastólica

PAS: Presión arterial sistólica

PGC1- α : Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α

PGC1- β : Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 β

preproBNP: proteína precursora de péptido natriurético tipo B

proBNP: propéptido de péptido natriurético tipo B

PTP: poros de transición mitocondrial

REDOX: Reducción-oxidación

SOD: Superóxido dismutasa

TOP2: Topoisomerasa II

TOP2A: Topoisomerasa II alfa

TOP2B: Topoisomerasa II beta

QT: medida de tiempo entre el comienzo de la onda Q y el final de la onda T en el electrocardiograma

QTc: intervalo QT corregido

QTD: dispersión del QT corregido

Resumen

Antecedentes: Las antraciclinas son una importante familia de agentes quimioterapéuticos utilizados contra diferentes tipos de neoplasias, incluyendo el cáncer de mama, sin embargo su uso está limitado por la ocurrencia de cardiotoxicidad. La cardiotoxicidad puede manifestarse de forma aguda, evidenciándose mediante la utilización de diferentes biomarcadores, algunos de los cuales están correlacionados además con el desarrollo de cardiotoxicidad crónica. Si bien la cardiotoxicidad producida es conocida desde hace muchas décadas, aún no ha logrado ser controlada en forma adecuada con alguna estrategia preventiva. Entre los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el daño miocárdico por antraciclinas, y que son diferentes de los mecanismos antineoplásicos, destaca la generación de especies reactivas de oxígeno, las que producirían tanto una injuria directa sobre los cardiomiocitos, pero más importantemente modularían una serie de eventos fisiopatológicos posteriores, que pudieran llevar al desarrollo progresivo de cardiotoxicidad crónica. Fundamentados en esto, el objetivo de nuestro estudio fue el de evaluar el efecto en la cardiotoxicidad aguda producida por antraciclinas de dos intervenciones farmacológicas basadas en el reforzamiento del sistema de defensa antioxidante, mediante la administración de carvedilol y de ácidos grasos omega 3, en pacientes con cáncer de mama.

Metodología: Un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo fue realizado en un grupo de 36 pacientes de sexo femenino con cáncer de mama, que tenían indicación de recibir quimioterapia con antraciclinas. Las pacientes con una media de edad de $50,2 \pm 9,5$ años fueron asignadas al azar en 3 grupos de intervención para recibir durante el primer ciclo de quimioterapia desde 7 días antes y hasta 7 días después del tratamiento con antraciclinas, alguna de las siguientes intervenciones: a) omega-3 en dosis de 3 comprimidos (1 gr) c/12 hrs vía oral (proporción DHA: EPA = 2:1) más placebo carvedilol 1 comprimidos c/12 hrs vía oral; o b) carvedilol 1 comprimido (12,5 mg) c/12 hrs vía oral más placebo omega-3 con 3 comprimidos c/12 hrs vía oral; o c) placebo carvedilol 1 comprimido c/12 hrs vía oral más placebo omega-3 con 3 comprimidos c/12 hrs vía oral. Durante el primer ciclo de quimioterapia, las pacientes fueron evaluadas clínicamente y controladas con tres muestras de sangre seriadas: con controles pre-quimioterapia, al 2º día y 4º día post quimioterapia (día +3 y día+5 respectivamente). En este primer ciclo también se realizaron controles electrocardiográficos seriados: con controles pre-quimioterapia (basal), a las 6 horas y al 2º día post quimioterapia (día +3). Como variable de observación primaria (endpoint primario) para evaluar la cardiotoxicidad aguda, se determinó el NT-ProBNP (NT-Pro B-type natriuretic peptide), y como variables de observación secundaria (endpoints secundarios), se evaluaron otros marcadores de cardiotoxicidad aguda tales como la distancia y dispersión del intervalo QT corregido y niveles séricos de Troponina T. Además para determinar los efectos de las intervenciones sobre el status redox se evaluaron los mecanismos de defensa antioxidante no enzimática mediante la capacidad antioxidante plasmática total (FRAP) y el índice thiólico eritrocitario (glutati6n reducido/glutati6n oxidado; GSH/GSSG). Los mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante de eritrocitos fueron evaluados a través de la determinaci6n de las actividades de super6xido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutati6n peroxidasa (GSH-Px). El daño oxidativo de lípidos se evaluó de acuerdo a las concentraciones plasmáticas de F2-isoprostanos. El potencial

efecto a más largo plazo de las intervenciones sobre la cardiotoxicidad aguda, fueron también evaluados con dos controles ecocardiográficos: una determinación pre-quimioterapia y otra determinación a los 10-12 meses después del inicio de la quimioterapia.

Resultados: El grupo total de pacientes evidenció un incremento estadísticamente significativo del NT-ProBNP en el día +3, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de intervención. En las variables de observación secundaria marcadoras de cardiotoxicidad aguda, la distancia y dispersión electrocardiográfica del intervalo QT corregido y los niveles séricos de Troponina T, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En los biomarcadores de estrés oxidativo en muestras de sangre, el grupo placebo presentó mayores niveles séricos de lipoperoxidación y una disminución en la actividad de las tres enzimas antioxidantes en eritrocitos entre los días +3 y +5 de tratamiento con antraciclinas, efectos que fueron prevenidos por las dos intervenciones. Esta disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes en eritrocitos en el grupo placebo fue acompañada por un aumento del índice tiólico (relación GSH/GSSG), probablemente como una respuesta compensatoria para mantener el balance redox. El control ecocardiográfico encontró en el grupo total de pacientes un descenso significativo de la Fracción de Eyección de Ventrículo Izquierdo (FEVI) a los 10-12 meses. En el análisis por grupos de intervención, el grupo carvedilol presentó un menor delta de reducción de FEVI, comparado al grupo placebo.

Conclusiones: El uso de dos intervenciones farmacológicas basadas en el reforzamiento del sistema de defensa antioxidante, mediante la administración de carvedilol y de ácidos grasos omega 3, en pacientes con cáncer de mama, no logró una reducción significativa de los niveles de NT-ProBNP post tratamiento con antraciclinas durante el primer ciclo de quimioterapia. Sin embargo, las dos intervenciones evaluadas fueron capaces de reducir la injuria oxidativa sistémica y prevenir la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes en eritrocitos durante el primer ciclo de quimioterapia. Este efecto de reducción del estrés oxidativo sistémico, podría potencialmente reducir también los efectos del estrés oxidativo en el corazón, con lo cual se pudiera disminuir a su vez los diferentes mecanismos de daño a un mediano o largo plazo modulados por el estrés oxidativo. En este sentido, el hallazgo de que una corta intervención con carvedilol provocó un menor delta de reducción de FEVI a los 10-12 meses, podría ofrecer un potencial beneficio a largo plazo, lo cual debe ser evaluado con nuevos estudios clínicos con un mayor tamaño muestral y con periodos más largos de seguimiento.

Abstract

Background: Anthracyclines are an important family of chemotherapeutic agents used against different types of neoplasms including breast cancer but its use is limited by the occurrence of cardiotoxicity. Cardiotoxicity can be presented in an acute form and evidenced through the use of different biomarkers, some of which are also correlated with the development of chronic cardiotoxicity. Although induced cardiotoxicity is known since many decades, has not been yet achieved an adequate control with some preventive strategy. Among the pathophysiological mechanisms involved in myocardial damage by anthracyclines, which are different respect to the antineoplastic mechanisms, we can highlight the generation of reactive oxygen species, which would cause of a direct injury in cardiomyocytes, but also primarily modulate one subsequent series of pathophysiological events that could lead to the progressive development of chronic cardiotoxicity. Founded on this, the aim of our study was to evaluate the effect in the acute anthracyclines cardiotoxicity of two pharmacological interventions based on strengthening of antioxidant defense system by administration of carvedilol and omega 3 fatty acids in breast cancer patients.

Methodology: A placebo-controlled, randomized, double-blind clinical trial was conducted on a group of 36 female patients with breast cancer, which had indication to receive chemotherapy with anthracyclines. The patients with a mean age of 50.2 ± 9.5 years were randomly assigned to 3 intervention groups to receive during the first cycle of chemotherapy since 7 days before until 7 days post treatment with anthracyclines, some of the following interventions: a) omega-3 (DHA:EPA ratio = 2:1) in dose of 3 tablets (1g) orally every 12 hours plus carvedilol placebo 1 tablet orally every 12 hours; b) carvedilol 1 tablet (12.5 mg) orally every 12 hours plus omega-3 placebo with 3 tablets orally every 12 hours; c) carvedilol placebo 1 tablet orally every 12 hours plus omega-3 placebo with 3 tablets orally every 12 hours. During the first cycle of chemotherapy, patients were clinically evaluated and controlled with three serial blood samples: pre-chemotherapy, 2nd and 4th days after chemotherapy (day +3 and day +5, respectively) controls. In the first cycle, serial electrocardiographic controls were also performed: pre-chemotherapy (baseline), to the 6 hours and the 2nd day after chemotherapy (day +3). As primary endpoint to evaluate acute cardiotoxicity, NT-proBNP (NT-pro B-type natriuretic peptide) was determined. In the secondary endpoints, other markers of acute cardiotoxicity such as electrocardiographic QTc interval distance and dispersion and the serum troponin T levels were evaluated. In addition to determine the effects of interventions on the redox status, mechanisms of non-enzymatic antioxidant defense through the total plasma antioxidant capacity (FRAP) and erythrocyte thiol index (reduced glutathione / oxidized glutathione; GSH/GSSG) were evaluated. The enzymatic antioxidant defense mechanisms of erythrocytes were evaluated through of determination of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px)

activities. Lipid oxidative damage was evaluated according to the plasma concentrations of F2-isoprostanes. The potential longer-term effects of interventions in the acute cardiotoxicity were also evaluated with two echocardiography controls: a pre-chemotherapy determination (baseline) and other determination to the 10-12 months after the initiation of chemotherapy.

Results: The total group of patients showed a statistically significant increase in NT-proBNP at day +3, however were not found significant differences between the intervention groups. In the secondary endpoints markers of acute cardiotoxicity, the electrocardiographic QTc interval distance and dispersion and the serum troponin T levels, didn't show statistically significant differences between intervention groups. In the biomarkers of oxidative stress in blood samples, the placebo group showed higher serum levels of lipoperoxidation and a decrease in the activity of the three antioxidants enzymes of erythrocytes between +3 and +5 days of treatment with anthracyclines, effects which were prevented by the two interventions. This decrease in the activities of antioxidant enzymes in the placebo group was accompanied by an increased in the thiol index (GSH/GSSG ratio), probably as a compensatory response for maintaining the redox balance. The echocardiographic monitoring found in the total group of patients a significant decrease in left ventricular ejection fraction (LVEF) at 10-12 months. In the analysis of intervention groups, the carvedilol group showed a smaller delta of LVEF reduction, compared to placebo group.

Conclusions: The use of two pharmacological interventions based on strengthening the antioxidant defense system by administration of carvedilol or omega-3 fatty acids in patients with breast cancer, did not achieve a significant reduction in the levels of NT-proBNP post anthracyclines treatment during the first cycle of chemotherapy. However, the two evaluated interventions were able to reduce the systemic oxidative injury and prevent the decreased activity of erythrocytes antioxidant enzymes during the first cycle of chemotherapy. This effect of reduction in the systemic oxidative stress could potentially also reduce the effects of oxidative stress on the heart, which could at the same time reduce the different mechanisms of damage to a medium or long term modulated by oxidative stress. In this sense, the finding that a short intervention with carvedilol led to a smaller delta of LVEF reduction at 10-12 months, could offer a potential long-term benefit, which should be evaluated with new clinical studies with larger sample sizes and longer follow-up periods.

I.- INTRODUCCION

I.1. Características Generales

Las antraciclinas representan una importante clase de agentes quimioterapéuticos muy utilizados en la actualidad, siendo la doxorubicina el principal exponente (Kufe DW et al, 2003), sin embargo su uso clínico está limitado por la cardiotoxicidad producida, la que se presenta de manera acumulativa y dosis dependiente (Hiridina et al., 2000) y que determina el pronóstico a largo plazo de los sobrevivientes del cáncer (Zuppinger C et al, 2007).

Los efectos de la cardiotoxicidad producida se han hecho más evidentes con el mejoramiento en la expectativa de vida de los pacientes con cáncer. Recientemente un meta-análisis evaluó la incidencia de cardiotoxicidad por antraciclinas, determinando la aparición de una cardiotoxicidad clínicamente evidente en 6 %, y una cardiotoxicidad subclínica en 18% de los pacientes, después de un periodo de seguimiento de aproximadamente 9 años (Lotrionte M et al., 2013).

Por otra parte, lamentablemente el manejo terapéutico de los pacientes con cardiotoxicidad por quimioterapia sigue siendo muy deficiente, evidenciándose en pacientes con disfunción sistólica de ventrículo izquierdo (DSVI) inducida por quimioterapia, que el tiempo entre el diagnóstico del cáncer y el de la DSVI fue de 2,2 años, en tanto que menos de 2/3 de los pacientes recibían un adecuado tratamiento de insuficiencia cardiaca Sistólica según la recomendación de las guías y solamente la mitad de los pacientes eran controladas por un cardiólogo (Ammon M et al., 2013).

I.2. Características farmacológicas de las antraciclinas

Las primeras antraciclinas, fueron aisladas de una especie de actinobacteria, la *Streptomyces peucetius* (Arcamone F et al., 1969; Tan C et al., 1967), siendo el primer antibiótico con actividad citotóxica la daunorrubicina, en tanto que su derivado 14-hidroxilado, la doxorubicina, fue obtenido de una mutante (*var peucetius*) y mostró mayor y más extensa actividad biológica. Las antraciclinas tienen una estructura anular tetracíclica unida a un azúcar. Los fármacos citotóxicos de esta

clase tienen moléculas con residuos quinona/hidroquinona en anillos adyacentes que permiten la ganancia y pérdida de electrones (Goodman & Gilman, 2007).

Posteriormente se han obtenido otros derivados: epirrubicina, idarrubicina, pirarrubicina y zorrubicina. Las pequeñas diferencias estructurales son suficientes para que presenten propiedades y espectro antitumoral diferentes (Flórez et al, 1998), es por esto que sólo profundizaremos en las características farmacológicas de la doxorubicina, que es el tratamiento recibido por las pacientes en nuestro estudio.

Características farmacocinéticas de la Doxorubicina

La doxorubicina se absorbe mal por vía oral y atraviesa mal la barrera hematoencefálica; el 70 % se une a proteínas plasmáticas y se metaboliza extensamente, uno de cuyos metabolitos, el doxorrubinol, es más cardiotoxico y menos antitumoral que la doxorubicina. Ambos se eliminan por bilis en el 40-50 % y por la orina en el 5 % (Flórez et al, 1998).

La curva de desaparición del plasma de la doxorubicina es multifásica, con una vida media de 18-30 horas (Flórez et al, 1998), y se capta con rapidez en corazón, riñones, pulmones, hígado y bazo (Goodman & Gilman, 2007).

Indicaciones de uso terapéutico de la Doxorubicina

Se dispone de la doxorubicina para uso intravenoso, siendo la dosis recomendada de 50 a 70 mg/m², administrados en venoclisis rápida que se repite después de 21 días. Debe tenerse cuidado con evitar extravasación, ya que puede tener una acción irritante local y causar necrosis tisular grave (Goodman & Gilman, 2007).

La doxorubicina es eficaz en linfomas malignos y varios tumores sólidos, en particular el cáncer de mama (tanto en tratamiento coadyuvante como metastásico), como también en cáncer de células pequeñas de pulmón y en una amplia variedad de sarcomas (Goodman & Gilman, 2007).

Reacciones adversas generales.

En forma inicial luego de su administración aparecen náuseas y vómitos, diarrea, signos de irritación local (sobre todo si hay extravasación), estomatitis y alopecia. La mielodepresión alcanza su mayor grado durante la segunda semana, afectando en mayor proporción la serie blanca que la roja o las plaquetas. Existe una sinergia o sensibilidad entre antraciclinas y radiaciones, incrementando la toxicidad en órganos aunque no hayan sido irradiados directamente (Flórez et al, 1998).

Características generales de la cardiotoxicidad por antraciclinas.

La ocurrencia de cardiotoxicidad por antraciclinas puede manifestarse desde el punto de vista temporal en una forma aguda (días o semanas), subaguda (meses) o crónica (años). Con respecto a la cardiotoxicidad crónica, y que es la más ampliamente conocida, como ya se señaló depende de la acumulación de dosis sucesivas, y aumenta cuando la dosis total de doxorubicina supera los 550 mg/m², y se manifiesta clínicamente con insuficiencia cardiaca congestiva cuya mortalidad se aproxima al 50%. Una dosis total de doxorubicina de apenas 250 mg/mt² puede causar alteraciones anatomopatológicas en el miocardio, lo que puede ser evidenciado a través de biopsias subendocárdicas, donde a través de microscopia electrónica pueden observarse alteraciones inespecíficas, que incluyen una disminución del número de fibrillas miocárdicas, cambios mitocondriales y degeneración celular (Flórez et al, 1998; Goodman & Gilman, 2007)

Otros de los factores de riesgo para la cardiotoxicidad crónica, además de las dosis acumulativa de antraciclinas, serían la radioterapia en la región torácica, etnia afro-americana, pacientes muy jóvenes o muy añosos, diabéticos, hipertensos, o con muy alto o bajo peso corporal (Lotrionte M et al., 2013). La cardiotoxicidad además puede verse acentuada en aquellos pacientes con cardiopatía preexistente o que reciben tratamiento con trastuzumab (Chabner B et al., 2006; Outomuro D et al., 2007; Elliot P, 2006; Lipshultz SE, 2006; Johnson SA, 2006; Jensen BV, 2006).

Por todo lo anteriormente descrito, se hace evidente la importancia de una adecuada valoración cardiológica previa, durante y posterior al tratamiento, de los pacientes con esquemas de quimioterapia que incluyen antraciclinas (D'Ortencio A,

Navigante A, 2006). En este sentido, y como una forma de identificar a los grupos más vulnerables para poder realizar una intervención más oportuna, es que ha surgido la necesidad de contar con biomarcadores de cardiotoxicidad precoces (Gianni L et al, 2008).

I.3. Mecanismos de acción de las antraciclinas.

Se han descrito múltiples acciones biológicas de las antraciclinas, pero básicamente se agrupan en mecanismos de acción antineoplásica y mecanismos de acción de cardiotoxicidad. En el último tiempo se han realizado importantes hallazgos en relación a los mecanismos que originan la cardiotoxicidad por antraciclinas (Force T, Wang Y, 2013), pero se mantendría la premisa de que los mecanismos que sustentan el efecto antineoplásico de las antraciclinas sobre las células tumorales, son diferentes de aquellos mecanismos que provocan la cardiotoxicidad. Es por esto que las nuevas intervenciones preventivas, actualmente en desarrollo, han tratado de aprovechar estas diferencias existentes entre los efectos que se producen sobre las células miocárdicas y células neoplásicas

I.3.1. Mecanismos de Acción Antineoplásicos.

En el caso de los efectos antineoplásicos, destaca su capacidad para intercalarse entre los pares de bases adyacentes de ADN y fijarse con intensidad diversa, lo que lleva a la inhibición de la síntesis de macromoléculas. Esta acción modifica las propiedades del ADN, pero por sí misma no es suficiente para ejercer su acción letal. Una de las acciones que actualmente se considera crítica es la inhibición de la topoisomerasa II (TOP2) (Flórez et al, 1998). Las antraciclinas se fijan al complejo binario ADN-topo II formando un complejo ternario, de gran estabilidad, que facilita la rotura irreversible tanto de cadenas sencillas como de cadenas dobles de ADN (Flórez et al, 1998), lo que podría llevar posteriormente a inducción de apoptosis (Takemura G, Fujiwara H, 2007; Gewirtz DA, 1999; Minotti G et al, 2004).

I.3.2. Mecanismos de acción de cardiotoxicidad.

Entre los mecanismos que explican la cardiotoxicidad por antraciclinas, clásicamente la hipótesis más extendida hasta hace muy poco tiempo, se basaba en el ciclo redox de las antraciclinas. La evidencia de esta señala que inicialmente las antraciclinas tienden a acumularse en las mitocondrias (Anderson et al, 2004), y debido a sus efectos sobre el complejo I de la cadena transportadora de electrones (Lebrecht D et al, 2005), se produciría uno de los eventos iniciales que se describe con el uso de antraciclinas, que es la formación de especies reactivas de oxígeno (EROS). Estas se generarían posterior a la reducción del anillo C de las antraciclinas, lo que conduce a la formación de un radical libre semiquinona (Simůnek T et al, 2009). Este radical es relativamente estable en un medio ambiente anóxico, pero en condiciones normóxicas, su electrón no apareado es donado al oxígeno, formando radicales superóxido. Flavoproteínas como el complejo I, catalizan la formación del radical semiquinona reducida al aceptar electrones desde el NADH o NADPH, y entregándolos a las antraciclinas. Esta secuencia de reacciones es lo que conocemos como ciclo redox, y que sería altamente perjudicial, porque una cantidad relativamente pequeña de antraciclinas es suficiente para la formación de numeroso radical superóxido (Keizer HG et al, 1990), con la consecuente injuria oxidativa (Doroshov JH et al, 1983).

Actualmente sin embargo, nuevos resultados entregados por Sui Zhang y colaboradores, revelaron que la primera etapa en el daño a los cardiomiocitos no sería gatillado por las EROS, sino que más bien estas serían una consecuencia de otras alteraciones que ocurrirían más precozmente y que tienen relación con las interacciones entre las antraciclinas con un tipo particular de topoisomerasa, una enzima que afecta tanto la tensión como las características topológicas del ADN para la replicación y transcripción (Zhang S et al, 2012). Como ya se señaló previamente, se considera que el principal efecto antineoplásico de las antraciclinas es el provocado por su unión y posterior formación de un complejo con la topoisomerasa II (TOP2), lo que ocasiona a un bloqueo de la actividad de esta enzima. Esto puede a su vez, llevar a la activación de vías encargadas de la respuesta al daño del ADN, lo

que podría inducir la muerte celular (Zhang S et al, 2012). Existen varias formas de topoisomerasas, pero en el caso particular de las células tumorales, estas expresan niveles elevados de topoisomerasa II alfa (TOP2A), a diferencia de lo que ocurre en los cardiomiocitos que no expresan la TOP2A, pero expresan una topoisomerasa II beta (TOP2B). Es así como Sui Zhang et al, desarrolló ratones mutantes deficientes de TOP2B en los cardiomiocitos, los que al ser expuestos a doxorubicina no presentaron una lesión cardíaca aguda o crónica, y los que tampoco presentaron reducción en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, en contraste con lo que ocurrió en los grupos controles (Zhang S et al, 2012).

Es así como se observó además, que las EROS se generarían como consecuencia de las interacciones entre las antraciclinas con la TOP2B, debido a la disfunción mitocondrial producida, y no directamente como consecuencia del ciclo redox de las antraciclinas (Zhang S et al, 2012; Force T, Wang Y, 2013).

Debemos decir, luego de haber conocido las dos hipótesis propuestas, que si bien actualmente se piensa que el efecto sobre la TOP2B, sería el evento inicial en la generación de la cardiotoxicidad por antraciclinas, de todas formas en etapas posteriores un mecanismo importante en el desarrollo de la cardiotoxicidad estaría dado por la generación de las EROS (FIGURA 1A, Sawyer DB, 2013).

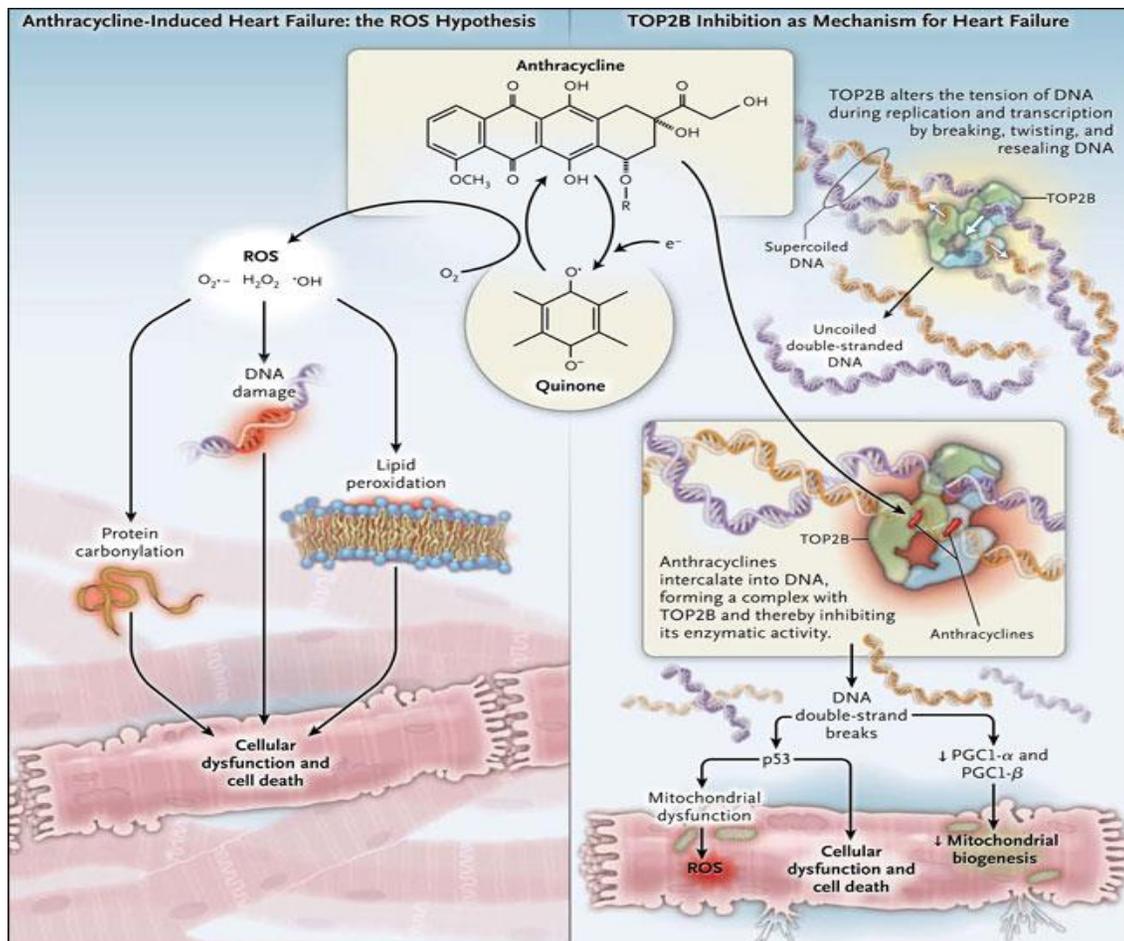


Figura 1A. Mecanismos de la injuria inducida por antraciclinas en células miocárdicas. El modelo clásico de la cardiotoxicidad por antraciclina implica la **generación de especies reactivas de oxígeno (EROS)** por una quinona común a todas las antraciclinas. Ahora, un modelo alternativo postula que la toxicidad es provocada por la desactivación de la función de la topoisomerasa II beta (TOP2B). Sin esta enzima funcional, se van acumulando las roturas en el ADN, lo que lleva a eventos como la activación de la proteína supresora de p53, disfunción mitocondrial y lo que también lleva a la **generación de EROS**, proceso que finalmente termina en la muerte de células cardíacas. PGC1-α y PGC1-β son los receptores activados por proliferadores de peroxisomas 1α y 1β. (Modificado de Sawyer DB, 2013).

Otro elemento que también ha contribuido a confirmar el rol de la TOP2, sería el uso del dexrazoxano, el que originalmente se desarrolló como un inhibidor de TOP2. En las células parece prevenir la unión de la doxorubicina a TOP2B, evitando roturas en el ADN y la muerte celular. Por lo tanto, podría pensarse que este mecanismo alternativo para el efecto cardioprotector del dexrazoxano, que evitaría la unión de las antraciclinas a TOP2B en el miocardiocito, sería más importante que su rol como quelante del hierro (Zhang S et al, 2012; Force T, Wang Y, 2013; Vavrova A et al, 2013). Sin embargo, si bien estos hallazgos permiten proyectar el posible

desarrollo de inhibidores específicos para TOP2A para terapias antitumorales más eficaces sin efectos sobre el corazón, como también el eventual desarrollo de moléculas que pueda unirse selectivamente a TOP2B de cardiomiocitos y evitar su interacción con las antraciclinas, aún son necesarios mayores estudios que confirmen más sólidamente que medicamentos como el dexrazoxano no afectarán los efectos antitumorales sobre las TOP2A de las antraciclinas.

I.3.2.1. Rol del estrés oxidativo en la cardiotoxicidad por antraciclinas.

Como ya se señaló, si bien el estrés oxidativo no sería el evento inicial en la generación de la cardiotoxicidad por antraciclinas, existen otros efectos posteriores que son modulados por el estrés oxidativo (Lee V et al, 1991; Xu MF et al, 2001), entre las que se encuentran efectos sobre la homeostasis del calcio intracelular (Solem LE et al, 1994) y sobre la generación de apoptosis (Thorburn A, Frankel AE, 2006; Niu J et al., 2009; Chua C et al, 2009; Simůnek T et al, 2009). En lo que respecta al desarrollo de apoptosis, existe evidencia directa como las EROS directamente pueden modular diferentes vías de señalización que inducen la apoptosis de los cardiomiocitos (Galang et al, 2000; Clanachan et al, 2003; Owuor & Kong, 2002). A modo de ejemplo, en estudios *in vitro* la exposición de cultivos de cardiomiocitos a dosis bajas de un sistema exógeno generador de EROS, tales como peróxido de hidrógeno y anión superóxido, causan liberación de citocromo c y activación de la caspasa-3, gatillando la muerte celular por apoptosis (Von Harsdorf R, 1999).

Por otra parte, con respecto a los efectos sobre la homeostasis del calcio intracelular, las EROS a través de varios mecanismos, pueden contribuir a generar una sobrecarga de calcio intracelular en los cardiomiocitos (Rothstein et al, 2002; Waypa et al, 2002; Mukherjee et al, 2002; Pacher et al, 2001). Esta masiva acumulación intracelular de calcio provoca, la apertura de poros de transición mitocondrial (PTP) dependientes de calcio, con una subsecuente liberación de proteínas intermembrana hacia el citoplasma incluyendo el citocromo c y el factor inductor de apoptosis (Mukherjee SB et al, 2002; Mathiasen IS et al, 2002; Chen M et al, 2002).

Así, en suma, sí consideramos que la generación de EROS provocada por las antraciclinas (ya sea producidos precozmente en el ciclo redox o bien en forma posterior secundario a los efectos sobre la TOP2B), representarían un evento a nivel intermedio en el desarrollo de cardiotoxicidad (al mediar efectos sobre el balance de calcio intracelular y la apoptosis), pareciera lógico considerarlo como un blanco potencial de intervención (Ray PD et al, 2012).

I.3.2.1.1. Biomarcadores de estrés oxidativo en la cardiotoxicidad por antraciclinas.

La utilidad clínica de biomarcadores de estrés oxidativo, aún no ha sido bien establecida, como tampoco su relación con la ocurrencia de cardiotoxicidad aguda. Las ventajas en su determinación, serían atribuidas a una eventual mayor sensibilidad frente al daño celular por EROS, lo que podría asociarse, a la magnitud de la muerte celular, ya sea por apoptosis o necrosis, como así también a la ocurrencia de disfunción celular provocada en el resto de tejido miocárdico (Dickey J, Rao V, 2012).

En relación a los posibles biomarcadores que pudieran utilizarse, recientemente Dickey JS y Rao VA han propuesto que los biomarcadores de estrés oxidativo y de oxidación de proteínas, podrían ser usados en conjunto con troponinas séricas así como NT-ProBNP para una mejor detección del daño inducido por antraciclinas. La lógica de este enfoque puede ser visto como el actual entendimiento de la línea de tiempo de eventos cardiacos representados en la FIGURA 1B. (Dickey J, Rao V, 2012). Aunque el aumento de la producción de EROS se producen rápidamente y el daño oxidativo a macromoléculas también surge de forma relativamente rápida, estos puede permanecer detectables en el plasma durante un período prolongado de tiempo (Dickey J, Rao V, 2012). Los niveles de biomarcadores de daño cardiaco pueden elevarse a partir de las 24 a 48 horas de la injuria, y aumentos durante un período de tiempo más prolongados serían un indicador de mayor severidad del daño. Es así como mediante la medición del daño oxidativo a macromoléculas, se podría pesquisar tempranamente una eventual disfunción cardíaca y correlacionarla con los aumentos posteriores de biomarcadores

de daño cardíaco (Dickey J, Rao V, 2012). Estos biomarcadores además podrían ser evaluados en conjunto con exámenes cardíacos clásicos como ECG o ecocardiograma. Es así como finalmente ellos propusieron que los futuros estudios debieran utilizar una batería de ambos biomarcadores tempranos y tardíos de daño por estrés oxidativo y de daño cardíaco para identificar mejor a los pacientes de riesgo que reciben quimioterapia con antraciclinas FIGURA 1B (Dickey J, Rao V, 2012). Este enfoque es el que nosotros decidimos utilizar en nuestro estudio, evaluando simultáneamente biomarcadores de daño cardíaco (NT-ProBNP y Troponina), y al mismo tiempo biomarcadores de estrés oxidativo.

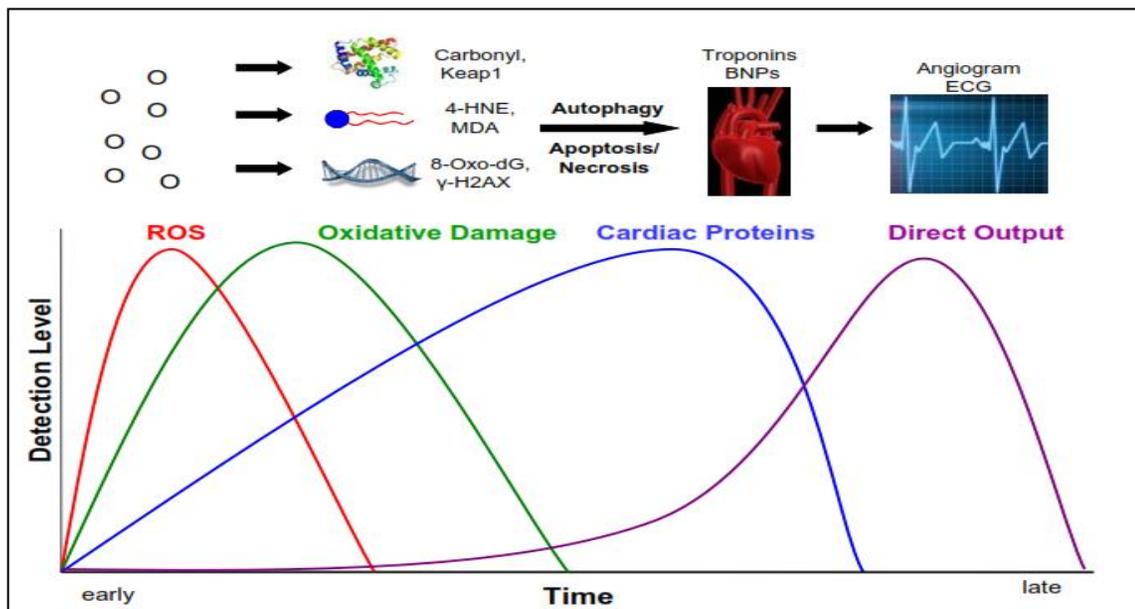


Figura 1B. Esquema en que se visualiza la temporalidad de los potenciales biomarcadores tanto de estrés oxidativo como de cardiotoxicidad. La relevancia de una evaluación con una combinación de biomarcadores para la detección precoz de la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas. La relación temporal entre el aumento de los biomarcadores cardíacos se representa en formato cualitativo, en la gráfica. El aumento de EROS (ROS, línea roja) inducida por la doxorubicina se podría producir en etapas iniciales. Posteriormente se produciría el daño oxidativo a las macromoléculas, como proteínas, lípidos y ADN causado por las EROS (línea verde), que es un poco más tardío pero detectable en la sangre y plasma durante períodos de tiempo más prolongados. Biomarcadores de daño oxidativo incluyen la formación de carbonilo y oxidación de Keap1 (oxidación de proteínas), 4HNE y MDA (oxidación de lípidos) y 8-oxo-dG (oxidación del ADN) y γ -H2AX (ADN doble filamento se rompe). Biomarcadores de daño cardíaco (línea azul), como la troponina o el NT-ProBNP se elevarían más tardíamente, y se correlacionarían fuertemente con la magnitud de la injuria miocárdica. Por último, mediciones de la función cardíaca (línea púrpura) a partir del ECG o ecocardiograma para la pesquisa de alteraciones funcionales. Es así como mediante el uso de una combinación de biomarcadores de daño oxidativo, autofagia y daño cardíaco, se podría obtener una precoz evaluación del riesgo cardiotoxicidad (Modificado de Dickey J, Rao V, 2012).

I.4. Características generales del NT-ProBNP.

I.4.1. Generalidades de Péptidos natriuréticos.

Todos los péptidos natriuréticos (incluyendo el péptido natriurético auricular (ANP), el BNP, y el péptido natriurético tipo C (CNP) comparten un efecto diurético directo, natriurético y vasodilatador, así como una acción inhibidora sobre los procesos proinflamatorios tanto del miocardio como de células musculares lisas (Clerico A et al, 2006). Los péptidos natriuréticos ejercen un efecto protector sobre la función endotelial y la remodelación vascular (Scotland RS et al, 2005). Esos efectos están mediados por dos diferentes receptores acoplados a guanilato ciclasa, NPR-A (más específico para ANP y BNP) y NPR-B (más específico para CNP), mientras que un tercer receptor específico, el NPR-C, no está acoplado a una guanilato ciclasa, y tiene esencialmente una función de depuración para todos péptidos natriuréticos (Clerico A et al, 2006).

I.4.2. Síntesis de NT-ProBNP en cardiomiocitos.

En los seres humanos, el BNP es sintetizado como una proteína precursora (preproBNP) de 134 aminoácidos (aa), y es posteriormente procesado para formar un propéptido de 108-aa, llamado proBNP 1-108. Los propéptidos de los péptidos natriuréticos cardiacos pueden ser enzimáticamente clivados por convertasas de proproteína producidos en el cardiomiocito (Nishikimi T et al, 2011). Una serina proteasa cardiaca, corin, y una serina proteasa ubicua, la furina, han sido propuestas como posibles convertasas para proBNP 1-108 (Ichiki T et al, 2011). Estas proteasas convierten el proBNP 1-108 en un péptido N-terminal de 76-aa (es decir, NT-proBNP 1-76) y en el biológicamente activo péptido C-terminal de 32-aa (es decir, BNP 1-32).

I.4.3. Características Bioquímicas del NT-ProBNP circulante.

Algunos recientes estudios han cambiado la visión sobre las características bioquímicas de las formas de los péptidos relacionados con el BNP circulante. Sólo hasta hace pocos años atrás, se pensaba que las prohormonas (es decir, proANP y proBNP) eran predominantemente almacenados en los gránulos secretores y luego casi completamente divididos en cantidades equimolares en fragmentos amino-

terminales más largos (es decir, NT-proANP y NT-proBNP) y más cortas hormonas peptídicas activas C-terminal (es decir, ANP y BNP), antes de la secreción en la sangre en sujetos sanos (Clerico A et al, 2006). Por el contrario, algunas evidencias recientes sugieren que el proBNP 1-108 es la forma inmunorreactiva predominante del tipo B en la sangre humana, tanto de los sujetos sanos y como de los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (Seferian KR et al, 2007).

I.4.4. Secreción de NT-ProBNP.

Tradicionalmente se ha propuesto que el principal gatillante para la liberación de BNP y NT-ProBNP es un aumento en la tensión de la pared del ventrículo izquierdo, lo que ocurre por ejemplo en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (Mantymaa P et al, 1993). Sin embargo, recientes estudios clínicos han tendido a demostrar que otros tipos de injurias sobre el miocardio, tales como la isquemia cardiaca, podrían llevar a un incremento en la expresión de BNP similar al observado en pacientes con insuficiencia cardiaca (Weber M et al, 2006; Kragelund C et al, 2005).

Los mecanismos por lo que otros tipos de injuria miocárdica pueden también incrementar la expresión de BNP, han comenzado a conocerse recién en los últimos años. Es así, como por ejemplo en el caso de la injuria miocárdica por isquemia, se ha propuesto que dicha isquemia puede llevar a disfunciones sistólicas o diastólicas, que se asocian con el estiramiento, es decir, la tensión mecánica de las estructuras de miocardio, gatillando con ello la expresión de BNP y su liberación (Hama N et al, 1995). Sin embargo, recientemente en un modelo de injuria por isquemia en que se logró bloquear los efectos hemodinámicos asociados, se demostró que la isquemia per se, gatilla la expresión de BNP en el miocardio humano independientemente de estrés mecánico, sin embargo no estableció los mecanismos subcelulares subyacentes que explicarían dicho fenómeno (Mollman H et al, 2010).

Debemos señalar sin embargo, que pese a que están recién conociéndose los mecanismos por los cuales el BNP es liberado en condiciones de injuria miocárdica diferentes de estrés hemodinámicos, en la actualidad el BNP y NT-ProBNP son considerados los principales biomarcadores utilizado en estudios clínicos para la

monitorización de la cardiotoxicidad en pacientes con quimioterapia con antraciclinas (Cil T et al, 2009; Sandri et al, 2005; Romano et al, 2011; Sawyer DB et al, 2010).

I.4.5. NT-ProBNP como biomarcador de daño por antraciclinas.

Desde hace años se ha establecido que durante los primeros ciclos de quimioterapia con antraciclinas se produciría una microinjuria miocárdica, que requerirá del uso de biomarcadores altamente sensibles para su detección. Es así, como se han detectado elevaciones de marcadores como la Troponina cardíaca T (cTnT) y el péptido natriurético tipo B (BNP), determinándose además que quienes presentan una elevación persistente de ellos, tendrían varias veces más riesgo de desarrollar miocardiopatía que quienes no los elevan (Nakamae H et al, 2005; Cardinale D et al, 2002; Auner H et al, 2003; Lipshultz SE et al, 1997; Meinardi M et al., 2001; Pichon M et al, 2005).

Pese a estos hallazgos, hasta la fecha ningún biomarcador ha sido totalmente validado para extender su uso de rutina en la práctica clínica. Entre los biomarcadores más promisorios que se encuentran actualmente en desarrollo, se encuentra el BNP (Péptido natriurético tipo B) y su fracción amino terminal del pro-péptido (NT-ProBNP) (Singh D et al, 2015). El BNP sería un marcador muy sensible de cardiotoxicidad aguda según lo describe Nakamae et al, (2005), incrementándose en aproximadamente en cuatro veces post-quimioterapia con respecto a su valor basal. Es por esto que, como veremos posteriormente, hemos decidido utilizar este biomarcador como variable de observación primaria de cardiotoxicidad aguda. Además según ha descrito Sandri (Sandri M et al., 2005), el incremento persistente del NT-pro BNP, se asocia fuertemente con el desarrollo de disfunción cardíaca a un año. De ahí su potencial papel como marcador de cardiotoxicidad aguda y como eventual predictor de cardiotoxicidad a largo plazo.

En suma podemos decir, que si bien se conoce la utilidad del NT-ProBNP como biomarcador de cardiotoxicidad en pacientes que reciben quimioterapia con antraciclinas, hasta la fecha no se han descrito los mecanismos fisiopatológicos que explicarían que estímulos son los que llevan a su liberación a la circulación. En este sentido, si bien teóricamente la injuria miocárdica por estrés oxidativo, podría ser uno

de los factores estimulantes, al llevar al daño de miofibrillas con una posterior disfunción diastólica, con el subsecuente estímulo mecánico sobre el ventrículo lo que llevaría a la liberación de NT-ProBNP, debemos considerar que muchas otras mecanismos pudieran potencialmente provocar el estímulo de liberación de NT-ProBNP.

Es así como el actual estudio pudiera entregarnos en forma secundaria, más allá de las intervenciones que fueron evaluadas, alguna información acerca de la temporalidad con la que se liberan los biomarcadores de estrés oxidativo y NT-ProBNP, lo que si bien no nos permitiría establecer causalidad, al menos nos permitiría sustentar una potencial hipótesis que indicara al estrés oxidativo como un estímulo de liberación del NT-ProBNP.

I.5. Estrategias terapéuticas de prevención.

Un elemento fundamental al momento de evaluar potenciales medicamentos cardioprotectores, es el hecho de que los mecanismos por los cuales se produce la acción antitumoral, son diferentes de aquellos que producen la cardiotoxicidad, por lo que las intervenciones potencialmente no interferirían con la efectividad de la quimioterapia.

Por otra parte, debido a que el estrés oxidativo sería un elemento esencial entre los mecanismos de cardiotoxicidad por antraciclinas, es lógico considerar a los antioxidantes como los principales candidatos a contrarrestar tales efectos tóxicos. De hecho, varios compuestos con propiedades antioxidantes han sido estudiadas *in vitro* con algún grado de éxito (DeAtley S et al, 1999; Monti E et al, 1996).

Esta estrategia pudiera ser de mucha utilidad debido a que además de actuar impidiendo el daño directo por estrés oxidativo, se lograría bloquear la inducción de apoptosis provocada por EROS. Esto, debido a que teniendo en cuenta que las EROS son los mayores iniciadores de apoptosis, el bloqueo de este proceso puede enlentecer o evitar la ocurrencia de dichas anomalías. Sin embargo, pese a que estudios previos con antioxidantes y eliminadores (“scavengers”) de radicales libres *in vitro* han mostrado una inhibición de la apoptosis miocárdica (Galang N et al, 2000; Ambrosio G et al, 1998), la tasa de éxito durante su utilización en estudios *in vivo* ha

sido menos satisfactoria. De hecho, moléculas con características antioxidantes tales como la vitamina E y selenio, (Van Vleet JF et al, 1980) o nimesulide (Kotsinas A et al, 1999) que mostraron buenos resultados *in vitro*, resultaron ser de un valor limitado en contrarrestar la cardiotoxicidad por doxorubicina *in vivo*.

Esta disociación *in vitro* – *in vivo*, se pudiera deber a que las concentraciones de antioxidantes que se debieran alcanzar en el tejido miocárdico para impedir el daño, son demasiado elevadas. En este sentido se sabe que la dosis indicada para obtener una efectiva acción eliminadora de radicales libres con vitamina E y C a nivel miocárdico, no puede ser obtenida con aportes por vía oral, por tanto es muy predecible los hallazgos de una nula acción clínica de terapias aportadas por esta vía.

En el presente estudio pretendemos evaluar la utilidad del efecto cardioprotector de dos intervenciones: omega-3 y carvedilol, ambos con propiedades antioxidantes conocidas, que por diferentes mecanismos producirían un reforzamiento de las defensas antioxidantes.

1.5.1. Carvedilol.

El Carvedilol (CV, 1-((carbazolyl-(4)-oxy)-3-(2-methoxyphenoxyethyl) amino)-propanol-(2)) es utilizado clínicamente para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión arterial e infarto agudo al miocardio. El Carvedilol competitivamente bloquea los receptores β -1, β -2 y α 1-adrenérgicos, mientras muestra propiedades vasodilatadoras. Una característica distintiva del carvedilol es su potente propiedad antioxidante, que no es compartida por otros antagonistas de los receptores β adrenérgicos (Yue TL et al, 1992). Esta actividad antioxidante del carvedilol es atribuible a su capacidad de quelar el hierro libre (Noguchi N et al, 2000), lo cual está ampliamente implicado en la mejorar la toxicidad mediada por radicales libres causada por la doxorubicina (Yue TL et al, 1992; Noguchi N et al, 2000). En este sentido, el Carvedilol es superior al atenolol (el que representa un antagonista de los receptores β adrenérgicos, pero sin propiedades antioxidantes), en disminuir el impacto negativo inducido por la doxorubicina, sobre la presión arterial sistólica y sobre la fracción de acortamiento de ventrículo izquierdo, al igual

que en el incremento de la lipoperoxidación (Matsui H et al, 1999), lo que podría ser explicado por un efecto directo sobre el tejido cardíaco o por los efectos vasculares del medicamento. Más recientemente, la balanza se inclinó por un efecto predominante en el tejido cardíaco como lo demostró Santos et al. (2002). En dicho estudio el carvedilol disminuyó tanto la toxicidad cardíaca mitocondrial como histopatológica causada por la doxorubicina. Lo que todavía no se ha determinado, es si esta protección cardiospecífica puede ser explicada por las propiedades antioxidantes o propiedades de antagonista de los receptores β adrenérgicos del carvedilol (Oliveira PJ et al, 2004).

Un estudio clínico evaluó el papel cardioprotector del Carvedilol contra el efecto cardiotóxico de las antraciclinas. Kalay et al. (2006), determinó que el uso preventivo del carvedilol en pacientes que recibieron antraciclinas, permitía la conservación de la función sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo a seis meses, basados en variables de observación ecocardiográficas. Sin embargo su papel protector en la ocurrencia de cardiotoxicidad aguda, y su relación con biomarcadores de estrés oxidativo no ha sido explorada aún en este tipo de pacientes.

I.5.2. Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3

Los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (PUFA n-3), son sustancias esenciales para el desarrollo y el normal funcionamiento del organismo. No pueden ser sintetizados en el organismo, debiendo ser adquiridos en la dieta principalmente del pescado, como ácido α -linolénico. Sus principales formas son el ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) y el ácido docosahexaenoico (22:6 n-3, DHA). En forma general, resultados de estudios prospectivos indican que el consumo de pescado o aceite de pescado conteniendo omega-3 se asocia a disminución de la mortalidad por enfermedades cardiovasculares (Wang et al, 2006; Breslow, 2006; Von Schacky 2007; Von Schacky & Harris 2007; Biscione et al, 2007).

En forma específica, la suplementación con los ácidos omega 3, ha mostrado beneficios en contrarrestar los efectos del estrés oxidativo a nivel miocárdico. Se ha reportado, que en pacientes sometidos a cirugía extracorpórea con circulación extracorpórea, la suplementación con omega 3 disminuiría la injuria oxidativa,

asociándose a una menor ocurrencia de eventos arrítmicos en el postoperatorio, particularmente, fibrilación auricular. Esto podría deberse a sus propiedades antioxidantes que contrarrestarían el daño por estrés oxidativo, y por otra parte su efecto precondicionante que incrementaría la actividad de las enzimas antioxidantes (Rodrigo R et al, 2007; Rodrigo R et al, 2008). Los mecanismos por los que la suplementación con omega 3, se asocian a una reducción de la susceptibilidad a la injuria por estrés oxidativo en los miocardiocitos, no se conocen con certeza, y esto pudiera estar relacionado a la incorporación de ácidos omega 3, el incremento de las defensas antioxidantes, cambios en la fluidez de la membrana y la capacidad de prevenir la liberación de calcio intracelular en respuesta al estrés oxidativo (Jahangiri A et al, 2006).

Si bien el uso de omega 3 no es una estrategia que se haya utilizado previamente con motivo de evaluar su rol de cardioprotección en pacientes en tratamiento con antraciclinas, si se han utilizado omega-3 tanto en estudios *in vitro*, *in vivo*, como en ensayos clínicos de pacientes con cáncer de mama con uso de antraciclinas. En estos se describe que el uso previo o durante la quimioterapia de omega-3, mejoraría la efectividad de la quimioterapia (Biondo PD et al, 2008).

Por otra parte, varios estudios en animales han evaluado la efectividad del uso del pre-acondicionamiento como medida de cardioprotección a las antraciclinas. Se ha establecido así, que el pre-acondicionamiento isquémico disminuiría la cardiotoxicidad por antraciclinas evaluada con controles ecocardiográficos de función ventricular, como también produciría una disminución de apoptosis en los miocardiocitos (Hydock DS et al, 2008; Schjøtt J et al, 1996; Wonders KY et al, 2008).

Así, en base a lo expuesto y considerando que un elemento clave en los mecanismos de cardiotoxicidad por antraciclinas, lo representan la generación de EROS, resulta razonable el proponer aplicar un reforzamiento del sistema de defensas antioxidantes miocárdico con objeto de minimizar la injuria por estrés oxidativo y, por esta vía prevenir el desarrollo de cardiotoxicidad. Con tal objetivo, con los omega-3, al recibirlo desde los días previos al tratamiento, se podría inducir un pre-acondicionamiento en el paciente, lo que produciría un aumento de la

actividad de enzimas antioxidantes a nivel miocárdico en los pacientes, permitiendo contrarrestar mejor el daño cardíaco por estrés oxidativo.

II. HIPÓTESIS:

En pacientes con cáncer de mama sometidos a quimioterapia con antraciclinas, la suplementación con ácidos grasos omega 3 o la administración de carvedilol (desde 7 días antes hasta 7 días después del inicio de un ciclo quimioterapia), disminuirá la ocurrencia de cardiotoxicidad aguda mediante un reforzamiento del sistema de defensa antioxidante sistémico. Este efecto se asociará con una disminución en los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo.

III. OBJETIVOS DEL PROYECTO:

III.1. Objetivo General:

Reducir la cardiotoxicidad aguda provocada por las antraciclinas en pacientes con cáncer de mama, mediante el reforzamiento del sistema de defensa antioxidante sistémico durante el primer ciclo de quimioterapia.

III.2. Objetivos Específicos:

III.2.1. Evaluar el efecto cardioprotector de omega-3 y carvedilol contra la cardiotoxicidad aguda inducida por antraciclinas durante el primer ciclo de quimioterapia, mediante la determinación de marcadores de injuria miocárdica.

- Determinación de biomarcadores séricos de cardiotoxicidad aguda.
 - o Variable de desenlace primario: Determinación de NT-ProBNP.
 - o Variable de desenlace secundario: Determinación cTnT
- Determinación de marcadores electrocardiográficos de cardiotoxicidad aguda.
 - o Determinación de intervalo QT corregido
 - o Determinación de la dispersión del intervalo QT corregido

III.2.2. Evaluar el efecto de omega-3 y carvedilol en los biomarcadores de daño por estrés oxidativo durante el primer ciclo de quimioterapia con antraciclinas.

III.2.3. Evaluar el efecto de omega-3 y carvedilol sobre el status antioxidante durante el primer ciclo de quimioterapia con antraciclinas.

III.2.4. Evaluar el efecto de omega-3 y carvedilol sobre la Fracción de Eyección de Ventrículo Izquierdo evaluada mediante ecocardiografía, a mediano plazo (a los 10-12 meses post-tratamientos con antraciclinas).

IV. METODOLOGÍA:

IV.1. Diseño del estudio

Se realizó un ensayo clínico, aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo, que incluyó a pacientes con diagnóstico de cáncer de mama que fueron sometidas a tratamiento de quimioterapia con antraciclinas, y que fueron controladas en la Unidad de Oncología del Hospital Salvador, entre Noviembre del 2010 hasta Abril 2015. El estudio contó con la aprobación del Comité de ética de investigación en seres humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y del Comité de ética del Servicio de Salud Metropolitano Oriente (Anexo 1).

Se reclutaron pacientes con diagnóstico reciente de cáncer de mama que ingresaban a control en la Unidad de oncología, que cumplían el criterio de elegibilidad de requerir tratamiento con antraciclinas, y que aceptaron y firmaron el consentimiento informado respectivo para participar en el estudio (Anexo2).

Se consideraron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

- Criterios de inclusión:

- Paciente que ingresa a primer ciclo de quimioterapia
- Mayor de 18 años y menor de 75 años
- Pacientes con un score de Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status entre 0-2.
- Pacientes que otorguen y firmen el consentimiento informado.
- Podrán ser incluidas pacientes que al momento del reclutamiento puedan haber recibido tratamiento con radioterapia. En dichos casos se realizará un registro detallado de las características de la radioterapia recibida.

- Criterios de exclusión:

- Embarazo y lactancia.
- Insuficiencia cardiaca previa, u otras enfermedades cardiacas con compromiso de la función ventricular (fracción de eyección menor a 55%).

- Cardiopatía coronaria, arritmias previas, arritmias con necesidad de medicación, miocardiopatía dilatada o hipertrófica con hipertrofia ventricular izquierda (grosor septal mayor de 13 mm).
- Enfermedad coronaria muy probable o demostrada.
- Enfermedad valvular: Insuficiencia mitral moderada a severa, estenosis mitral moderada a severa (área valvular mitral < 1.5 cm²), insuficiencia aórtica moderada a severa y estenosis aórtica moderada a severa (área valvular aórtica > 1.0 y < 0.7 cm²) con gradiente mayor de 50 mmHg.
- Cardiopatía congénita: Comunicación interauricular e interventricular, conducto arterioso persistente, enfermedad de Ebstein, tetralogía de Fallot y coartación de aorta.
- Insuficiencia renal crónica (creatininemia mayor de 2 mg/ml).
- Insuficiencia hepática (bilirrubinemia > 3.0 mg/dl o albuminemia < 3.5 g/dl o protrombinemia < 60% en ausencia de terapia anticoagulante oral o signos ecográficos de daño hepático crónico).
- Potasio plasmático mayor de 5 mEq/L.
- Presión arterial sistólica menor de 90 y/o diastólica < de 60 mm de Hg.
- Bradicardia menor de 50 latidos por minuto.
- Bloqueo aurículo-ventricular de 2° y 3er grado
- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica con contraindicación de beta bloqueo.
- Antecedente de reacción adversa grave a Carvedilol.
- Tratamiento previo con betabloqueadores dentro de los últimos 3 meses
- Uso de Vitamina E, Vitamina C o probucol, durante los últimos 3 meses
- Uso de anticoagulantes orales.
- Historia de trastornos hemorragíparos.

Posteriormente las pacientes fueron aleatoriamente asignadas a uno de los tres grupos de intervención: grupo omega 3, grupo carvedilol y grupo doble placebo. Durante el primer ciclo de quimioterapia los pacientes recibieron los siguientes tratamientos: grupo omega-3, recibieron ácidos grasos omega 3 (relación ácido docosahexaenoico, DHA: ácido eicosapentaenoico, EPA; en la relación 2:1) en dosis

de 1 gr c/12 hrs vo más placebo de carvedilol 1 comprimido c/12 hrs vo (que en caso de FC < 55x min. en control, se había establecido reducir a 1 comp/día vo); grupo carvedilol, que recibió carvedilol en dosis máxima tolerada, con dosis inicial de 12,5 mg c/12 hrs vo (que en caso de FC < 55x min. en control, se había establecido reducir a 12,5 mg/día vo), más placebo de omega 3 c/12 hrs vo; y el grupo doble placebo que recibió placebo de carvedilol 1 comp. c/ 12 hrs vo (que en caso de FC < 55x min. en control, se había establecido reducir a 1 comp/día vo) más placebo de omega-3 c/ 12 hrs vo. Cada tratamiento se mantuvo desde 7 días antes hasta 7 días después del día de inicio de la quimioterapia, que consideraremos como día +1. Estos tratamientos se administraron durante el primer ciclo de quimioterapia. Cada uno de los participantes de los tres grupos recibió el mismo número de cápsulas diarias, dado que ninguno de los pacientes presentó FC < 55 x min en el control clínico del día +1, por lo que no debió reducirse ni las dosis de carvedilol ni de placebo de carvedilol.

En las pacientes se determinó la cardiotoxicidad aguda con marcadores séricos y electrocardiográficos, y se evaluaron también los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo en plasma y eritrocito. Además se realizó un control ecocardiográfico basal pre quimioterapia y otro a los 10-12 meses post-quimioterapia. El manejo de las muestras de sangre y datos clínicos se realizó de acuerdo a la declaración de Helsinki (2000).

IV.2. Variables de Desenlace evaluadas (Endpoints).

IV.2.1. Variable de desenlace primaria para Cardiotoxicidad Aguda: NT-ProBNP

La variable de observación primaria fue definida como la ocurrencia de cardiotoxicidad aguda, determinada por el incremento de los niveles del biomarcador NT-ProBNP (fragmento N-terminal de la prohormona del péptido natriurético tipo B) mayor o igual al 50% a las 48 hrs (Día +3) de iniciada la quimioterapia con respecto a su valor pre quimioterapia (Día -7). La elección de esta variable se fundamenta en que sería el biomarcador más sensible y presentaría su mayor incremento entre las 24 a 72 hrs posterior a la quimioterapia (Nakamae H et al, 2005; Sandri MT et al., 2005).

IV. 2.2. Variables de desenlace secundario.

V. 2.2.1. Otras variables de Cardiotoxicidad Aguda

Se determinó además la ocurrencia de cardiotoxicidad aguda considerando a través de parámetros electrocardiográficos y séricos.

La cardiotoxicidad aguda fue expresada por:

IV.2.2.1.1. Marcadores séricos de injuria miocárdica.

Se consideró como criterios de cardiotoxicidad aguda en control a las 48 hrs (DIA+3) posterior al inicio de la quimioterapia:

- Elevación de Troponina Cardíaca T (cTnT) sobre el límite detectable, o un incremento $\geq 10\%$ con respecto a control BASAL.

IV.2.2.1.2. Marcadores electrocardiográficos.

Como criterio electrocardiográfico se consideró en control del DIA+1

- Una prolongación del intervalo del QTc ($>10\%$) en comparación a control BASAL.
- Un aumento en la dispersión del QT ($>10\%$) en comparación a control BASAL.

IV.2.2.2. Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo.

Se determinó la ocurrencia de estrés oxidativo, mediante la evaluación seriada tanto de la injuria oxidativa como también del status antioxidante de los pacientes.

- Evaluación de biomarcadores séricos de injuria por estrés oxidativo:

- Determinación de niveles de Lipoperoxidación: Se evaluó el incremento sérico de productos de la lipoperoxidación, mediante la determinación de F-2 isoprostanos.

- **Evaluación del status antioxidante:** Se evaluó el estado de los mecanismos de defensa antioxidante mediante la evaluación de:

- Mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante: Se determinó en eritrocitos la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peróxidasa (GSH-Px).

-Mecanismos no enzimáticos de defensa antioxidante:

a) Evaluación de la capacidad antioxidante del Plasma: Se evaluó la capacidad antioxidante del plasma mediante la determinación de la capacidad reductora férrica del plasma (FRAP, Ferric Reducity Ability of Plasma).

b) Evaluación de la capacidad antioxidante intracelular: Se evaluó mediante la determinación en eritrocito de la concentración de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG), para obtener la relación GSH/GSSG, llamada también índice thiólico.

IV.2.2.3. Determinación de efectos sobre la FEVI a 10-12 meses

Como criterio ecocardiográfico de deterioro de la función ventricular se consideró:

- Disminución $\geq 10\%$ en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo en el control a los 10-12 meses post quimioterapia, con respecto al control basal pre-quimioterapia.

IV.3. Procedimientos analíticos.

En el primer ciclo de quimioterapia con antraciclinas se obtuvieron 3 muestras de sangre en forma seriada, las que se utilizaron para determinar marcadores séricos de cardiotoxicidad aguda, de estrés oxidativo y de estatus antioxidante.

- 1ª Muestra: 7 días antes de la quimioterapia (Basal sin intervención, día -7)
- 2ª Muestra: Muestra del DIA+3 (a las 48 post quimioterapia)
- 3ª Muestra al 5º día de iniciada quimioterapia (DIA+5).

V.3.1. Procesamiento de las muestras.

Para la determinación de parámetros de estrés oxidativo, se tomaron muestras de 4mL de sangre y se almacenaron en tubos Vacutainer® con EDTA (K2-EDTA 1,8 mg/mL sangre). Mediante centrifugación se separó el plasma de los elementos figurados (3600 x g por 15 minutos). Los eritrocitos se lavaron 2 veces con solución fisiológica tras lo que se sometieron a hemólisis en medio hipotónico (agua destilada) en relación aproximada 1:4. Las muestras de plasma y hemolizado se almacenaron en alícuotas a -80° C hasta su utilización. Una alícuota de plasma se almacenó con hidroxitolueno butilado (BHT) 0,005% para la determinación de concentración de F 2 -isoprostanos.

Para la determinación de NT-ProBNP y cTnT se tomaron muestras de 4 mL en tubos con separador de Suero Vacutainer® SST™ (que contiene un gel separador

inerte en el fondo del tubo). Luego de separarse el suero sin necesidad de centrifugación, el contenido de suero se separó en dos alícuotas, una de las cuales se almacenó a -20°C para la determinación del NT-ProBNP y la otra alícuota se almacenó a -80°C para la determinación de cTnT.

IV.3.2. Determinación de NT-ProBNP y Troponina cardíaca T.

Las determinaciones de NT ProBNP se realizaron utilizando el kit VIDAS NT ProBNP assay (BioMérieux SA, Lyon, France), un test cuantitativo automatizado para la determinación del fragmento N-terminal del péptido natriurético tipo B en suero o plasma humano, usando una técnica de ELFA (Enzyme-Linked Fluorescent Assay). Los resultados son expresados en pg/mL.

La Troponina cardíaca T (cTnT), también fue evaluada mediante la técnica VIDAS cTnT assay (BioMérieux SA, Lyon, France), usando igualmente una técnica de ELFA. Los test VIDAS (BioMérieux SA, Lyon, France), son técnicas caracterizadas por una gran simplicidad, debido a su extendida utilización en la práctica clínica. Por este motivo, para cada determinación se dispone de un reactivo unitario, que contiene un cono en el que están adheridos anticuerpos, que actúan como fase sólida de la reacción y además contiene un cartucho con todos los reactivos necesarios para la reacción. El cono actúa como sistema de pipeteo para aspirar y expeler reactivos en cada etapa de la reacción (lo que permite prevenir la contaminación entre reactivos y entre muestras, además de no requerir tubos ni jeringas para facilitar su uso). Finalmente el sistema ELFA, combina el método ELISA con una lectura final en fluorescencia azul, lo que permite mejores resultados de sensibilidad y especificidad (BioMérieux SA, Lyon, France).

IV.3.3. Determinación de parámetros de estrés oxidativo.

IV.3.3.1. Biomarcadores de daño oxidativo.

A fin de cuantificar el daño oxidativo de lípidos (lipoperoxidación), se realizó medición de niveles plasmáticos de F2-isoprostanos mediante kit que utiliza técnica de ELISA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Esta medición se basa en un ensayo de competencia entre F2-isoprostanos de la muestra y un conjugado entre F2-

isoprostanos y acetilcolinesterasa, utilizando para la reacción colorimétrica un sustrato de acetilcolinesterasa. El resultado se expresó en concentración plasmática de F2-isoprostanos (pg/mL).

IV.3.3.2. Mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante.

Se determinó la actividad de SOD, CAT y GSH-Px en eritrocitos.

Actividad de SOD.

La actividad de SOD se midió mediante técnica de espectrofotometría, de acuerdo a la capacidad de SOD de inhibir la oxidación de epinefrina a adrenocromo mediada por el anión radical superóxido (Misra HP & Fridovich I. 1972). El hemolizado se centrifugó a 23.000 x g por 5 minutos. Se hizo una dilución 1:10 del sobrenadante en solución KCl-Tris pH 7,40. En solución buffer glicina (glicina 50 mM, pH 10,2) se realizaron lecturas por 180 segundos a distintas concentraciones de plasma. Se evaluó la capacidad de inhibir la producción de adrenocromo (lectura a 480 nm) de acuerdo a la relación de las pendientes observadas. La actividad se expresó en relación a concentración de hemoglobina en la muestra original de hemolizado.

Actividad de CAT.

La actividad de CAT se cuantificó mediante técnica de espectrofotometría de acuerdo a la velocidad de descomposición (no espontánea) de H₂O₂ (Aebi H et al, 1974). Se realizó una dilución del hemolizado en proporción 1:10 con tritón-etanol 10% en buffer fosfato (KH₂PO₄ 20mM; Na₂HPO₄ 30mM; pH 7,0). Se realizaron lecturas seriadas por 1 minuto, siguiendo el consumo de H₂O₂ (240 nm). Las lecturas se corrigieron de acuerdo a la descomposición de H₂O₂ en ausencia de muestra. La actividad enzimática se expresó en términos de constante cinética de primer orden por gramo de hemoglobina.

Actividad de GSH-Px.

La actividad de GSH-Px se cuantificó mediante técnica de espectrofotometría. La cuantificación utiliza como principio el consumo de NADPH por la reacción catalizada por la enzima glutatión reductasa, que a su vez utiliza también como sustrato el GSSG generado por la glutatión peroxidasa (Flohé L & Günzler WA, 1984). El

hemolizado se centrifugó a 23.000xg por 5 minutos. Se hizo una dilución 1:5 del sobrenadante en solución fosfato de potasio (KH_2PO_4 0,1M; EDTA 1mM; pH 7,0). En la solución buffer descrita se realizaron lecturas seriadas por 5 minutos, analizando el consumo de NADPH (lectura a 340 nm) en presencia de GSH, azida de sodio (inhibidor de catalasa) y glutatión reductasa en exceso. La actividad enzimática se expresó en relación a la concentración de hemoglobina.

IV.3.3.3. Mecanismos no enzimáticos de defensa antioxidante.

Capacidad Antioxidante del Plasma (FRAP).

Se determinó el nivel de FRAP ('ferric reducing ability of plasma') como medida de la capacidad antioxidante plasmática total. La cuantificación se realizó mediante técnica espectrofotométrica en muestra de plasma, de acuerdo a la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} en presencia de plasma y la reacción colorimétrica de Fe^{+2} con tripiridiltriazina (lectura a 594 nm) (Benzie IF & Strain JJ, 1996). La curva de calibración se realizó de acuerdo a concentración de Fe^{+2} en forma de sulfato ferroso.

Capacidad antioxidante intracelular del eritrocito.

Como medida de capacidad antioxidante intracelular se determinó en eritrocito la concentración de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG), como forma de obtener la relación GSH/GSSG, llamada también índice tiólico. Esta medición se realizó mediante técnica de fluorimetría, de acuerdo a la reacción de fluorescencia del orto-ftalaldehído (OPT) a pH 8 con GSH y a pH 12 con GSSG (Hissin PJ & Hilf R, 1976). Inicialmente se centrifugaron 80 μL de hemolizado (23.000 x g por 45 minutos) en presencia de ácido metafosfórico al 5% en solución buffer fosfato (K_2HPO_4 0,1M; EDTA 5 mM; pH 8,0), a fin de inducir precipitación de proteínas. El sobrenadante se diluyó en solución buffer fosfato descrita y luego se midió la reacción de fluorescencia de GSH con OPT. La determinación de GSSG se realizó en solución NaOH 0,1N (pH 12,0) de acuerdo a la reacción con OPT en presencia de N-etilmaleimida (a fin de prevenir la oxidación de GSH a GSSG). Las concentraciones se expresaron en relación a concentración de hemoglobina en la muestra inicial de hemolizado.

IV.3.4. Determinación de control ecocardiográfico.

En todos los pacientes se realizó un control ecocardiográfico basal, previo a la administración de antraciclinas en el primer ciclo de quimioterapia. Posteriormente se realizó un segundo control ecocardiográfico de seguimiento a los 10-12 meses de iniciada la quimioterapia. Como marcadores de la función sistólica, se utilizó la fracción de acortamiento (FS) y la fracción de eyección ventricular (FEVI) medida por método de Teichhold y técnica modificada de SIMPSON en vista apical en 4 y 2 cámaras (Schiller NB et al, 1989; Himelman RB et al, 1988), dependiendo de la ventana ecográfica obtenida.

IV.3.5. Determinación de control electrocardiográfico.

Se realizaron 3 controles electrocardiográficos en el primer ciclo de quimioterapia: un control BASAL pre-quimioterapia (DIA-7), otro entre las 3 a 12 hrs. del inicio de la quimioterapia (Día +1), y el último a las 48 hrs. (Día +3). Para la evaluación electrocardiográfica de cardiotoxicidad aguda se empleó la medición del intervalo QT corregido (QTc) y la dispersión QT corregido (QTc dispersión). El intervalo QT se determinó mediante un equipo de electrocardiograma de 12 derivaciones simultáneas, con velocidad de registro de 50 mm/seg, realizándose tres determinaciones, con lo que cada control se obtuvo del valor promedio de tres mediciones. El QTc y la dispersión del intervalo QTc se calcularon mediante la corrección del intervalo QT con fórmulas que corrigieron por la frecuencia cardiaca.

VI.3.6. Técnicas de recolección de la información

Se realizó un ensayo clínico según las normas de buenas prácticas clínicas, y se confeccionó una ficha de cada paciente para registrar la información obtenida (clínica, ecocardiográfica, electrocardiográfica y de laboratorio), contenidos que luego se traspasaron a una base de datos en plantilla Excel, y posteriormente a una ficha de paquete estadístico.

IV.4. Métodos estadísticos.

IV.4.1. Cálculo de tamaño muestral.

El tamaño muestral se calculó en base a los resultados preliminares obtenidos con el análisis parcial de los datos en el anterior avance de tesis, y se realizó considerando como variable de resultado primario la elevación del marcador sérico NT-ProBNP (fragmento N-terminal de la prohormona del péptido natriurético tipo B) el día +3 como marcador de cardiotoxicidad aguda. La estimación se realizó mediante comparación de medias con placebo para un modelo jerárquico de tiempo y paciente, con una media para el grupo placebo de 475 pg/mL y una media para el grupo omega-3 de 120 pg/mL, con una desviación estándar común de 407 pg/mL, considerando que el grupo omega-3 presentó menor diferencia entre medias con el grupo placebo que el grupo carvedilol. Es así que se pudo suponer que nuestra intervención producirá un efecto de similar magnitud de los niveles de NT Pro-BNP, y considerando un error α del 5% con un poder del 80%, se determinó un tamaño muestral de 11 pacientes por rama para muestras emparejadas y de una vía, según el programa estadístico Win Episcope 2.0 utilizando la fórmula $(n=2 (Z\alpha+Z\beta)^2 * s^2/d^2)$.

Por lo tanto, considerando que tenemos 3 grupos en nuestro estudio: Grupo omega-3, Grupo carvedilol y Grupo doble placebo, se requerirá un número total de 33 pacientes, por lo que considerando potenciales pérdidas se estableció un número de 36 paciente. Este tamaño de la muestra fue el que se reclutó, y de los cuales 34 pacientes fueron incluidas en el análisis primario.

IV.4.2. Análisis estadístico para comparación de los efectos.

Se evaluó el efecto tratamiento sobre la ocurrencia de las variables de observación primaria y secundaria.

La distribución de los datos se evaluó mediante test de Shapiro-Wilk. En el caso del análisis estadístico en relación al tratamiento, en el que teníamos tres grupos (placebo, carvedilol y omega-3), con determinaciones en tres tiempos diferentes, las variables con distribución paramétrica fueron comparadas mediante la prueba de ANOVA con análisis post-hoc de Bonferroni. En el caso que las

variables tuvieran una distribución no paramétrica se utilizó el test de Kruskal-Wallis, este último seguido por test de comparaciones múltiples de Dunn. Se estableció como diferencia significativa un $P < 0.05$.

Los análisis estadísticos en relación al tiempo, para un mismo grupo de intervención, se realizaron utilizando el test de Student para variables con distribución paramétrica, en tanto que fueron comparadas a través del test de Mann Whitney en caso que la distribución fuera no paramétrica, considerándose en ambos casos como diferencia significativa un $P < 0.05$.

Para la comparación entre los grupos de intervención de sus características clínicas, las variables continuas fueron evaluadas con el Test no paramétrico de Kruskal-Wallis, en tanto que las variables categóricas se evaluaron mediante el Test de Fisher.

Los datos fueron procesados en STATA 12.0 y GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego California, USA). De acuerdo a su distribución, los datos se describen en mediana-rango intercuartílico o media-desviación estándar (DE). La representación de un grupo de intervención a diferentes tiempos fue realizado mediante barras en el caso de variables paramétricas (promedio-desviación estándar) y, en el caso de variables no paramétricas, en diagrama de caja y bigotes (mediana, rango intercuartílico y p5-p95). Los gráficos para comparación de los diferentes grupos de intervención a diferentes tiempos, se expresan en barras en el caso de variables paramétricas (promedio-desviación estándar) y, en el caso de variables no paramétricas, para una más fácil comprensión se expresaron mediante barras que representan medianas y rango intercuartílico superior (p75). Finalmente para expresar los controles ecocardiográficos de seguimiento, el análisis total de pacientes, además del análisis de cada grupo de intervención por separado, se utilizó un gráfico lineal, para evidenciar mejor la tendencia de los pacientes en forma individual. Todos los gráficos se diseñaron en software GraphPad Prism versión 4.0.

V. Resultados.

V.1. Caracterización general de los pacientes.

V.1.1. Línea de Base y factores de riesgo cardiovascular de los pacientes.

En el reclutamiento realizado en el servicio de Oncología del Hospital Salvador entre Junio 2011 hasta Febrero 2014, 55 pacientes cumplieron criterios de elegibilidad, que consideraba tener diagnóstico reciente de cáncer de mama, con indicación de recibir quimioterapia con antraciclinas. Sin embargo, 19 pacientes fueron excluidas (8 por criterios de exclusión, 8 rechazaron participar y 3 por otros motivos), por lo tanto los 36 pacientes restantes fueron asignados al azar a uno de los tres grupos posibles. De estos pacientes, 34 completaron el estudio y fueron incluidos en el análisis primario, en tanto que 2 pacientes abandonaron el seguimiento por retiro de su consentimiento (Ver Figura 1. Diagrama de flujo de las pacientes reclutadas).

En las 36 pacientes ingresadas al estudio, la dosis acumulativa total de doxorubicina fue en promedio de 231 ± 33 mg/m². El promedio de edad de las pacientes fue de $50,3 \pm 9,5$ años (rango entre 33-69 años). Dentro de factores de riesgo cardiovascular presentados por las pacientes, destacan un índice de masa corporal (IMC) cuyo promedio se encontró en rango de sobrepeso 28 ± 5 kg m⁻², además de un índice cintura/cadera elevado con un promedio de $0,92 \pm 0,06$. Además dentro de las comorbilidades encontradas, destacó la presencia de hipertensión arterial (31%), dislipidemia (22%) y tabaquismo (42%). Las características de todas las pacientes son incluidas en la Tabla 1, en tanto que las características por grupo de intervención se muestran en la Tabla 2.

Figura 2. Diagrama de flujo del seguimiento de las pacientes reclutadas.

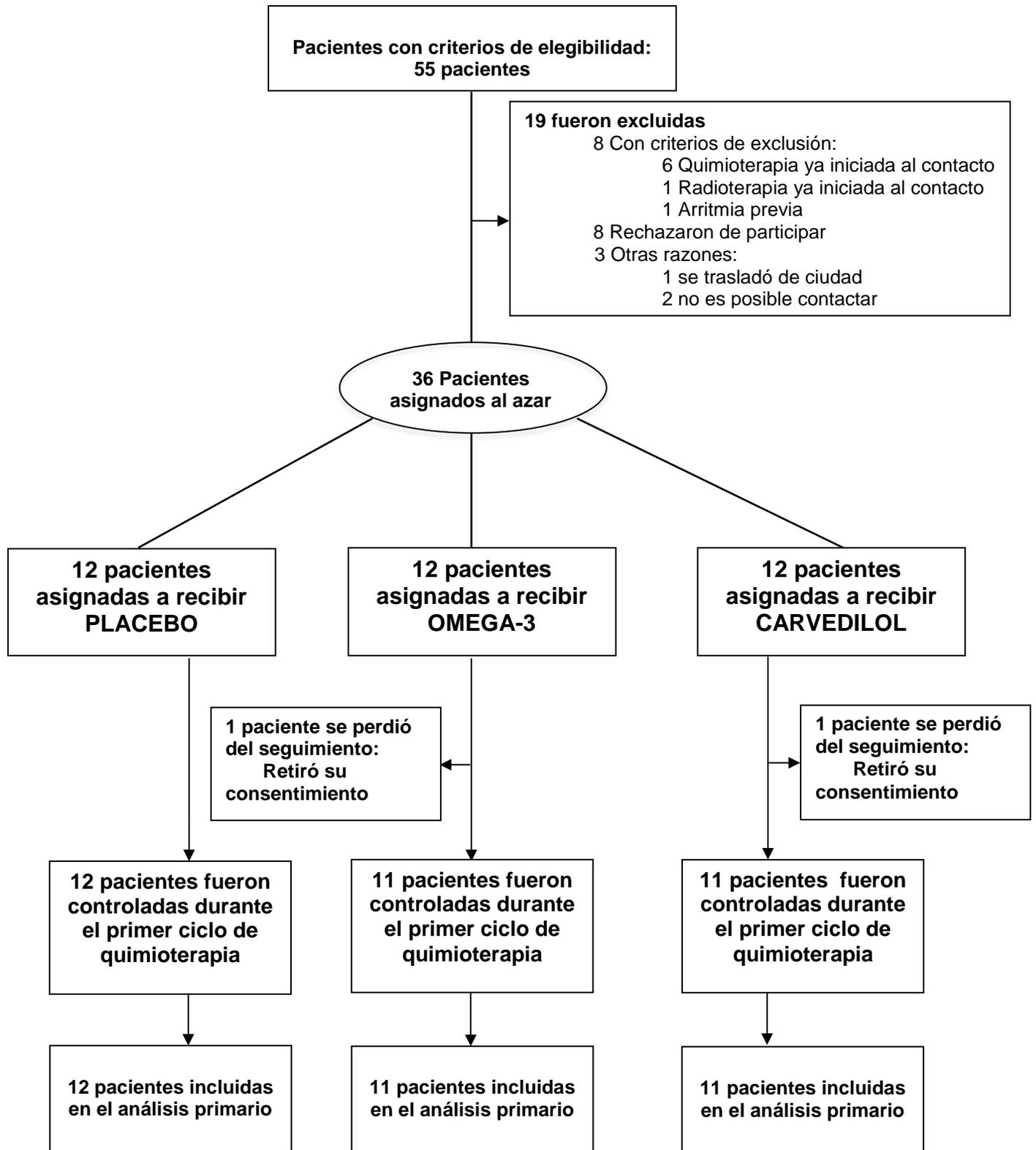


Tabla 1. Características clínicas de las pacientes incluidas en el estudio.

Características Generales	(n=36)
Edad (años)	50,3±9,5 (33-69)
IMC (kg m ⁻²)	28±4,7
Índice cintura/cadera	0,92±0,06
Basal de PAS (mmHg)	110,4±16,5
Basal de PAD (mmHg)	71,7±10,3
Basal de FC (l.p.m)	74,6±10,7
Basal de FEVI (%)	69,8±4,1
Factores de Riesgo CV	
Hipertensión (%)	11 (30,6%)
Diabetes mellitus 2 (%)	3 (8,3%)
Dislipidemia (%)	8 (22,2%)
Tabaquismo (%)	15 (41,7%)
Índice paquete/año	12,9±17,2
Tratamientos	
IECA/ARAI (%)	9 (25%)
Aspirina/AINES (%)	8 (22,2%)
Estatinas (%)	2 (5,6%)
Etapificación TNM	
I	3 (8,3%)
II	21 (58,3%)
III	12 (33,3%)
IV	0 (0%)
Dosis acumulativa Doxorrubicina (mg/m ²)	230,5±32,6
Dosis Doxorrubicina por ciclo (mg/m ²)	59±2,8
Tratamiento con Radioterapia	26 (72,2%)
Mama derecha	12 (33,3%)
Mama izquierda	14 (38,9%)

Tabla 2. Características clínicas de las pacientes incluidas en el análisis primario por grupo de intervención.

	Carvedilol (n=11)	Placebo (n=12)	Omega-3 (n=11)	P value
Edad (años)	51,6±10,7	49,8±10,8	49,5±7,9	0,904
IMC (kg m⁻²)	27,5±3,4	28,2±5,6	28,6±5,2	0,965
Índice cintura/cadera	0,92±0,04	0,92±0,09	0,93±0,06	0,721
Basal de PAS (mmHg)	105,6±21,4	110,6±13,9	115,2±13,4	0,234
Basal de PAD (mmHg)	69,2±12,9	72,2±8,9	73,6±9,1	0,686
Basal de FC (l.p.m)	72,2±9,5	80,4 ±12,3	70,6±7,6	0,125
Basal de FEVI (%)	69,9±3,2	71,7±4,6	68,9±3,9	0,210
Factores de Riesgo CV				
Hipertensión (%)	4 (36,4%)	2(16,7%)	5 (45,5 %)	0,347(F)
Diabetes mellitus 2 (%)	1 (9,1%)	0 (0%)	2(18,2%)	0,294(F)
Dislipidemia (%)	3 (27,3%)	2(16,7%)	3 (27,3%)	0,876(F)
Tabaquismo (%)	3 (27,3%)	6 (50%)	5 (45,5%)	0,570(F)
Índice paquete/año	6±4,4	15,4±20,3	11,2±10,4	0,895
Tratamientos				
IECA/ARAI (%)	4 (36,7%)	1 (8,3%)	4 (36,4%)	0,192(F)
Aspirina/AINES (%)	4 (36,4%)	1 (8,3%)	3 (27,3%)	0,280(F)
Estatinas (%)	0 (0%)	1 (8,3%)	1 (9,1%)	0,999(F)
Etapificación TNM				
I	1 (9,1%)	0	2 (18,2%)	0,294(F)
II	4 (36,4%)	9 (75%)	7 (63,6%)	0,214(F)
III	6 (54,6%)	3 (25%)	2 (18,2%)	0,218(F)
IV	0	0	0	-----
Dosis acumulativa (mg/m²)	237,8±7,2	219,2±52	236,0±12,7	0,448
Dosis Doxorubicina por ciclo (mg/m²)	59,5±1,8	58,5±3,5	59,0±3,2	0,811
Tratamiento con Radioterapia				
Mama derecha	7 (63,6%)	10 (83,3%)	9 (81,8%)	0,599(F)
Mama izquierda	4 (36,4%)	3 (25%)	5 (45,5%)	0,607(F)
Total Gy recibidos	3 (27,3%)	7 (58,3%)	4 (36,4%)	0,314(F)
	66,0±0,0	62,8±6,8	57,6±15,2	0,334

Pvalue obtenido de variables continuas se evaluó con el Test no paramétrico de Kruskal-Wallis, en tanto que *Pvalue(F)* obtenido de variables categóricas se evaluó mediante el Test de Fisher.

V.2. Resultados según objetivos específicos.

V.2.1. Determinación del efecto cardioprotector de omega-3 y carvedilol contra la cardiotoxicidad aguda inducida por antraciclinas, mediante determinación de marcadores de injuria miocárdica (objetivo específico1).

V.2.1.1. Determinación de biomarcadores séricos de cardiotoxicidad aguda.

V.2.1.1.1. Variable de desenlace primario: Determinación de NT-ProBNP.

Se realizaron determinaciones de niveles de NT-ProBNP durante el primer ciclo de quimioterapia durante un control BASAL, en DIA+3 y en DIA+5. Específicamente nuestra variable de desenlace primario fueron los niveles de NT-ProBNP en el DIA+3, por lo tanto evaluamos el efecto de las intervenciones sobre este marcador. Inicialmente, se realizó un análisis primario incluyendo a la totalidad de las pacientes del estudio, en el que destacó un incremento en los niveles de NT-ProBNP al comparar el control BASAL, que tuvo una mediana de 43,5 (22,5-75,5) pg/mL con el DIA +3 post-quimioterapia con una mediana de 112 (54-328) pg/mL, lo que significó un incremento de un 260% ($p < 0,01$). Posteriormente en el control del DIA+5 se presentó una disminución en el valor de NT-ProBNP, con una mediana 19 (19-51) pg/mL, lo que significó una disminución de un 83% con respecto al control del DIA +3 ($p < 0,001$). Por otro lado, no se registraron diferencias significativas entre el control BASAL y el DIA+5 (Figura 3).

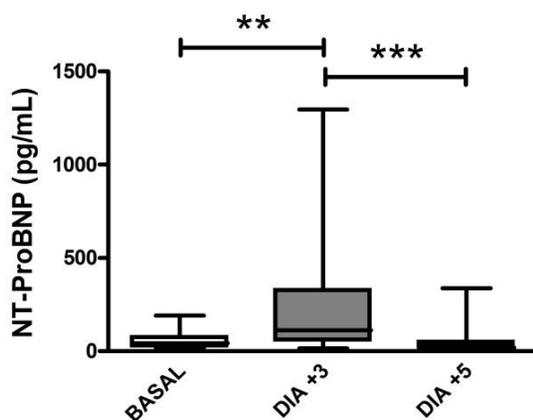


Figura 3. Niveles de NT-ProBNP (pg/mL) del total de pacientes en primer ciclo de quimioterapia. Muestras de suero incluyendo a todos los pacientes ($n=34$), durante el control BASAL, DIA+3 y DIA+5 en el primer ciclo de quimioterapia. (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y seguido por test de comparaciones múltiples de Dunn. Diferencias significativas con * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, $p5-p95$).

Por otra parte al realizar una evaluación según los grupos de intervención, las medianas de NT-ProBNP durante el DIA +3 fueron de 112 (54-518) pg/mL para el grupo placebo, 246 (54-646,5) pg/mL para el grupo carvedilol y de 96 (25-276) pg/mL para el grupo omega-3, desatacando así, una gran dispersión de las determinaciones de NT-ProBNP en los 3 grupos durante el control del DIA +3. Por otra parte, pese la mediana de NT-ProBNP en el grupo omega-3, fue un 14,3% más bajo comparado al promedio del grupo placebo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 4A). Cabe la pena señalar además, que al evaluar cada grupo por separado, se encontraron diferencias significativas entre los controles BASAL vs DIA+3 y DIA+3 vs DIA+5, tanto en el grupo placebo ($P<0,05$ y $P<0,01$) como carvedilol ($P<0,05$ y $P<0,01$), sin embargo en el grupo omega-3 no encontraron diferencias significativas entre los diferentes controles (Figura 4B).

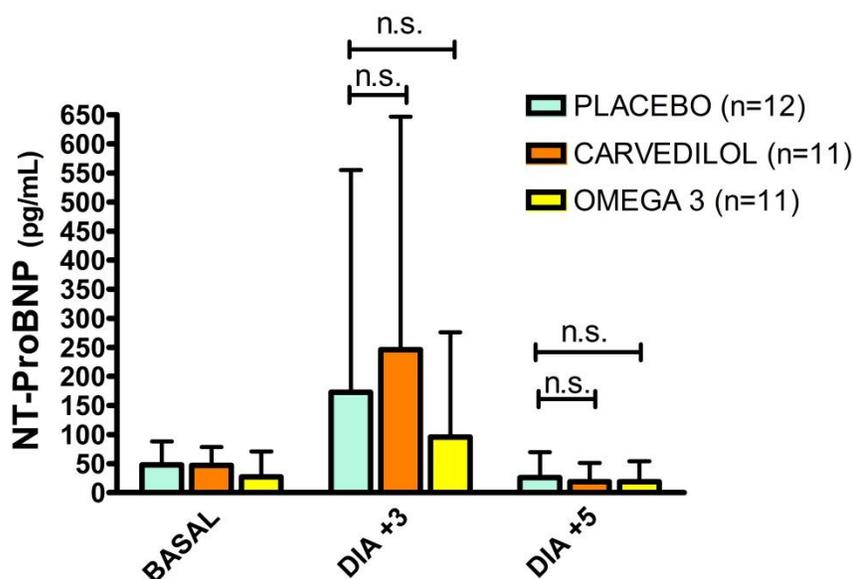


Figura 4. Determinaciones NT-ProBNP por grupos. 4A. Comparación de niveles de NT-ProBNP (pg/mL) entre grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3. Se compararon niveles de los tres grupos de intervención, durante control BASAL, DIA+3 y DIA+5 en el primer ciclo de quimioterapia (análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y seguido por test de comparaciones múltiples de Dunn. N.S., indica no significativo. Barras representan medianas y rango intercuartílico superior).

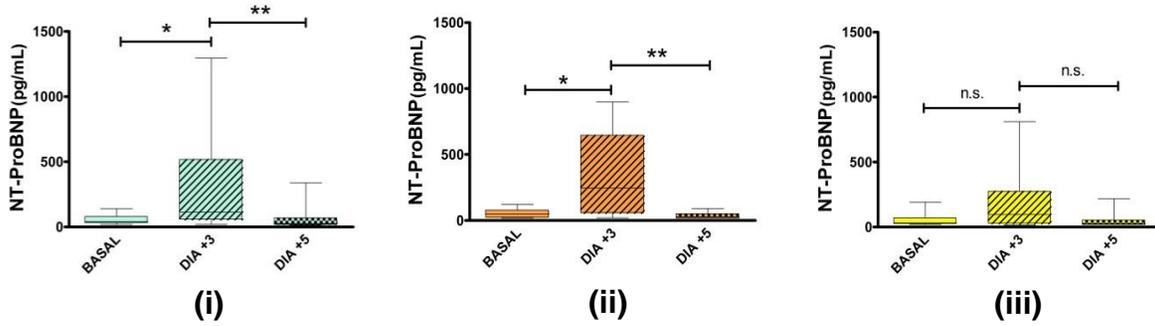


Figura 4B. Niveles de NT-ProBNP (pg/mL) en cada grupo por separado: (i) Placebo, (ii) Carvedilol y (iii) Omega-3. Se muestran niveles de NT-ProBNP de cada grupo de pacientes por separado durante control BASAL, DIA+3 y DIA+5 en el Primer ciclo de quimioterapia (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Mann Whitney. Diferencias significativas con *P <0.05; **P<0,01; n.s, indica no significativo. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95).

Para aumentar la sensibilidad en la detección de diferencias entre los grupos, se decidió realizar un análisis de las diferencias encontradas para el NT-ProBNP entre dos periodos de tiempo, y realizar una evaluación de diferencias entre los grupos. Fue así que se realizó un análisis con los valores diferenciales o “delta”, encontrados entre el DIA +3 con respecto al BASAL, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 4C).

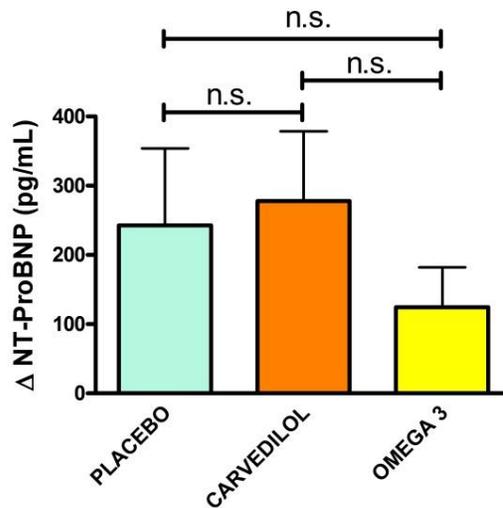


Figura 4C. Comparación de Δ NT-ProBNP (pg/mL) entre DIA +3 y BASAL entre grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3. Se comparó el diferencial (Δ) entre el DIA +3 y BASAL entre los tres grupos de intervención, durante el primer ciclo de quimioterapia (análisis estadístico fue realizado con el test paramétrico de ANOVA con análisis post test de Bonferroni. N.S., indica no significativo. Barras de error representan el promedio \pm DE).

V.2.1.1.2. Variable de desenlace secundario: Determinación de Troponina Cardíaca T.

Con respecto a los controles realizados con troponina cardíaca T (cTnT) sérica, ninguna de las pacientes incluidas en el estudio presentó niveles superiores al límite inferior detectable por la técnica (todas las pacientes con valores $<0,01$ ng/mL). Debemos recordar que la troponina cardíaca T es utilizada como diagnóstico de exclusión del infarto agudo al miocardio y posiblemente tendría utilidad en monitorización de pacientes con injuria cardíaca de causa no isquémica, por lo que fue utilizado en el actual estudio. Los valores de referencia considerados con valor diagnóstico y pronóstico son mayores o iguales a $0,01$ ng/mL. Por otra parte el límite superior para individuos sanos es $<0,01$ ng/mL (no detectable por este método) (Jaffe AS, 1999).

V.2.1.2. Determinación de marcadores electrocardiográficos de cardiotoxicidad aguda.

Se realizó la medición del intervalo QT corregido (QTc) y dispersión del QT corregido (QTDC). Mediante los registros electrocardiográficos realizados en los controles BASAL, DIA+1 y DIA+3.

V.2.1.2.1. Determinación del intervalo QT corregido.

Al realizar un evaluación del QTc en la totalidad de los pacientes, se encontró en el DIA+1 un incremento de las medianas de un 5,1% comparado con el control BASAL ($p<0,01$). Posteriormente, en el control del DIA+3 se pesquiso un descenso del QTc de un 2,9% menos con respecto al control del DIA +1 ($p<0,05$). Por otro lado, no se registraron diferencias significativas entre el control BASAL y el DIA+3 (Figura 5).

Al realizar una comparación del QTc entre los tres grupos de intervención, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ninguno de los controles electrocardiográficos (Figura 6A). Sin embargo, debemos señalar que al evaluar cada grupo por separado, el incremento del QTc el DIA +1 con respecto al control BASAL, fue encontrado únicamente en los grupos placebo

($P < 0,05$) y omega-3 ($P > 0,01$), pero no hubieron variaciones significativas del QTc en el DIA+1 en el grupo carvedilol (Figura 6B).

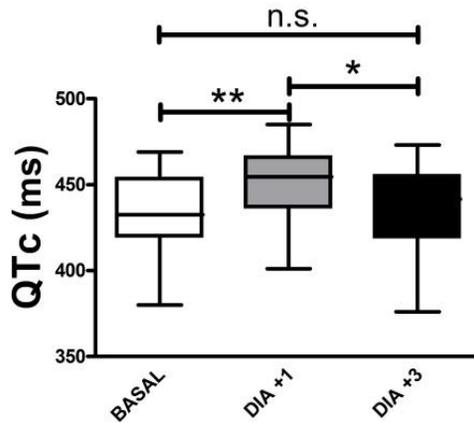


Figura 5. Valores del intervalo QT corregido (QTc) en milisegundos del total de pacientes en primer ciclo de quimioterapia. Se evaluó el QTc en la totalidad de pacientes, durante control BASAL, DIA+1 y DIA+3 en el primer ciclo de quimioterapia (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y seguido por test de comparaciones múltiples de Dunn. Diferencias significativas con * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; n.s., sin diferencias significativas. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95).

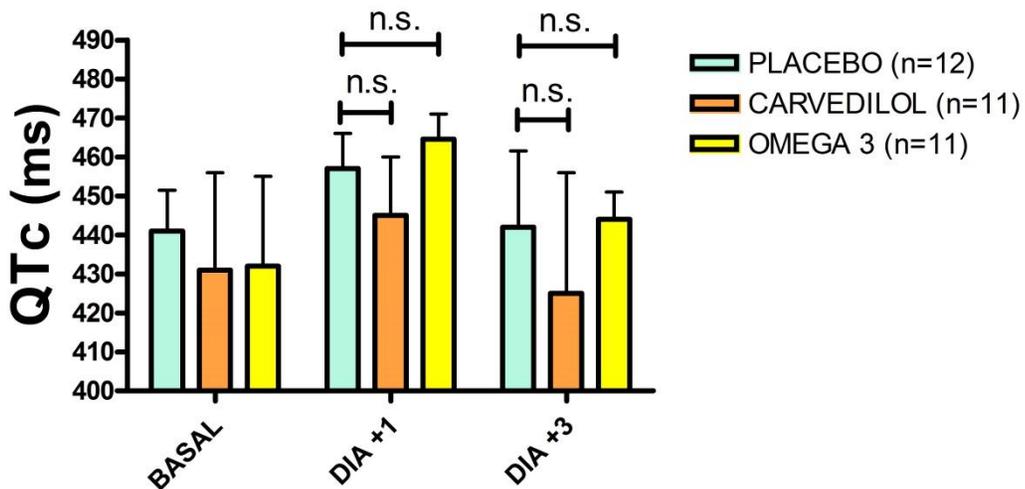


Figura 6. Determinaciones de intervalo QT corregido (QTc) por grupos. 6A. Comparación del intervalo (QTc) entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3. Se evaluó el QTc durante control BASAL, DIA+1 y DIA+3 en el primer ciclo de quimioterapia (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y seguido por test de comparaciones múltiples de Dunn. n.s., sin diferencias significativas. Barras representan medianas y rango intercuartílico superior).

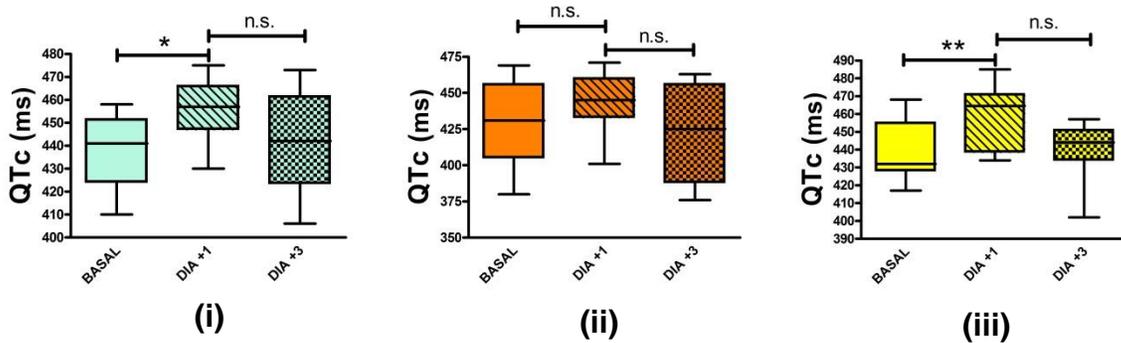


Figura 6B. Evaluación del QTc en cada grupo por separado: (i) Placebo, (ii) Carvedilol y (iii) Omega-3. Se evaluó el QTc durante control BASAL, DIA+1 y DIA+3 en el primer ciclo de quimioterapia (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Mann Whitney. Diferencias significativas con * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; n.s., sin diferencias significativas. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95).

Para aumentar la sensibilidad en la detección de diferencias entre los grupos, se decidió realizar un análisis de las diferencias encontradas para el intervalo QTc entre dos periodos de tiempo, y realizar una evaluación de diferencias entre los grupos. Fue así, que se se compararon los valores diferenciales o “delta” de QTc, encontrados tanto entre el DIA +1 con respecto al BASAL, como así mismo entre el DIA +3 y el BASAL no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos casos (Figura 6C (i) y (ii)).

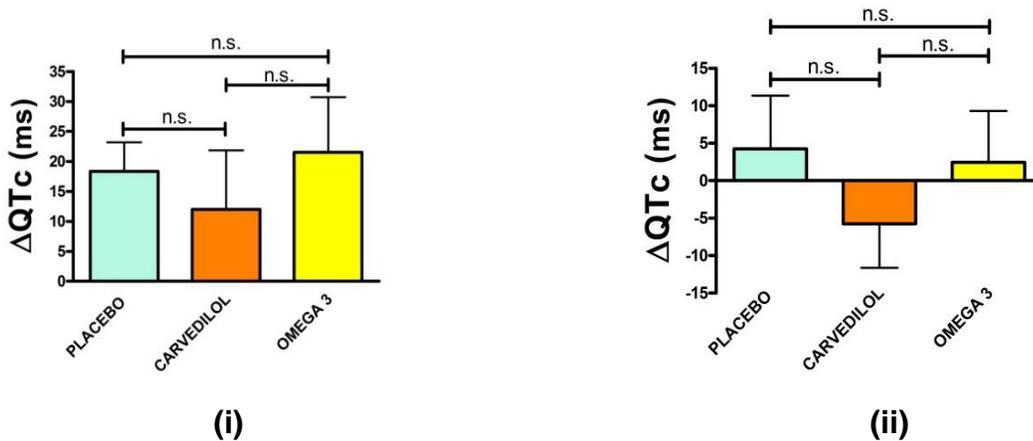


Figura 6C. Comparación de Δ QT corregido (QTc) entre grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3: (i) Δ QT corregido (QTc) entre DIA +1 y BASAL. Se comparó el diferencial (Δ) entre el DIA +1 y BASAL entre los tres grupos de intervención, durante el primer ciclo de quimioterapia). **(ii) Δ QT corregido (QTc) entre DIA +3 y BASAL.** Se comparó el diferencial (Δ) entre el DIA +3 y BASAL entre los tres grupos de intervención, durante el primer ciclo de quimioterapia (análisis estadístico fue realizado con el test paramétrico de ANOVA con análisis post test de Bonferroni.. n.s., sin diferencias significativas. Barras de error representan el promedio \pm DE).

V.2.1.2.2. Determinación de la dispersión del intervalo QT corregido.

Al analizar la dispersión del intervalo QT corregido (QTDC) en la totalidad de los pacientes, no se encontraron variaciones significativas entre los diferentes controles (Figura 7). Además, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas al realizar una comparación del QTDC entre los tres grupos de intervención (Figura 8).

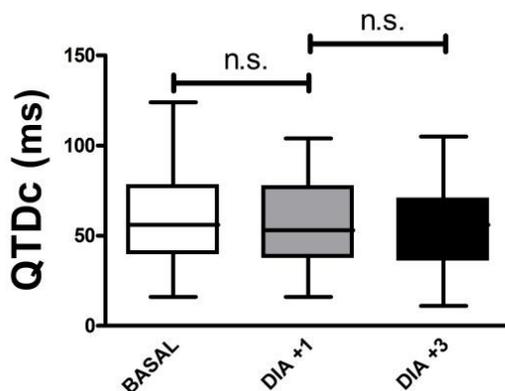


Figura 7. Determinación de la dispersión del intervalo QT corregido (QTDC) en milisegundos. 7A. Evaluación del QTDC en la totalidad de pacientes en primer ciclo de quimioterapia. Se evaluó la QTDC durante control BASAL, DIA+1 y DIA+3 en el primer ciclo de quimioterapia. (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y seguido por test de comparaciones múltiples de Dunn. Diferencias significativas con * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; n.s., sin diferencias significativas. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95).

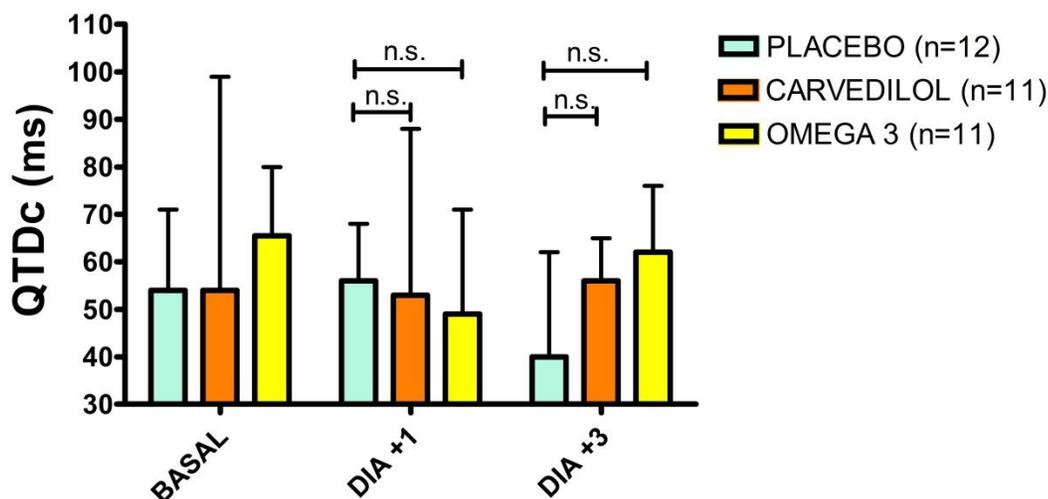


Figura 7B. Comparación de QTDC entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3. Se comparó entre grupos la QTDC durante control BASAL, DIA+1 y DIA+3 en el primer ciclo de quimioterapia (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y seguido por test de comparaciones múltiples de Dunn; n.s., sin diferencias significativas. Barras representan medianas y rango intercuartílico superior).

V.2.2. Evaluación del efecto de omega-3 y carvedilol en los biomarcadores de daño por estrés oxidativo durante el primer ciclo de quimioterapia con antraciclinas (objetivo específico 2).

La evaluación del daño por estrés oxidativo se realizó mediante la determinación de niveles de F2-isoprostanos plasmáticos, como productos de la lipoperoxidación *in vivo*.

Al evaluar en su conjunto a la totalidad de los pacientes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de F2-isoprostanos entre los diferentes días evaluados (Figura 8A). Sin embargo, al realizar un análisis comparando los diferentes grupos de intervención, se observaron menores niveles de F2-isoprostanos en el DIA+5 en los grupos carvedilol y omega-3, comparados con el Grupo placebo, con diferencias que fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Figura 8B). Por otra parte al evaluar cada grupo de intervención por separado a diferentes tiempos, no se encontraron diferencias significativas (Figura 8C).

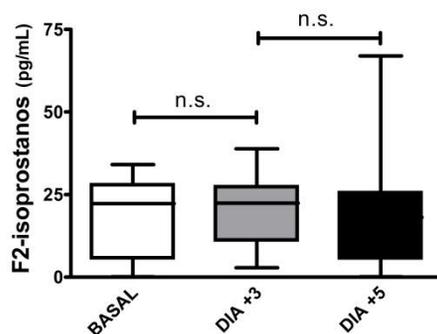


Figura 8. Lipoperoxidación *in vivo* a través de la determinación de niveles de F2-isoprostanos (pg/mL) en plasma de pacientes. 8A. Niveles de F2-isoprostanos al evaluar la totalidad de pacientes. Se evaluaron niveles de F2-isoprostanos durante control BASAL, DIA+3 y DIA+5 en el primer ciclo de quimioterapia. (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y seguido por test de comparaciones múltiples de Dunn; n.s., sin diferencias significativas. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95.)

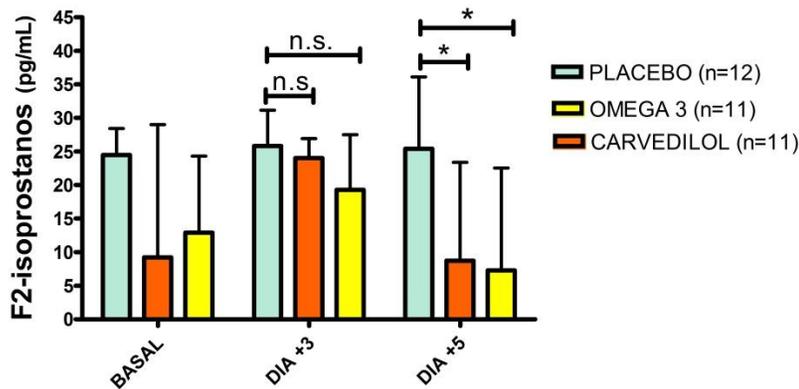


Figura 8B. Comparación de niveles de F2-isoprostanos entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3. (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y seguido por test de comparaciones múltiples de Dunn. Diferencias significativas con $*P < 0,05$; n.s., sin diferencias significativas. Barras representan medianas y rango intercuartílico superior.).

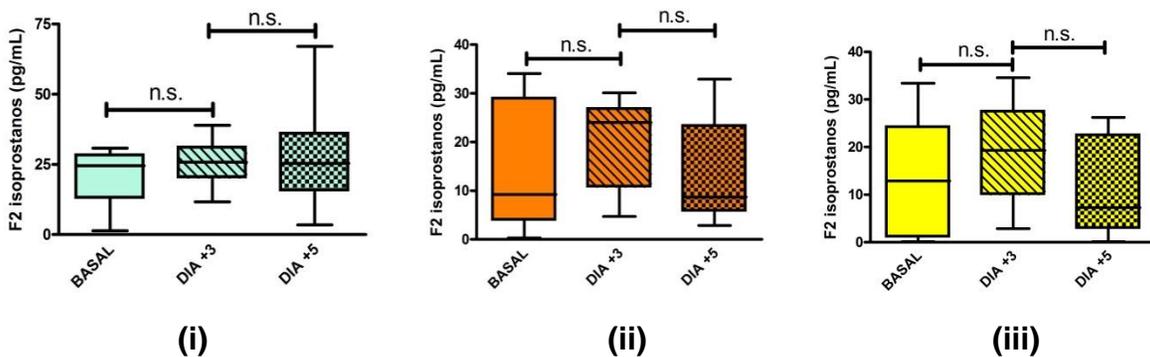


Figura 8C. Evaluación niveles de F2-isoprostanos en cada grupo por separado: (i) Placebo, (ii) Carvedilol y (iii) Omega-3. Se evaluaron los niveles de F2-isoprostanos durante control BASAL, DIA+3 y DIA+5 en el primer ciclo de quimioterapia (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Mann Whitney; n.s., sin diferencias significativas. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95).

V.2.3. Evaluación del efecto de omega-3 y carvedilol sobre el status antioxidante durante el primer ciclo de quimioterapia con antraciclinas (objetivo específico 3).

V.2.3.1. Evaluación de los mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante en eritrocito.

V.2.3.1.1. Determinación de la actividad de SOD.

Al comparar la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) entre los diferentes grupos de intervención, no se encontraron diferencias significativas entre

los grupos (Figura 9A). Por otra parte, al evaluar la actividad de SOD por separado, en los diferentes grupos de intervención, se constató en el grupo placebo un descenso de un 24,5%% en la actividad enzimática durante el DIA +3 en comparación a su control BASAL ($p < 0,05$) (Figura 9B(i)), en tanto que los grupos carvedilol y omega-3 no mostraron variaciones significativas en los diferentes controles (Figuras 9B(ii) y 9B(iii)).

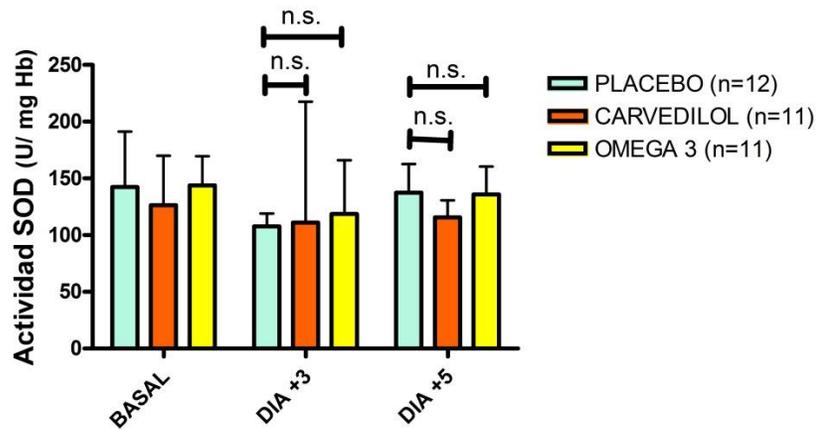


Figura 9. Actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) en eritrocito (U/mg Hb). 9A. Comparación de la actividad de SOD entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3. Se evaluó la actividad de SOD durante control BASAL, DIA+3 y DIA+5 en el primer ciclo de quimioterapia (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y seguido por test de comparaciones múltiples de Dunn. n.s., sin diferencias significativas. Barras representan medianas y rango intercuartílico superior).

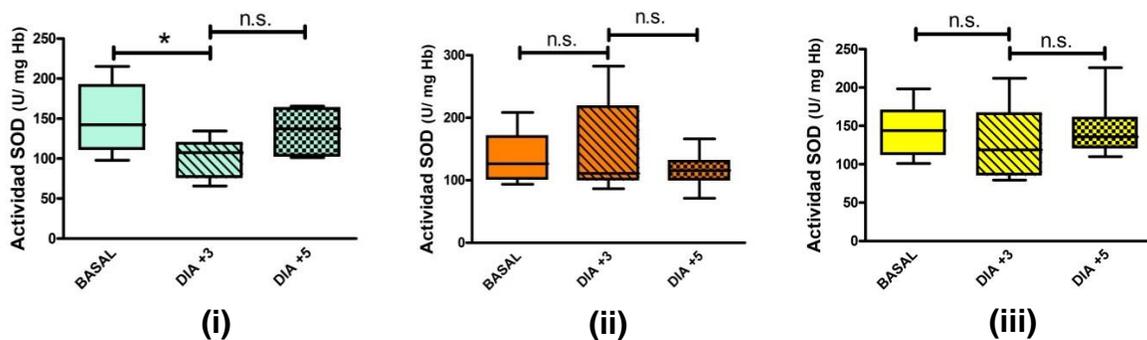


Figura 9B. Evaluación de la actividad de SOD en cada grupo por separado: (i) Placebo, (ii) Carvedilol y (iii) Omega-3. Se evaluó la actividad de SOD durante control BASAL, DIA+3 y DIA+5 en el primer ciclo de quimioterapia (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Mann Whitney. Diferencias significativas con $*P < 0,05$; n.s., sin diferencias significativas. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95).

V.2.3.1.2. Determinación de la actividad de CAT.

Con respecto a la evaluación de la actividad enzimática de Catalasa (CAT) en eritrocito, al realizar un análisis comparativo entre los grupos de intervención, se encontró en el DIA +5 una menor actividad enzimática de CAT en el grupo placebo, en comparación al grupo carvedilol ($P<0,05$) y omega-3 ($P<0,01$) (Figura 10A). Al evaluar cada grupo de intervención por separado, se encontró en el grupo placebo, una actividad de CAT que disminuyó un 48,1% el DIA +5 comparado con el control BASAL ($P<0,05$) (Figura 10B(i)), disminución que no se presentó en grupos carvedilol (Figura 10B(ii)) y omega-3 (Figura 10B(iii)).

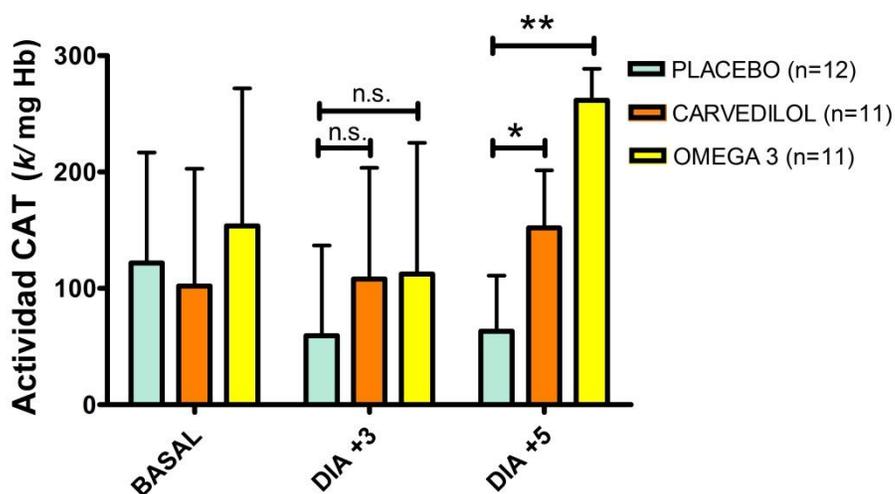


Figura 10. Actividad de la enzima Catalasa (CAT) en eritrocito (k/ mg Hb). 10A. Comparación de la actividad de CAT entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3. Se evaluó la actividad de CAT durante control BASAL, DIA+3 y DIA+5 en el primer ciclo de quimioterapia (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y seguido por test de comparaciones múltiples de Dunn. Diferencias significativas con * $P<0,05$; ** $P<0,01$; n.s., sin diferencias significativas. Barras representan medianas y rango intercuartílico superior.).

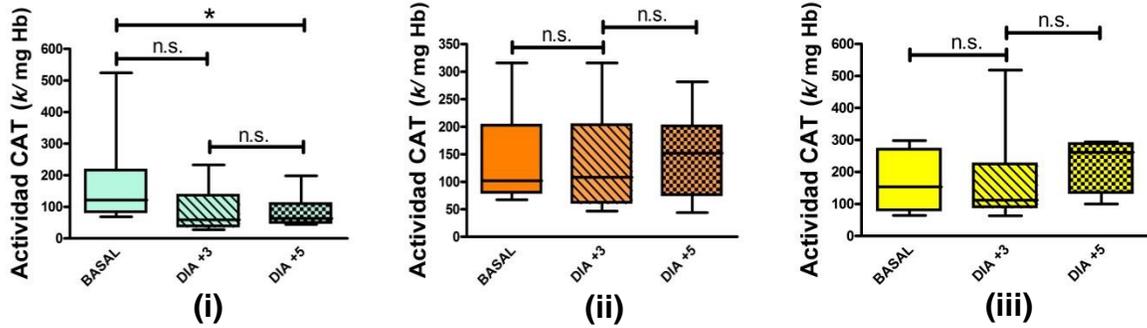


Figura 10B. Evaluación de la actividad de CAT en cada grupo por separado: (i) Placebo, (ii) Carvedilol y (iii) Omega-3. Se evaluó la actividad de CAT durante control BASAL, DIA+3 y DIA+5 en el primer ciclo de quimioterapia (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Mann Whitney. Diferencias significativas con $*P<0,05$; n.s., sin diferencias significativas. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95.).

V.2.3.1.3. Determinación de la actividad de GSH-Px.

Se evaluó también la actividad de la enzima Glutation Peroxidasa (GSH-Px) en eritrocito. Al realizar el análisis comparativo entre los tres grupos de intervención, se encontró en el DIA +5 una menor actividad enzimática de GSH-Px en el grupo placebo en comparación al grupo omega-3 ($P<0,05$) (Figura 11A). Al evaluar a cada grupo de intervención por separado, se encontró en el grupo placebo, una disminución de un 28,1% de la actividad de GSH-Px en el DIA +5 comparado con su control BASAL ($P<0,05$) (Figura 11B(i)), disminución que no se presentó en los grupos carvedilol (Figura 11B(ii)) y omega-3 (Figura 11B(iii)).

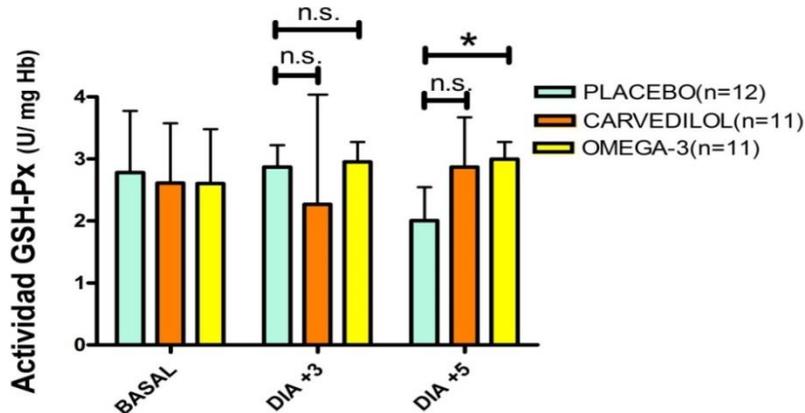


Figura 11. Actividad de la enzima Glutation Peroxidasa (GSH-Px) en eritrocito (U/ mg Hb). 11A. Comparación de la actividad de GSH-Px entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3. Se evaluó la actividad de GSH-Px durante control BASAL, DIA+3 y DIA+5 en el primer ciclo de quimioterapia (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y seguido por test de comparaciones múltiples de Dunn. Diferencias significativas con $*P<0,05$; n.s., sin diferencias significativas. Barras representan medianas y rango intercuartílico superior).

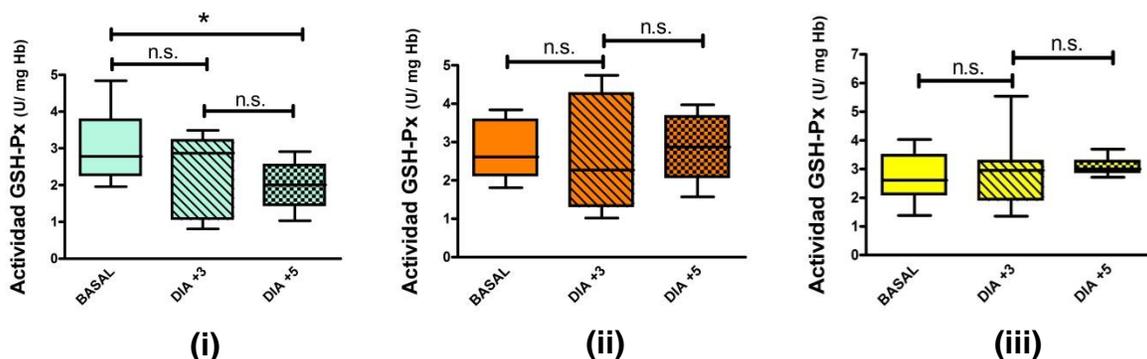


Figura 11B. Evaluación de la actividad de GSH-Px en cada grupo por separado: (i) Placebo, (ii) Carvedilol y (iii) Omega-3. Se evaluó la actividad de GSH-Px durante control BASAL, DIA+3 y DIA+5 en el primer ciclo de quimioterapia (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Mann Whitney. Diferencias significativas con $*P<0,05$; n.s., sin diferencias significativas. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95).

V.2.3.2. Evaluación de los mecanismos no enzimáticos de defensa antioxidante.

V.2.3.2.1. Determinación de la Capacidad antioxidante del Plasma.

Se evaluó la capacidad antioxidante del plasma mediante el FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma), con parámetro extracelular del status antioxidante en caso de que fuera modificado por los tratamientos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de intervención durante ninguno de los controles realizados (Figura 12).

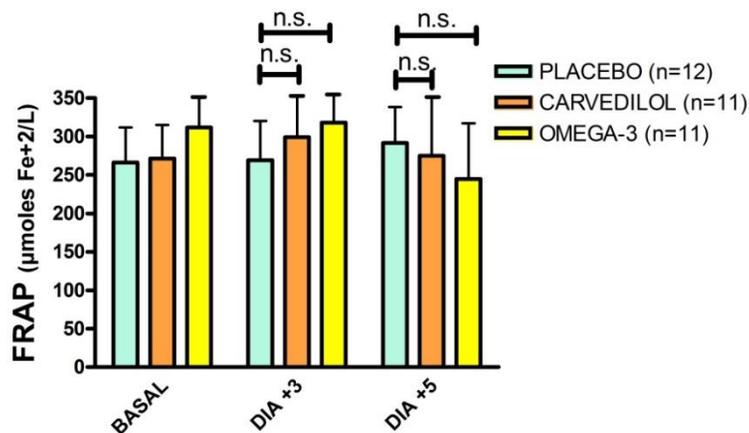


Figura 12. Determinación de la Capacidad Antioxidante del Plasma, mediante el “Ferric Reducing Ability of Plasma” (FRAP) en umoles Fe²⁺/L. Comparación de FRAP entre los grupos placebo, Carvedilol y Omega-3, durante control BASAL, DIA+3 y DIA+5 en el primer ciclo de quimioterapia (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y seguido por test de comparaciones múltiples de Dunn. n.s., sin diferencias significativas. Barras representan medianas y rango intercuartílico superior).

V.2.3.2.2. Determinación de la Capacidad antioxidante intracelular del eritrocito.

Como una forma de evaluar la capacidad antioxidante intracelular se determinó en eritrocito la relación entre Glutation reducido/Glutation Oxidado (GSH/GSSG), que corresponde al índice Thiolico. Al evaluar los grupos de intervención por separado, se encontró en el grupo placebo un incremento de un 50,6% de la relación GSH/GSSG en el DIA+5 en comparación a su control previo del DIA +3 ($p < 0,05$) (Figura 13B(i)). Por otra parte en los grupos carvedilol (Figura 13B(ii)) y omega-3 (Figura 13B(iii)), no se encontraron variaciones estadísticamente significativas de la relación GSH/GSSG en los diferentes controles. Finalmente, y debido al ya comentado incremento de la relación GSH/GSSG el DIA +5 en el grupo placebo, al compararse con el grupo carvedilol y el grupo omega 3, el grupo placebo presentó una mayor relación GSH/GSSG que los otros dos grupos, diferencias que fueron estadísticamente significativas ($P < 0,05$ en ambos casos) (Figura 13A).

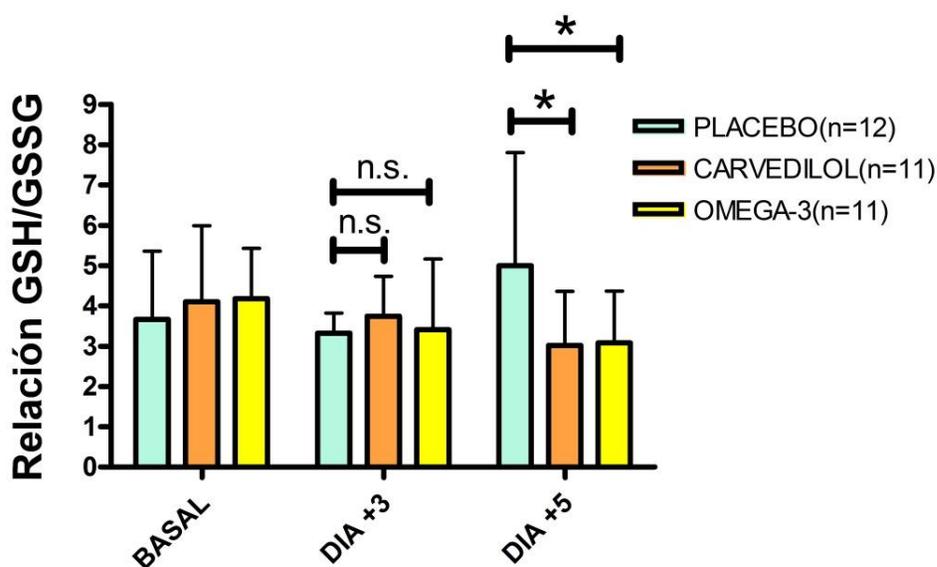


Figura 13. Determinación de la relación GSH/GSSG (Índice Thiolico) en eritrocito. 13A. Comparación de la relación GSH/GSSG entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3. Se evaluó la relación GSH/GSSG durante control BASAL, DIA+3 y DIA+5 en el primer ciclo de quimioterapia (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y seguido por test de comparaciones múltiples de Dunn. Diferencias significativas con $*P < 0,05$; n.s., sin diferencias significativas. Barras representan medianas y rango intercuartílico superior.).

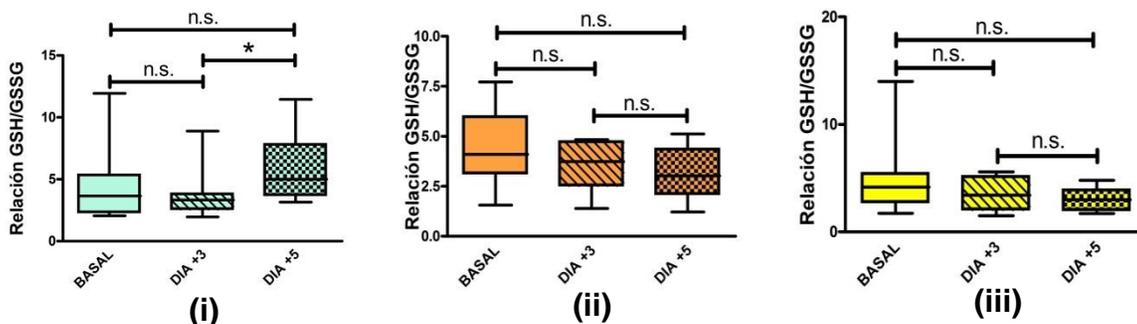


Figura 13B. Evaluación de la relación GSH/GSSG en cada grupo por separado: (i) Placebo, (ii) Carvedilol y (iii) Omega-3. Se evaluó la relación GSH/GSSG durante control BASAL, DIA+3 y DIA+5 en el primer ciclo de quimioterapia (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Mann Whitney. Diferencias significativas con $*P < 0,05$; n.s., sin diferencias significativas. Cajas, mediana y rango intercuartílico; bigotes, p5-p95).

V.2.4. Evaluación del efecto de omega-3 y carvedilol sobre la Fracción de Eyección de Ventrículo Izquierdo evaluada mediante ecocardiografía, a mediano plazo (a los 10-12 meses post-tratamientos con antraciclinas) (objetivo específico 4).

Se realizó un primer control ecocardiográfico BASAL, previo al inicio de la quimioterapia con antraciclinas y un segundo control entre los 10 a 12 meses posterior al inicio del tratamiento, evaluándose parámetros ecocardiográficos clásicos. Los segundos controles en promedio se realizaron a los 10,15 meses en el grupo placebo, a los 11,3 meses en el grupo carvedilol y a los 10,7 meses en el grupo omega-3, y todos dentro del rango de tiempo de 10 a 12 meses.

Por otra parte, el segundo control sólo pudo ser realizado en 30 pacientes, debido a que dos pacientes se trasladaron de ciudad y dos pacientes no tenían una adecuada ventana ecocardiográfica.

Además, si bien el método utilizado para la estimación de la fracción de eyección de ventrículo izquierdo (FEVI), pudo variar de un paciente a otro, para el análisis de los resultados de un determinado paciente, se utilizó un mismo método de estimación para su primer y segundo control. En el caso de que en un paciente se pudiera realizar más de método de estimación de FEVI, se priorizó: 1º Simpson Biplano, 2º Simpson 4 cámaras y 3º Teichholz por modo M.

Inicialmente, al evaluar a la totalidad de los pacientes se encontró una disminución de un 7,48% de la FEVI en el control a los 10-12 meses, con respecto al

control BASAL, lo que fue estadísticamente significativo ($P < 0,001$) (Figura 14A). Por otra parte, al evaluar los diferentes grupos de intervención por separado, comparando el primer y segundo control, se encontró un descenso significativo en el segundo control tanto en el grupo omega-3 como en el grupos placebo, aunque este último con una diferencia de mayor magnitud (Figura 14B).

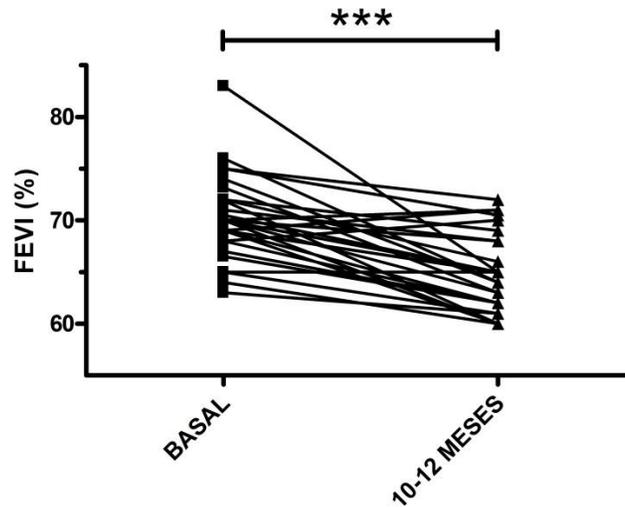
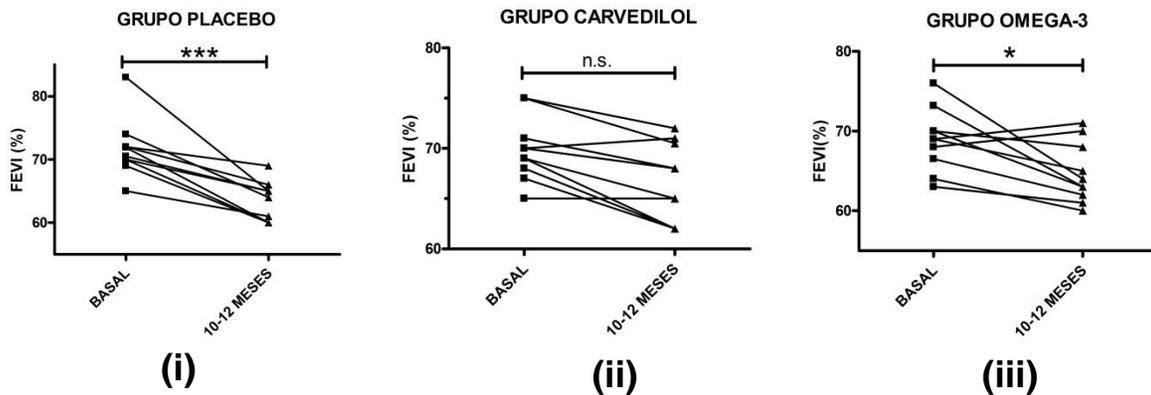


Figura 14. Determinación de Fracción de Eyección de Ventrículo Izquierdo (FEVI) en control BASAL y a los 10-12 meses post inicio de quimioterapia con antraciclinas. 14A. Evaluación de FEVI de la totalidad de los pacientes (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Mann Whitney. Diferencias significativas con $***P < 0,001$. Cada línea representa un paciente en particular).



14B. Evaluación de FEVI en cada grupo por separado: (i) Placebo, (ii) Carvedilol, (iii) Omega-3. (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Mann Whitney. Diferencias significativas con $*P < 0,05$; $***P < 0,001$; n.s., sin diferencias significativas. Cada línea representa un paciente en particular).

Luego, al comparar los grupos de intervención entre sí, no se encontraron diferencias significativas en la FEVI tanto en el control basal como en el control a los 10-12 meses (Figura 14C).

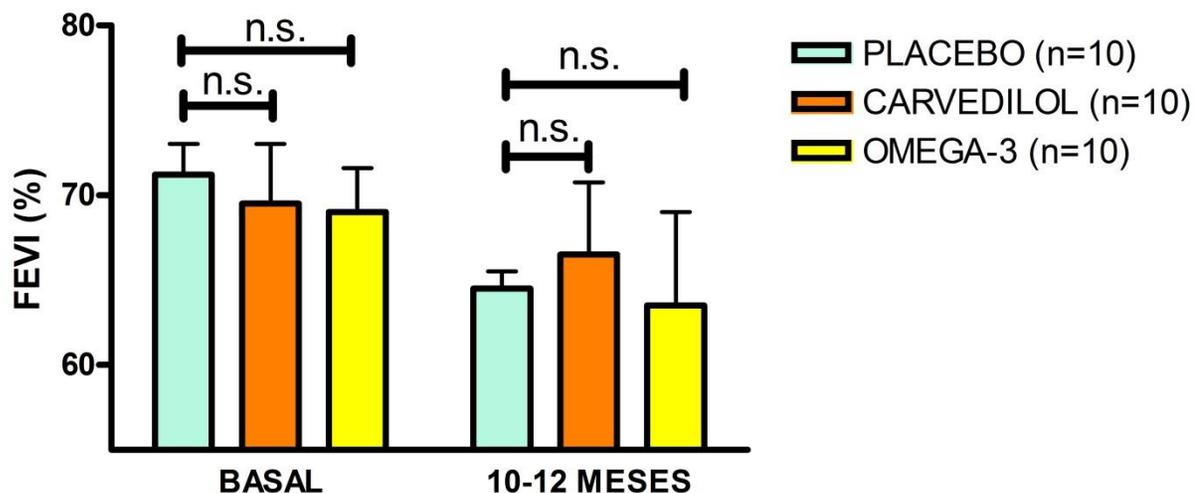


Figura 14C. Comparación de la FEVI entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3 (Análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y seguido por test de comparaciones múltiples de Dunn. n.s., sin diferencias significativas. Barras representan medianas y rango intercuartílico superior).

Debemos señalar sin embargo, que si bien las diferencias no fueron significativas entre los grupos, al comparar el grupo carvedilol con el grupo placebo, se encontró un *Pvalue* de 0,08, que fue cercano al punto de corte. Por esto se decidió realizar un análisis de diferencia entre dos periodos de tiempo entre los grupos, lo que permite aumentar la sensibilidad en la detección de diferencias entre los grupos. Es por esto que se realizó un análisis considerando los valores diferenciales (delta), entre el control a los 10-12 meses y el control BASAL de los diferentes grupos de intervención (Figura 14D). Fue así, que se encontró un menor delta de reducción de la FEVI en el grupo carvedilol comparado con placebo (14D), lo que sugiere que el grupo carvedilol previene parcialmente la caída de FEVI inducida por doxorubicina.

Al evaluar por grupo los pacientes que presentaron un descenso de la FEVI >10%, encontramos que esta ocurrió en 5 pacientes del grupo placebo, en 3 pacientes del grupo omega-3 y en 1 paciente del grupo carvedilol. Además al momento del control a los 10-12 meses post quimioterapia, todos los pacientes se

encontraban asintomáticos, y ninguno presentó una FEVI <55%, con FEVI que fue en promedio $64,91 \pm 3,7$ (60-72).

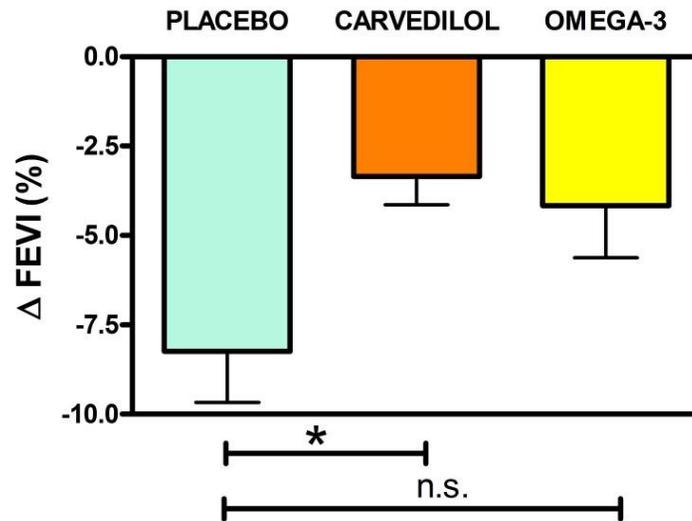


Figura 14D. Comparación del diferencial (Δ) de FEVI entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3. Se realizó una comparación de los valores diferenciales (Δ) del control BASAL y a los 10-12 meses, entre los grupos Placebo, Carvedilol y Omega-3 (Análisis estadístico fue realizado con el test paramétrico de ANOVA con análisis post test de Bonferroni. Diferencias significativas con $*P < 0,05$; n.s., sin diferencias significativas. Barras de error representan el promedio \pm DE).

VI. Discusión.

Esta tesis corresponde a un estudio clínico, aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo, que sustenta la hipótesis que un reforzamiento del sistema de defensa antioxidante sistémico, disminuirá la ocurrencia de cardiotoxicidad aguda por antraciclinas en un grupo de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama. Por este motivo se expone el efecto provocado por las intervenciones sobre biomarcadores de cardiotoxicidad aguda por antraciclinas, y en forma complementaria se presenta también su efecto sobre biomarcadores sistémicos de estrés oxidativo para evaluar el potencial efecto antioxidante de las intervenciones. También se presenta el potencial efecto a un mediano plazo sobre la FEVI (control a los 10-12 meses post-quimioterapia), que pudieran tener las intervenciones.

VI.1 Características clínicas de la población del estudio y factores de riesgo para el desarrollo de cardiotoxicidad por antraciclinas.

Las características clínicas generales de las pacientes incluidas en nuestro estudio son similares a lo señalado por otros autores, en cuanto a que al momento del diagnóstico, muchas mujeres con cáncer de mama presentan un mayor riesgo cardiovascular debido a que frecuentemente presentan en forma concomitante otras comorbilidades que incrementan dicho riesgo. Entre las comorbilidades que se describen, se encuentran la hipertensión arterial, diabetes mellitus y obesidad, los cuales pueden afectar negativamente la supervivencia de las pacientes. (Jones LW et al., 2007; Yancik R et al., 2001). A su vez, dentro de estos factores de riesgo algunos de ellos ya han evidenciado directamente incrementar el riesgo de cardiotoxicidad por antraciclinas, tales como la edad mayor de 65 años, el sexo femenino, la hipertensión arterial y el antecedente de enfermedad cardiovascular previa (Von Hoff DD et al, 1979; Volkova M, Russell R 3rd, 2011). Es así como al evaluar nuestra población de estudio encontramos hipertensión arterial en un 30,55%, dislipidemia en un 22,22% y tabaquismo crónico activo en un 41,67%, factores que representan un mayor riesgo potencial para el desarrollo de cardiotoxicidad por antraciclinas. Por el contrario, un factor que no estaría influyendo en un mayor riesgo de cardiotoxicidad en nuestra población de estudio, estaría dado por la edad de las pacientes incluidas, la que fue

en promedio de 50,26 años (usualmente edad mayor a 65 años se considera de mayor riesgo). Cabe destacar que la mayoría de los factores de riesgo, tienen en común la característica de encontrarse asociadas a la ocurrencia de estrés oxidativo.

Por otra parte, con respecto el principal factor de riesgo dependiente de la quimioterapia, es decir la dosis acumulativa de antraciclinas recibida, se ha demostrado un incremento del riesgo que es proporcional a las dosis recibidas, y aún para dosis menores de 300 mg/m² (Swain et al., 2003; Volkova M, Russell R 3rd, 2011), que es lo que ocurre en nuestra población de estudio, donde las pacientes recibieron una dosis acumulativa de 230,5±32,6 mg/m², riesgo que se incrementaría por los otros factores de riesgo previamente señalados.

VI.2. Efectos de las intervenciones sobre los desenlaces.

VI.2.1. Efectos de las intervenciones en marcadores de cardiotoxicidad aguda.

VI.2.1.1. Variable de desenlace primario: NT-ProBNP

Nuestro estudio confirma hallazgos previamente descritos en la literatura, entre los que se encuentran la ocurrencia de mayores niveles de NT-ProBNP en un subgrupo de pacientes, entre las 24 y 36 hrs, que en nuestro caso coincide temporalmente con nuestro registro del DIA+3, (Sandri et al, 2005). Por otra parte este incremento sería de mayor intensidad en el primer ciclo de quimioterapia, información que obtuvimos luego de la evaluación parcial de nuestros resultados y por lo cual nos concentramos en los efectos sobre el primer ciclo de quimioterapia.

Al evaluar el efecto de nuestras dos intervenciones, carvedilol y omega-3, sobre el NT-ProBNP, que fue nuestra variable de desenlace primario de cardiotoxicidad aguda, debemos señalar nuestro estudio no encontró ningún efecto sobre los niveles del NT-ProBNP en el día +3 del primer ciclo de quimioterapia en comparación con el grupo placebo.

Así, pese a que no se logró conseguir el efecto buscado con respecto a lograr una reducción de los niveles de NT-ProBNP en el DIA+3 del primer ciclo de quimioterapia en los grupos intervenidos, debemos señalar otros hallazgos encontrados con respecto a nuestras variables de observación secundaria.

VI.2.1.2. Variables de desenlace secundario.

VI.2.1.2.1. Troponina Cardíaca T (cTnT).

Con respecto al biomarcador Troponina Cardíaca T (cTnT) sérica, ninguna de las pacientes incluidas en el estudio presentó niveles superiores al límite inferior detectable por la técnica (todas las pacientes con valores $<0,01$ ng/mL). Debemos recordar que los valores de referencia considerados con valor diagnóstico y pronóstico son mayores o iguales a $0,01$ ng/mL para injuria cardíaca. Por otra parte el límite superior para individuos sanos es $<0,01$ ng/mL (no detectable por este método) (Jaffe AS, 1999). Si bien algunos estudios habían evidenciado una eventual utilidad de las determinaciones de troponinas cardíacas T (Lipshultz SE et al, 1997; Auner HW et al, 2003), en nuestro estudio no se presentaron valores dentro del rango detectable. Sin embargo, debemos considerar como limitante que no se utilizó determinaciones de troponina altamente sensible.

VI.2.1.2.2. Marcadores Electrocardiográficos.

Se confirmó la ocurrencia de un incremento del intervalo QT corregido post-quimioterapia, cuestión que si bien había sido descrita por Nakamae en el DIA+3 (Nakamae et al, 2005), nuestro estudio encontró que este incremento sería de mayor intensidad el DIA+1.

Con respecto al efecto de las intervenciones sobre el intervalo QT corregido (QTc) y dispersión del QT corregido (QTdc), no se encontraron diferencias significativas de las intervenciones con respecto al grupo placebo. Sin embargo, al evaluar cada grupo de intervención por separado, en el grupo carvedilol, no hubo un incremento significativo el DIA+1 comparado con el control BASAL, a diferencia de lo que ocurrió en el grupo placebo y omega-3.

VI.2.2. Biomarcadores de estrés oxidativo.

Con respecto a las variables de observación secundaria relacionadas con el status redox, en términos generales se encontraron efectos tanto el biomarcador de daño por estrés oxidativo (F2-isoprostanos), como así también sobre algunos de los biomarcadores de defensa antioxidante. Lo relevante de la temporalidad de los

hallazgos, es que estos ocurren posterior al punto de máximo incremento del NT-ProBNP (DIA+3), cuestión que sería concordante con el rol que en los últimos años se le ha dado al estrés oxidativo en la cardiotoxicidad por antraciclinas, es decir, no como un evento iniciador del daño, sino más bien como un evento cascada abajo con respecto al daño inicial, teniendo como rol principal su efecto modulador de las diferentes vías de daño que llevan al desarrollo de cardiotoxicidad, entre las que se encuentran desbalance de la homeostasis de calcio y apoptosis.

En relación al efecto producido sobre el biomarcador de daño por estrés oxidativo (F2-isoprostanos), tanto el grupo carvedilol como el grupo omega-3 presentaron menores niveles de niveles de F-2 isoprostanos en plasma el DIA+5, en comparación al grupo placebo. Este efecto, se encuentra asociado además al hecho de que en el grupo placebo se observó una caída de la actividad de las 3 enzimas antioxidantes entre los días 3-5 de tratamiento con antraciclinas, lo que fue prevenido por las 2 intervenciones. Esto nos señala que ambas intervenciones crearon un efecto sistémico de menor vulnerabilidad frente al daño oxidativo, lo que pudo ser evaluado séricamente (F2-isoprostanos) y en eritrocitos (actividad de enzimas antioxidantes). Probablemente, el mayor desafío oxidativo de las pacientes del grupo placebo se constituyó en estímulo de un mecanismo adaptativo por la vía del aumento del índice tiólico (relación GSH/GSSG) para mantener el balance redox, lo que no fue necesario en los grupos intervenidos.

VI.2.3. Control ecocardiográfico a mediano plazo.

El principal parámetro evaluado por su repercusión clínica fue la FEVI, la que en su condición basal pre-quimioterapia, no evidenciaba diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos

Al evaluar en su conjunto a los 3 grupos de intervención, la FEVI a los 10-12 meses evidenció una disminución de un 7,48%, lo que fue estadísticamente significativo. Por otra parte, al evaluar cada grupo por separado, la reducción de la FEVI también se observa en los grupos placebo y omega-3, pero sin embargo destaca no encontrarse en el grupo carvedilol.

Al comparar a los 3 grupos de intervención con respecto a la FEVI a los 10-12 meses, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Sin embargo, al comparar los grupos según sus deltas de FEVI a los 10-12 meses con respecto al control basal, se encontró que la delta del grupo con carvedilol es significativamente de menor magnitud que el delta grupo placebo ($P=0,0089$).

Con respecto al omega-3, si bien no hubieron diferencias estadísticamente significativas con placebo, se observó también una tendencia no significativa al evaluar los delta de FEVI ($p=0,0892$).

Tenemos así que el grupo carvedilol tendría un menor deterioro de la Función Sistólica de ventrículo Izquierdo, lo que ofrecería un importante beneficio en el mediano a largo plazo de los pacientes, debido a la relevancia pronóstica que tiene la FEVI en la morbi-mortalidad de los pacientes a largo plazo. Este resultado es también concordante con los hallazgos encontrados con Kalay et al, 2005, quien encontró un menor deterioro de la FEVI en grupos intervenidos preventivamente con carvedilol en etapas precoces de la quimioterapia.

VI.2.4. Comentario general de las variables de desenlace evaluadas.

Si bien las intervenciones con omega-3 y carvedilol no lograron reducir el incremento del marcador de daño NT-ProBNP, y así potencialmente brindar protección contra la cardiotoxicidad aguda durante el primer ciclo de quimioterapia con antraciclinas, si lograron provocar una reducción de la injuria oxidativa, una menor vulnerabilidad de las enzimas antioxidantes frente al daño oxidativo y en el caso del carvedilol, potencialmente una menor reducción de FEVI a los 10-12 meses.

Finalmente, debemos decir que si bien las intervenciones no lograron prevenir la cardiotoxicidad aguda en forma directa, el hecho de reducir los efectos de un evento intermedio en el mecanismo de daño miocárdico por antraciclinas, como es el estrés oxidativo, potencialmente podría brindar eventuales beneficios en etapas más tardías del desarrollo de la cardiotoxicidad por antraciclinas (subaguda y/o crónica), lo que habría sido en parte corroborado por el efecto del grupo carvedilol sobre FEVI, y por lo cual será relevante mantener un seguimiento de las pacientes incluidas en el

actual estudio. Esto es de suma relevancia, porque si bien el NT-ProBNP pudiera ser un útil biomarcador predictor a mediano y largo plazo de riesgo cardiotoxicidad (Sandri et al, 2005), indudablemente que la determinación de la FEVI a los 10-12 meses representa una mayor relevancia en cuanto a precisar mejor el pronóstico a largo plazo.

VI.3. Comparación de nuestros resultados con otros estudios.

VI.3.1. Estudios con intervenciones farmacológicas en cardiotoxicidad aguda.

Al comparar nuestros resultados con datos de la literatura, en general salvo el estudio de Nakamae et al, 2005, quién intento determinar el efecto protector del Valsartán, no existen otros estudios en pacientes en que se haya evaluado el efecto de intervenciones farmacológicas específicamente sobre la cardiotoxicidad aguda. En relación al estudio realizado por Nakamae, cuando se compara el comportamiento que tuvieron los niveles de BNP en el grupo placebo de dicho estudio con los niveles de NT-proBNP de nuestro estudio, se aprecia que la magnitud del incremento presentado durante el primer ciclo de quimioterapia fue similar en ambos estudios a las 48 hrs, siendo en ambos casos una elevación de aproximadamente 4 veces en relación al valor basal. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió con Nakamae, quién encontró una menor elevación de los niveles de BNP en el grupos que recibió su intervención con Valsartán, nosotros no encontramos diferencias significativas con nuestras intervenciones. Además, con respecto a otros marcadores de daño, nuestro estudio solo encontró el hallazgo electrocardiográfico de incremento del intervalo QTc, pero sin obtener un efecto en este con las intervenciones (Nakamae et al, 2005).

VI.3.2. Estudios previos con las mismas intervenciones y su efecto en biomarcadores de estrés oxidativo.

Con respecto a otros estudios que se relacionen con los resultados obtenidos, debemos señalar en lo que respecta a los potenciales efectos antioxidantes del carvedilol, se ha determinado que el uso de este tratamiento produciría un efecto antioxidante, provocando un incremento en la capacidad antioxidante del plasma a

las 8 semanas en pacientes con hipertensión esencial (Zepeda RJ et al, 2012). Así, por una parte este hecho apoyaría el potencial efecto antioxidante del carvedilol, pero por otra parte nos explicaría el porqué de la ausencia de un efecto en nuestra determinación de la capacidad antioxidante del plasma en los pacientes con carvedilol, ya que podría deberse a que nuestras determinaciones fueron por una parte mucho más precoces y por otra parte a los efectos sobre el status redox de las antraciclinas.

VI.3.3. Estudios previos en cardiotoxicidad por antraciclinas con uso de BNP o NT-ProBNP.

Al comparar nuestro estudio, con otros que han realizado evaluaciones seriadas del NT-ProBNP, debemos señalar que además del estudio de Nakamae, el resto de estudios han sido realizados exclusivamente para evaluar el valor pronóstico de biomarcadores, pero en ningún caso evaluando intervenciones. Es así como dentro de los últimos estudios realizados destaca Cil T et al, quién encontró un incremento del NT-ProBNP en aquellos pacientes que posteriormente presentaron un deterioro en la función sistólica del ventrículo izquierdo. Sin embargo, las determinaciones con NT-ProBNP en dicho estudio fueron solo con controles basales y al término de la Quimioterapia (Cil T et al, 2009).

Finalmente otro de los pocos estudios que ha evaluado en forma seriada el comportamiento evolutivo los niveles del NT ProBNP y su rol pronostico asociado, fue el realizado por Romano et al., donde se realizaron determinaciones seriadas de NT-ProBNP y Troponina I en pacientes que recibieron dosis no elevadas de antraciclinas. Se realizaron determinaciones antes y después de 24 hrs de cada ciclo de quimioterapia, con evaluaciones ecocardiográficas seriadas basales, 3, 6 y 12 meses de seguimiento. En este caso se determinó que aquellos pacientes con elevaciones persistentes en el tiempo de NT-ProBNP, presentaron un mayor riesgo de cardiotoxicidad durante el periodo de seguimiento, resultados que fueron concordantes con los resultados ya comentados de Sandri et al (Romano et al, 2011; Sandri et al 2005). Por otra parte, debemos señalar que un aspecto de nuestro estudio que fue concordante con el estudio realizado por Romano et al, fue que al

evaluar la Troponina I, esta tampoco fue relevante como marcador de cardiotoxicidad, lo que es concordante con la nula elevación de esta en nuestro estudio. En relación a la elevación de troponina I, una explicación que se ha dado al respecto, estaría dada porque la cardiotoxicidad por antraciclinas produciría una “disrupción sarcomérica” lo que se asociaría a un incremento de los niveles de BNP, incluso en ausencia de muerte celular (valores de troponina I normal) (Sawyer DB et al, 2010).

VI.3.4. Estudios previos con otras intervenciones preventivas de cardiotoxicidad por antraciclinas y rol del estrés oxidativo.

Con respecto a otras intervenciones preventivas que han sido estudiadas, recientemente un meta-análisis evaluó el rol cardioprotector de diferentes tratamientos preventivos de cardiotoxicidad por antraciclinas (Kalam K and Marwick TH, 2013). En este caso si bien los tratamientos preventivos fueron evaluados en relación a la cardiotoxicidad de tipo crónica y subaguda (a diferencia de la cardiotoxicidad aguda evaluada en el actual estudio), se indicó que los tratamientos con dexrazoxane, betabloqueadores, estatinas o IECA/ARAII parecen tener una eficacia similar para la reducción de la cardiotoxicidad (Kalam K and Marwick TH, 2013). Es así como, más allá de los recientes hallazgos en relación a los mecanismos fisiopatológicos de generación del daño por antraciclinas, acerca de la importancia en los efectos sobre la TOP2A en el corazón (Zhang S et al, 2012; Sawyer DB, 2013), desde el punto de vista de las intervenciones realizadas, persiste igualmente el rol del estrés oxidativo como blanco terapéutico (Vincent DT et al, 2013). Es así como vemos que betabloqueadores como el carvedilol, estatinas, IECA/ARA II y el dexrazoxane, tienen en común el producir un potencial efecto antioxidante, y aunque si bien recientemente se ha planteado que el principal efecto terapéutico del dexrazoxane sería dado por su acción sobre la TOP2B en el corazón, al menos desde el punto de vista clínico, esta no ha probado ser superior a las otras intervenciones preventivas ya señaladas con potenciales efectos antioxidantes (Kalam K and Marwick TH, 2013).

Esta situación podría ser explicada en parte porque si bien los nuevos hallazgos fisiopatológicos acerca de la relevancia que tendrían los efectos de las antraciclinas sobre TOP2 han llevado a una menor relevancia del ciclo redox de las antraciclinas (Zhang S et al, 2012; Sawyer DB, 2013) como evento inicial dentro de la generación de los mecanismos de cardiotoxicidad. En los eventos posteriores y que están asociados principalmente disfunción mitocondrial, se mantendría dentro de los mecanismos la generación de estrés oxidativo y activación de otra serie de vías que podrían a llevar a apoptosis, autofagia y necrosis (Mazevet M et al, 2013). Por lo tanto, si bien el estrés oxidativo pudiera haber pasado a segundo plano como potencial “evento inicial” en la generación de la cardiotoxicidad por antraciclinas, aún persistiría con un importante rol en relación a representar un potencial blanco terapéutico de intervenciones preventivas (Vincent DT et al, 2013), tal como la desarrollada por nuestro estudio.

Por otra parte, algo que ha reforzado más aún el rol que tendría el estrés oxidativo, es que recientemente se ha descrito la participación que podrían tener algunas fuentes de EROS como la NADPH oxidasa, cuya activación de una de sus subunidades por las antraciclinas sería fundamental en el desarrollo de la cardiotoxicidad y podría representar un eventual nuevo blanco terapéutico relacionado con estrés oxidativo (Ma J et al, 2013).

Además si bien futuras intervenciones a nivel de TOP2B en el corazón o a nivel activación de vías de señalización de neuregulinas parecen como promisorias intervenciones, por el momento solo contamos con estudios in vitro o en modelos animales, por lo que pasará un tiempo no despreciable hasta que dichas intervenciones sean correctamente evaluadas para poder utilizarse en nuestros pacientes, tiempo que lamentablemente nuestros pacientes no tienen, por lo que intervenciones que ya han demostrado un eventual efecto terapéutico debieran evaluarse en forma más rigurosa ofreciendo una alternativa a más corto plazo.

VI.3.5. Estudios previos realizados con Betabloqueadores para prevención de cardiotoxicidad por antraciclinas.

Como ya señalamos en nuestro estudio, dentro de las estrategias preventivas de cardiotoxicidad mediante el reforzamiento del sistema antioxidante, se utilizó el carvedilol, un betabloqueador que particularmente tendría propiedades antioxidantes, y que habría sido utilizado previamente con efectos favorables

En particular con el carvedilol, el objetivo de nuestro estudio era el evaluar por primera vez el efecto de prevención en la cardiotoxicidad aguda, evaluada mediante el control de biomarcadores de daño, y evaluar si un eventual efecto protector se asociaría a la modulación de parámetros de estrés oxidativo. Es así como en nuestro caso, si bien no se consiguió reducir los niveles de NT-ProBNP en el DIA+3 post quimioterapia en comparación al grupo placebo, si se obtuvo efecto sobre variables secundarias relacionadas al estrés oxidativo, al reducirse la injuria por F2-isoprostanos (DIA+5) y tener un mayor actividad de las enzimas antioxidantes (entre DIA +3 y DIA+5). Estos últimos efectos, considerando el hecho que el estrés oxidativo podría modular diversos mecanismos de daño asociados a cardiotoxicidad, pudieran correlacionarse con el resultado favorable de otros estudios que han dado cuenta del efecto preventivo de los betabloqueadores sobre el desarrollo de cardiotoxicidad a más largo plazo.

Por otra parte, con respecto a la evidencia que existe en relación al rol del uso de betabloqueadores, podemos señalar que se han realizado 3 estudios que han evaluado el uso de β -bloqueadores para prevenir la cardiotoxicidad por antraciclinas. Kalay et al, evaluó la cardiotoxicidad temprana en 50 pacientes asignados al azar para recibir carvedilol o placebo, mientras se sometían a quimioterapia con antraciclinas. Es así como la fracción de eyección y las dimensiones del ventrículo izquierdo no cambiaron en el grupo carvedilol, mientras que en el grupo placebo la fracción de eyección del ventrículo izquierdo disminuyó ($p < 0,001$) y las dimensiones del VI aumentaron significativamente durante un período de 6 meses (Kalay et al, 2006). Georgakopoulos et al., en tanto llevó a cabo un estudio abierto, donde se randomizaron 147 pacientes sometidos a quimioterapia con antraciclina para recibir metoprolol, enalapril o placebo durante 1 año. Ellos encontraron que, aunque la

incidencia de insuficiencia cardiaca sintomática era menor en los pacientes tratados con metoprolol o enalapril, la diferencia no alcanzó significación clínica. Por otra parte, no hubo diferencias en los parámetros ecocardiográficos de la función del ventrículo izquierdo entre los 3 grupos (Georgakopoulos P et al, 2010). Otro pequeño estudio recientemente realizado evaluó los efectos de nebivolol en 45 pacientes con cáncer de mama, encontrando que la fracción de eyección y las dimensiones del VI no cambiaron después de 6 meses en el grupo de nebivolol, pero fueron peores en los pacientes tratados con placebo ($p < 0,01$) (Kaya MG et al., 2013). Además, en el grupo de nebivolol los niveles de NT-ProBNP se mantuvieron sin cambios a los 6 meses comparados con el basal, pero se incrementaron de manera significativa en el grupo placebo ($p < 0,01$) (Kaya MG et al., 2013). Si bien estos resultados son alentadores, aún no está claro si el uso profiláctico de β -bloqueadores reduce la incidencia de insuficiencia cardiaca sintomática en pacientes sometidos a quimioterapia basada en antraciclinas. Por otra parte, el efecto dispar de los β -bloqueadores en las dimensiones del VI en los mencionados estudios (Kalay et al, 2006; Georgakopoulos P et al, 2010; Kaya MG et al., 2013), aumenta la preocupación de que no todos los β -bloqueantes son igualmente eficaz en la reducción de la cardiotoxicidad por antraciclinas.

Con respecto específicamente al carvedilol, antagonista adrenérgico β no selectivo y α_1 , con propiedades antioxidantes, además del estudio ya señalado realizado por Kalay (Kalay et al., 2006), existe cierto grado de evidencia en estudios *in vitro* e *in vivo*, que también han evidenciado un potencial efecto en la reducción de la cardiotoxicidad por antraciclinas. El carvedilol protege a las células miocárdicas contra la toxicidad de la doxorubicina al reducir el estrés oxidativo y la apoptosis (Spallarossa P et al, 2004; Arozal W et al, 2010). En este sentido, se señala que la actividad antioxidante del carvedilol, en lugar de su acción β -bloqueante, parecería ser responsable de sus efectos cardioprotectores. Es así como un estudio que comparó el carvedilol con el atenolol (un antagonista selectivo β_1 sin propiedades antioxidantes), mostró que el carvedilol, pero no atenolol, previno el daño mitocondrial y redujo los cambios histopatológicos asociados con la cardiotoxicidad por doxorubicina (Oliveira PJ et al, 2004). Además, en algunas células tumorales, el

carvedilol aumentaría la citotoxicidad de la doxorubicina por revertir la resistencia a múltiples fármacos del tumor a través de la inhibición de la proteína de eflujo, p-glycoprotein (Jonsson O et al, 1999). Por lo tanto, el carvedilol puede ser particularmente atractivo como un agente cardioprotector, ya que no parece afectar la actividad antineoplásica de las antraciclinas, sino por el contrario hasta podría favorecerla.

Debemos señalar además, que se han establecido nuevas estrategias preventivas, intentando utilizar los betabloqueadores, pero esta vez asociados a otros fármacos con objetivo de obtener un mayor efecto preventivo. Es así, como se realizó el OVERCOME Trial (preventiOn of left Ventricular dysfunction with Enalapril and carvedilol in patients submitted to intensive ChemOtherapy for the treatment of Malignant hEmopathies), un ensayo clínico piloto, randomizado que evaluó un tratamiento combinado de enalapril y carvedilol, y que logró prevenir la reducción de la Fracción de Eyección de Ventrículo Izquierdo en pacientes hemato-oncológicos que habían recibido quimioterapia intensiva, por lo que representó una alentadora estrategia que deberá ser confirmada con ensayos clínicos más grandes (Bosch X et al, 2013).

Debemos destacar además en relación al uso de betabloqueadores, de que recientemente se realizó un estudio observacional que evaluó en retrospectiva la incidencia de nuevas insuficiencias cardíacas sintomáticas en pacientes con cáncer de mama que habían recibido tratamiento con antraciclinas, trastuzumab o ambos, y compararon aquellos pacientes que habían utilizado en forma continua betabloqueadores durante el tratamiento del cáncer de aquello que no. Es así como en este artículo reforzó el apoyo a la hipótesis de que el uso de betabloqueadores profilácticos puede ser cardioprotector en pacientes que recibieron trastuzumab, antraciclinas, o ambos (Seicean S et al., 2013).

Con lo ya expuesto, la evidencia clínica pareciera avalar el efecto del carvedilol en cuanto a su rol cardioprotector, sin embargo nuestros resultados aportan el hecho de que potencialmente cortas intervenciones (de 14 días), una semana antes y otra después de sólo el primer ciclo de quimioterapia, ya podría ofrecer un potencial efecto protector a un mediano plazo. Además nuestro estudio,

sería el primero evaluar el efecto del carvedilol sobre biomarcadores sistémicos de estrés oxidativo, en paciente que reciben quimioterapia con antraciclinas.

VI.3.6. Estudios previos realizados con omega-3 para prevención de cardiotoxicidad por antraciclinas y prevención cardiovascular general.

En este momento no existen estudios previos que hayan utilizado omega 3, específicamente como estrategia preventiva para la cardiotoxicidad por antraciclinas. Como ya señalamos, al evaluar los efectos del omega-3 sobre nuestra variable de observación primaria, si bien no se encontró una disminución estadísticamente significativa de los niveles del NT-ProBNP en el DIA+3, y pese a que pareciera existir una tendencia hacia su reducción, si se encontró una reducción de biomarcador de daño oxidativo (F2-isoprostanos el DIA+5), y además una mayor actividad de las enzimas antioxidantes en comparación al grupo placebo (entre DIA+3 y DIA+5). Esto último, y debido al rol del estrés oxidativo como modulador de los mecanismos de daño, podría eventualmente ofrecer un potencial beneficio preventivo sobre la cardiotoxicidad a largo plazo.

Debemos señalar que en modelos animales se determinó que los omega-3 no incrementaban la cardiotoxicidad por antraciclinas (Germain E et al, 2003), lo que se contrapuso eso sí, a un estudio reciente de Carbone et al., en que los omega 3 fallaron en prevenir cardiotoxicidad, y aún más podrían exacerbar la cardiotoxicidad por antraciclinas (Carbone et al, 2012). Este hecho podría estar explicado porque el estudio se realizó en un modelo ovino, lo que significa un metabolismo de los ácidos grasos totalmente diferente al de un hombre, por tratarse de un modelo animal herbívoro.

En forma general, del punto de vista cardiovascular, acerca de los omega 3, debemos señalar que inicialmente estudios experimentales y epidemiológicos sugirieron el beneficio de los omega-3 en insuficiencia cardíaca (Mozaffarian D et al, 2005; Duda MK et al, 2009). Y los mecanismos por los que los omega-3 pueden prevenir la insuficiencia cardíaca, podrían ser por sus efectos antiinflamatorios, sobre el perfil lipídico (Harris WS, 1997(a); Harris WS, 1997(b)), sobre la presión arterial (Geleijnse JM et al, 2002), o bien sobre la función miocárdica (Pepe S et al, 1999;

McMillin JB et al, 1992). Interesantemente se habría reportado también, que los omega-3 afectarían marcadores inflamatorios y los niveles del NT-ProBNP en pacientes con insuficiencia cardiaca (Zhao YT et al, 2009).

Es por esto que dado los potenciales efectos de protección cardiovascular, de los omega-3, se planteó que podrían prevenir la cardiotoxicidad por antraciclinas. En este sentido, se realizó un estudio en ratas donde se evaluó el efecto de los omega-3 en la función e histológica cardiaca en un modelo de insuficiencia cardiaca por antraciclinas. Fue así que la dieta con suplementación de omega-3 atenúa la disfunción cardiaca inducida por antraciclinas, proponiendo que esto podría estar asociado con una recuperación más precoz del desbalance de citoquinas provocado por las antraciclinas (Teng LL et al., 2010).

En cuanto a la seguridad del uso de omega-3 en pacientes con cáncer de mama en quimioterapia por antraciclinas, esto fue evaluado en un estudio Fase II, donde se utilizaba DHA para mejorar la sensibilidad a la quimioterapia. Es así, como en este estudio no se encontraron mayores efectos adversos secundarios, tales como cardiotoxicidad posterior a la quimioterapia (Bougnoux P et al, 2009).

Finalmente, debemos decir, que los omega-3 también pueden ejercer un efecto como antioxidantes indirectos (Rodrigo 2013, Clin Sci) ya que al inducir un estrés oxidativo de baja intensidad pueden activar la expresión de enzimas antioxidante por la vía del factor transcripcional Nrf2. Esto podría explicar que las enzimas antioxidantes lograron recuperar sus niveles durante el tratamiento con antraciclinas en el grupo de pacientes tratadas con omega-3 en el presente estudio.

VI.4. Potenciales limitaciones del estudio.

VI.4.1. Potenciales limitaciones de la determinación del NT-ProBNP y biomarcadores de estrés oxidativo.

Un aspecto a señalar es que si bien el NT-ProBNP podría verse alterado según el estado hemodinámico del paciente, en relación a su balance hídrico, debemos señalar que todas las pacientes durante el día de quimioterapia reciben por protocolo igual aporte de volumen endovenoso y con la misma duración de tiempo de la infusión, lo que sumado a que nuestras determinaciones ocurren a las 48 posterior

a la quimioterapia, no pareciera ser un factor relevante en este caso. Además de los numerosos estudios realizados con NT-ProBNP en pacientes con quimioterapia, no se han descrito mayores sesgos en relación a la determinación del NT-ProBNP y el estado de volemicación del paciente (Nakamae H et al., 2005; Cardinale D et al., 2002; Sandri M et al, 2005), sino que más bien en relación a los efectos de una eventual disminución de la volemia por un hiperémesis de los pacientes, lo que pudiera producir algunos sesgos en las determinaciones ecocardiográficas bidimensionales al evaluar la Fracción de Eyección de Ventrículo Izquierdo (Lotrionte M et al, 2013).

En lo que respecta a potenciales sesgos relacionados a la evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo, debemos señalar que las pacientes con cáncer, y en particular con cáncer de mama, presentan un desbalance del status redox en forma basal, debido al incremento del estrés oxidativo causado por la acelerada proliferación celular, la constante estimulación de vías promotoras del crecimiento y por alteraciones de la actividad metabólica (Woolston CM et al, 2012), lo que más que ser un hecho confundente, debiera ser considerado como un factor de riesgo más que al contribuir a la magnitud de la injuria oxidativa, contribuiría al mayor riesgo de desarrollo de cardiotoxicidad por antraciclinas.

VI.4.2. Limitaciones del estudio en la evaluación ecocardiográfica.

Con respecto a los controles imagenológicos, debemos decir de que si bien en el último tiempo se ha ido extendiendo la tendencia a la realización de estudios clínicos que evalúan la utilidad con resonancia nuclear magnética para el control de la cardiotoxicidad por antraciclinas (Vasu S and Hundley WG., 2013), los controles ecocardiográficos siguen siendo realizados por algunos estudios clínicos como el nuestro, en contexto de las ventajas que presenta el método en cuanto a su uso más generalizado, bajo costo y sin necesidad de ningún tipo de medio de contraste (Lotrionte M et al, 2013). Y como ya fue señalado previamente, en nuestro estudio se logró evidenciar los efectos sobre la FEVI de una de nuestras intervenciones.

Pese a esto, debemos señalar que debido a las intervenciones quirúrgicas previas de las pacientes, que en ocasiones comprometía la mama izquierda,

asociado al sobrepeso de nuestras pacientes, provocó que en cuatro pacientes no se contara con una adecuada ventana ecocardiográfica. Además, la ecocardiografía al ser un examen operador dependiente pudiera tener variaciones interobservadores asociadas, lo que se trató de reducir concentrando la totalidad de las ecografías en sólo tres ecocardiografistas. Por otra parte, en términos de análisis individual de los pacientes se consideraron variaciones en la FEVI mayores o iguales al 10%, para considerar un descenso como significativo, valor que sería adecuado en ecocardiografía bidimensional, lo que es avalado por los últimos consensos realizados por la “Sociedad Americana de Ecocardiografía” (American Society of Echocardiography) y la “Asociación Europea de Imágenes Cardiovasculares” (European Association of Cardiovascular Imaging), los que han incluido como uno de los criterios para definir cardiotoxicidad en pacientes asintomáticos un descenso mayor o igual a 10% (Plana et al, 2014).

Debemos señalar además que en la actualidad, las determinaciones ecocardiográficas clásicas pudiendo optimizar su sensibilidad con las nuevas técnicas ecocardiográficas de speckle tracking para la determinación del strain rate, técnicas que actualmente están siendo validadas para la pesquisa temprana de anomalías cardiovasculares aún con dosis bajas a moderadas de antraciclina (Drafts BC et al, 2013).

VII. Conclusiones.

En esta tesis se presentaron los resultados correspondientes a un estudio clínico, aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo, que sustentó la hipótesis que un reforzamiento del sistema de defensa antioxidante sistémico, disminuirá la ocurrencia de cardiotoxicidad aguda por antraciclinas en un grupo de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama.

Del punto de vista de la caracterización de biomarcadores de estrés oxidativo en el grupo placebo, se encontró post-quimioterapia una reducción del sistema enzimático de defensa antioxidante en eritrocito, y posteriormente con lo que pudiera estar en contexto a una respuesta compensatoria, se encontró un incremento del índice thiolico.

Al evaluar el efecto de las intervenciones, fue que se encontró una reducción de la injuria sistémica por estrés oxidativo (niveles de F-2 isoprostanos) comparado con placebo, lo que estuvo asociado a un mejor funcionamiento del sistema enzimático de defensa antioxidante en eritrocitos, lo que fue más marcado en el grupo omega-3. Sin embargo, en lo que respecta a los marcadores de cardiotoxicidad aguda (incluyendo la variable de observación primaria NT-ProBNP), no se encontraron reducciones significativas con las intervenciones utilizadas.

Pese a esto, debemos destacar el potencial efecto a un mediano plazo sobre la FEVI (control a los 10-12 meses post-quimioterapia), que pudieran tener el carvedilol. Esto porque el hecho de encontrar en el grupo carvedilol un menor delta de reducción de la fracción de eyección comparado al grupo placebo, asociado a un menor número de pacientes con deterioros >10% de la FEVI, podría representar un potencial terapéutico a desarrollar a futuro. Otro aspecto relevante, es que se permite plantear que sería posible conseguir un beneficio en el mediano plazo sólo con cortas intervenciones con carvedilol durante el primer ciclo de quimioterapia, por la relevancia que esto pudiera tener en términos de costos y de facilidad de implementación en la práctica clínica.

En suma, podemos decir que existiría alguna evidencia de la ocurrencia de la alteración del balance redox con el uso de antraciclinas, y que estas alteraciones podrían verse reducidas por el efecto de las intervenciones con omega-3 y carvedilol. Sin embargo, resulta difícil correlacionar los efectos provocados en los biomarcadores de estrés oxidativo con los efectos sobre biomarcadores de cardiotoxicidad aguda. Pese a esto, el carvedilol representaría una potencial intervención con probables efectos favorables a mediano plazo en la función ventricular, lo que pudiera también estar explicado por otros mecanismos no relacionados con el estrés oxidativo sistémico.

VIII. Bibliografía.

Aebi H. Catalase, *Methods in Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, HU; ed.). Academic Press, New York. 673–677, 1974.

Ambrosio G; Zweier JL; Becker LC. Apoptosis is prevented by administration of superoxide dismutase in dogs with reperfused myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 93: 94–96, 1998.

Ammon M; Arenja N; Leibundgut G; Buechel RR; Kuster GM; Kaufmann BA; Pfister O. Cardiovascular management of cancer patients with chemotherapy-associated left ventricular systolic dysfunction in real-world clinical practice. *J Card Fail.* 19: 629-34, 2013.

Anderson AB; Arriaga EA. Subcellular metabolite profiles of the parent CCRF-CEM and the derived CEM/C2 cell lines after treatment with doxorubicin. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 808: 295-302, 2004.

Arcamone F; Cassinelli G; Fantini G; Grein A; Orezzi P; Pol C; Spalla C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin: a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng.* 11: 1101-1110, 1969.

Arozal W; Watanabe K; Veeraveedu PT; Ma M; Thandavarayan RA; Sukumaran V; Suzuki K; Kodama M; Aizawa Y. Protective effect of carvedilol on daunorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Toxicology.* 274:18-26, 2010.

Auner HW; Tinchon C; Linkesch W; Tiran A; Quehenberger F; Link H; Sill H. Prolonged monitoring of troponin T for the detection of anthracycline cardiotoxicity in adults with hematological malignancies. *Ann Hematol.* 82: 218-222, 2003.

Bañuelos-Gutiérrez A; Enciso-Gómez R. Detección de disfunción ventricular izquierda subclínica secundaria a quimioterapia mediante ecografía Doppler tisular. *Rev Mex Cardiol.* 19: 68-72, 2008.

Barth E; Stammler G; Speiser B; Schaper J. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J Mol Cell Cardiol.* 24: 669-81, 1992.

Bazett HC. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart.* 7: 353-370, 1920.

Benzie IF; Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 239: 70-76, 1996.

Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels exchangers and permeability transition. *Physiol Rev.* 79: 1127-1155, 1999.

Billingham ME; Mason JW; Bristow MR et al. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep.* 62: 865-72, 1978.

Biondo PD; Brindley D; Sawyer M; Fielda C. Review: The potential for treatment with dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids during chemotherapy. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 19: 787-796, 2008.

Bird BR; Swain SM. Cardiac toxicity in breast cancer survivors: review of potential cardiac problems. *Clin Cancer Res.* 14: 14-24, 2008.

Bosch X; Rovira M; Sitges M; Domènech A; Ortiz-Pérez JT; de Caralt TM; Morales-Ruiz M; Perea RJ; Monzó M; Esteve J. Enalapril and carvedilol for preventing chemotherapy-induced left ventricular systolic dysfunction in patients with malignant hemopathies: the OVERCOME trial (preventiOn of left Ventricular dysfunction with Enalapril and carvedilol in patients submitted to intensive ChemOtherapy for the treatment of Malignant hEmopathies). *J Am Coll Cardiol.* 61:2355-62, 2013.

Borutaite V; Brown GC. Mitochondria in apoptosis of ischemic heart. *FEBS Lett.* 541:1-5, 2003.

Bougnoux P; Hajjaji N; Ferrasson MN; Giraudeau B; Couet C; Le Floch O. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *Br J Cancer.* 101:1978-85, 2009.

Bristow MR; Mason JW; Billingham ME; et al. Doxorubicin cardiomyopathy: evaluation by phonocardiography; endomyocardial biopsy; and cardiac catheterization. *Ann Intern Med.* 88: 168-75, 1978.

Broekemeier KM; Dempsey ME; Pfeiffer DR. Cyclosporina is a potent inhibitor of the inner membrane mitochondrial transition in liver mitochondria. *J Biol Chem.* 264: 7826-7830, 1989.

Carbone A; Psaltis PJ; Nelson AJ; Metcalf R; Richardson JD; Weightman M; Thomas A; Finnie JW; Young GD; Worthley SG. Dietary omega-3 supplementation

exacerbates left ventricular dysfunction in an ovine model of anthracycline-induced cardiotoxicity. *J Card Fail.* 18:502-11, 2012.

Cardinale D; Sandri M; Martinoni A; Borghini E; Civelli M; Lamantia G; Cinieri S; Martinelli G; Fiorentini C; Cipolla C. Myocardial injury revealed by plasma troponin I in breast cancer treated with high dose chemotherapy. *Ann Oncol.* 13:710-715, 2002.

Cardinale D; Colombo A; Lamantia G; Colombo N; Civelli M; De Giacomi G; Rubino M; Veglia F; Fiorentini C; Cipolla CM. Anthracycline-induced cardiomyopathy: clinical relevance and response to pharmacologic therapy. *J Am Coll Cardiol.* 55: 213-220, 2010.

Chabner B; Anreïn P; Druker B et al. Fármacos antineoplásicos. Goodman y Gillman: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Editor: Brunton LL. 11ª edición. McGraw Hill. 1315-1359, 2006.

Chen M; Won D; Krajewski S; Gottlieb R. Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *J Biol Chem.* 277: 29181-29186, 2002.

Chua C; Gao J; Ho Y; Xu X; Kuo I; Chua K; Wang H; Hamdy R; Reed J; Chua B. Over-expression of a modified bifunctional apoptosis regulator protects against cardiac injury and doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice. *Cardiovasc Res.* 81: 20-27, 2009.

Cil T; Kaplan AM; Altintas A; Akin AM; Alan S; Isikdogan A. Use of N-terminal pro-brain natriuretic peptide to assess left ventricular function after adjuvant doxorubicin therapy in early breast cancer patients: a prospective series. *Clin Drug Investig.* 29:131-7, 2009.

Clanachan A; Jaswal J; Gandhi M; Bottorff D. Effects of inhibition of myocardial extracellular-responsive kinase and p38 mitogen-activated protein kinase on mechanical function of rat hearts after prolonged hypothermic ischemia. *Transplantation.* 75:173-180, 2003.

Clerico A; Recchia FA; Passino C et al. Cardiac endocrine function is an essential component of the homeostatic regulation network: physiological and clinical implications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290:H17-H29, 2006.

Collins CE; Quaggiotto P; Wood L; O'Loughlin EV; Henry RL; Garg ML. Elevated plasma levels of F2 alpha isoprostane in cystic fibrosis. *Lipids.* 34:551-556, 1999.

Crimmins DL; Kao JL. A glycosylated form of the human cardiac hormone pro B-type natriuretic peptide is an intrinsically unstructured monomeric protein. *Arch Biochem Biophys.* 475: 36-41, 2008.

Crow MT; Mani K; Nam YJ; Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res.* 95: 957-970, 2004.

Date T; Luo Z; Yamakawa M; Belanger A; Scaria A; Cheng S; Gregory R; Mochizuki S; Jiang C. Myocardial expression of baculoviral p35 alleviates doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Hum Gene Ther.* 14:947-57, 2003.

DeAtley S; Aksenov M; Aksenova M; Harris B; Hadley R; Harper P; Carney J; Butterfield D. Antioxidants protect against reactive oxygen species associated with adriamycin-treated cardiomyocytes. *Cancer Lett.* 136:41-46,1999.

Demant E. Inactivation of cytochrome c oxidase activity in mitochondrial membranes during redox cycling of doxorubicin. *Biochem Pharmacol.* 41: 543-552, 1991.

De Nigris F; Rienzo M; Schiano C; Fiorito C; Casamassimi A; Napoli C. Prominent cardioprotective effects of third generation beta blocker nebivolol against anthracycline-induced cardiotoxicity using the model of isolated perfused rat heart. *Eur J Cancer.* 44:334-40, 2008.

Dickey JS; Rao VA. Current and proposed biomarkers of anthracycline cardiotoxicity in cancer: emerging opportunities in oxidative damage and autophagy. *Curr Mol Med.* 12: 763-71, 2012.

Doll D; List A; Greco F; Hainsworth J; Hande K; Johnson D. Acute vascular ischemic events after cisplatin-based combination chemotherapy for germ-cell tumors of the testis. *Ann Int Med.* 105:48-51,1986.

Doroshov J. Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide; hydrogen peroxide; and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res.* 43: 4543-4551, 1983.

D'Ortencio A; Navigante A. Insuficiencia cardíaca relacionada a quimioterapia. Nuevo enfoque. *Insuf Cardíaca.* 1: 28-32, 2006.

Drafts BC; Twomley KM; D'Agostino R Jr; Lawrence J; Avis N; Ellis LR; Thohan V; Jordan J; Melin SA; Torti FM; Little WC; Hamilton CA; Hundley WG. Low to moderate dose anthracycline-based chemotherapy is associated with early noninvasive imaging

evidence of subclinical cardiovascular disease. *JACC Cardiovasc Imaging*. 6: 877-85, 2013.

Duda MK; O'Shea KM; Tintinu A et al. Fish oil, but not flaxseed oil, decreases inflammation and prevents pressure overload-induced cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res*. 81: 319-327, 2009.

Elliot P. Pathogenesis of Cardiotoxicity induced by anthracyclines. *Semin Oncol*. Suppl 8: S2-S7, 2006.

Ekstein S; Nir A; Rein A; Perles Z; Bar-Oz B; Salpeter L; Algur N; Weintraub M. N-terminal-proB-type natriuretic peptide as a marker for acute anthracycline cardiotoxicity in children. *J Pediatr Hematol Oncol*. 29: 440-4, 2007.

Fernández V; Tapia G; Varela P; Castillo I; Mora C; Moya F; Orellana M; Videla LA. Redox up-regulated expression of rat liver manganese superoxide dismutase and Bcl-2 by thyroid hormone is associated with inhibitor of kappaB-alpha phosphorylation and nuclear factor-kappaB activation. *J Endocrinol*. 186: 539-547, 2005.

Fleury C; Mignotte B; Vayssiere J. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*. 84: 131-141, 2002.

Flohé L and Günzler WA. "Assays of glutathione peroxidase". *Methods Enzymol*. 105:114-121,1984.

Flórez J; Armijo JA; Mediavilla A. Capítulo 62: Quimioterapia antineoplásica II. Agentes alquilantes. Antibióticos. Agentes varios. *Farmacología Humana*. Tercera Edición. Editorial MASSON. 1039-1058, 1998.

Floyd J; Nguyen D; Lobins R; Bashir Q; Doll D; Perry M. Cardiotoxicity of cancer therapy. *J Clin Oncol*. 23: 7685-7696, 2005.

Force T; Wang Y. Mechanism-based engineering against anthracycline cardiotoxicity. *Circulation*. 128: 98-100, 2013.

Galang N; Sasaki H and Maulik N. Apoptotic cell death during ischemia/reperfusion and its attenuation by antioxidant therapy. *Toxicology*. 148: 111–118, 2000.

Gao F; Yue TL; Shi D; Christopher T. p38 MAPK inhibition reduces myocardial reperfusion injury via inhibition of endothelial adhesion molecule expression and blockade of PMN accumulation. *Cardiovasc Res*. 53: 414-422, 2002.

García-Fernández M; Zamorano L. Doppler tisular. Procedimientos en ecocardiografía. Editores: Almería C; García-Fernández M; Zamorano L. 1era ed. España. Editorial McGraw-Hill-Interamericana, España. 289-300, 2004.

Gatta G; Capocaccia R; Coleman MP; Ries LA; Berrino F. Childhood cancer survival in Europe and the United. States. *Cancer*. 95: 1767-1772, 2002.

Geleijnse JM; Giltay EJ; Grobbee DE; et al: Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. *J Hypertens*. 20: 1493 – 1499, 2002.

Georgakopoulos P; Roussou P; Matsakas E; Karavidas A; Anagnostopoulos N; Marinakis T; Galanopoulos A; Georgiakodis F; Zimeras S; Kyriakidis M; Ahimastos A. Cardioprotective effect of metoprolol and enalapril in doxorubicin-treated lymphoma patients: a prospective; parallel-group; randomized; controlled study with 36-month follow-up. *Am J Hematol*. 85: 894-896, 2010.

Germain E; Bonnet P; Aubourg L; Grangepon MC; Chajès V; Bougnoux P. Anthracycline-induced cardiac toxicity is not increased by dietary omega-3 fatty acids. *Pharmacol Res*. 47:111-7, 2003.

Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics Adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*. 57: 727–741, 1999.

Gianni L; Salvatorelli E y Minotti G. Anthracycline cardiotoxicity in breast cancer patients: synergism with trastuzumab and taxanes. *Cardiovasc Toxicol*. 7:67-71, 2007.

Gianni L; Herman E; Steven E et al. Anthracycline Cardiotoxicity: From Bench to Bedside. *J Clin Oncol*. 26: 3777-3784, 2008.

Gilleron M; Marechal X; Montaigne D; Franczak J; Neviere R; Lancel S. NADPH oxidases participate to doxorubicin-induced cardiac myocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 388:727-731, 2009.

Goodman & Gilman. Las Bases farmacológicas de la Terapéutica. Sección IX. Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas. Capítulo 51. Fármacos Antineoplásicos. Editores: Brunton LL; Lazo JS; Parker KL. Undécima Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 1357-1359, 2007.

Hama N; Itoh H; Shirakami G et al. Rapid ventricular induction of brain natriuretic peptide gene expression in experimental acute myocardial infarction. *Circulation*. 92:1558-1564, 1995.

Harris WS. n-3 Fatty acids and serum lipoproteins: animal studies. *Am J Clin Nutr*. 65(5 suppl): 1611S-1616S, 1997.

Harris WS. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr*. 65(5 suppl): 1645S-1654S, 1997.

Hershko C; Link G; Tzahor M; Pinson A. The role of iron and iron chelators in anthracycline cardiotoxicity. *Leuk Lymphoma*. 11: 207-214, 1993.

Hershman DL; Shao T. Review. Anthracycline cardiotoxicity after breast cancer treatment. *Oncology*. 23: 227-34, 2009.

Himelman RB; Cassidy MM; Landzberg JS; Schiller NB. Reproducibility of quantitative two-dimensional echocardiography. *Am Heart J*. 115:425-431, 1988.

Hissin P; Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 74:214-226, 1976.

Ho C; Solomon S. A clinician's guide to tissue Doppler imaging. *Circulation*. 113: e396-e398, 2006.

Hrdina R; Gersl V; Klimtové I; Simunek T; Machácková J; Adamcová M. Anthracycline-induced cardiomyopathy. *Acta Med*. 43:75-82, 2000.

Hydock DS; Lien CY; Schneider CM; Hayward R. Exercise preconditioning protects against doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Med Sci Sports Exerc*. 40:808-17, 2008.

Ichiki T; Huntley BK; Heublein DM et al. Corin is present in the normal human heart; kidney; and blood; with pro-B-type natriuretic peptide processing in the circulation. *Clin. Chem*. 57:40-47, 2011.

Ito K; Ozasa H; Sanada K; Horikawa S. Doxorubicin preconditioning: A protection against rat hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology*. 31:416-419, 2000.

Ito K; Ozasa H; Nagashima Y; Hagiwara K; Horikawa S. Pharmacological preconditioning with doxorubicin. Implications of heme oxygenase-1 induction in doxorubicin-induced hepatic injury in rats. *Biochem Pharmacol.* 62:1249-55, 2001.

Jahangiri A; Leifert WR; Kind KL; McMurchie EJ. Dietary fish oil alters cardiomyocyte Ca²⁺ dynamics and antioxidant status. *Free Radic Biol Med.* 40:1592-602, 2006.

Jancsó G; Cserepes B; Gasz B; Benkó L; Borsiczky B; Ferenc A; Kürthy M; Rácz B; Lantos J; Gál J; Arató E; Sínayc L; Wéber G; Róth E. Expression and protective role of heme oxygenase-1 in delayed myocardial preconditioning. *Ann N Y Acad Sci.* 1095: 251-61, 2007.

Jaffe AS. 2001--a biomarker odyssey. *Clin Chim Acta.* 284:197-211,1999.

Jensen BV. Cardiotoxic consequences of anthracycline therapy in patients with breast cancer *Sem Oncol.* Suppl 8: S15-S21, 2006.

Johnson SA. Anthracycline induced cardiotoxicity in adult hematologic malignancies. *Sem Oncol.* Suppl 8: S22-S27, 2006.

Jones LW; Haykowsky MJ; Swartz JJ et al. Early breast cancer: therapy and cardiovascular injury. *J Am Coll Cardiol.* 50: 1435-1441, 2007.

Jonsson O; Behnam-Motlagh P; Persson M; Henriksson R; Grankvist K. Increase in doxorubicin cytotoxicity by carvedilol inhibition of P-glycoprotein activity. *Biochem Pharmacol.* 58:1801-1806, 1999.

Kalay N; Basar E; Ozdogru I; Er O; Cetinkaya Y; Dogan A; Inanc T; Oguzhan A; Eryol NK; Topsakal R; Ergin A. Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 48: 2258-2262, 2006.

Kang YJ; Zhou ZX; Wang GW; Buridi A; Klein JB. Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 275: 13690-13698, 2000.

Kaya MG; Ozkan M; Gunebakmaz O; Akkaya H; Kaya EG; Akpek M; Kalay N; Dikilitas M; Yarlioglu M; Karaca H; Berk V; Ardic I; Ergin A; Lam YY. Protective effects of nebivolol against anthracycline-induced cardiomyopathy: a randomized control study. *Int J Cardiol.* 167: 2306-2310, 2013.

Keizer HG; Pinedo HM; Schuurhuis GJ; Joenje H. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther.* 47: 219-231, 1990.

Kelso GF; Porteous CM; Hughes G; Ledgerwood EC. Prevention of mitochondrial oxidative damage using targeted antioxidants. *Ann N Y Acad Sci.* 959: 263-274, 2002.

Koshy T; Rohatgi A; Orino A; Andrews T; Matulevicius S. The relationship between depressed left ventricular function by cardiac MRI and traditional cardiovascular risk factors in patients exposed to anthracyclines *J Am Coll Cardiol.* 61:S0735, 2013.

Kotamraju S; Konorev EA; Joseph J; Kalyanaraman B. Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitron spin traps and ebselen. Role of reactive oxygen and nitrogen species. *B J Biol Chem.* 275: 33585-92, 2000.

Kotsinas A; Gorgoulis V; Zacharatos P; Zioris H; Triposkiadis F; Donta I; Kyriakidis M; Karayannacos P; Kittas C. Antioxidant agent nimesulid and beta-blocker metoprolol do not exert protective effects against rat mitochondrial DNA alterations in adriamycin-induced cardiotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 254:651-656, 1999.

Kowaltowski AJ; Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biol Med.* 26: 463-471, 1999.

Kragelund C; Gronning B; Kober L; Hildebrandt P; Steffensen R. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in stable coronary heart disease. *N Engl J Med.* 352: 666-675, 2005.

Kufe DW; Pollock RE; Weichselbaum RR; Bast RC; Gansler TS; Holland JF; Frei E III. Eds. *Cancer Medicine.* 6th Ed. Hamilton. Ontario: BC Decker. 569-583, 2003.

Kumar D; Kirshenbaum LA; Li T; Danelisen I; Singal PK. Apoptosis in adriamycin cardiomyopathy and its modulation by Probucol. *Antioxidants & Redox Signaling.* 3: 135-145, 2001.

Lebrecht D; Kokkori A; Ketelsen UP; Setzer B; Walker UA. Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *J Pathol.* 207: 436-44, 2005.

Lee V; Randhawa A; Singal P. Adriamycin-induced myocardial dysfunction in vitro is mediated by free radicals. *Am J Physiol.* 261:H989-H995,1991.

Liang F; O'Rear J; Schellenberger U et al. Evidence for functional heterogeneity of circulating B-type natriuretic peptide. *J Am Coll Cardiol.* 49: 1071-1078, 2007.

Lipshultz SE; Rifai N; Sallan SE; Lipsitz SR; Dalton V; Sacks DB; Ottlinger ME. Predictive value of cardiac troponin T in pediatric patients at risk for myocardial injury. *Circulation.* 96: 2641-2648, 1997.

Lipshultz SE. Exposure to Anthracyclines during childhood causes cardiac injury. *Semin Oncol. Suppl 8:S8-S14,* 2006.

Lotrionte M; Cavarretta E; Abbate A; Mezzaroma E; De Marco E; Di Persio S; Loperfido F; Biondi-Zoccai G; Frati G; Palazzoni G. Temporal changes in standard and tissue Doppler imaging echocardiographic parameters after anthracycline chemotherapy in women with breast cancer. *Am J Cardiol.* 112: 1005-12, 2013.

Ma J; Wang Y; Zheng D; Wei M; Xu H; Peng T. Rac1 signalling mediates doxorubicin-induced cardiotoxicity through both reactive oxygen species-dependent and -independent pathways. *Cardiovasc Res.* 97: 77-87, 2013.

Mantymaa P; Vuolteenaho O; Marttila M; Ruskoaho H. Atrial stretch induces rapid increase in brain natriuretic peptide but not in atrial natriuretic peptide gene expression in vitro. *Endocrinology.* 133:1470-1473,1993.

Mason JW; Bristow MR; Billingham ME et al. Invasive and noninvasive methods of assessing adriamycin cardiotoxic effects in man: superiority of histopathologic assessment using endomyocardial biopsy. *Cancer Treat Rep.* 62: 857-864, 1978.

Mathiasen IS; Sergeev IN; Bastholm L; Elling F. Calcium and calpain as key mediators of apoptosis-like death induced by vitamin D compounds in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 277: 30738-30745, 2002.

Matsui H; Morishima I; Numaguchi Y; Toki Y; Okumura K; Hayakawa T. Protective effects of carvedilol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Life Sci.* 65: 1265-1274, 1999.

Mazevet M; Moulin M; Llach-Martinez A; Chargari C; Deutsch E; Gomez AM; Morel E. Complications of chemotherapy; a basic science update. *Presse Med.* 42: e352-61, 2013.

McFalls EO; Liem D; Schoonderwoerd K; Lamers J; Sluiter W; Duncker D. Mitochondrial function: the heart of myocardial preservation. *J Lab Clin Med.* 142: 141–148, 2003.

McMillin JB; Bick RJ; Benedict CR. Influence of dietary fish oil on mitochondrial function and response to ischemia. *Am J Physiol.* 263: H1479-H1485, 1992.

Meinardi MT; Van Veldhuisen DJ; Gietema JA; Dolsma WV; Boomsma F; Van Den Berg MP; Volkers C; Haaksma J; De Vries EG; Sleijfer DT; Van Der Graaf WT. Prospective evaluation of early cardiac damage induced by epirubicin-containing adjuvant chemotherapy and locoregional radiotherapy in breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 19: 2746-2753, 2001.

Mercuro G; Cadeddu C; Piras A; Dessì M; Madeddu C; Deidda M; Serpe R; Massa E; Mantovani G. Early epirubicin-induced myocardial dysfunction revealed by serial tissue Doppler echocardiography: correlation with inflammatory and oxidative stress markers. *Oncologist.* 12:1124-33, 2007.

Mimnaugh EG; Trush MA; Bhatnagar M; Gram TE. Enhancement of reactive oxygen-dependent mitochondrial membrane lipid peroxidation by the anticancer drug adriamycin. *Biochem Pharmacol.* 34: 847-856, 1985.

Minotti G; Menna P; Salvatorelli E; Cairo G; Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 56:185-229, 2004.

Misra HP and Fridovich I. "The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase". *J Biol Chem.* 247:3170–3175, 1972.

Möllmann H; Nef HM; Kostin S; et al. Ischemia triggers BNP expression in the human myocardium independent from mechanical stress. *International Journal of Cardiology.* 143: 289-297, 2010.

Monti E; Cova D; Guido E; Morelli R; Oliva C. Protective effect of the nitroxide tempol against the cardiotoxicity of adriamycin. *Free Radical Biol Med.* 21: 463-470, 1996.

Mozaffarian D; Bryson CL; Lemaitre RN et al. Fish intake and risk of incident heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 45:2015-2021, 2005.

Mukherjee SB; Das M; Sudhandiran G; Shaha C. Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Biol Chem.* 277: 24717–24727, 2002.

Muindi JR; Sinha BK; Gianni L; Myers CE. Hydroxyl radical production and DNA damage induced by anthracycline-iron complex. *FEBS Lett.* 172: 226-230,1984.

Murry CE; Jennings RB; Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 74: 1124-1136, 1986.

Myers CE; McGuire WP; Liss RH; Ifrim I; Grotzinger K; Young RC. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science.* 197: 165-167, 1977.

Nagueh SF; Appleton CP; Gillebert TC; Marino PN; Oh JK; Smiseth OA; Waggoner AD; Flachskampf FA; Pellikka PA; Evangelisa A. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *Eur J Echocardiogr.* 10:165-93, 2009.

Nakamae H; Tsumura K; Terada Y. Notable effects of angiotensin II receptor blocker, valsartan, on acute cardiotoxic changes after standard chemotherapy with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone. *Cancer.* 104: 2492-2498, 2005.

Nakamura T; Ueda Y; Juan Y; Katsuda S; Takahashi H; Koh E. Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: in vivo study. *Circulation.* 102: 572-578, 2000.

Negoro S; Oh H; Tone E; Kunisada K; Fujio Y; Walsh K; Kishimoto T; Yamauchi-Takahara K. Glycoprotein 130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicin-induced apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt phosphorylation and Bcl-xL/caspase-3 interaction. *Circulation.* 103: 555-61, 2001.

Neilan TG; Coelho-Filho OR; Pena-Herrera D; Shah RV; Jerosch-Herold M; Francis SA; Moslehi J; Kwong RY. Left ventricular mass in patients with a cardiomyopathy after treatment with anthracyclines. *Am J Cardiol.* 110:1679-86, 2012.

Neilan TG; Coelho-Filho OR; Shah RV; Feng JH; Pena-Herrera D; Mandry D; Pierre-Mongeon F; Heydari B; Francis SA; Moslehi J; Kwong RY; Jerosch-Herold.

Myocardial extracellular volume by cardiac magnetic resonance imaging in patients treated with anthracycline-based chemotherapy. *Am J Cardiol.* 111: 717-22, 2013.

Nishikimi T; Kuwahara K; Nakao K. Current biochemistry, molecular biology and clinical relevance of natriuretic peptides. *J. Cardiol.* 57:131-140, 2011.

Niu J; Azfer A; Wang K; Wang X; Kolattukudy PE. Cardiac-targeted expression of soluble Fas attenuates Doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 328: 740-748, 2009.

Noguchi N; Nishino K; Niki E. Antioxidant action of the antihypertensive drug carvedilol against lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* 59:1069-1076, 2000.

Nohria A. β -Adrenergic blockade for anthracycline- and trastuzumab-induced cardiotoxicity: is prevention better than cure?. *Circ Heart Fail.* 6: 358-61, 2013.

Oh JK; Appleton CP; Hatle LK; Nishimura RA; Seward JB; Tajik AJ. The noninvasive assessment of left ventricular diastolic function with two-dimensional and Doppler echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 10:246-270, 1997.

Oh JK; Seward J; Jamil A. The echo manual. In: Powell B; Espinosa R; Yu Ch; Oh JK; editors. Tissue Doppler imaging, strain imaging and dyssynchrony assessment. 3rd Ed. Editorial: Lippincott Williams & Wilkins. 80-98, 2006.

Oliveira PJ; Bjork JA; Santos MS; Leino RL; Froberg MK; Moreno AJ; Wallace KB. Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 200:159-68, 2004.

Olson R; Mushlin PS. Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *FASEB J.* 4:3076-3086, 1990.

Organización Mundial de la Salud. Informe mundial de cáncer de 2008. Publicado el 09/12/2008.

Outomuro D; Grana D; Azzato F; Milei J. Adriamycin induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem?. *Int J Cardiol.* 117:6-15, 2007.

Owuor ED; Kong AN. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol.* 64: 765-770, 2002.

Pacher P; Csordas G; Hajnoczky G. Mitochondrial Ca²⁺ signaling and cardiac apoptosis. *Biol Signals Recept.* 10: 200-223, 2001.

Palmeira CM; Serrano J; Kuehl DW; Wallace KB. Preferential oxidation of cardiac mitochondrial DNA following acute intoxication with doxorubicin. *Biochim Biophys Acta.* 1321:101-106, 1997.

Pepe S; Tsuchiya N; Lakatta EG et al. PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and Ca²⁺ activation of PDH. *Am J Physiol.* 276: H149-H158, 1999.

Pichon MF; Cvitkovic F; Hacene K et al. Drug-induced cardiotoxicity studied by longitudinal B-type natriuretic peptide assays and radionuclide ventriculography. *In Vivo.* 19:567-76, 2005.

Plana JC; Galderisi M; Barac A et al. Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 15:1063-93, 2014.

Prieto M; Torres S. Situación epidemiológica del cáncer de mama en Chile 1994-2003. *Rev Med Clin Condes.* 17(4): 140-48, 2006.

Ray PD; Huang BW; Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 24(5): 981-90, 2012.

Rayson D; Richel D; Chia S; Jackisch C; van der Vegt S; Suter T. Anthracycline-trastuzumab regimens for HER2/neu-overexpressing breast cancer: current experience and future strategies. *Ann Oncol.* 19: 1530-1539, 2008.

Rodrigo R; Castillo R; Cereceda M; Asenjo R; Zamorano J; Araya J. Non-hypoxic preconditioning of myocardium against postoperative atrial fibrillation: mechanism based on enhancement of the antioxidant defense system. *Med Hypotheses.* 69:1242-8, 2007.

Rodrigo R; Cereceda M; Castillo R; Asenjo R; Zamorano J; Araya J; Castillo-Koch R; Espinoza J; Larraín E. Prevention of atrial fibrillation following cardiac surgery: basis for a novel therapeutic strategy based on non-hypoxic myocardial preconditioning. *Pharmacol Ther.* 118:104-27, 2008.

Rodrigo R; Korantzopoulos P; Cereceda M; Asenjo R; Zamorano J; Villalabeitia E; Baeza C; Aguayo R; Castillo R; Carrasco R; Gormaz JG. A randomized controlled trial to prevent post-operative atrial fibrillation by antioxidant reinforcement. *J Am Coll Cardiol.* 62(16): 1457-65, 2013.

Reznick AZ; Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric methods for carbonyl assay. In: Colowic SP; Kaplan NO. Eds. *Methods in Enzymology.* New York: Academic Press. 233: 357, 1994.

Rothstein EC; Byron KL; Reed RE; Fliegel L; Lucchesi PA. H₂O₂-induced Ca²⁺ overload in NRVM involves ERK1/2 MAP kinases: role for an NHE-1-dependent pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283(2):H598-605, 2002.

Rüdiger HA; Clavien PA. A cytotoxic drug against reperfusion injury?. *Hepatology;* 31: 533-5, 2000.

Sandri MT; Salvatici M; Cardinale D; Zorzino L; Passerini R; Lentati P; Leon M; Civelli M; Martinelli G; Cipolla CM. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide after high-dose chemotherapy: a marker predictive of cardiac dysfunction? *Clin Chem.* 51:1405-10, 2005.

Santos DL; Moreno AJM; Leino RL; Froberg MK; Wallace KB. Carvedilol protects against doxorubicin-induced mitochondrial cardiomyopathy. *Toxicol Appl Pharmacol.* 185: 218-227, 2002.

Sawyer DB. Anthracyclines and heart failure. *N Engl J Med.* 368(12): 1154-6, 2013.

Sawyer DB; Peng X; Chen B; Pentassuglia L; Lim CC. Mechanisms of anthracycline cardiac injury: can we identify strategies for cardioprotection. *Prog Cardiovasc Dis.* 53: 105–113, 2010.

Schiller NB; Shah PM; Crawford M et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards; Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr.* 2:358 –367, 1989.

Schjøtt J; Olsen H; Berg K; Jynge P. Pretreatment with ischaemia attenuates acute epirubicin-induced cardiotoxicity in isolated rat hearts. *Pharmacol Toxicol.* 78(6):381-6, 1996.

Scotland RS; Cohen M; Foster P et al. C-type natriuretic peptide inhibits leukocyte recruitment and platelet-leukocyte interactions via suppression of P-selectin expression. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 102:14452-14457, 2005.

Seferian KR; Tamm NN; Semenov AG; et al. The brain natriuretic peptide (BNP) precursor is the major immunoreactive form of BNP in patients with heart failure. *Clin Chem.* 53: 866-873, 2007.

Seicean S; Seicean A; Alan N; Plana JC; Budd GT; Marwick TH. Cardioprotective effect of β -adrenoceptor blockade in patients with breast cancer undergoing chemotherapy: follow-up study of heart failure. *Circ Heart Fail.* 6(3):420-6, 2013.

Semenov AG; Postnikov AB; Tamm NN et al. Processing of pro-brain natriuretic peptide is suppressed by O-glycosylation in the region close to the cleavage site; *Clin. Chem.* 55, 489–498, 2009.

Simunek T; Stérba M; Popelová O; Adamcová M; Hrdina R; Gersl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep.* 61(1):154-71, 2009.

Singh D; Thakur A; Tang WH. Utilizing Cardiac Biomarkers to Detect and Prevent Chemotherapy-Induced Cardiomyopathy. *Curr Heart Fail Rep.* 12(3):255-62, 2015.

Sokolove PM; Shinaberry RG. Na⁺-independent release of Ca²⁺ from rat heart mitochondria-induction by adriamycin aglycone. *Biochem Pharmacol.* 37: 803–812, 1988.

Solem LE; Henry TR; Wallace KB. Disruption of mitochondrial calcium homeostasis in vivo following chronic doxorubicin administration. *Toxicol Appl Pharmacol.* 129: 214–222, 1994.

Solem LE; Heller LJ; Wallace KB. Dose-dependent increase in sensitivity to calcium-induced mitochondrial dysfunction and cardiomyocyte cell injury by doxorubicin. *J Mol Cell Cardiol.* 28: 1023–1032, 1996.

Spallarossa P; Garibaldi S; Altieri P; Fabbi P; Manca V; Nasti S; Rossettin P; Ghigliotti G; Ballestrero A; Patrone F; Barsotti A; Brunelli C. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 37: 837–846, 2004.

Stewart DJ; Grewaal D; Green RM; Mikhael N; Goel R; Montpetit VA; Redmond MD. Concentrations of doxorubicin and its metabolites in human autopsy heart and other tissues. *Anticancer Res.* 1945-52,1993.

Stoodley PW; Richards DA; Hui R; Boyd A; Harnett PR; Meikle SR; Clarke J; Thomas L. Two-dimensional myocardial strain imaging detects changes in left ventricular systolic function immediately after anthracycline chemotherapy. *Eur J Echocardiogr.* 12(12):945-52, 2011.

Swain SM; Whaley FS; Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin. *Cancer.* 97(11): 2869-79, 2003.

Swain SM; Vici P. The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: Expert panel review. *J Cancer Res Clin Oncol.*130:1-7, 2004.

Takashi O; Tomotsugu T; Yuichiro M; Hirotsugu Y; Miho A; Yukiko O et al. Pulsed tissue Doppler imaging of left ventricular systolic and diastolic wall motion velocities to evaluate differences between long and short axes in healthy subjects. *Journal of the American Society of Echocardiography.* 12: 308-313, 1999.

Takemura G; Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis.* 49: 330-352, 2007.

Tan C; Tasaka H; Yu KP; Murphy ML; Karnofsky DA. Daunomycin: an antitumor antibiotic; in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer.* 20: 333–353, 1967.

Tassan-Mangina S; Codoreana D; Metiviera D; Costab B; Humberlinc Ch; Jouannaub Ch et al. Tissue Doppler imaging and conventional echocardiography alter anthracycline treatment in adults: Early and late alterations of ventricular function during a prospective study. *European Journal of Echocardiography.* 7: 141-146, 2006.

Tei C. New non-invasive index for combined systolic and diastolic ventricular function. *J Cardiol.* 26:135-136, 1995.

Teng LL; Shao L; Zhao YT; Yu X; Zhang DF; Zhang H. The beneficial effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on doxorubicin-induced chronic heart failure in rats. *J Int Med Res.* 38(3):940-8, 2010.

Thavendiranathan P; Grant AD; Negishi T; Plana JC; Popović ZB; Marwick TH. Reproducibility of echocardiographic techniques for sequential assessment of left

ventricular ejection fraction and volumes: application to patients undergoing cancer chemotherapy. *J Am Coll Cardiol.* 61(1): 77-84, 2013.

Thorburn A; Frankel AE. Apoptosis and anthracycline cardiotoxicity. *Mol Cancer Ther.* 5(2):197-199, 2006.

Van Vleet JF; Ferrans VJ; Weirich WE. Cardiac disease induced by chronic adriamycin administration in dogs and evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectants. *Am J Pathol.* 99:13-42, 1980.

Vasu S; Hundley WG. Understanding cardiovascular injury after treatment for cancer: an overview of current uses and future directions of cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson.* 15(1): 66, 2013.

Vavrova A; Jansova H; Mackova E; Machacek M; Haskova P; Tichotova L; Sterba M; Simunek T. Catalytic Inhibitors of Topoisomerase II Differently Modulate the Toxicity of Anthracyclines in Cardiac and Cancer Cells. *PLoS One.* 8(10): e76676, 2013.

Vincent DT; Ibrahim YF; Espey MG; Suzuki YJ. The role of antioxidants in the era of cardio-oncology. *Cancer Chemother Pharmacol.* 72(6):1157-68, 2013.

Volkova M; Russell R 3rd. Review. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Curr Cardiol Rev.* 7(4):214-20, 2011.

Von Harsdorf R; Li PF; Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation.* 99:2934–2941, 1999.

Von Hoff DD; Layard MW; Basa P et al. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med.* 91(5): 710-7, 1979.

Wang L; Ma W; Markovich R; Chen JW; Wang PH. Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circ Res.* 83: 516–522, 1998.

Waypa GB; Marks JD; Mack MM; Boriboun C. Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Circ Res.* 91: 719-726, 2002.

Weber M; Kleine C; Keil E et al. Release pattern of N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) in acute coronary syndromes. *Clin Res Cardiol.* 95(5): 270-80, 2006.

Woolston CM; Zhang L; Storr SJ; Al-Attar A; Shehata M; Ellis IO; Chan SY; Martin SG. The prognostic and predictive power of redox protein expression for anthracycline-based chemotherapy response in locally advanced breast cancer. *Mod Pathol.* 25:1106-16, 2012.

Wonders KY; Hydock DS; Schneider CM; Hayward R. Acute exercise protects against doxorubicin cardiotoxicity. *Integr Cancer Ther.* 7(3):147-54, 2008.

Wu X; Hasinoff BB. The antitumor anthracyclines doxorubicin and daunorubicin do not inhibit cell growth through the formation of iron-mediated reactive oxygen species. *Anticancer Drugs.* 16(1): 93-9, 2005.

Wu S; Ko YS; Teng MS; Ko YL; Hsu LA; Hsueh C; Chou YY; Lee YS et al. Adriamycin-induced cardiomyocyte and endothelial cell apoptosis: in vitro and in vivo studies. *J Mol Cell Cardiol.* 34(12): 1595-1607, 2002.

Xu MF; Tang PL; Qian ZM; Ashraf M. Effects by doxorubicin on the myocardium are mediated by oxygen free radicals. *Life Sci.* 68: 889-901, 2001.

Yamamoto Y; Kume M; Yamaoka Y. Implications of heat shock proteins during liver surgery and liver perfusion. *Recent Results Cancer Res.* 147:157-172,1998.

Yancik R; Wesley MN; Ries LA et al. Effect of age and comorbidity in postmenopausal breast cancer patients aged 55 years and older. *JAMA.* 285: 885–892, 2001.

Young IS; Trimble ER. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Ann Clin Biochem.* 28: 504-508, 1991.

Yue TL; McKenna PJ; Ruffolo RR; Feuerstein G. Carvedilol: a new alfa-adrenoceptor antagonist and vasodilator antihypertensive drug; inhibits superoxide release from human neutrophils. *Eur J Pharmacol.* 214:277–280,1992.

Zepeda RJ; Castillo R; Rodrigo R; Prieto JC; Aramburu I; Brugere S; Galdames K; Noriega V; Miranda HF. Effect of carvedilol and nebivolol on oxidative stress-related parameters and endothelial function in patients with essential hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 111(5):309-16, 2012.

Zhang S; Liu X; Bawa-Khalfe T; Lu LS; Lyu YL; Liu LF; Yeh ET. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med.* 18(11): 1639-42, 2012.

Zhao Y; McLaughlin D; Robinson E; Harvey AP; Hookham MB; Shah AM et al. Nox2 NADPH oxidase promotes pathologic cardiac remodeling associated with Doxorubicin chemotherapy. *Cancer Res.* 70: 9287-9297, 2010.

Zhao YT; Shao L; Teng LL et al. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids therapy on plasma inflammatory markers and N-terminal probrain natriuretic peptide in elderly patients with chronic heart failure. *J Int Med Res.* 37: 1831-1841, 2009.

Zhao ZQ; Vinten-Johansen J. Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 55: 438-455, 2002.

Zhao ZQ. Oxidative stress-elicited myocardial apoptosis during reperfusion. *Current Opinion in Pharmacology.* 4: 159-165, 2004.

Zhou S; Heller LJ; Wallace KB. Interference with calcium dependent mitochondrial bioenergetics in cardiac myocytes isolated from doxorubicin-treated rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 175: 60–67, 2001a.

Zhou S; Starkov A; Froberg MK; Leino RL; Wallace KB. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer Res.* 61: 771–777, 2001b.

Zuppinger C; Timolati F; Suter T. Pathophysiology and diagnosis of cancer drug induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Toxicol.* 7: 61-66, 2007.

Anexo 1 (1/2)



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

1/2



19 ENE. 2011

ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

FECHA: 19 ENE. 2011.

PROYECTO: REDUCCIÓN DE LA CARDIOTOXICIDAD AGUDA POR ANTRACICLINAS MEDIANTE LA DISMINUCIÓN DE LA INJURIA OXIDATIVA EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

INVESTIGADOR RESPONSABLE: DR. RODRIGO CARRASCO L.

INSTITUCIÓN: PROYECTO DE TESIS PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ESCUELA DE POSTGRADO, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CHILE

Con fecha 18 de enero 2011, el proyecto ha sido analizado a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de la Guía Internacional de Ética para la Investigación Biomédica que involucra sujetos humanos CIOMS 1992, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de la información proporcionada en el texto del proyecto el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión modificada con fecha 17 de enero de 2011. Se adjunta aprobación de los siguientes documentos: Consentimiento Informado.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl

Anexo 1 (2/2)



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

2/2



INTEGRANTES DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

NOMBRE	CARGO	RELACIÓN CON LA INSTITUCIÓN
Dr. Manuel Oyarzún	Presidente	Sí
Sra. Marianne Gaudlitz	Vicepresidenta	Sí
Dr. Hugo Amigo	Miembro	Sí
Dr. Leandro Biagini	Miembro	Sí
Dra. Lucia Cifuentes	Miembro	Sí
Sra. Nina Horwitz	Miembro	Sí
Dra. María Eugenia Pinto	Miembro	Sí
Sra. Claudia Marshall	Miembro	No

Santiago, 18 de enero de 2011.

Sra. Marianne Gaudlitz H.
Vicepresidenta

MGH/mva
c.c: Archivo Proy. N° 061-2010.

Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl

Anexo 2 (1/6)



Consentimiento informado.

Usted está siendo invitada a participar en un estudio de investigación titulado *“Reducción de la Cardiotoxicidad Aguda por Antraciclinas mediante la disminución de la injuria oxidativa en pacientes con Cáncer de mama”*.

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de 2 tratamientos que podrían prevenir el daño cardíaco producido principalmente por la doxorubicina, medicamento que se utiliza frecuentemente como quimioterapia en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. El tratamiento con doxorubicina, forma parte esencial de su tratamiento para el cáncer de mama, su efectividad no se ha logrado superar con los nuevos tratamientos en desarrollados contra el cáncer, por lo tanto, se mantiene como la primera alternativa para esta enfermedad y su uso es habitual, sin embargo, entre sus principales efectos adversos encontramos el daño que puede provocar al corazón que podría afectar de manera poco frecuente a los pacientes en un 18%.

El probable daño al corazón consiste en provocar una enfermedad llamada insuficiencia cardíaca, que en el caso de desarrollarla podría afectar en un futuro su capacidad de realizar normalmente sus actividades de la vida diaria. La doxorubicina daña los tejidos y el corazón a través de sus radicales libres, una forma de bloquear este daño es con sustancias que neutralicen los efectos de los radicales en los tejidos, llamados antioxidantes.

Este estudio propone la aplicación de dos tratamientos que buscarían aumentar las defensas del organismo, reforzando el sistema antioxidante para así proteger al corazón del probable daño que podría provocar la doxorubicina.

El primer tratamiento consistiría en el aporte de ácidos grasos omega 3, esenciales para el desarrollo y normal funcionamiento del organismo, los que deben ser adquiridos a través de la dieta, principalmente con el consumo de pescado. Diferentes estudios indican que el consumo de omega-3 a través del pescado o aceite de pescado se asocia a una disminución de la mortalidad por enfermedades al corazón, y se ha demostrado que esto sería beneficioso para reducir el daño al corazón provocado por radicales libres.

El segundo tratamiento tiene que ver con el uso de carvedilol, medicamento utilizado en forma frecuente para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, hipertensión arterial e infarto agudo al miocardio. El carvedilol tiene una potente propiedad antioxidante, lo que evitaría la toxicidad causada por la doxorubicina.

Anexo 2 (2/6)

El mecanismo por el que la doxorubicina daña el corazón, es diferente de su mecanismo antineoplásico, por lo que el hecho de utilizar los tratamientos propuestos para prevenir el daño al corazón no interferirá con el efecto de la quimioterapia en su cáncer. Además tanto el carvedilol como el omega-3, ya han sido utilizados en personas que como usted, presentaban cáncer de mama y estaban siendo tratadas con doxorubicina sin encontrar alteración en el efecto quimioterápico.

Con este tratamiento se podría evitar que se produzcan alteraciones en su corazón, lo que en un largo plazo podría disminuir su capacidad de hacer labores diarias.

El objetivo de este estudio es evaluar el uso de omega 3 y carvedilol, para disminuir el daño sobre la función de su corazón provocada por la doxorubicina. El estudio se realizará en el Hospital del Salvador y la Fundación Arturo López Pérez, con pacientes que sean controlados entre los años 2010 al 2015.

El presente estudio incluirá a un total de 36 pacientes de sexo femenino entre 18 y 75 años, con diagnóstico reciente de cáncer de mama y sin tratamiento previo con quimioterapia, que tengan indicación de tratamiento de quimioterapia con uso de doxorubicina.

Se excluirán del estudio pacientes que se encuentren embarazadas, o con lactancia, además aquellas que presenten alguna enfermedad cardiovascular tales como Insuficiencia Cardíaca, cardiopatía coronaria, enfermedades valvulares, también aquellos con Insuficiencia Renal Crónica, Insuficiencia Hepática, antecedentes de trastornos hemorrágicos y alguna contraindicación a uso de beta-bloqueadores o uso previo de betabloqueador, IECA o angiotensina II en los últimos 3 meses.

Si usted cumple con los criterios de ingreso a este estudio y decide participar, se le asignará al azar a uno de 3 grupos posibles:

- A) El primer grupo que recibirá carvedilol más placebo de omega 3
- B) El segundo grupo que recibirá omega 3 más placebo de carvedilol
- C) El tercer grupo recibirá doble placebo.

Procedimientos:

Sí usted se debe someter a un tratamiento de quimioterapia con uso de doxorubicina, y acepta participar en este estudio, será sometido a los siguientes procedimientos:

- 1) Se le asignará un tratamiento, el que se mantendrá durante los tres primeros ciclos de quimioterapia: carvedilol, omega 3 o placebo.
- 2) Se le tomarán 3 muestras de sangre en el primer ciclo de quimioterapia, es decir, un total de 3 muestras durante todo el estudio. Dichas muestras serán tomadas por enfermeras o tecnólogos médicos que colaboran con el estudio.

Anexo 2 (3/6)

Las muestras se tomarán de la siguiente forma:

- a) **Primera muestra:** una semana previo al inicio de la quimioterapia, para evaluar su condición de oxidación previa a la intervención.
 - b) **Segunda muestra:** 48 hrs post quimioterapia, para evaluar daño cardiaco post quimioterapia, y la evolución de marcadores de daño.
 - c) **Tercera muestra:** al final del ciclo de quimioterapia, para evaluar si hay una eventual tendencia hacia su normalización.
- 3) Además, una semana previo y a las 48 horas post inicio de quimioterapia del primer ciclo, se realizarán:
- a) Electrocardiograma en reposo (ECG)
- 4) Se realizará además 3 controles ecocardiográficos, uno basal y otros 2 controles de seguimiento a los 3 y a los 6 meses desde iniciada la quimioterapia. El ecocardiograma transtorácico, para evaluar la función de su corazón. Este es un examen que no causa dolor ni invade su cuerpo, permite visualizar la función y características estructurales del corazón. Este podrá evidenciar el beneficio producido por las intervenciones propuestas.

Estas intervenciones propuestas no interferirán en nada con la efectividad de su tratamiento de quimioterapia.

De cada punción se obtendrán muestras de sangre separadas en dos fracciones de aproximadamente 5 ml cada una. El excedente de las muestras de sangre será eliminado, ya que ninguna otra determinación ni procedimiento será aplicado sobre ellas.

Uso de placebo

El placebo es una forma de presentación de medicamentos igual al tratamiento propuesto pero que no contiene ni carvedilol ni omega 3.

Ya que usted será asignado al azar a uno de los tres grupos existe la posibilidad de que usted no reciba ni carvedilol ni omega-3. En caso de que reciba placebo, usted será vigilada igual que los dos grupos restantes, por el equipo médico y técnico que lleva a cabo este estudio.

Mientras se encuentre recibiendo la quimioterapia durante el primer ciclo, usted será visitado por alguno de los investigadores y enfermera del proyecto. Será controlado en el policlínico del Hospital del Salvador o de la Fundación Arturo López Pérez de manera habitual.

Riesgos. La administración de *omega -3* será en dosis de 1 gr c/12 hrs vo o carvedilol en dosis 12,5 c/ 12 hrs vo.

Anexo 2 (4/6)

Por lo general a las dosis utilizadas de ambas intervenciones en el estudio, carecerían de efectos adversos, sin embargo se describen algunas reacciones tales como síntomas digestivos como distensión abdominal, y otras como rash y alteraciones hemorrágicas menores tales como epistaxis o gingivorragia.

En tanto que con el carvedilol, se describe que se pudiera provocar una baja en la presión arterial, fatiga o debilidad.

Cualquier efecto que Ud. considere que puede ser causado por el uso de estas sustancias deberá comunicarlo al equipo de investigadores a cargo en el Laboratorio de Fisiopatología renal, o al investigador responsable, el **Dr. Rodrigo Carrasco Loza, al teléfono 9-9590310.**

Costos. Los medicamentos en estudio omega-3 y carvedilol serán aportados por los investigadores sin costo alguno para Ud. durante el desarrollo de este estudio. Todos los exámenes o prestaciones que no sean necesarias para el estudio o tratamiento habitual de su enfermedad serán igualmente financiados por el proyecto.

Beneficios. Este estudio podría protegerlo a Ud. o a futuros pacientes de las secuelas en la calidad de vida que produce el daño al corazón provocado por la doxorubicina. También será beneficioso para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de esta patología.

Alternativas. Si Ud. decide no participar en esta investigación recibirá el estudio y tratamiento que se aplica habitualmente a los pacientes que son sometidos a quimioterapia con uso de doxorubicina.

Compensación. Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

Confidencialidad. Toda la información derivada de su participación en este estudio, será conservada en forma de estricta confidencialidad. Sólo tendrán acceso a ella los investigadores del proyecto y/o los supervisoras de la investigación de la institución que financia el proyecto (Sociedad de Cardiología de Chile). Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima. Además los participantes del estudio tendrán acceso a los resultados obtenidos de los análisis y exámenes que se les realicen, como también de los resultados del estudio.

Información adicional. Ud. o su médico tratante serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en la investigación.

Anexo 2 (5/6)

Voluntariedad. Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador y a su médico tratante, sin necesidad de tener que dar explicaciones por esta decisión y sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de su enfermedad. De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro del estudio si consideran que esa decisión va en su beneficio.

Complicaciones. En el caso de la punción venosa para la extracción de las muestras de sangre, podría ocasionarle ciertos inconvenientes como dolor o un leve hematoma o moretón que es común a cualquier punción, lo que será evaluado por la enfermera del estudio.

En el caso de que Ud. presente complicaciones directamente derivadas de la administración de omega-3 o carvedilol, usted recibirá el tratamiento médico completo de dicha complicación, financiado por el proyecto, y sin costo para usted o su sistema previsional. Esto no incluye las complicaciones propias de su enfermedad y de su curso natural.

Fin de la participación en el estudio. Su participación en este estudio es estrictamente voluntaria; no está obligado(a) a participar. El hecho de negarse a participar no afectará de ninguna forma a su persona. Si decide participar, deberá firmar el Formulario de Consentimiento, para demostrar su decisión de hacerlo. Sin embargo, usted puede retirarse del estudio en cualquier momento, sin que por esto reciba un trato diferente. Para lo anterior, le agradeceremos comunicarlo a cualquiera de los investigadores principales.

Dr. Rodrigo Carrasco Loza: 02-9786943

Se podrá dar por terminada su participación en el estudio con o sin su consentimiento, en caso de que se diera por terminado el estudio.

Anexo 2 (6/6)

Si Ud. acepta o no participar en el estudio marque alguna de las opciones abajo señaladas:

Si acepto _____

No acepto _____

Conclusión:

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto ***“Reducción de la Cardiotoxicidad Aguda por Antraciclinas mediante la disminución de la injuria oxidativa en pacientes con Cáncer de mama”***.

Nombre del paciente

Firma

Fecha

Nombre de informante

Firma

Fecha

Nombre del investigador

Firma

Fecha

Nombre del representante
(en caso de ser necesario)

Firma

Fecha

Nombre del Investigador responsable: Dr. Rodrigo Carrasco Loza
Laboratorio de Fisiopatología Renal. Facultad de Medicina Universidad de Chile
Teléfono de contacto: 02-9786943

Anexo 3 (1/6)



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

***Reducción de la Cardiotoxicidad Aguda por Antraciclinas
mediante la disminución de la injuria oxidativa en pacientes
con Cáncer de mama***

Sección de Cardiología, Hospital del Salvador

Sección de Oncología, Hospital del Salvador

Departamento de Medicina Oriente.

Laboratorio Fisiopatología Renal,

Facultad de Medicina

Universidad de Chile

F. 9786943

Inv. Responsables: Dr. Rodrigo Carrasco

Inv. Principales: Dr. Ramón Rodrigo- Dr. Fernando Florenzano

Anexo 3 (2/6)

Check list estudio

Nombre Paciente:

Nº de paciente:

Fecha:

ETAPAS DEL ESTUDIO				V O X
1ª Etapa: Ingreso a estudio		Paciente cumple criterios de inclusión		
		Paciente sin criterios de exclusión		
		Consentimiento informado		
		Evaluación clínica		
		Fijar fecha de control para exámenes y entrega de medicamentos		
2ª Etapa: PRIMER CICLO DE QMT	Pre-QMT (BASAL)	DIA -7	Evaluación clínica y entrega medicamentos	
			EXAMEN DE SANGRE: 1ª Muestra (1/3)	
			ECOCARDIOGRAMA	
			ELECTROCARDIOGRAMA	
	Post-QMT	DIA +1	Control clínico (FC/PA)	
			ELECTROCARDIOGRAMA	
		DIA +3	EXAMEN DE SANGRE: 2ª Muestra (2/3)	
			ELECTROCARDIOGRAMA	
		DIA +5	EXAMEN DE SANGRE: 3ª Muestra (3/3)	
			Estimación de compliance de capsulas y fijar fecha de próximo control	

3ª Etapa: Control Ecocardiograma	10-12 meses Post Quimioterapia	
---	---	--

Anexo 3 (3/6)

FORMULARIO DE INGRESO A PROTOCOLO

Nombre Paciente:

Nº de paciente:

Fecha:

Formulario de ingreso a protocolo

Consignar fechas como día/mes/año, una vez completado el formulario enviar al laboratorio.

Número de ficha	
Apellido Paterno	
Apellido Materno	
Nombres	
Edad (años)	
RUT	
Fecha de nacimiento	
Nº RANDOMIZACIÓN	
Primer ciclo de quimioterapia (fecha, hora)	
Segundo ciclo de quimioterapia (fecha, hora)	
Tercer ciclo de quimioterapia (fecha, hora)	
Cuarto ciclo de quimioterapia (fecha, hora)	

Anexo 3 (4/6)

PRIMER CICLO (fecha, hora)	Peso:	Cintura:
	Talla	Cadera:
	Basal (-7)	PA
		FC:
	Día +1	PA:
		FC:
	Dosis antraciclinas:	
Síntomas durante quimioterapia:		

Anexo 3 (5/6)

Formulario de datos clínicos de paciente en protocolo.

Completar con letra y números claros y luego enviar al laboratorio.

Número de ficha	
Apellido Paterno	
Apellido Materno	
Nombres	
Anamnesis: Síntomas referidos durante realización de quimioterapia	
Fecha de Sintomas	

HTA *si/no*

DM *si/no*

Dislipidemia diagnosticada *si/no*

Tabaquismo activo *si/no*

Paquete año ((N° cigarrillos/20)x años):

Antecedentes familiares de Cardiopatía coronaria *si/no*

Otras comorbilidades	
Antecedentes quirúrgicos	
Fármacos usados	
Drogas	
IMC	
Circunferencia de cintura	

Anexo 3 (6/6)

Formulario de Electrocardiografía:

IDENTIFICACIÓN

Número de ficha	
Nombre completo	

ECG PRIMER CICLO

	PRE QUIMIOTERAPIA (Basal)	POST QUIMIOTERAPIA	
		Día +1 (3-6 hrs)	Día +3 (48 hrs)
Informe electrocardiográfico			
Frecuencia cardíaca en ECG			
Duración onda P			
Intervalo PR			
Duración QRS			
Eje QRS			
Intervalo QTc			
Dispersión del QT			

Anexo 4 (1/3)



FORMULARIO DE EVALUACIÓN ECOCARDIOGRÁFICA DE PROYECTO:

*Reducción de la Cardiotoxicidad Aguda por Antraciclinas
mediante la disminución de la injuria oxidativa en pacientes
con Cáncer de mama*

Laboratorio de Ecocardiografía. Sección de Cardiología. Hospital del Salvador.

Departamento de Medicina Oriente. Facultad de Medicina Universidad de Chile

Jefe de Laboratorio de Ecocardiografía: Dr. Claudio Parra

Investigadores del Laboratorio participantes:

Dr. Alvarez

Dr. Bunster

Anexo 4 (2/3)

Nombre Paciente:

N°de paciente:

RUT:

Fecha:

Superficie corporal:

1) REGISTRO ECOCARDIOGRÁFICO

FE 4C		DFD M L	
FE 2C		e`lat	
FEBP		e`septal	
FE M EC		E	
FA M EC		A	
DFS M EC		E/A	
DFDM EC		T Des	
FE M L		T Rel	
FA ML		Dif E/A	
DFS M L		Vol AI	

Anexo 4 (3/3)

2) Si paciente presenta FE normal, estimar la Presión de llenado Ventricular izquierdo:

