



ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE
POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y LA
SUSCEPTIBILIDAD A INFECCIONES EN PACIENTES
CON NEOPLASIA HEMATOLÓGICA EN
TRATAMIENTO CITOTÓXICO.

Tesis para optar al grado de Doctor en Farmacología

MATÍAS MARTÍNEZ OLGUÍN

Directores:

Dr. Luis Quiñones Sepúlveda

Dra. Eva Bustamante Barra

Santiago, Chile

Septiembre 2020

Dedicado a los pacientes.
A los que luchan y sufren,
A los que hemos perdido
un ser querido por el cáncer.
Que la ciencia no se olvide de las personas
que no se vuelva dura y vacía
y que se llene de amor, pasión y comprensión.

Dedicado especialmente a mi padrino Fernando Campos Brammbilla (QEPD)
y toda la familia

“Try to leave this world a little better than you found it and, when your turns come to die, you can die happy in feeling that at any rate you have not wasted your time but have done your best”

BP

Agradecimientos

Quisiera agradecer a los que me apoyaron y no dudaron de que todo esto resultaría bien. A mi mamá, a mi papá, mis hermanos, abuelita, mi tata, tías, tíos, primas y primos.

Agradecer a mis amigos, incluso aquellos que ya veía poco y la pandemia ha hecho que vea menos, a esos amigos que, aunque pasen varios años, cuando nos volvemos a ver si siente como si el tiempo no pasara.

A los amigos de pocos años, pero que no por eso se les quiere menos, a los amigos, compañeros y grandes colegas que me dio este programa: Raúl, Miguel, Aimée, Nachito, Parra, Pepe, Seba, Mari, Andrea, Emma y Dani. Nos debemos varias chelas. Les deseo lo mejor en sus caminos, elegimos uno difícil y los buenos deseos y buenas vibras serán útiles, les agradezco su compañerismo y amistad. También a los chiquillos del lab, muchos de ellos ya amigos, más que colegas, a JP, Leslie, Enzo, Chris, Ale, Carla, Marcelo y mención especial a la hermandad: Mario y Seba.

Al team, como no, Pancho, Seba y Dani. Los infaltables, los infalibles. Siempre estuvieron y siempre van a estar. Todos para uno y uno para todos.

Agradezco a esas personas que estuvieron en los primeros años de este proceso y que, por cosas de la vida, ya estamos alejados. Fueron importantes, muchas veces trascendentales en las decisiones y al camino a tomar, gracias por el apoyo y en verdad lamento no poder expresar la gratitud que merecen.

A mis directores, al profe Luis, gracias por darme la libertad de crear mi proyecto, gracias por ayudarme a hacer crecer mi idea y madurarla, gran parte de este trabajo se debe solo a su apoyo y su fe en mí, sin eso nada sería posible. A Eva, que me adoptó cuando más la necesitaba, con su tremenda voluntad el desarrollo del trabajo fue mucho mejor, muchas gracias por tu apoyo y preocupación. También quiero agradecer a la profe Marcela, que, pese a que no la incluí mucho en este trabajo, sus consejos siempre me ayudaron a ver con más claridad los pasos futuros.

La gente de la FALP: Ivonne, Clau, Ricardo y Nelly, que fueron un apoyo importante durante el trabajo clínico, a Manuel Trujillo, gran valor. A todes en la UID, su buena onda se valora tremendamente. Del HCUCH, a Feña, que fue fundamental en el reclutamiento, aunque ella siga pensando que no hizo nada y también a Rebeca.

A Lore, que es quien se llevó quizás la peor parte del proceso, gracias por aguantarme y apoyarme, incluso en los momentos de ansiedad y de incertidumbre, por instarme a seguir y terminar. Se vendrán más proyectos y espero tenerte a mi lado.

Tabla de contenido

1. Resumen.....	10
2. Abstract.....	12
3. Introducción.....	14
4. Hipótesis.....	30
5. Objetivos.....	30
5.1 <i>Objetivo general</i>	30
5.2 <i>Objetivos específicos</i>	30
6. Metodología.....	32
6.1 <i>Diseño de estudio:</i>	32
6.2 <i>Participantes:</i>	32
6.3 <i>Procedimiento:</i>	33
6.4 <i>Cálculo del tamaño de muestra</i>	36
6.5 <i>Análisis estadístico</i>	36
6.6 <i>Consideraciones bioéticas y de bioseguridad</i>	41
7. Resultados.....	43
7.1 <i>Caracterización de la muestra</i>	43
7.2 <i>Asociación entre polimorfismos genéticos y el Recuento Absoluto de neutrófilos (RAN)</i> 45	
7.2.1 <i>Polimorfismos en ABCB1 y su relación con el RAN</i>	47
7.2.2 <i>Polimorfismos en enzimas CYP450 y su relación con el RAN</i>	49
7.2.3 <i>Polimorfismos en otros transportadores y su relación con el RAN</i>	51
7.2.4 <i>Polimorfismo en Interleuquina 1β y su relación con el RAN</i>	56
7.2.5 <i>Toll-Like receptor y su relación con el RAN</i>	59
7.2.6 <i>Polimorfismos en CARD8 y su relación con el RAN</i>	59
7.2.7 <i>Polimorfismo en Interleuquina 6 y su relación con el RAN</i>	62
7.3 <i>Asociación entre polimorfismos genéticos y la susceptibilidad a infecciones</i> ..	68
7.3.1 <i>Polimorfismos en enzimas de CYP450 y su relación con el riesgo de infecciones</i>	68
7.3.2 <i>Polimorfismos en trasportadores y su relación con el riesgo de infecciones</i>	69
7.3.3 <i>Polimorfismos en TLR2 y su relación con el riesgo de infecciones</i>	73

7.3.4	<i>Polimorfismos en IL-6 y su relación con el riesgo de infecciones.....</i>	75
7.4	<i>Construcción del modelo predictivo para infecciones</i>	76
7.4.1	<i>Calibración del modelo predictivo para infecciones</i>	78
7.4.2	<i>Discriminación del modelo predictivo para infecciones</i>	79
8.	Discusión	84
9.	Conclusiones.....	94
10.	Proyecciones futuras	95
11.	Productos derivados de esta tesis	96
11.1	<i>Presentaciones a Congresos, Jornadas o reuniones científicas</i>	96
11.2	<i>Publicaciones y capítulos de libros.....</i>	97
12.	Referencias.....	99
13.	Anexos	108
13.1	Anexo 1. Consentimiento informado FALP Aprobado por Servicio de Salud Metropolitano Oriente.	108
13.2	Anexo 2. Consentimiento informado HCUCH, aprobado por el Comité Ético Científico del HCUCH	111
13.3	Anexo 3. Acta de aprobación del proyecto por Comité de Ética Científico del Servicio de Salud Metropolitano Oriente.....	114
13.4	Anexo 4. Aprobación Comité Ético Científico del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.	116
13.5	Anexo 5. Publicación derivada de esta tesis: IL-6 -572C>G and CARD8 304T>A Genetic Polymorphisms are Associated with the Absolute Neutrophil Count in Patients with Hematological Malignancies Under Chemotherapy: An Application of Multilevel Models to a Preliminary Pharmacogenetic Study. Pharmacogenomics and personalized medicine. 2020. 337-343. DOI: https://doi.org/10.2147/PGPM.S261208	118

Índice de Tablas

Tabla 1. Variantes genéticas incluidas en este estudio	35
Tabla 2. Caracterización general de la muestra (n = 50).....	43
Tabla 3. Resumen de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos estudiados (n= 50*).	44
Tabla 4. Comparación de la media y mediana del Recuento Absoluto de Neutrófilos según el genotipo de cada variante polimórfica.	46
Tabla 5. Comparación del valor del Recuento Absoluto de Neutrófilos entre genotipos, modelos univariado y multivariado.	47
Tabla 6. Resumen de la regresión multivariada de Cox para la relación entre el polimorfismo CYP3A5 rs15524 y la neutropenia profunda.....	51
Tabla 7. Comparación del promedio de Recuento Absoluto de Neutrófilos según el genotipo de cada variante polimórfica	55
Tabla 8. Comparación del valor del RAN entre genotipos, modelo univariado y multivariado.	56
Tabla 9. Resumen de la regresión multivariada de Cox para la relación entre el polimorfismo IL-1 β rs1143627 y la neutropenia profunda.....	58
Tabla 10. Resumen de la regresión multivariada de Cox para la relación entre el polimorfismo CARD8 rs2043211 y la neutropenia profunda.	61
Tabla 11. Resumen de la regresión multivariada de Cox para la relación entre el polimorfismo IL-6 rs1800796 y la neutropenia profunda.	64
Tabla 12. Diagrama Multinivel que muestra las variables evaluadas en cada nivel, así como las posibilidades de miembros de cada uno.	66
Tabla 13. Regresión logística multivariada para la relación entre el polimorfismo CYP3A4 rs2242480 con la presencia de infecciones durante la quimioterapia.	69
Tabla 14. Regresión logística multivariada para la relación entre el polimorfismo ABCC2 rs12762549 con la presencia de infecciones posterior a la quimioterapia.....	70
Tabla 15. Resumen regresión logística multivariada para la relación entre el polimorfismo SLC22A11 (OAT4) rs11231809 con la presencia de infecciones posterior a la quimioterapia.	72
Tabla 16. Regresión logística multivariada para la relación entre el polimorfismo TLR2 rs4696480 con la presencia de infecciones posterior a la quimioterapia.	74
Tabla 17. Resumen regresión logística multivariada para la relación entre el polimorfismo IL-6 rs1800796 con la presencia de infecciones posterior a la quimioterapia.	75
Tabla 18. Resumen de modelo multi - génico para la predicción de infecciones durante la quimioterapia.	77

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de localización de las proteínas (enzimas y transportadores) en que se estudiarán los polimorfismos y el proceso farmacocinético involucrado.....	24
Figura 2. Variantes genéticas relacionadas a la respuesta inmune/inflamatoria que estudian en este proyecto y su efecto en la sobrevida de neutrófilo (figura extraída de una de las publicaciones derivadas de esta investigación).	27
Figura 3. Grafo acíclico dirigido que resume las variables que se analizarán en la tesis y su posible relación con la presencia de infecciones. En verde se muestran los factores de exposición principales (genética) y en celeste se muestran los factores que se utilizarán para controlar los análisis. En gris se muestran variables no medidas que podrían explicar la relación entre los factores de exposición y la aparición del evento.....	29
Figura 4. Curva de <i>Kaplan – Meier</i> para el análisis de tiempo hasta presentar neutropenia profunda por genotipo del polimorfismo <i>CYP3A5</i> rs15524.	50
Figura 5. Relación entre los genotipos del polimorfismo <i>SLC22A11</i> (<i>OAT4</i>) rs11231809 y la duración en días de los períodos de neutropenia con recuento absoluto de neutrófilos igual 0 células/mm ³ (a), menor a 500 (b) y menor a 1000 (c). Los valores corresponden a mediana y rango intercuartílico. Diferencias testeadas con la prueba de Kruskal – Wallis.	53
Figura 6. Relación entre los genotipos del polimorfismo <i>ABCC2</i> rs12762549 y la duración en días de los períodos de neutropenia con recuento absoluto de neutrófilos igual 0 células/mm ³ (a), menor a 500 (b) y menor a 1000 (c). Los valores corresponden a mediana y rango intercuartílico. Diferencia testada con la prueba de Kurskal – Wallis.....	54
Figura 7. Curva de <i>Kaplan – Meier</i> para el análisis de tiempo hasta presentar neutropenia profunda por genotipo del polimorfismo <i>IL-1β</i> rs1143627.	57
Figura 8. Relación entre los genotipos del polimorfismo <i>TLR2</i> rs4696480 y la duración en días del período de neutropenia con recuento absoluto de neutrófilos igual 0 células/mm ³ . Los valores corresponden a mediana y rango intercuartílico.	59
Figura 9. Curva de <i>Kaplan – Meier</i> para el análisis de tiempo hasta presentar neutropenia profunda en el primer ciclo de quimioterapia por genotipo del polimorfismo <i>CARD8</i> rs2043211.	60
Figura 10. Relación entre los genotipos del polimorfismo <i>ABCC2</i> rs12762549 y la duración en días de los períodos de neutropenia con recuento absoluto de neutrófilos menor a 500 células/mm ³ (a) y menor a 1000 (b). Los valores corresponden a mediana y rango intercuartílico. Diferencia testada con la prueba U de Mann – Whitney.....	62
Figura 11. Curva de <i>Kaplan – Meier</i> para el análisis de tiempo hasta presentar neutropenia profunda en el primer ciclo de quimioterapia por genotipo del polimorfismo <i>IL-6</i> rs1800796.	63
Figura 12. Factores genéticos y no genéticos asociados al Recuento Absoluto de Neutrófilos, demostrado a través de un modelo multinivel.	67
Figura 13. Curva ROC para el modelo propuesto para predicción de infecciones basado en la genética de los pacientes.....	80
Figura 14. Cambio de la sensibilidad y especificidad del modelo propuesto respecto del punto de corte para definición de caso.	83

Abreviaturas

ABC: ATP-Binding Cassette

ABCB1: ATP-Binding Cassette sub-family B member 1 (Glicoproteína-P)

ABCC2: ATP-Binding Cassette sub-family C member 2

ABCC4: ATP-Binding Cassette sub-family C member 4

ABCG2: ATP-Binding Cassette sub-family G member 2

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AIC: Akaike's Information Criterion o Criterio de información de Akaike

BCRP: Breast Cancer resistant protein (ABCG2)

CARD8: Caspase Recruitment Domain Family Member 8

CYP3A4: cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4

CYP3A5: cytochrome P450 family 3 subfamily A member 5

CYP450: cytochrome P450

DE: Desviación Estándar

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

G-CSF: Granulocyte – colonies stimylating factor o Factores estimuladores de colonias de granulocitos

HR: Hazard Ratio

IC95%: Intervalo de Confianza al 95%

IL: Interleuquinas

IL-1 β : Interleuquina 1 β

IL-6: Interleuquina 6

Ln: Logaritmo natural

MASCC: Multinational Association for Supportive Care in Cancer

MRP2: Multidrug resistance-associated protein 2

MRP4: Multidrug resistance-associated protein 4

OAT2: Organic Anion Transporter 2

OAT4: Organic Anion Transporter 4

OE: Objetivo específico

OR: Odds Ratio

p: p value

PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns

PCR: Polymerase chain reaction

q-PCR: Quantitative polymerase chain reaction

RAN: Recuento Absoluto de Neutrófilos

RIC: Rango Intercuartil

ROC: Receiver Operating Characteristics

rt-PCR: real time Polymerase Chain Reaction

SLC: Solute Linking Carriers

SLC22A8: Solute carrier family 22 member 8 (OAT3)

SLC22A9: Solute carrier family 22 member 9

SNP: Polimorfismo de Nucleótido Único

TLR: Toll-Like Receptor

TLR2: Toll-Like Receptor 2

TNF α : Tumor necrosis factor alpha

1. Resumen

Introducción: las infecciones en pacientes diagnosticados con neoplasias hematológicas que se encuentran en tratamiento antineoplásico citotóxico son comunes y a menudo muy graves, aumentando la morbilidad, mortalidad y los costos asociados a la terapia. Actualmente no existen herramientas que incorporen el factor genético y que puedan explicar la probabilidad de incidencia de las infecciones ni predecir los períodos de mayor riesgo.

Objetivo General: Establecer asociaciones, con un fin predictivo, entre variantes genéticas en proteínas involucradas en la farmacocinética de antineoplásicos (transportadores y enzimas de metabolismo), junto con otras asociadas a la respuesta inmune, con la incidencia de infecciones y los períodos de mayor riesgo en pacientes hemato-oncológicos en tratamiento antineoplásico.

Objetivos específicos:

- Determinar asociaciones entre variantes genéticas de las enzimas de biotransformación CYP3A4, CYP3A5 y los transportadores ABCB1, ABCC2, ABCG2, OAT4 y OAT2, con la incidencia de infecciones y con el inicio y duración de la neutropenia en pacientes hemato-oncológicos en tratamiento antineoplásico.
- Determinar asociaciones de riesgo entre variantes genéticas en las proteínas CARD8, IL-6, IL-1 β y TLR2 con la incidencia de infecciones y con el inicio y duración de la neutropenia en pacientes hemato-oncológicos en tratamiento antineoplásico.

- Determinar el valor predictivo de las variantes genéticas asociadas a las proteínas antes mencionadas (OE 1-4) utilizando modelos de regresión como aproximación preliminar de respuesta la clínica en pacientes hemato-oncológicos en tratamiento antineoplásico.

Metodología: Estudio de cohorte mixta en pacientes adultos (n= 50) diagnosticados con neoplasias hematológicas y en tratamiento citotóxico. Los genotipos fueron determinados por la metodología de *real time – PCR* usando sondas *TaqMan®*. Los factores de riesgo fueron determinados mediante regresión logística.

Resultados: Se analizaron en total 203 ciclos de quimioterapia en 50 pacientes (47,8 ±16,1 años; 56% mujeres), incluyendo 13 (16%) con leucemia linfoblástica aguda y 12 (24%) con leucemia mieloide aguda. Los polimorfismos *CYP3A4* rs2242480C>T y *OAT4* rs11231809T>A, relacionados a la farmacocinética y los polimorfismos *TLR2* rs4696480T>A e *IL-6* rs1800796C>G, asociados a la respuesta inmune/inflamatoria; se asociaron significativamente a la incidencia de infecciones. Las variables clínicas y sociodemográficas incluidas en el modelo final fueron el ciclo y tipo de quimioterapia, el diagnóstico, los días en neutropenia severa, el sexo y la edad. El pseudo R² del modelo fue 0,56; el *p-value* de la prueba de Hosmer- Lemeshow fue de 0,98; indicando que el modelo tiene una buena bondad de ajuste. Y el área bajo la curva ROC fue de 0,93, mostrando una buena discriminación de diagnóstico.

Conclusiones: Variantes polimórficas en los genes que codifican las proteínas *CYP3A4*, *OAT4*, *IL-6* y *TLR2* ayudan a predecir las infecciones en pacientes con neoplasias hematológicas en quimioterapia citotóxica. Los hallazgos podrían ayudar a optimizar las terapias, generando tratamientos más seguros para los pacientes con cáncer.

2. Abstract

Introduction: infections are common and often very serious in patients diagnosed with hematological neoplasms who are under cytotoxic antineoplastic treatment. Infections increase morbidity, mortality, and costs associated with therapy. Nowadays, no tools are incorporating genetic factors to explain the probability of infections or to predict the most significant risk periods.

General Objective: To establish associations, with a predictive purpose, between specific genetic variants in proteins involved in the pharmacokinetics of antineoplastic drugs (transporters and metabolic enzymes), together with others associated with the immune response, with the incidence of infections and periods of higher risk in hematological malignancies patients undergoing cytotoxic antineoplastic treatment.

Specific objectives:

- To determine associations between genetic variants of the biotransformation enzymes CYP3A4, CYP3A5 and transporters ABCB1, ABCC2, ABCG2, OAT4, and OAT2, with the incidence of infections and with the onset and duration of neutropenia in hematological malignancies patients under antineoplastic treatment.
- To determine risk associations between genetic variants in the CARD8, IL-6, IL-1 β , and TLR2 proteins with the incidence of infections and with the onset and duration of neutropenia in hematological malignancies patients under antineoplastic treatment.

- To determine the predictive value of the genetic variants associated with the proteins mentioned above (OE 1-4) using regression models as a preliminary approximation of clinical response in hematological malignancies patients undergoing antineoplastic treatment.

Methodology: A mixed cohort study in adult patients (n = 50) diagnosed with hematological neoplasms and undergoing cytotoxic treatment. Genotypes were determined by real-time-PCR methodology using *TaqMan*® probes. Risk factors were determined by logistic regression.

Results: We analyzed 203 chemotherapy cycles in 50 patients (47.8±16.1 years; 56% women), including 13 (16%) with acute lymphoblastic leukemia and 12 (24%) with acute myeloid leukemia. The polymorphisms *CYP3A4* rs2242480C>T and *SLC22A11* (OAT4) rs11231809T>A and the polymorphisms *TLR2* rs4696480T>A and *IL-6* rs1800796C>G were associated with infection incidence. The clinical and sociodemographic variables included in the model were cycle and type of chemotherapy, diagnosis, days in severe neutropenia, sex, and age. The pseudo R² of the model was 0.56; the p-value of the Hosmer-Lemeshow test was 0.98, indicating the model has good goodness of fit, and the area under the ROC curve was 0.93, showing good diagnostic discrimination.

Conclusions: Polymorphic variants in the genes encoding CYP3A4, OAT4, IL-6, and TLR2 proteins help to predict infections in hematologic malignancies patients undergoing cytotoxic chemotherapy. The findings could be used to optimize therapies, leading to safer treatments for cancer patients.

3. Introducción

Las infecciones en pacientes con cáncer en tratamiento con quimioterapia citotóxica representan un evento adverso grave que se presenta en un 30% en la población de riesgo y genera una mortalidad de alrededor de un 11% (1-3).

La ocurrencia de una infección tiene consecuencias clínicas directas, ya que pueden provocar o prolongar una hospitalización, aumentar la carga de medicamentos que recibe el paciente, retraso de ciclos de quimioterapia, hasta poner en riesgo la vida del paciente (4, 5).

Los costos de hospitalización aumentan un 300% en promedio cuando el paciente presenta un proceso infeccioso, incrementando el valor la medicación, exámenes de laboratorio e imagenología (datos derivados de esta investigación, no publicados).

Un paciente con cáncer en quimioterapia tiene una mayor susceptibilidad a sufrir una infección dados diferentes factores, entre los cuales se encuentran la alteración de barreras anatómicas, instrumentalización, procedimientos invasivos, la misma patología y medicación antineoplásica que le confiere un mayor grado de neutropenia y por lo tanto una menor respuesta inmune celular ante agentes patógenos (6-8).

Infecciones en neoplasias hematológicas

Uno de los tipos de cáncer con mayor susceptibilidad a tener infecciones y de mayor gravedad son las neoplasias de tipo hematológico, que comprenden leucemias, linfomas y mielomas (7).

La mayor susceptibilidad en las neoplasias hematológicas se da por dos causas principales:

En primer lugar, debido a la patología en sí, dado que existe una alta proliferación de células de la línea blanca en la médula ósea, lo que conlleva a una falta de maduración de los leucocitos impidiendo su correcto funcionamiento y por consecuencia mayor susceptibilidad a infecciones (9).

En el caso de las leucemias, se ve más afectado el sistema de respuesta inmune innato, en que las células con actividad fagocítica, especialmente los macrófagos neutrófilos, no alcanzan el nivel de madurez necesario para detectar y eliminar patógenos, esta condición es mucho más marcada en las leucemias del tipo linfoblástica o linfoides, pero es transversal a otras leucemias (10).

En el caso de linfomas, se afecta en mayor medida el sistema de respuesta inmune adaptativo, ya que son los linfocitos el tipo celular que ve más disminuido su proceso de maduración, decreciendo su reconocimiento de antígenos y por lo tanto las señales de inflamación no se desencadenan eficientemente (11).

En segundo lugar, el otro factor que provoca que los pacientes tratados por neoplasias hematológicas sean más propensos a las infecciones es el tratamiento en sí. La quimioterapia administrada busca generar una aplasia de la médula ósea, ya que son aquellas células las que se dividen anormalmente en estas patologías, lo que trae como consecuencia una profunda neutropenia (12, 13).

Quimioterapia en pacientes hemato-oncológicos

El tipo de quimioterapia más utilizada actualmente en este tipo de pacientes es utilizando medicamentos citotóxicos, es decir, medicamentos que afectan la división celular interfiriendo procesos claves y causando la muerte de la célula en la que actúan (14).

La quimioterapia citotóxica tiene la gran desventaja de su alta toxicidad, ya que, al no ser medicamentos específicos para un tipo celular o un marcador, afectan a cualquier célula que esté en división. Esta característica hace que sean efectivos para el control de neoplasias, dada su alta tasa de replicación, sin embargo, también se asocian a reacciones adversas dada la destrucción de otros tipos celulares. Es por esto por lo que son comunes eventos como la alopecia, malestares intestinales, anemia y neutropenia (15).

La neutropenia, en este tipo de pacientes, es un evento esperado e incluso buscado con la terapia, dado que son las células progenitoras hematopoyéticas las que se encuentran con una proliferación más alta de lo normal. Esto trae como consecuencia la incidencia de períodos prolongados de neutropenia, los que varían en magnitud según el paciente y el esquema terapéutico (16).

Algo que tienen en común gran parte de los esquemas quimioterapéuticos utilizados en este tipo de paciente, es el potencial de aplasia de la médula ósea, dado que es ese el blanco terapéutico. La incidencia de reacciones adversas, así como su gravedad, pueden variar según los medicamentos que se incluyen en el esquema específico (14, 15).

Unos de los esquemas altamente utilizado es el esquema Hyper CVAD, que es un esquema de dos fases, es decir que se dan distintos medicamentos en según la fase. La fase I se

compone de ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y dexametasona. Por otro lado, la fase II incluye metotrexato y citarabina. Este es un esquema altamente utilizado en el tratamiento de leucemias linfoblástica aguda, linfoma no Hodgkin y otros tipos de leucemias en adultos (17, 18).

Otro esquema utilizado en leucemias agudas es el que incluye daunorrubicina y citarabina, conocido como 3+7, dado la cantidad de días que se administra cada uno de los medicamentos mencionados en un ciclo de inducción, luego, durante la consolidación, se utiliza citarabina (19).

Otro esquema enfocado en leucemias agudas es el llamado esquema 15-30, que también incluye medicamentos distintos según si se trata de una inducción o una consolidación. En el primer caso incluye dexametasona, vincristina, daunorrubicina, y asparraginasa y en la consolidación incluye 6-mercaptopurina, ciclofosfamida, citarabina, vincristina y asparraginasa (20).

Dado el alto potencial de aplasia de la médula ósea que caracteriza a los esquemas mencionados, es que las reacciones adversas del tipo hematológicas son muy frecuentes, teniendo una incidencia mayor al 80% en la globalidad de los pacientes (14, 15).

Uno de los eventos frecuentes que pone en riesgo potencialmente la vida de los pacientes es la neutropenia, dado que genera una mayor susceptibilidad a infecciones graves que pueden llegar a ser mortales (10).

Neutropenia en pacientes hemato-oncológicos

La neutropenia se define como un recuento absoluto de neutrófilos (RAN) menor a 2000 células por milímetro cúbico y se clasifican según su severidad en grado 1 con un RAN entre 1500 y 2000, grado 2 entre 1000 y 1500, grado 3 entre 500 y 1000 y grado 4 con un RAN menor a 500 (21).

En pacientes hemato-oncológicos, la neutropenia de grado 4 es un evento común que llegan incluso a un RAN igual a cero, es decir, el paciente no presenta neutrófilos en circulación y pueden mantenerse en ese estado por alrededor de dos a cuatro semanas, siendo este el período de mayor riesgo de infecciones (22).

Hasta la fecha no se puede determinar con precisión ni el inicio ni la duración del período de neutropenia, esto genera dificultad en la administración y duración de la profilaxis, la programación de aislamiento y la evaluación de riesgo en caso de presentarse neutropenia febril (5).

La neutropenia febril es una urgencia oncológica, que implica una medición de temperatura de 38,5 °C o dos mediciones de 38°C separadas por una hora, en un momento en que el paciente está experimentando un período de neutropenia en cualquier grado. Estas se clasifican según la *Multinational Association for Supportive Care in Cancer* (MASCC) por el riesgo de complicaciones en bajo y alto riesgo (23).

Algunas características que permiten la clasificación de alto riesgo son, entre otros, el diagnóstico de patología hematológica, inicio de la fiebre en contexto hospitalario y RAN

menor a 100 cels/mm^3 por más de 7 días, todas características comunes en pacientes en quimioterapia por neoplasia hematológica (23, 24).

El período de mayor riesgo de presentar una infección en los pacientes en quimioterapia es entre los 7 y 12 días posteriores al inicio de esta, momento que coincide con el inicio y la mayor profundidad de la neutropenia. Conocer con mayor exactitud cuándo ser el inicio permitirá programar medidas preventivas con mayor eficiencia y uso de recursos (25, 26).

La variabilidad en el inicio y duración de la neutropenia podría tener relación con la capacidad metabólica y farmacocinética de los pacientes frente a la quimioterapia, es decir, un menor metabolismo puede estar asociado a un aumento en los niveles plasmáticos y esto a su vez relacionarse con un inicio más rápido de la neutropenia o podría aumentar la vida media de los medicamentos, lo que conduciría a una prolongación de su efecto conduciendo a una mayor duración del período de neutropenia (27).

Farmacocinética de antineoplásicos y su relación con la respuesta al tratamiento.

Entre los procesos farmacocinéticos más estudiados, y en el que se ha descrito un mayor impacto en la respuesta terapéutica es en el metabolismo de los medicamentos. Proceso que consiste en la transformación, principalmente enzimática, de los principios activos o sus metabolitos, con el fin de favorecer su excreción (28).

Existen dos fases de metabolismo, la fase I consiste en reacciones de funcionalización, cambios pequeños en la estructura molecular a través de reacciones de oxidación, reducción o funcionalización. Las enzimas más representativas de esta fase es la superfamilia CYP450 (29).

Este grupo de enzimas es el responsable del metabolismo de gran parte de los medicamentos utilizados actualmente en la práctica clínica, uno de los representantes que tiene una gran participación es el CYP3A4 y también CYP3A5 (30, 31).

La enzima CYP3A4 participa en el metabolismo de un gran número de medicamentos, los antineoplásicos no son la excepción. Algunos de los medicamentos que sufren amplio metabolismo por esta isoforma de CYP450 son Vincristina, ciclofosfamida y etopósido que son medicamentos utilizados en el tratamiento de las neoplasias hematológicas, específicamente en los esquemas Hyper CVAD y 15-30 (32).

Además de las enzimas, es necesario considerar otros actores en los procesos farmacocinéticos como son los transportadores. Las familias más estudiadas son las *ATP-Binding Cassette* (ABC) y los *Solute Linking Carriers* (SLC), que participan en las fases de absorción, distribución y eliminación (33, 34).

El transportador ABCC2, está involucrado en la eliminación hepática y en la distribución hacia hepatocitos, por lo que modifica los niveles plasmáticos de los medicamentos. Algunos de los sustratos que se han atribuido a este transportador son vincristina y doxorubicina, que forman parte de esquemas quimioterapéuticos en neoplasias hematológicas (35).

Así mismo, los transportadores de aniones orgánicos (OAT), pertenecientes a la familia SLC, participan en la eliminación de numerosos fármacos, dada su expresión a nivel a renal, los transportadores OAT3 y OAT4 se ubican en la membrana basolateral y apical

respectivamente, y participan en el transporte de numerosos medicamentos antineoplásicos (36).

Genética como factor de variación a la respuesta al tratamiento.

Uno de los factores que genera variabilidad en el metabolismo y eliminación de medicamentos entre los pacientes es la presencia de ciertas variantes en genes que codifican para proteínas involucradas en la farmacocinética (28).

Las variantes más estudiadas son los polimorfismos genéticos, que se definen como aquellas variantes que en una población normal se presentan con una frecuencia mayor al 1% y conducen a al menos dos fenotipos. El polimorfismo más estudiado es el de nucleótido único (SNP) que corresponde al cambio de una única base nitrogenada en la secuencia de ADN (37).

Los polimorfismos genéticos pueden tener diferentes consecuencias en la capacidad metabólica de las enzimas de biotransformación o en los transportadores de drogas, según su ubicación en el gen e impacto en la proteína, aumentando o disminuyendo su funcionalidad o la cantidad de proteína generada por cambio en la expresión génica (38, 39).

Farmacogenética: Polimorfismos asociados a la farmacocinética de antineoplásicos.

Dos de las enzimas de biotransformación mayormente implicadas en el metabolismo de la mayoría de los medicamentos utilizados en el tratamiento de neoplasias hematológicas es la CYP3A4 y la CYP3A5, que en su conjunto participan en el metabolismo de la mayoría de los medicamentos más usados en leucemias y linfomas (40-42).

La funcionalidad y cantidad de las enzimas CYP3A4 Y CYP3A5 puede verse afectada por la presencia de polimorfismos en sus genes respectivos. En el caso de CYP3A5, el SNP rs776746 (CYP3A5*3), conduce a la producción de proteína no funcional debido a un *splicing* alternativo en la maduración del transcrito. Por otro lado, el SNP rs2740574 (CYP3A4*1B), ubicado en la región promotora del gen, conduce a una menor transcripción, es decir una menor cantidad de enzima (43-45).

Otro polimorfismo que se ha asociado a una menor funcionalidad de la proteína CYP3A4 es la variante rs2242480, en la que el alelo C es el que produce el efecto mencionado (46). Una menor funcionalidad o expresión de la enzima trae como consecuencia una mayor acumulación de los medicamentos metabolizados por esta vía, eso se podría asociar a una mayor tasa de reacciones adversas dosis dependientes.

Uno de los transportadores más estudiados es ABCB1 o Glicoproteína-P que participa en gran parte de los procesos farmacocinéticos y tiene como sustrato un amplio número de fármacos. Se han estudiado polimorfismos que afectan su acción a distintos niveles. Por ejemplo, el SNP rs2032582 ubicado en uno de los exones del gen disminuye la

funcionalidad de transporte de la proteína y el SNP rs1045642 afecta la unión con el sustrato (47, 48).

El polimorfismo rs12762549 en el gen que codifica para la proteína ABCC2 genera una menor funcionalidad en el transportador. El genotipo GG se ha asociado con un menor *clearance* de ciertos medicamentos que son sustratos de transporte de ABCC2 (49). La disminución en la eliminación a nivel hepático que se podría atribuir al polimorfismo, también se suma a que existe una menor distribución hacia el hígado y por lo tanto menor metabolismo, esto sumado conduce a mayores niveles plasmáticos de medicamentos y mayor probabilidad de desarrollo de toxicidad (35).

La eliminación a nivel renal también se puede ver afectada por la genética, más que a través de la filtración glomerular, se afecta la eliminación por transporte activo, el polimorfismo rs11231809 en el gen SLC22A9, que codifica para la proteína OAT4, provoca una menor funcionalidad del transportador, el genotipo AA, se asocia a una menor eliminación de medicamentos (50, 51).

Conocer la capacidad metabólica y de transporte de fármacos de cada paciente podría ayudar a entender la variabilidad en la respuesta al tratamiento quimioterapéutico, permitiendo optimizar las terapias y medidas asociadas, tanto farmacológicas, como la profilaxis antibiótica, como las no farmacológicas, como el aislamiento preventivo.

Si, por ejemplo, estuviera disminuida la eliminación debido a una menor capacidad del transportador OAT4 producida por el SNP rs11231809, se podría pensar que el medicamento alcanza mayores niveles a nivel plasmático y, por lo tanto, tener un inicio

más temprano del efecto y de la neutropenia. Esto sumado a un menor metabolismo podría comenzar a orientar y entender de mejor forma la respuesta del paciente frente a cada tratamiento (51). Esto podría permitir una selección más adecuada de los esquemas, previendo mejor la respuesta.

Las variantes genéticas relacionadas a la farmacocinética que se estudiarán en este proyecto se muestran en la **Figura 1**, ahí se muestra que algunos transportadores como ABCB1 y ABCG2 podrían tener un efecto en la absorción de medicamentos, sin embargo, la evidencia indica que dada la alta ubiquidad de la Glicoproteína P también podría afectar la eliminación. El transportador ABCC2 podría estar involucrado en la distribución hacia el hígado, pero se ha mostrado que su mayor actividad es en la eliminación hepática.

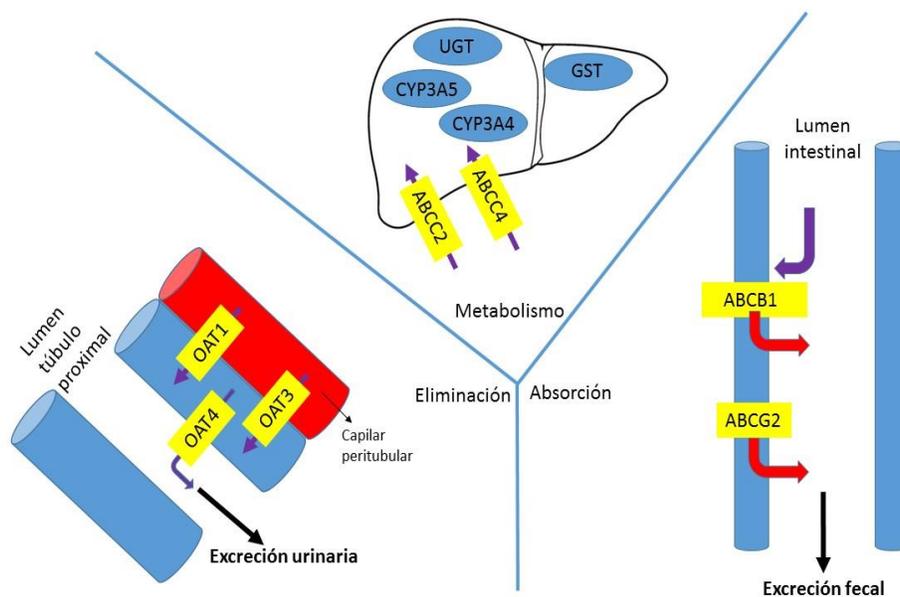


Figura 1. Esquema de localización de las proteínas (enzimas y transportadores) en que se estudiarán los polimorfismos y el proceso farmacocinético involucrado.

Farmacogenética: Polimorfismos asociados a la respuesta inflamatoria/inmune.

Además de los factores genéticos del paciente relacionados a procesos farmacocinéticos, es recomendable considerar los procesos que se desencadenan luego de iniciar la quimioterapia. Dada la alta tasa de destrucción celular provocada por la terapia citotóxica, se genera un proceso inflamatorio en respuesta. En el área de las infecciones en inmunosuprimidos, la respuesta inflamatoria juega un rol clave, tanto en la detección temprana como en el pronóstico. Una menor respuesta inmune puede verse asociada a una menor detección o a una mayor gravedad de la infección, tanto como a una mayor susceptibilidad a sufrir procesos infecciosos.

Las interleuquinas (IL) son proteínas liberadas por los leucocitos, entre otras células, que participan en el proceso inflamatorio y que, por lo tanto, están relacionados con la respuesta ante infecciones, tanto a nivel de susceptibilidad, como en la gravedad o la respuesta al tratamiento (52, 53). Estas IL también se pueden ver afectadas por la presencia de variantes polimórficas en los genes que las codifican. Por ejemplo, en el promotor del gen que codifica para IL-1 β , existe una variante polimórfica que conduce a una mayor expresión, lo que se asocia a una respuesta inflamatoria exacerbada, lo que podría estar relacionado con una respuesta más temprana frente a infecciones y, por lo tanto, una menor gravedad de estas (54, 55).

El polimorfismo rs1800796 en el gen que codifica para la IL-6 se relaciona con una menor expresión de la proteína, esto tiene consecuencias en distintos aspectos, por un lado, se genera un proceso inflamatorio menos eficiente y, por otro lado, puede provocar una

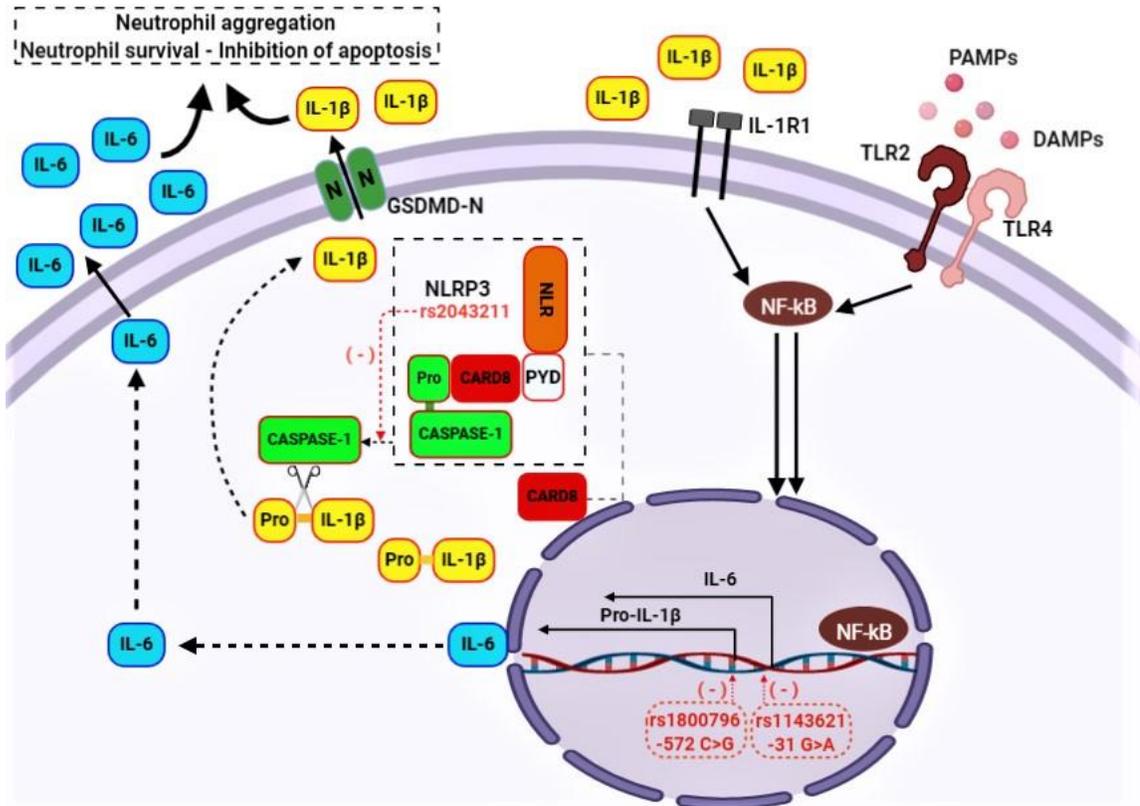
respuesta distinta a ciertos tratamientos de enfermedades que involucran un proceso inflamatorio (56).

El genotipo GG del SNP rs1800796, ubicado en el promotor del gen, se ha asociado a una menor unión de la maquinaria transcripcional al promotor y por este motivo se produce menos proteína. Esto podría estar relacionado a una menor activación de los neutrófilos, dado que las señales inflamatorias promueven la sobrevida de este tipo celular (57).

Otras proteínas relacionadas a la respuesta inmune son los *Toll-Like Receptor* (TLR), cuya función es detectar patógenos circulantes y desencadenar la respuesta inflamatoria, por lo que una mayor actividad, como la provocada por el polimorfismo rs4696480 en el gen *TLR2*, se asocia a una mayor secreción de proteínas proinflamatorias y podría ser asociada con un inicio de temprano de síntomas o una respuesta más efectiva ante agentes potencialmente infecciosos (58-60).

Las variantes polimórficas en genes que codifican para proteínas involucradas en el proceso inflamatorio y respuesta inmune se relacionan con la respuesta a la quimioterapia, dado que un proceso inflamatorio eficiente se asocia a la inhibición de la apoptosis y, por lo tanto, mayor sobrevida de algunas células, entre ellas de los neutrófilos. Por lo que, una vez iniciada la quimioterapia, podría generarse un inicio más tardío de la neutropenia (61-63).

Las variantes genéticas involucradas en la respuesta inmune e inflamatoria y su relación con la sobrevida de neutrófilos estudiadas en esta tesis se muestran en la **Figura 2**.



Fuente: Martínez et al. 2020 (64)

Figura 2. Variantes genéticas relacionadas a la respuesta inmune/inflamatoria que estudian en este proyecto y su efecto en la sobrevivencia de neutrófilo (figura extraída de una de las publicaciones derivadas de esta investigación).

Farmacogenética y su relación con la susceptibilidad a infecciones.

En definitiva, la susceptibilidad a infecciones en pacientes hemato-oncológicos está dada por diferentes factores, algunos inherentes a la patología en sí, otros asociados al potencial de aplasia del tratamiento con medicamentos antineoplásicos. Otros factores terapéuticos como el uso de estimuladores de colonias de granulocitos podrían cambiar el riesgo de

presentar una infección. Además, el sexo y la edad podrían jugar un rol en una mayor susceptibilidad.

Pese a que se conocen algunos factores protectores y de riesgo para la incidencia de infecciones, la respuesta es variable entre los pacientes, por lo tanto, es posible hipotetizar que existen factores genéticos que permitan entender la variabilidad en la aparición de los de eventos y con esto, predecir su incidencia y el tiempo en que ocurrirá el evento.

Las variantes genéticas asociadas a la farmacocinética de los antineoplásicos podrían exponer al paciente a una mayor concentración de los medicamentos y con eso generar mayor probabilidad de toxicidad del tipo dosis-dependiente, con esto una mayor susceptibilidad a infecciones.

Adicionalmente, los genes que codifican para proteínas que participan en la respuesta inmune, podrían aumentar el riesgo de infecciones, ya sea por una menor respuesta frente a un patógeno, como a un proceso inflamatorio menos eficiente lo que no permite prolongar la sobrevivencia de los neutrófilos, que son una de las principales defensas contra las infecciones.

En la **Figura 3** se muestra de forma resumida las variables que serán analizadas en este trabajo de investigación, con una línea verde se observa gráficamente la relación propuesta en esta tesis entre la genética (asociada tanto a sistema inmune como a farmacocinética) con la variable respuesta, que corresponde a la infección, pasando por variables intermedias que no serán medidas (círculo gris), pero que podrían explicar de mejor forma la relación entre factores. En líneas negras, y desde los círculos azules, se unen las

variables que podrían modificar la respuesta al tratamiento, ya sea como factores protectores o de riesgo y que se utilizarán para controlar los resultados, permitiendo obtener resultados más depurados.

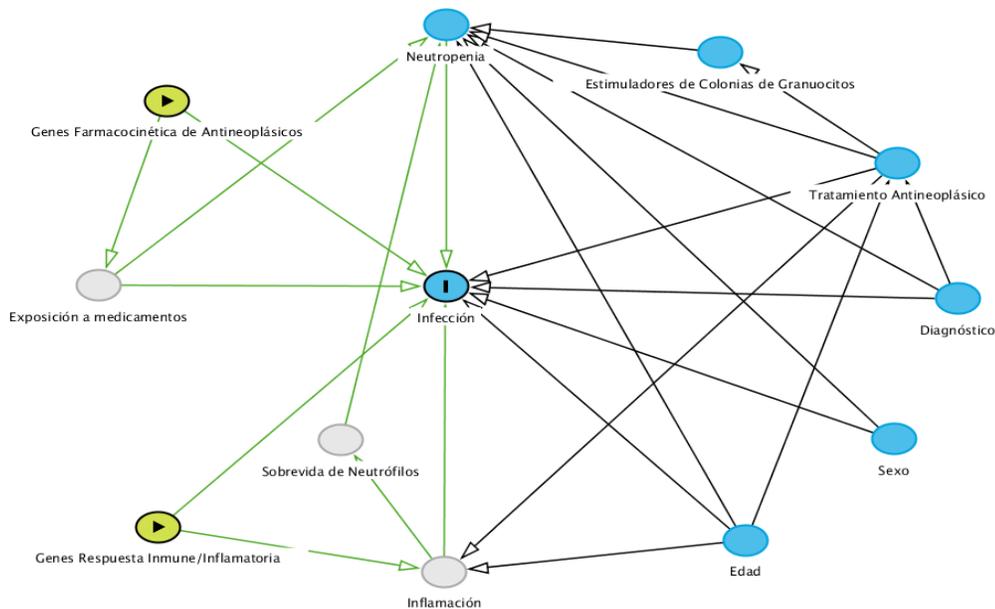


Figura 3. Grafo acíclico dirigido que resume las variables que se analizarán en la tesis y su posible relación con la presencia de infecciones. En verde se muestran los factores de exposición principales (genética) y en celeste se muestran los factores que se utilizarán para controlar los análisis. En gris se muestran variables no medidas que podrían explicar la relación entre los factores de exposición y la aparición del evento.

De acuerdo con los antecedentes anteriormente señalados el presente trabajo de tesis plantea la siguiente hipótesis:

4. Hipótesis

Variantes genéticas relacionadas a la farmacocinética de antineoplásicos sumadas a variantes genéticas asociadas a respuesta inmune/inflamatoria, pueden predecir el riesgo de infección en pacientes diagnosticados con neoplasias hematológicas en tratamiento citotóxico.

5. Objetivos

Para la comprobación de dicha hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

5.1 Objetivo general

Establecer asociaciones, con un fin predictivo, entre variantes genéticas involucradas en la farmacocinética de antineoplásicos (transportadores y enzimas de metabolismo) y asociadas a la respuesta inmune, con la incidencia de infecciones y los períodos de mayor riesgo en pacientes hemato – oncológicos en tratamiento antineoplásico.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar asociación entre variantes genéticas de las enzimas de biotransformación CYP3A4, CYP3A5 y los transportadores ABCB1, ABCC2, ABCG2, OAT4 y OAT2, con la incidencia de infecciones en pacientes hemato-oncológicos en tratamiento antineoplásico.

2. Determinar asociación entre variantes genéticas de las proteínas CARD8, IL-6, IL-1 β y TLR2 con la incidencia de infecciones en pacientes hemato-oncológicos en tratamiento antineoplásico.
3. Determinar asociación entre variantes genéticas de las enzimas de biotransformación CYP3A4, CYP3A5 y los transportadores ABCB1, ABCC2, ABCG2, OAT4 y OAT2 con el inicio y duración de la neutropenia en pacientes hemato-oncológicos en tratamiento antineoplásico.
4. Determinar asociación entre variantes genéticas de las proteínas CARD8, IL-6, IL-1 β y TLR2 con el inicio y duración de la neutropenia en pacientes hemato-oncológicos en tratamiento antineoplásico.
5. Determinar el valor predictivo de las variantes genéticas asociadas a las proteínas antes mencionadas (OE 1-4) utilizando modelos de regresión como aproximación preliminar de respuesta la clínica en pacientes hemato-oncológicos en tratamiento antineoplásico.

6. Metodología

6.1 Diseño de estudio:

Estudio de tipo cohorte mixta, en que se reclutaron pacientes en la Fundación Arturo López Pérez y el Hospital Clínico de la Universidad de Chile, durante la administración de quimioterapia y se siguió de forma ambispectiva durante todos los ciclos de tratamiento.

6.2 Participantes:

Criterios de inclusión:

- Pacientes con 18 años o más, que acepten participar mediante la firma de un formulario de consentimiento informado.
- Pacientes diagnosticados con neoplasias hematológica (leucemia, linfoma o mieloma) y en tratamiento actual con quimioterapia citotóxica.
- Pacientes que, basado en los criterios del equipo tratante, necesite ser hospitalizado, para realizar un seguimiento intensivo del tratamiento.

Criterios de exclusión:

- Pacientes que consuman medicamentos inmunosupresores para tratamiento de una comorbilidad, diferente al cáncer.
- Pacientes con patologías (diferentes al cáncer) que impliquen inmunodeficiencia.
- Pacientes que consuman con regularidad medicamentos inductores o inhibidores de enzimas metabólicas.
- Pacientes embarazadas.

- Pacientes cuya historia clínica no pueda ser obtenida.

6.3 Procedimiento:

Los pacientes que cumplieron los criterios de selección fueron invitados a participar del estudio, en este proceso se les explicó detalladamente en qué consistía su participación, incluyendo riesgos y beneficios, el proceso terminó con la firma de un formulario de consentimiento informado (Anexo 1 y 2).

A los pacientes que aceptaron participar se les realizó una entrevista con el fin de realizar la caracterización de la muestra. Además, se extrajo una muestra de sangre periférica de 5 ml colectada en un tubo con anticoagulante EDTA, de la cual se aisló el ADN desde leucocitos periféricos centrifugados (*buffy coat*) utilizando un método comercial de purificación de ADN genómico de sangre.

Para la extracción de ADN se utilizaron kits comerciales *E.Z.N.A Blood DNA kit* de la marca Omega Biotek®, para la extracción desde una muestra de *buffy coat*, lo cual permitió obtener ADN en forma simple, rápida y con una pureza adecuada para la metodología de genotipificación. La concentración de ADN y su pureza se determinó midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro *NanoDrop DeNovix DS-11 Spectrophotometer*. Se consideró como criterio de aceptación para una muestra de ADN genómico una concentración mínima de 15 ng/mL y una razón de absorbancia 260/280 > 1,70.

Una vez obtenido el ADN genómico y cuantificado, El análisis de los genotipos de los pacientes se realizó mediante la técnica de *real time Polymerase Chain Reaction* (rt-PCR) usando sondas *TaqMan*®.

Esta técnica, consiste en que la sonda en su estructura contiene una molécula reportera que es fluorescente (HEX o FAM) en el extremo 5' y un *quencher*, el cual bloquea la emisión de la fluorescencia de la molécula fluorescente o fluoróforo. El *quencher* está ubicado en el extremo 3' de la sonda. En la primera etapa del experimento, ocurre la desnaturalización de las hebras de ADN, aquí los los *primers forward* y *reverse* hibridan con secuencias complementarias a lo largo de las cadenas de ADN. La detección de los productos se realiza cuando la *Taq* ADN Polimerasa, con su actividad nucleasa degrada la sonda en el extremo 5', que se encuentra unido a la cadena molde de ADN, provocando que se libere el fluoróforo reportero del *quencher*, resultando en la detección de fluorescencia. Una vez finalizado el experimento, se analizan los resultados a través de las curvas de amplificación.

La técnica de rt-PCR se realizó en un volumen de 7 µL (30 ng/µL de ADN más una solución de reacción con los siguientes volúmenes: 3,5 µL de Master Mix, 0,35 µL de sonda y 3,15 µL de agua libre de nucleasas). El protocolo de PCR consistió en una activación enzimática a 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos, cada uno compuesto de una desnaturalización a 95 °C por 15 minutos, alineamiento y extensión a 60 °C por 1 minuto. Las variantes genotípicas se observaron mediante la fluorescencia entregada por el equipo.

Las variantes genéticas involucradas en esta investigación se resumen en la **Tabla 1**

Tabla 1. Variantes genéticas incluidas en este estudio

Gen	Enzima / transportador	rs	Cambio	Frecuencia (MAF)	Población
<i>CYP3A4</i>	CYP3A4	rs2740574	-392A>G	14,7% (*1B)	Chilena
<i>CYP3A5</i>	CYP3A5	rs776746	6986A>G	18,3% (*1)	Chilena
<i>SLC22A8</i>	OAT3	rs11568482	64302950 T > A	A: 3,5%	Asiática
<i>SLC22A9</i>	OAT4	rs11231809	64302950 T > A	A: 43%	Mixta de EE. UU.
<i>ABCB1</i>	Glicoproteína P	rs2032582	87160618 A > C	C: 57,8%	Mexicana
		rs1128503	87179601 A > G	G: 53,4%	Mexicana
		rs1045642	87138645 A > G	G: 54,3%	Mexicana
<i>ABCC2</i>	MRP2	rs12762549	101620771 C > G	G: 56,9%	Mexicana
		rs17222723	101595996 T > A	A: 24%	Mixta
<i>ABCC4</i>	MRP4	rs11568658	95863008 C > A	A: 19,3%	China
				A: 13,6%	Japonesa
		rs3765534	95815415 C > T	T: 18%	Japonesa
<i>ABCG2</i>	BCRP	rs2231142	89052323 G > T	T: 22,4%	Mexicana
<i>CARD8</i>	CARD8	rs2043211	304 T>A	A: 32%	Mixta
<i>TLR2</i>	TLR2	rs4696480	-16934 A>T	T: 42%	Mixta
<i>IL-6</i>	Interleuquina 6	rs1800796	-572 G>C	C:31%	Mixta
<i>IL-1β</i>	Interleuquina 1β	rs1143627	-118 G>A	A:47%	Mixta

6.4 Cálculo del tamaño de muestra

Se calculó en base a un estudio de Cohorte no pareada, basada en los resultados obtenidos hasta el momento y considerando un 30% de no expuestos positivos, un 60% de expuestos positivos, se estima un OR de diferencia de 3,5 y una razón de prevalencia de 2. Con un nivel de significancia de 5% y una potencia del 80%. El tamaño de muestra necesario es de 88 pacientes (Utilizando el método de Kelsey).

6.5 Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva para la caracterización de la muestra tanto sociodemográfica, como farmacológica, mórbida y genética. Se generó una base de datos en Microsoft Excel ®. Las diferencias estadísticamente significativas fueron asociadas a un valor de p (p) $<0,05$ a dos colas. La prueba de normalidad de distribución de las variables continuas y discretas se realizó de forma gráfica con el histograma en conjunto con el test de *Shapiro-Wilk*.

Las pruebas de asociación bivariadas entre variantes genéticas y el evento de interés falla terapéutica o eventos adversos, fue estudiada mediante la prueba estadística X^2 .

Para el análisis de factores de riesgo y modelo predictivo, se realizó una regresión logística bivariada y multivariada para establecer la influencia de cada factor en la variable de interés, tanto en forma individual como integrada. En este punto además de la presencia de las variantes genéticas, serán considerados otras variantes tanto sociodemográficas

(sexo y edad); mórbidas, cómo tipo de cáncer y farmacoterapéuticas, es decir, medicamentos utilizados para su tratamiento.

Para el análisis de variantes genéticas se realizó un análisis multivariado y “unigénico”, es decir, se estudió la relación de una única variante genética con el evento de interés, pero controlado por variables sociodemográficas, mórbidas y farmacoterapéuticas. De esta forma, se puede estudiar la relación de cada uno de los polimorfismos, pero de una forma más controlada por posibles confundentes.

La variable dependiente dicotómica fue la incidencia de infecciones.

Para las variables explicativas que sean categóricas, con más de dos categorías se utilizó la metodología de “variables dummy” o “variables indicadoras” seleccionando categorías representativas para cada indicador cuando sea necesario. La misma metodología se probó para variables continuas o discretas, utilizando rangos.

La fuerza de asociación entre variable de interés y los factores estudiados se midieron a través del *Odds Ratio* (OR) crudo y ajustado con sus respectivos intervalos de confianza al 95% (IC95%) y el *p value*.

El modelo predictivo al estar basado en una regresión de tipo logística tendrá la siguiente forma general:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n$$

Donde p es la probabilidad de que ocurra la variable de interés, las variables independientes están representadas con la letra “x” y los coeficientes (derivados de la regresión) aparecen con la letra b.

La significancia de cada coeficiente fue evaluada a través del intervalo de confianza, aquellas variables que no resulten significativas no serán incluidas en el modelo, a menos que estén confundidas con otra variable independiente que sí resulte significativa.

A través de los coeficientes se calculó el OR y se podrá establecer el riesgo de cada factor sobre el evento de interés, en que valores mayores a 1 serán calificados como factores de riesgo y menores a 1 como factores protectores.

Para los análisis que incluyen el tiempo a la aparición de un evento se utilizará en primer lugar la curva de *Kaplan-Meier* para explorar la relación entre la variante genética y el evento, generando distintas curvas según el genotipo del paciente.

Los eventos analizados con esta metodología serán la neutropenia profunda, definida como un recuento absoluto de neutrófilos de 0 (cero) células/mm³, neutropenia severa definida como un RAN menor a 500 células/mm³ y neutropenia leve, que corresponde a un RAN menor a 1000 células/mm³.

Análisis de tiempo al evento se realizó descriptivamente con curvas de *Kaplan-Meier* y su diferencia se testeó con la prueba de logrank. Posteriormente, para aquellos polimorfismos con un valor de p significativo para el logrank, se realizó una regresión bivariada y multivariada de Cox. Las variables de ajuste en el modelo multivariado fueron la edad, el sexo, el ciclo y tipo de quimioterapia y el diagnóstico.

Se midió el tiempo en días hasta alcanzar la neutropenia con un RAN igual 0 células/mm³.

La magnitud del efecto se evaluó mediante el *Hazard Ratio* (HR) y su IC95%.

Para la determinar la asociación entre los polimorfismos genéticos y si alguno de los genotipos estaba asociado a un mayor o menor recuento absoluto de neutrófilos se buscó predecir la media de RAN en cada ciclo. Dado que la distribución de la variable que se deseaba predecir no era normal, se utilizaron modelos de regresión no lineal o no paramétrica de kernel, con una repetición de 100 veces para cada proceso y generar un mejor ajuste, con el software estadístico STATA 15.0. Los resultados de esta regresión se interpretan de igual forma que aquellos obtenidos de una regresión lineal, es decir aquellos coeficientes positivos se relacionan con un mayor RAN en promedio en cada ciclo, respecto a la referencia y viceversa.

Además, para establecer más claramente el efecto que tiene la genética en el cambio en el RAN posterior a la quimioterapia y tomando en cuenta que los datos recogidos se encuentran anidados y correlacionados, se utilizó una metodología de análisis multinivel o jerárquica. Esta metodología nos permite controlar la variabilidad interindividual y correlación de valores provocada por el esquema específico de quimioterapia. La unidad de observación para este análisis fueron las mediciones periódicas de RAN no los pacientes. Aquí se utilizaron aquellos pacientes que experimentaron neutropenia durante alguno de los ciclos de quimioterapia y que tuvieran al menos cuatro mediciones de RAN durante ese ciclo.

El modelo multinivel tuvo 4 niveles: El superior fue el nivel “Paciente”, aquí se incluyeron las variables genéticas, luego el nivel “Esquema”, seguido del nivel ciclo y finalmente el nivel tiempo, donde fueron medidos los RAN diariamente, además de la administración de Factores estimuladores de colonias de granulocitos (G-CSF). Además, se incluyeron dos interacciones entre variables, G-CSF con tiempo y la administración de G-CSF y el hospital.

Para mejorar el ajuste se realizó una transformación logarítmica de la variable dependiente (los valores “0” se reemplazaron por “1”, dada la incompatibilidad matemática. Además, como el RAN tiene comportamiento polinómico, se agregaron las variables Día² y Día³ al modelo, quedando el modelo basal de la siguiente forma:

$$\ln(ANC)_{ijkl} = \beta_0 + \beta_{0i} + \beta_{0ij} + \beta_{0ijk} + Día + Día^2 + Día^3 + e_{ijkl}$$

Donde β_{0i} , β_{0ij} y β_{0ijk} son interceptos aleatorios para “paciente”, “esquema dentro de paciente” y “Ciclo dentro de esquema dentro de paciente”, respectivamente.

El mejor modelo fue elegido utilizando el criterio de información de *Akaike* (AIC) y las variables fueron incorporadas al modelo según su significancia estadística. Los análisis se realizaron con el software R (v3.6.1) y RStudio (v2.1.5001) con el paquete "lme4".

6.6 Consideraciones bioéticas y de bioseguridad

El presente proyecto fue presentado y aprobado en el Comité de ética del Servicio de Salud Metropolitano Oriente, obteniéndose la aprobación día 4 de julio de 2017 (Anexo 3) y en el Comité-ético científico del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, obteniéndose la aprobación el día 18 de julio de 2018 (Anexo 4).

Este estudio buscó mejorar o aportar a la optimización de las terapias farmacológicas utilizadas actualmente en los pacientes con cáncer, específicamente en aquellos que sufran infecciones, que es una condición que pone en riesgo la vida. Es por esto que el presente proyecto se cuadra con el principio ético de la beneficencia. Esperando, a futuro, ser un aporte positivo en el desenlace clínico de los pacientes. En el mismo sentido, en este estudio no se busca provocar ningún perjuicio ni físico ni social, al extraer la muestra de sangre y estudiar la información genética, ya que toda la información derivada de este estudio solo será compartida entre los miembros del equipo de investigación y siempre bajo códigos, como exige la Ley 20.584 o Ley de Derechos y deberes de los pacientes, por lo que no sugiere una transgresión al principio de no maleficencia.

El principio de autonomía de los pacientes se cumplió a través de la comprensión y firma de un formulario de consentimiento informado, en el cual se explicó el estudio al que el paciente fue invitado, incluyendo los posibles riesgos y beneficios de su participación, principalmente su aporte al desarrollo científico de nuestro país, el rechazo a participar no implicó un cambio conductual por parte del equipo de salud o diferencias en la calidad de la atención. Siguiendo el principio de justicia, todos los pacientes recibieron la

atención que su condición de salud ameritaba, independiente de otros factores discriminantes, incluyendo la no participación del presente trabajo.

Este proyecto contempló el cumplimiento de la Ley 20.120, sobre la investigación científica en seres humanos, su genoma y prohíbe la clonación humana. Toda información obtenida de la genotipificación fue utilizada solo con los fines mencionados en este proyecto y fue compartida solamente entre el grupo de investigación, basándose en un sistema de códigos. Las publicaciones derivadas del estudio no individualizaron a los participantes, ni su información fue facilitada a ningún tipo de entidad o asociación que pudiera generar un beneficio o perjuicio a raíz de esta, dando cumplimiento a la Ley 19.628, sobre protección de datos de carácter personal.

7. Resultados

7.1 Caracterización de la muestra

Entre octubre de 2017 y febrero 2019 fueron incluidos todos los pacientes que cumplieron con los criterios de selección (inclusión y exclusión), estableciendo un total de 50 pacientes, cuyas características generales se observan a continuación en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Caracterización general de la muestra (n = 50)

Característica	n (%)
Edad (media \pm DE)	47,8 \pm 16,1
18 a 40 años	17 (34)
41 a 60 años	20 (40)
> 61 años	13 (26)
Mujeres	27 (56)
Diagnóstico	
Leucemia Linfoblástica Aguda	13 (26)
Leucemia Mieloblástica Aguda	12 (24)
Otras Leucemias	5 (10)
Linfoma	18 (36)
Mieloma	2 (4)

DE: desviación estándar

Posterior a la extracción de ADN y control de calidad de las muestras se realizó la genotipificación de los 13 SNPs para las 50 muestras de ADN de los pacientes. Las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas se resumen a continuación en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Resumen de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos estudiados (n= 50*).

Polimorfismo	n	Frecuencias alélicas		Frecuencias genotípicas n (%)		
		A	T	A/A	A/T	T/T
<i>CARD8</i> <i>rs2043211</i>	49	0,64	0,36	19 (39)	25 (51)	5 (10)
<i>TLR2</i> <i>rs4696480</i>	48	0,63	0,38	20 (42)	20 (42)	8 (17)
<i>IL-6</i> <i>rs1800796</i>	50	0,50	0,50	11 (22)	28 (56)	11 (22)
<i>IL-1β</i> <i>rs1143627</i>	49	0,54	0,46	16 (33)	21 (43)	12 (24)
<i>SLC22A11 (OAT4)</i> <i>rs11231809</i>	46	0,38	0,62	11 (24)	13 (28)	22 (48)
<i>ABCB1</i> <i>rs2032582</i>	40	0,68	0,32	21 (53)	12 (30)	7 (18)
<i>ABCB1</i> <i>rs1045642</i>	50	0,33	0,67	3 (6)	27 (54)	20 (40)
<i>ABCB1</i> <i>rs1128503</i>	50	0,38	0,62	7 (14)	24 (48)	19 (38)
<i>CYP3A4</i> <i>rs2740574</i>	42	0,83	0,17	31 (74)	8 (19)	3 (7)
<i>CYP3A4</i> <i>rs2242480</i>	49	0,71	0,29	29 (59)	12 (24)	8 (16)
<i>CYP3A5</i> <i>rs15524</i>	50	0,84	0,16	37 (74)	10 (20)	3 (6)
<i>ABCC2</i> <i>rs12762549</i>	45	0,62	0,38	19 (42)	18 (40)	8 (18)
<i>ABCG2</i> <i>rs2231142</i>	46	0,90	0,10	37 (80)	9 (20)	(0)

*Algunas muestras no pudieron ser genotipificadas para todos los polimorfismos

- **Objetivo 1:** Determinar asociaciones de riesgo entre variantes genéticas de las enzimas de biotransformación CYP3A4, CYP3A5 y los transportadores ABCB1, ABCC2, ABCG2, OAT4 y OAT2 con el inicio y duración de la neutropenia en pacientes hemato-oncológicos en tratamiento antineoplásico.

7.2 Asociación entre polimorfismos genéticos y el Recuento Absoluto de neutrófilos

(RAN)

En la **Tabla 4** se muestra la comparación entre genotipos de las distintas variantes asociadas a la farmacocinética de antineoplásicos respecto de la media y mediana de RAN. En la columna de “*p - value*” se muestra el resultado de la comparación de los tres genotipos, un valor menor a 0,05 indica que al menos uno de los genotipos es distinto a los otros. Es importante destacar que la variable RAN no tiene una distribución paramétrica, por lo que es más correcta la comparación de las medianas del valor con respecto a las medias, además se utilizaron pruebas no paramétricas (U de *Mann-Whitney* o *Kruskal-Wallis*) para testear si la diferencia entre genotipos era estadísticamente significativa.

Tabla 4. Comparación de la media y mediana del Recuento Absoluto de Neutrófilos según el genotipo de cada variante polimórfica.

Polimorfismo	Genotipo	Media	DE	Mediana	RIC	p - value
<i>ABCB1</i> <i>rs1045642</i>	AA	768,9	1368,2	0	0 - 1088	0,0001^a
	AG	1647,3	3971,4	303	0 - 1656	
	GG	1857,5	3707,7	412	0 - 2264	
<i>ABCB1</i> <i>rs1128503</i>	AA	917,3	1646,9	111	0 - 1146	0,0005^a
	AG	2321,6	5048,2	462	0 - 2871	
	GG	1558,1	2964,7	324,5	0 - 1874	
<i>CYP3A4</i> <i>rs2242480</i>	CC	1576,1	3339,9	187	0 - 1819	0,0001^a
	CT	1980,3	5047,6	165	0 - 1910	
	TT	1913,8	3195,1	597	0 - 2814	
<i>CYP3A5</i> <i>rs15524</i>	AA	1555,0	3276,4	190	0 - 1751	0,0001^a
	AG	2692,4	6402,9	510	0 - 2635,5	
	GG	1702,0	2112,5	741,5	0 - 2771	
<i>SLC22A11</i> (<i>OAT4</i>) <i>rs11231809</i>	AA	2531,8	4956,2	1004,5	0 - 3626	0,0001^a
	AT	1494,8	2928,9	284,5	0 - 1477	
	TT	1081,0	2138,2	104	0 - 1200	
<i>ABCC2</i> <i>rs12762549</i>	CC	1068,2	2299,2	137	0 - 1076	0,0001^a
	GC	1803,5	2993,4	440	0 - 2592	
	GG	2840,3	6257,5	860,5	0 - 3577	

DE: Desviación estándar. RIC: Rango Inter cuartílico (Percentil 25 – Percentil 75). ^a: Diferencia testada mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

En la **Tabla 5** se resumen las relaciones entre los genotipos con respecto a un genotipo definido como referencia, lo que permitirá dilucidar el modelo de herencia de cada variante genética. La comparación se realizó mediante regresiones lineales no paramétricas (de Kernel), la regresión multivariada fue ajustada por el diagnóstico y la edad de los pacientes.

Tabla 5. Comparación del valor del Recuento Absoluto de Neutrófilos entre genotipos, modelos univariado y multivariado.

Polimorfismo	Genotipo	Univariado			Multivariado*		
		Estimado	DE	p value	Estimado	DE	p value
<i>ABCB1</i> <i>rs1045642</i>	AA	Referencia	--	--	Referencia	--	--
	AG	23,8	46,1	0,605	9,2	31,1	0,768
	GG	113,1	41,0	0,006	68,1	23,8	0,014
<i>ABCB1</i> <i>rs1128503</i>	AA	Referencia	--	--	Referencia	--	--
	AG	387,0	65,5	0,001	672,9	41,2	0,001
	GG	106,2	41,7	0,011	791,8	23,2	0,001
<i>CYP3A4</i> <i>rs2242480</i>	CC	Referencia	--	--	Referencia	--	--
	CT	136,6	82,7	0,099	224,9	125,1	0,072
	TT	113,1	54,8	0,039	362,1	198,4	0,068
<i>CYP3A5</i> <i>rs15524</i>	AA	Referencia	--	--	Referencia	--	--
	AG	252,4	89,7	0,005	206,5	153,2	0,178
	GG	86,4	48,5	0,075	-49,0	169,7	0,773
<i>SLC22A11</i> (<i>OAT4</i>) <i>rs11231809</i>	AA	465,5	90,2	0,001	1429,0	323,1	0,001
	AT	170,0	50,7	0,001	602,4	136,1	0,001
	TT	Referencia	--	--	Referencia	--	--
<i>ABCC2</i> <i>rs12762549</i>	CC	Referencia	--	--	Referencia	--	--
	GC	289,8	55,5	0,001	722,8	157,9	0,001
	GG	423,8	94,4	0,001	1713,2	380,4	0,001
<i>ABCB1</i> <i>rs2032582</i>	CC	115,5	49,1	0,019	60,9	31,0	0,049
	CA	-25,5	44,1	0,563	-13,8	29,7	0,642
	AA	Referencia	--	--	Referencia	--	--

DE: Desviación estándar. *Modelo ajustado por diagnóstico, edad, sexo y ciclo de quimioterapia. En negrita $p < 0,05$.

7.2.1 Polimorfismos en *ABCB1* y su relación con el RAN

En el caso del polimorfismo *ABCB1* rs1045642, no hay diferencia significativa entre el genotipo heterocigoto y el homocigoto AA (**Tabla 4**), y dado esto es que la presencia del alelo G en forma homocigota solamente se asocia a un mayor RAN con respecto a los otros genotipos. Para el polimorfismo *ABCB1* rs1128503, tanto el genotipo AG como el GG, presentan diferencia con respecto al homocigoto AA, además el genotipo

heterocigoto pareciera ser el que está asociado a un mayor RAN, lo que podría asociarse a un modelo de herencia sobredominante.

El genotipo AA para el polimorfismo *ABCB1* rs1045642 está asociado a mayor toxicidad de ciertos medicamentos utilizados en neoplasias hematológicas por aumento de las concentraciones plasmáticas de los mismos, tanto en pacientes adultos como pediátricos (65, 66). También fue asociado con un mayor riesgo de anemia y trombocitopenia, es decir toxicidad hematológica, en niños diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda tratados con doxorubicina, metotrexato, prednisolona y vincristina (67). En pacientes tratados con vincristina, el alelo A se asoció a mayor probabilidad de tener una falla en la inducción o recaída luego de alcanzar la remisión completa (68). Similar a lo observado en pacientes con cáncer colorrectal tratados con oxaliplatino, donde el genotipo AA se asoció con un menor tiempo a la recurrencia comparado con el genotipo AG (69).

En el caso del polimorfismo *ABCB1* rs1128503, los genotipos AA + AG están asociados a una mayor sobrevida en pacientes tratados con citarabina para una leucemia mieloide aguda (70, 71). En pacientes tratados con compuestos de platino el genotipo AA se asoció a un mayor riesgo de toxicidad (72), pero también a una mayor sobrevida (69). En pacientes con leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib, el genotipo AA muestra una peor respuesta, entendida como recaída citogenética (73).

7.2.2 Polimorfismos en enzimas CYP450 y su relación con el RAN

En el polimorfismo *CYP3A4* rs2242480 entre el genotipo CC y CT no hay diferencia estadísticamente significativa en el RAN mediano a lo largo de los ciclos, por lo que se puede asumir que forman parte del mismo fenotipo, por otro lado, el genotipo TT se asoció a un mayor RAN. El alelo T se asoció con un mayor metabolismo de tacrolimus (46) y un mayor *clearance* (74, 75) del mismo medicamento en pacientes con trasplante renal. Un mayor metabolismo de los medicamentos implicaría menores niveles plasmáticos de los mismos, lo que a su vez en estos pacientes se podrían asociar a menores niveles de RAN al ser un efecto dosis – dependiente.

Los pacientes con el genotipo TT demoran en promedio $6,1 \pm 5,0$ días en llegar a un RAN = 0 en comparación a los $9,4 \pm 4,0$ días que demoran aquellos con genotipo CT o CC. Además, los pacientes homocigotos TT estuvieron en neutropenia severa (RAN < 500) por mayor tiempo ($16,0 \pm 11,0$ días) con respecto a los pacientes heterocigotos u homocigotos CC ($10,1 \pm 8,1$). Resultado concordante con el tiempo en el período de neutropenia leve (RAN 1000) en que los pacientes con genotipo TT estuvieron en promedio una semana más con respecto aquellos portadores de los genotipos CT o CC ($18,9 \pm 10,6$ vs $11,8 \pm 8,3$, $p = 0,0175$).

Para el polimorfismo *CYP3A5* rs15524 los genotipos AG y GG no muestran diferencia estadísticamente significativa entre ellos y el genotipo AA se asoció a un menor RAN en comparación a los otros dos genotipos. El mismo genotipo se asoció a un menor *clearance* (76) y mayores concentraciones (77, 78) de tacrolimus, esto concuerda con que aquellos

pacientes portadores del genotipo AA tengan valores menores de RAN, en que al haber mayores niveles plasmáticos será más probable la toxicidad.

Además de presentar diferencia en los niveles medios del RAN, también existe diferencia en el tiempo en que los pacientes portadores del genotipo AA experimentan la neutropenia profunda (RAN = 0) con respecto a los genotipos AG y GG que a pesar de tener un mayor conteo de RAN promedio, alcanzan en menos tiempo la neutropenia profunda (**Figura 4**).

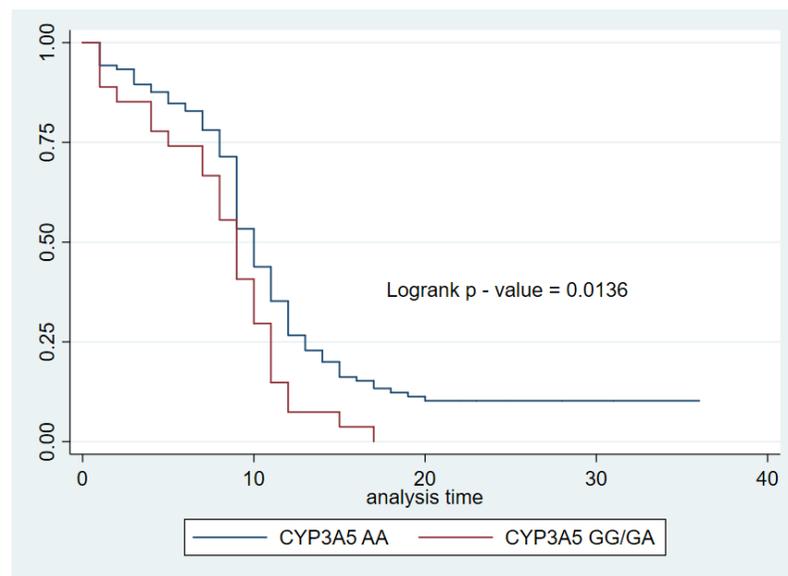


Figura 4. Curva de *Kaplan – Meier* para el análisis de tiempo hasta presentar neutropenia profunda por genotipo del polimorfismo *CYP3A5* rs15524.

Por otro lado, la regresión multivariada de Cox confirma que los genotipos GG y GA son un factor de riesgo para presentar más tempranamente un RAN = 0, con respecto al genotipo AA (promedio de días en llegar a neutropenia profunda $9,4 \pm 4,1$ vs $8,2 \pm 4,1$, respectivamente) aun ajustando por edad, sexo, el ciclo de quimioterapia y el diagnóstico, los resultados se resumen en la **Tabla 6**. Otros factores asociados a un inicio más temprano

de la neutropenia profunda son la leucemia linfoblástica aguda con respecto a la mieloblástica aguda y cuando los pacientes son sometidos a esquemas de inducción con respecto a esquemas de consolidación.

Tabla 6. Resumen de la regresión multivariada de Cox para la relación entre el polimorfismo *CYP3A5* rs15524 y la neutropenia profunda.

Variable	Hazard Ratio	Intervalo de confianza 95%		p - value
<i>CYP3A5</i> GG/GA	1,83	1,12	2,98	0,016
Ciclo	0,99	0,81	1,20	0,916
Sexo	0,88	0,57	1,36	0,578
Edad	1,00	0,99	1,02	0,638
Diagnóstico				
Leucemia Linfoblástica Aguda	Referencia			
Leucemia Mieloide Aguda	0,54	0,34	0,88	0,012
Otras Leucemias	1,36	0,52	3,57	0,528
Linfoma	0,62	0,31	1,28	0,196
Tipo de esquema				
Inducción	3,00	1,69	5,31	0,001

En negrita $p < 0,05$

7.2.3 Polimorfismos en otros transportadores y su relación con el RAN

El genotipo AA para el polimorfismo *SLC22A11* rs11231809 presentó una mediana de RAN significativamente mayor con respecto a los genotipos AT y TT, que no presentaron diferencia significativa entre ellos. Estos últimos genotipos nombrados han sido relacionados con una menor respuesta a metotrexato. El genotipo AA se ha relacionado con un menor *clearance* de algunas drogas (50, 51) y una mayor respuesta a metotrexato. Estos resultados parecen contradictorios con nuestros hallazgos, sin embargo, el transportador OAT4, también participa en procesos de reabsorción y es esta función la

que estaría disminuida en los pacientes con genotipo AA, provocando menores niveles de toxicidad (79). El efecto de este polimorfismo en este tipo de pacientes no ha sido estudiado previamente.

En cuanto a la duración de la neutropenia profunda en la **Figura 5** se observa que el genotipo TT, que se relacionó a un menor RAN, permanece más tiempo ($11,1 \pm 9,4$ días en promedio), con respecto a los otros dos genotipos ($6,1 \pm 5,0$ días para AA y $6,9 \pm 6,5$ días para AT, $p = 0,0055$). Relación que se mantiene para la duración del período de RAN menor a 500, en que para los pacientes homocigotos TT es de $15,0 \pm 10$ días en promedio, en comparación con los $9,7 \pm 6,8$ del heterocigoto y los $7,0 \pm 5,6$ días del homocigoto AA ($p = 0,0002$). La duración de la neutropenia leve (RAN menor a 1000) también muestra diferencias significativas entre los genotipos ($p = 0,0014$).

En el caso del polimorfismo *ABCC2* rs12762549, todos los genotipos presentan diferencia estadísticamente significativa, lo que sugiere un modo de herencia codominante, es decir, cada genotipo se asocia a un fenotipo distinto, en que el heterocigoto tiene funcionalidad intermedia entre ambos homocigotos. La evidencia indica que el genotipo CC tiene un menor riesgo de leucopenia en comparación al genotipo GG en pacientes tratado con docetaxel (49), lo que parece contrario a los hallazgos, sin embargo, en la página *PharmGKB* advierten de la falta de calidad del estudio y de la posible confusión en el reporte de las hebras (80), además de que utilizan la metodología de PCR “convencional”, por lo que es posible que no se esté presentando la hebra cromosómica positiva, sino que la base complementara, si esto fuera así, los resultados reportados serían totalmente

coincidentes con los nuestros. No existen más estudios que asocien este polimorfismo a reacciones hematológicas u otras toxicidades.

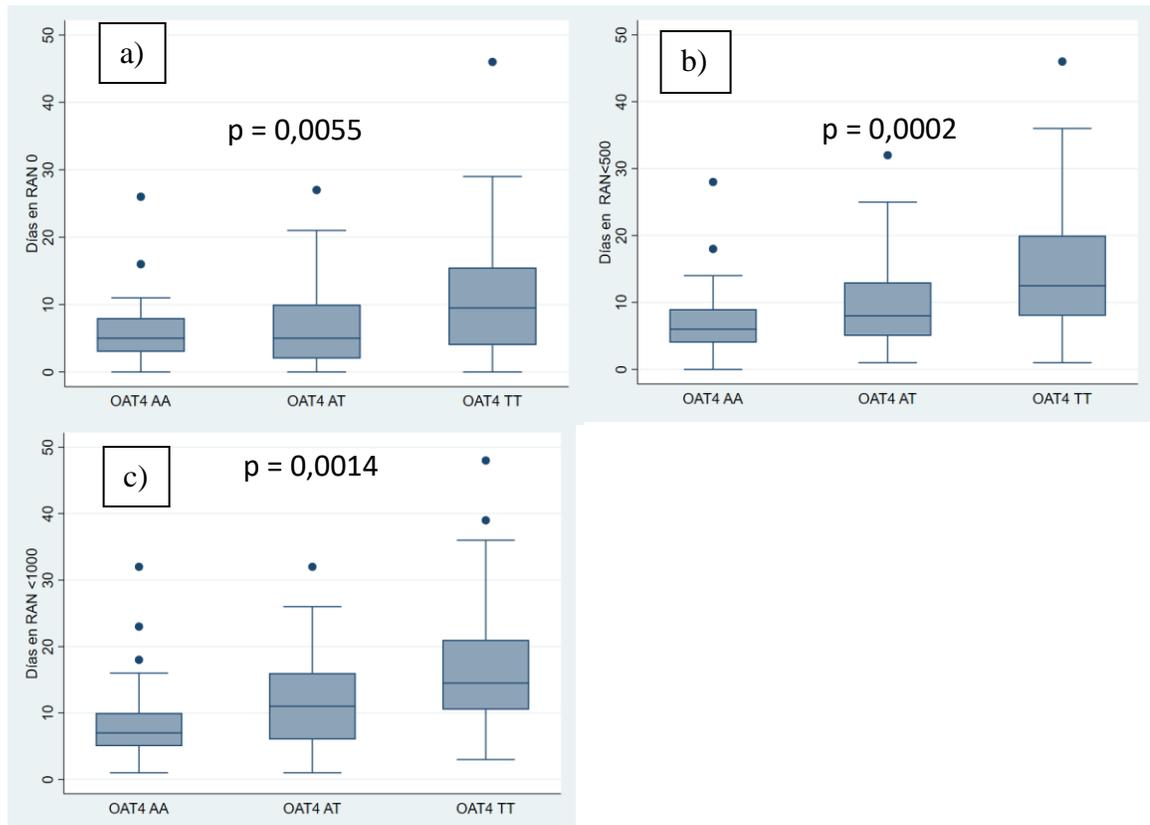


Figura 5. Relación entre los genotipos del polimorfismo *SLC22A11* (OAT4) rs11231809 y la duración en días de los períodos de neutropenia con recuento absoluto de neutrófilos igual 0 células/mm³ (a), menor a 500 (b) y menor a 1000 (c). Los valores corresponden a mediana y rango intercuartílico. Diferencias testeadas con la prueba de Kruskal – Wallis.

Otra diferencia encontrada entre los genotipos de *ABCC2* rs12762549 es la duración del período de neutropenia profunda. En la **Figura 6** se muestra la duración mediana según el genotipo. Los pacientes portadores del genotipo CC están en neutropenia un promedio de $10,4 \pm 8,5$ días, los pacientes heterocigotos para esta variante están en promedio $8,0 \pm 7,9$ días en RAN = 0 y los pacientes con genotipo homocigoto GG están en promedio $5,3 \pm$

2,7 días en neutropenia profunda ($p = 0,05$). Además, hay diferencia significativa entre los genotipos con respecto a la duración del período de neutropenia severa, en que existe una diferencia de 5 días en promedio entre el homocigoto CC y el heterocigoto, y una diferencia de 10 días con respecto al homocigoto GG ($15,1 \pm 8,7$ vs $10,2 \pm 8,4$ vs $5,7 \pm 3,4$, $p = 0,0001$). La diferencia en la duración del período de neutropenia leve también es significativa entre los distintos genotipos de esta variante en que en los pacientes con el genotipo GG es en promedio una semana ($7,3 \pm 3,4$ días), en los heterocigotos dura en promedio $12,0 \pm 8,9$ días y $17,3 \pm 8,4$ días en el homocigoto CC ($p = 0,0001$) (**Figura 6**).

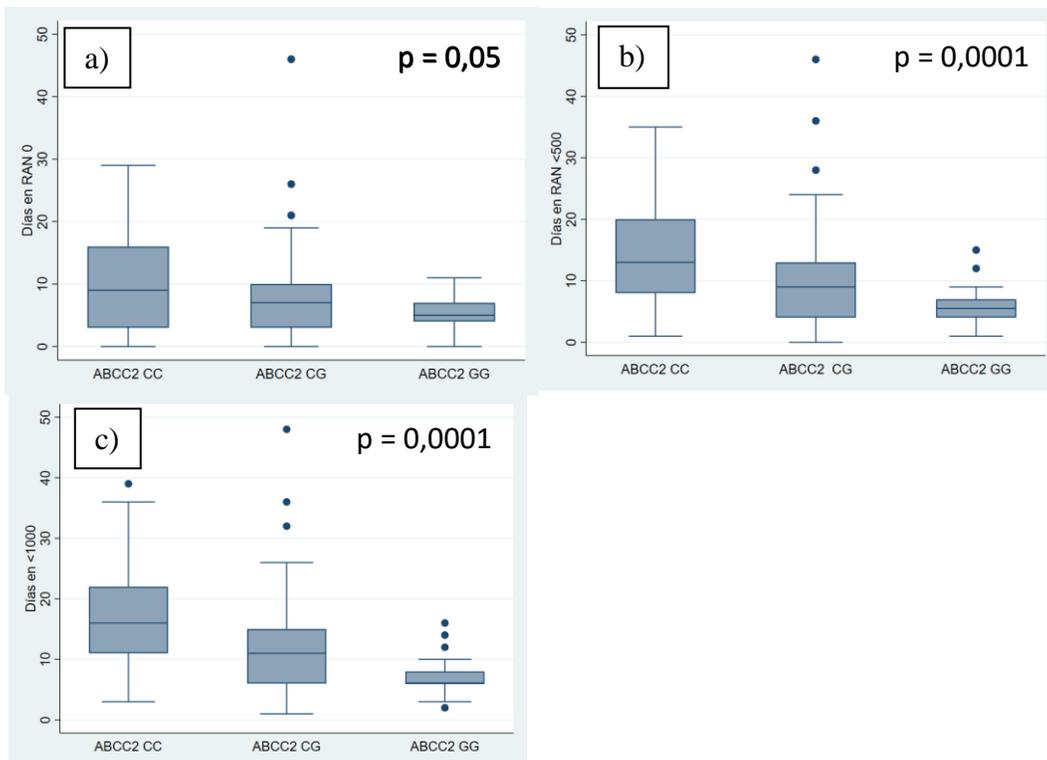


Figura 6. Relación entre los genotipos del polimorfismo *ABCC2* rs12762549 y la duración en días de los períodos de neutropenia con recuento absoluto de neutrófilos igual 0 células/mm³ (a), menor a 500 (b) y menor a 1000 (c). Los valores corresponden a mediana y rango intercuartílico. Diferencia testeada con la prueba de Kurskal – Wallis.

Objetivo 2: Determinar asociaciones de riesgo entre variantes genéticas de las proteínas CARD8, IL-6, IL-1 β y TLR2 con el inicio y duración de la neutropenia en pacientes hemato-oncológicos en tratamiento antineoplásico.

En la **Tabla 7** se muestra la comparación entre genotipos de las distintas variantes asociadas a la respuesta inflamatoria, respecto de la media y mediana de RAN. En la columna de “*p - value*” se muestra la comparación entre los genotipos probados, un valor de *p* menor a 0,05 indica que al menos uno de los genotipos es distinto a otro, no implica que todos ellos lo sean, por lo que solo orienta a un efecto del genotipo sobre la variable medida.

Tabla 7. Comparación del promedio de Recuento Absoluto de Neutrófilos según el genotipo de cada variante polimórfica

Polimorfismo	Genotipo	Media	DE	Mediana	RIC	p-value
<i>IL-1β</i> rs1143627	AA	1902,3	3579,3	489	0 - 2547	0,001^a
	AG	1746,4	4188,0	287,5	0 - 1824,5	
	GG	1149,0	2519,0	0	0 - 1310	
<i>TLR2</i> rs4696480	AA	2430,2	4999,0	864	0 -3136	0,001^a
	AT	1491,2	3449,6	375	0 - 1631,5	
	TT	1436,6	2983,2	272	0 - 1566	
<i>CARD8</i> rs2043211	AA	1407,5	2504,9	146,5	0 - 1980	0,06 ^a
	TA	1994,1	4138,8	403	0 – 2098	
	TT	1994,8	5555,7	424,5	0 - 2098	
<i>IL-6</i> rs1800796	GG	1283,4	2819,6	195,5	0 - 1199,5	0,286 ^a
	CC	1573,7	2428,7	475	0 – 2275,5	
	CG	1904,8	4434,0	378	0 – 2131	

DE: Desviación estándar. RIC: Rango Intercuartílico (Percentil 25 – Percentil 75). a: Diferencia testada mediante la prueba de Kruskal-Wallis. b: Diferencia testada mediante la prueba U de Mann-Whitney. En negrita $p < 0,05$

En la **Tabla 8** se resumen las relaciones entre los genotipos con respecto al RAN mediano lo largo de los ciclos, lo que permitirá dilucidar el modelo de herencia de cada variante genética. La comparación se realizó mediante regresiones lineales no paramétricas (de Kernel), la regresión multivariada fue ajustada por el diagnóstico y la edad de los pacientes.

Tabla 8. Comparación del valor del RAN entre genotipos, modelo univariado y multivariado.

Polimorfismo	Genotipo	Univariado			Ajustado		
		Estimado	DE	p value	Estimado	DE	p value
<i>CARD8</i> rs2043211	TT	Referencia	--	--	Referencia	--	--
	TA	230,4	72,1	0,001	840,5	213,6	0,001
	AA	175,8	81,9	0,032	1478,4	391,1	0,001
<i>TLR2</i> rs4696480	AA	Referencia	--	--	Referencia	--	--
	AT	-294,7	89,8	0,001	-564,9	202,6	0,005
	TT	-284,5	80,4	0	-859,4	326,3	0,008
<i>IL-6</i> rs1800796	CC	64,7	50,0	0,195	232,5	218,4	0,288
	CG	192,5	59,1	0,001	271,8	136,6	0,047
	GG	Referencia	--	--	Referencia	--	--
<i>IL-1β</i> rs1143627	AA	155,8	47,6	0,001	560,9	267,6	0,036
	AG	98,0	55,2	0,076	342,0	133,4	0,010
	GG	Referencia	--	--	Referencia	--	--

DE: Desviación estándar. *Modelo ajustado por diagnóstico, edad, sexo y ciclo de quimioterapia.
En negrita $p < 0,05$

7.2.4 Polimorfismo en Interleuquina 1 β y su relación con el RAN

En el caso del polimorfismo *IL-1 β* rs1143627 se observó diferencia significativa en la mediana de RAN, el genotipo GG se asocia a un menor RAN en comparación a los genotipos AG y AA (los cuales no presentaron diferencia significativa entre ellos (**Tabla 8**)). El genotipo AA de este polimorfismo se ha asociado a una mejor respuesta en

pacientes tratados con medicamentos inhibidores de TNF α para el tratamiento de psoriasis, comparado con los otros dos genotipos (81). El mismo genotipo fue asociado a un riesgo aumentado de úlcera gástrica en pacientes con patología cardiovascular tomando aspirina, donde una mayor secreción de IL-1 β en la mucosa gástrica se cree que puede inhibir la secreción de ácido gástrico (82).

Además de presentar diferencia en los niveles medios del RAN, también existe diferencia ($p = 0,05$) en el tiempo en que los pacientes portadores del genotipo GG experimentan la neutropenia profunda (RAN = 0) con respecto a los genotipos AG y AA que además son los genotipos que presentan un menor conteo de neutrófilos (**Figura 7**).

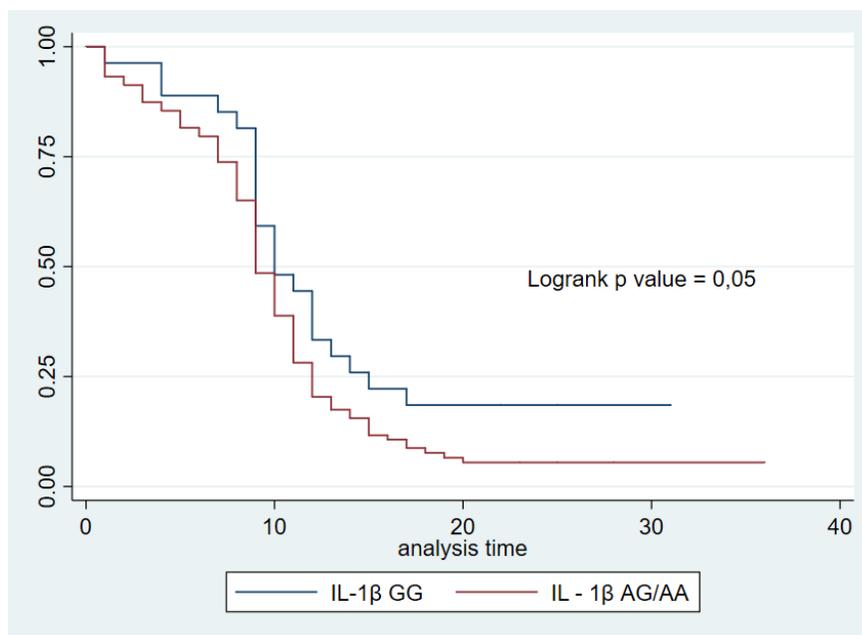


Figura 7. Curva de *Kaplan – Meier* para el análisis de tiempo hasta presentar neutropenia profunda por genotipo del polimorfismo *IL-1 β* rs1143627.

Por otro lado, la regresión multivariada de Cox confirma que los genotipos AA y GA tienen más del doble de riesgo de presentar más tempranamente un RAN = 0, con respecto al genotipo GG (HR: 2,6 IC95% 1,5 – 4,4; p = 0,001) aun ajustando por edad, sexo, el ciclo de quimioterapia y el diagnóstico, los resultados se resumen en la **Tabla 9**. Otros factores asociados a un inicio más temprano de la neutropenia profunda son la leucemia linfoblástica aguda con respecto a la mieloblástica aguda y cuando lo pacientes son sometidos a esquemas de inducción con respecto a esquemas de consolidación.

Tabla 9. Resumen de la regresión multivariada de Cox para la relación entre el polimorfismo *IL-1β* rs1143627 y la neutropenia profunda.

Variable	Hazard Ratio	Intervalo de confianza 95%		p - value
<i>IL-1β</i> GA/AA	2,56	1,49	4,38	0,001
Ciclo	1,04	0,84	1,28	0,731
Sexo	0,66	0,43	1,02	0,064
Edad	1,00	0,98	1,02	0,876
Diagnóstico				
Leucemia Linfoblástica Aguda	Referencia			
Leucemia Mieloide Aguda	0,53	0,33	0,85	0,008
Otras Leucemias	1,71	0,66	4,42	0,267
Linfoma	0,78	0,41	1,48	0,445
Tipo de esquema				
Inducción	4,37	2,32	8,23	0,001

En negrita p < 0,05

Por otro lado, los genotipos GA y AA se asociaron a un mayor riesgo de presentar neutropenia profunda, con respecto al genotipo GG (OR:17,3 IC95% 1,8 – 166,5; p = 0,013). Ajustando por ciclo, sexo, edad, diagnóstico y tipo de esquema.

7.2.5 Toll-Like receptor y su relación con el RAN

En el caso del polimorfismo *TLR2* rs4696480, el genotipo AA se asoció significativamente a un mayor RAN, en comparación a los genotipos AT y TT, los cuales no presentaron diferencia significativa entre ellos.

Además de presentar mayores niveles de neutrófilos, el genotipo AA se asoció a una menor duración del período de neutropenia profunda (**Figura 8**), con un promedio de 5,9 días comparado con los 8,8 días de duración promedio de los genotipos AT y TT ($p = 0,0338$).

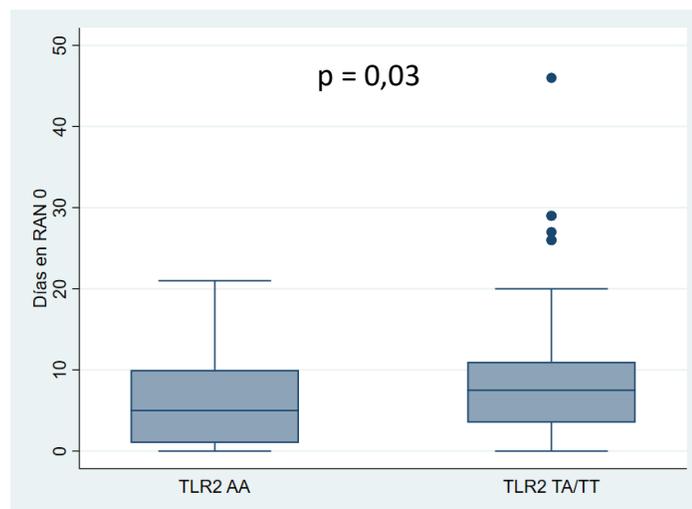


Figura 8. Relación entre los genotipos del polimorfismo *TLR2* rs4696480 y la duración en días del período de neutropenia con recuento absoluto de neutrófilos igual 0 células/mm³. Los valores corresponden a mediana y rango intercuartílico.

7.2.6 Polimorfismos en *CARD8* y su relación con el RAN

En el caso del polimorfismo *CARD8* rs2043211, encontramos una diferencia significativa en los valores de RAN entre el genotipo AA, que presenta menores recuentos en promedio

con respecto al genotipo TA y AA combinados ($p = 0,048$), sin embargo, al analizar los genotipos por separados no se ve una diferencia significativa. La transversión de timina por adenina en el codón 10 del gen provoca un cambio de cisteína por un codón de término (p.C10X), por lo que la proteína resultante es trunca y menos funcional que la original, afectando la eficiencia del proceso inflamatorio (83, 84) o que probablemente sufra el efecto llamado *Nonsense mediated decay* que se traduce como Degradación del ARN mensajero mediada por mutaciones terminadoras, lo que impide que se produzcan proteínas trucas poco funcionales.

Además, aquellos pacientes con genotipo AA, que fueron asociados a un menor RAN, alcanzaron antes la neutropenia en el primer ciclo de quimioterapia (5,7 días en promedio), respecto a los genotipos TT y TA (8,1 días en promedio) (**Figura 9**).

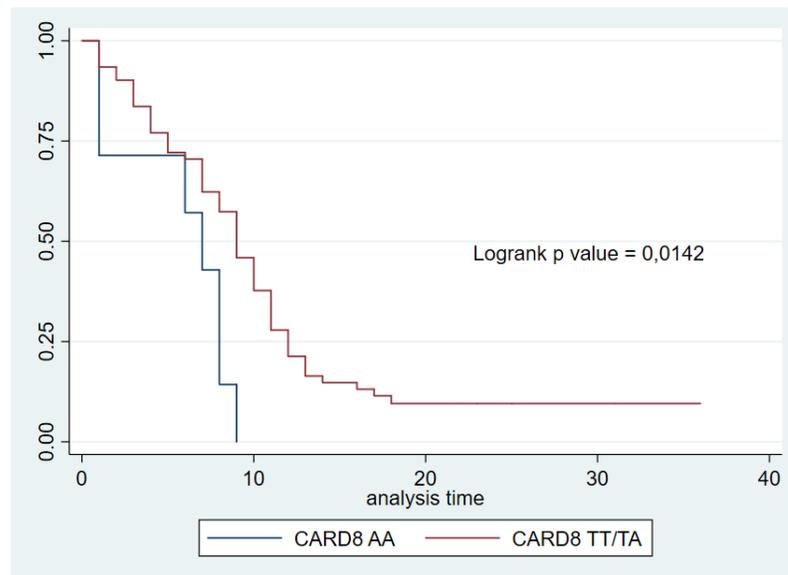


Figura 9. Curva de *Kaplan – Meier* para el análisis de tiempo hasta presentar neutropenia profunda en el primer ciclo de quimioterapia por genotipo del polimorfismo *CARD8* rs2043211.

Por otro lado, la regresión multivariada de Cox confirma que los genotipos TA y TT tienen menos de la mitad de riesgo de presentar más tempranamente un RAN = 0 en el primer ciclo de quimioterapia, con respecto al genotipo AA (HR: 0,3 IC95% 0,1 – 0,8; p = 0,021) aun ajustando por edad, sexo, tipo de esquema y el diagnóstico, los resultados se resumen en la **Tabla 10**. Otro factor asociado a un inicio más temprano de la neutropenia profunda es leucemia cuando lo pacientes son sometidos a esquemas de inducción con respecto a esquemas de consolidación. El diagnóstico no se asoció a un mayor riesgo de neutropenia en esta variante.

Tabla 10. Resumen de la regresión multivariada de Cox para la relación entre el polimorfismo *CARD8* rs2043211 y la neutropenia profunda.

Variable	Hazard Ratio	Intervalo de confianza 95%		p - value
<i>CARD8</i> TA/TT	0,32	0,12	0,84	0,021
Sexo	0,81	0,44	1,51	0,511
Edad	1,00	0,98	1,03	0,81
Diagnóstico				
Leucemia Linfoblástica Aguda	1,00	Referencia		
Leucemia Mieloide Aguda	0,74	0,37	1,46	0,384
Otras Leucemias	1,90	0,57	6,29	0,296
Linfoma	0,63	0,25	1,57	0,321
Tipo de esquema				
Inducción	2,62	1,41	4,88	0,002

En negrita $p < 0,05$

En cuanto a la duración de la neutropenia en la **Figura 10** se observa que el genotipo AA, que se relacionó a un menor RAN, permanece más tiempo ($12,5 \pm 8,8$ días en promedio), con respecto a los otros dos genotipos ($9,3 \pm 8,1$, $p = 0,0062$). Relación que se mantiene para la duración del período de RAN menor a 1000, en que para los pacientes homocigotos

AA es de $14,6 \pm 9,0$ días en promedio, en comparación con los $10,8 \pm 8,2$ de los genotipos AT y TT ($p = 0,0034$).

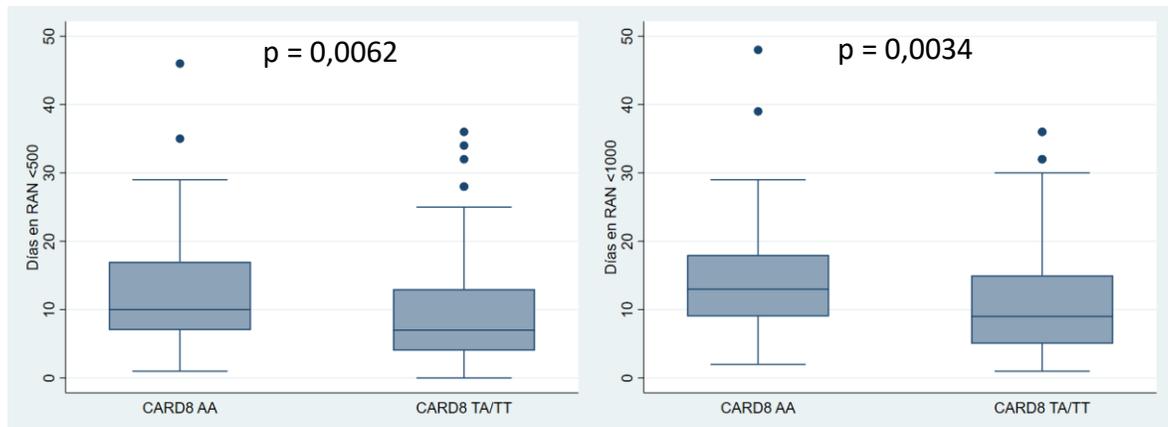


Figura 10. Relación entre los genotipos del polimorfismo *ABCC2* rs12762549 y la duración en días de los períodos de neutropenia con recuento absoluto de neutrófilos menor a 500 células/mm³ (a) y menor a 1000 (b). Los valores corresponden a mediana y rango intercuartílico. Diferencia testada con la prueba U de Mann – Whitney.

7.2.7 Polimorfismo en Interleuquina 6 y su relación con el RAN

El genotipo GG del polimorfismo *IL-6* rs1800796 presentó menores niveles de RAN en comparación a los genotipos CG y GG combinados ($p = 0,022$). Sin embargo, al analizar los genotipos por separado no se encuentra una diferencia significativa entre ellos. EL polimorfismo (-572C>G) es una variante ubicada en el promotor del gen lo que afecta la expresión de la proteína (85, 86) y ha sido asociado a un peor pronóstico de enfermedades reumatoideas y con el riesgo de enfermedades coronarias (87, 88). Además el alelo G se relaciona con una peor respuesta al PEG-Interferón α -2a en pacientes con hepatitis C crónica, en comparación al alelo C (89).

Además, aquellos pacientes con genotipo GG, que fueron asociados a un menor RAN, alcanzaron un día antes en promedio la neutropenia en el primer ciclo de quimioterapia, respecto a los genotipos TT y TA (**Figura 11**).

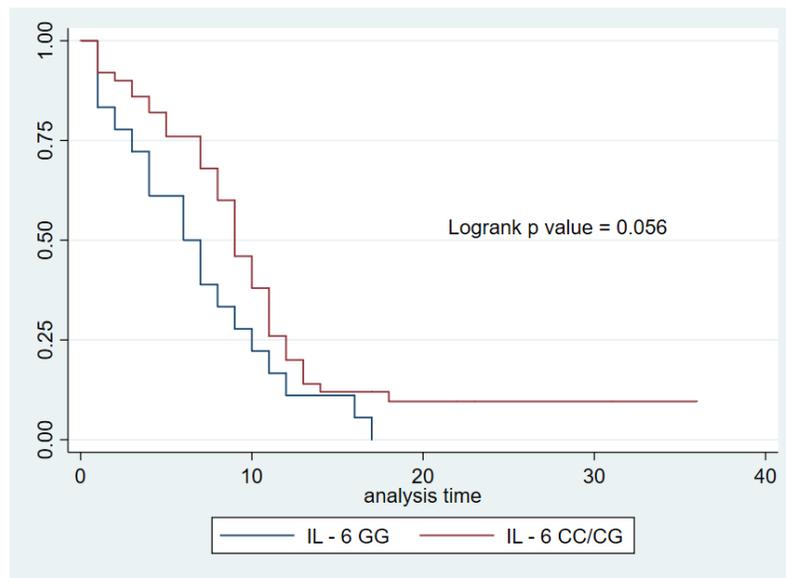


Figura 11. Curva de Kaplan – Meier para el análisis de tiempo hasta presentar neutropenia profunda en el primer ciclo de quimioterapia por genotipo del polimorfismo *IL-6* rs1800796.

Por otro lado, la regresión multivariada de Cox confirma que los genotipos CG y CC tienen la mitad de riesgo de presentar más tempranamente un RAN = 0 en el primer ciclo de quimioterapia, con respecto al genotipo AA (HR: 0,3 IC95% 0,1 – 0,8; $p = 0,021$), ajustando por edad, sexo y tipo de esquema y el diagnóstico, los resultados se resumen en la **Tabla 11**. Otro factor asociado a un inicio más temprano de la neutropenia profunda en el primer ciclo de quimioterapia fue recibir esquemas de inducción con respecto a esquemas de consolidación. El diagnóstico parece explicar alta variabilidad en la

respuesta, dado que al agregarlo al modelo la relación entre este genotipo y el inicio de la neutropenia profunda se pierde.

Tabla 11. Resumen de la regresión multivariada de Cox para la relación entre el polimorfismo *IL-6* rs1800796 y la neutropenia profunda.

Variable	Hazard Ratio	Intervalo de confianza 95%		p - value
<i>IL-6</i> CC/CG	0,53	0,30	0,92	0,025
Sexo	0,93	0,53	1,64	0,801
Edad	0,99	0,97	1,01	0,247
Tipo de esquema				
Inducción	2,71	1,49	4,95	0,001

En negrita p<0,05

Para dar un mejor cumplimiento al OE 2, se realizó un análisis multinivel, de esta forma se puede concluir de mejor forma cuales son las variantes que efectivamente están relacionadas con el RAN en pacientes recibiendo quimioterapia.

Para esto debemos considerar que no es posible predecir el valor o establecer una asociación con mayores o menores niveles de RAN directamente con una regresión lineal, dado que se estarían violando dos supuestos, en primer lugar, el supuesto de la independencia de los datos, esto se debe a que existe una correlación y dependencia entre los valores observados.

Hay dependencia debido a que un valor observado tiene relación con el observado en la medición anterior y condicionará el valor de la siguiente. Y la correlación se debe a que un paciente generará valores similares en cada ciclo, si recibe el mismo esquema de quimioterapia, así mismo dos pacientes distintos tendrán perfiles de RAN similares si es que reciben el mismo esquema, dado que recibirán los mismos medicamentos en los

mismos días, lo que provocará que el descenso de los neutrófilos se produzca en momentos similares. Para solucionar este problema es que se utilizan los modelos jerárquicos o multinivel.

El segundo supuesto que se violaría al utilizar una regresión lineal directamente es la normalidad de distribución, la que no se cumple al tener una alta frecuencia de valores bajos. Para esto se realizó una transformación logarítmica de los datos y además, se observó que el comportamiento de la variable sigue una curva polinómica cúbica, por lo que se agregaron valores elevados al cuadrado y al cubo.

En la **Tabla 12**, se muestra el diagrama multinivel y las variables medidas en cada nivel. Aquí se organiza la información jerárquicamente, es decir, el nivel superior contiene al inferior y sucesivamente.

Los resultados de la regresión multinivel se muestran en la **Figura 12**, ahí se observa que los genotipos CC y CG para el polimorfismo *IL-6* rs1800796 presentan mayores niveles de RAN respecto del genotipo GG, y que los genotipos TT y AT para el polimorfismo *CARD8* rs2043211 presentan mayores RAN en comparación al genotipo AA. Otros polimorfismos no presentaron asociación significativa.

Entre las variables no genéticas que se encontraron asociadas al RAN está el tiempo, el comportamiento cúbico de esta variable se explica en gran medida con el tiempo, dado que los primeros días comienza a descender, incluso llegando a 0, luego comienza nuevamente a subir superando incluso los niveles normales, para luego volver a descender levemente hasta alcanzar niveles entre los parámetros normales.

Tabla 12. Diagrama Multinivel que muestra las variables evaluadas en cada nivel, así como las posibilidades de miembros de cada uno.

Nivel	Indicador de nivel	Miembros en cada nivel	Variables medidas en cada miembro del nivel
Paciente	$i = 1, \dots, 32$	ID (1 - 32)	Diagnóstico _i , Genotipo <i>IL-6</i> _i , Genotipo <i>IL-1β</i> _i , Genotipo <i>CARD8</i> _i , Hospital _i
Esquema	$j = 1, \dots, 9$	<ul style="list-style-type: none"> • Hiper CVAD fase I, • Hiper CVAD fase II, • 15 – 30 inducción, • 15 – 30 consolidación, • 3 + 7 (inducción), • Citarabina (consolidación), • R BAC, • FLAG – Ida, • ARCHIMBAUD 	Sin variables medidas a este nivel
Ciclo	$k = 1, \dots, 6$	Ciclo (1 - 6)	Sin variables medidas a este nivel
Tiempo	$t = 0, \dots, 50$	Day (0 - 50)	RAN_{ijkt} , $G-CSF_{ijkt}$, $G-CSFxDía_{ijkt}$, $G-CSFxHospital_{ijkt}$

RAN: Recuento Absoluto de neutrófilos. G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor (Factor estimulador de colonias de granulocitos).

Hiper CVAD fase I: ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, dexametasona. Hyper CVAD fase II: metotrexato, citarabina. 15 – 30 inducción: dexametasona, vincristina, daunorrubicina, L-asparaginasa. 15 – 30 consolidación: 6- mercaptopurina, ciclofosfamida, citarabina, vincristina, L-asparaginasa. 3 + 7 (inducción): citarabina, daunorrubicina. R BAC: Rituximab, bendamustina, citarabina. FLAG – Ida: fludarabina, Ara-C (citarabina), G-CSF, idarrubicina. ARCHIMBAUD: mitoxantrona, citarabina, etopósido. G-CSFxDía: Interacción entre la administración de G-CSF y el tiempo. G-CSFxHospital: Interacción entre la administración de G-CSF y el hospital donde fue administrado.

Otras variables no genéticas que se asociaron con el RAN fueron la interacción entre tiempo y administración de G-CSF, lo que se explica porque el efecto de estos medicamentos no es inmediato, y alcanza su máximo efecto en los días posteriores a su administración, por lo que se ve un aumento en el RAN, luego de la administración del medicamento, y esta es progresiva.

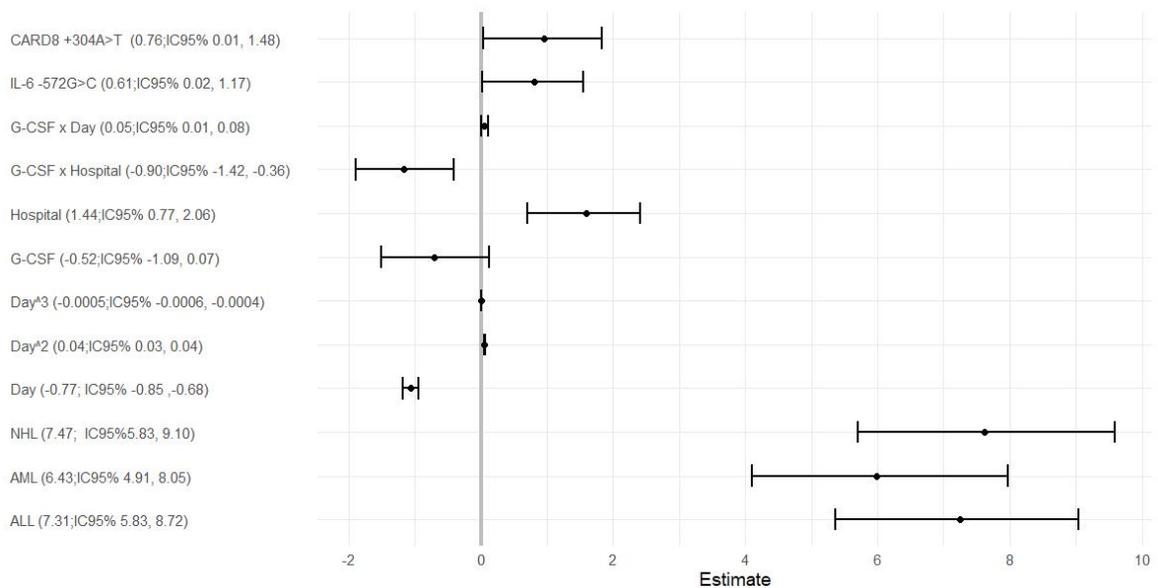


Figura 12. Factores genéticos y no genéticos asociados al Recuento Absoluto de Neutrófilos, demostrado a través de un modelo multinivel.

7.3 Asociación entre polimorfismos genéticos y la susceptibilidad a infecciones

En la totalidad de pacientes se analizaron 202 ciclos de quimioterapia, de las cuales en 82 se presentó una infección asociada, es decir en un 40,5% de ellos. Además, en un 65% (28) de los pacientes se produjo al menos una infección.

Objetivo 3: Determinar asociaciones de riesgo entre variantes genéticas de las enzimas de biotransformación CYP3A4, CYP3A5 y los transportadores ABCB1, ABCC2, ABCG2, OAT4 y OAT2, con la incidencia de infecciones en pacientes hemato-oncológicos en tratamiento antineoplásico.

De las variantes analizadas en este objetivo tres fueron asociadas significativamente a la presencia de infecciones, luego de los análisis controlados por variables confundentes.

7.3.1 Polimorfismos en enzimas de CYP450 y su relación con el riesgo de infecciones

En el polimorfismo *CYP3A4* rs2242480, el genotipo CC se asoció con el riesgo de presentar una infección comparado con los genotipos TT y CT (OR: 5,7 IC95% 1,6 – 21,2), en la **Tabla 13** se resumen otros factores asociados, por los cuales fueron controlados los análisis previos. Otra de las variables asociadas a la infección fue la cantidad de días que el paciente estuvo en neutropenia profunda ($RAN < 500 \text{ cels/mm}^3$), en que al ser un OR mayor a 1, representa un factor de riesgo. Esta variable es continua por lo que se puede interpretar que por cada día extra que el paciente está en una neutropenia severa, el riesgo de tener una infección aumenta en un 11%. Otros factores,

como el sexo, la edad y el ciclo, no resultaron estar asociados a una mayor incidencia de infecciones en este análisis.

Tabla 13. Regresión logística multivariada para la relación entre el polimorfismo *CYP3A4* rs2242480 con la presencia de infecciones durante la quimioterapia.

Variable	Odds Ratio	Intervalo de confianza 95%		p value
<i>CYP3A4</i> CC	5,74	1,56	21,18	0,009
Ciclo	0,61	0,35	1,06	0,078
Sexo	0,63	0,20	1,99	0,429
Edad				
18 - 40 años	1,71	0,11	25,71	0,697
41 - 60 años	1,19	0,08	16,84	0,898
> 60 años	1,0	Referencia		
Inducción	0,45	0,07	2,91	0,406
Diagnóstico				
Leucemia linfoblástica aguda	1,0	Referencia		
Leucemia mieloblástica aguda	2,45	0,78	7,63	0,124
Otras leucemias	3,74	0,20	69,37	0,375
Linfoma	1,40	0,25	7,91	0,704
Días en neutropenia severa	1,11	1,02	1,21	0,019

En negrita p<0,05

El genotipo CC para la variante rs2242480, fue asociado a un menor RAN con respecto a los genotipos TT y TC, lo que se condice con el riesgo aumentado de tener una infección, dado que el homocigoto CC, se ha asociado a una menor funcionalidad de la enzima *CYP3A4* en comparación a los otros genotipos, por lo que implica una mayor exposición a los medicamentos, aumentando la toxicidad (46).

7.3.2 Polimorfismos en transportadores y su relación con el riesgo de infecciones

Una de las variantes polimórficas asociadas a una mayor probabilidad de infecciones en genes que codifican para transportadores es *ABCC2* rs12762549, en la cual el genotipo

GG es un factor que aumenta casi seis veces la chance de tener una infección con respecto a los genotipos CG y GG (OR: 5,7, IC95% 1,1 - 29,4), en la **Tabla 14** se resumen otros factores asociados, por los cuales fueron controlados los análisis previos. Otra de las variables asociadas a la infección fue la cantidad de días que el paciente estuvo en neutropenia profunda (RAN < 500 céls/mm³), en que al ser un OR mayor a 1, representa un factor de riesgo. Otros factores, como el sexo, la edad y el ciclo, no resultaron estar asociados a una mayor incidencia de infecciones en este análisis.

Tabla 14. Regresión logística multivariada para la relación entre el polimorfismo *ABCC2* rs12762549 con la presencia de infecciones posterior a la quimioterapia.

Variable	Odds Ratio	Intervalo de confianza 95%		p value
<i>ABCC2</i> GG	5,69	1,10	29,39	0,038
Ciclo	0,62	0,37	1,05	0,074
Sexo	0,48	0,15	1,53	0,214
Edad				
18 - 40 años	0,71	0,06	8,93	0,792
41 - 60 años	0,96	0,07	14,15	0,979
> 60 años	1,0	Referencia		
Inducción	0,45	0,08	2,62	0,376
Diagnóstico				
Leucemia linfoblástica aguda	1,0	Referencia		
Leucemia mieloblástica aguda	2,63	0,85	8,14	0,093
Otras leucemias	2,22	0,15	32,26	0,561
Linfoma	0,31	0,07	1,47	0,14
Días en neutropenia severa	1,10	1,01	1,19	0,031

En negrita p<0,05

El genotipo GG para el polimorfismo rs12762549 fue asociado a un mayor RAN y a una menor duración de la neutropenia en todas las categorías evaluadas, lo que parece contradictorio con el riesgo de infección. Sin embargo, al ser un análisis multivariado y

controlado por la duración de la neutropenia, es posible que exista otro mecanismo asociado al riesgo de infección que no tenga una relación con el riesgo de neutropenia. Estudios previos han reportado que el alelo G se asocia a una menor funcionalidad de la proteína y con un mayor riesgo de leucopenia, hallazgos que se condicen con el riesgo de infección en pacientes en quimioterapia (49).

Otro de los transportadores en los que encontramos una asociación con la presencia de infecciones fue el transportador OAT4, en los que para el polimorfismo rs11231809 el genotipo AA se asoció a un mayor riesgo de tener una infección con respecto a los genotipos TT y AT (OR: 19,3 IC95% 3,2 – 115,4; p = 0,001). Al hacer el análisis por genotipo se encontró, concordantemente, que con respecto al genotipo AA, el genotipo TT es un factor protector para tener una infección (OR: 0,02 IC95% 0,02 – 0,27) al igual que el genotipo AT (OR: 0,08 IC95% 0,05 - 0,45). En la **Tabla 15**, se resumen otros factores asociados, por los cuales fueron controlados los análisis previos. Otras de las variables asociadas a la infección fue el diagnóstico de leucemia mieloide aguda, con respecto a leucemia linfoblástica aguda y los días en que el paciente estuvo en neutropenia severa. Otros factores, como el sexo, la edad y el ciclo, no resultaron estar asociados a una mayor incidencia de infecciones.

Tabla 15. Resumen regresión logística multivariada para la relación entre el polimorfismo *SLC22A11* (OAT4) rs11231809 con la presencia de infecciones posterior a la quimioterapia.

Variable	Odds Ratio	Intervalo de confianza 95%		p value
<i>OAT4</i> TT	0,02	0,002	0,21	0,001
<i>OAT4</i> AT	0,08	0,01	0,54	0,009
Ciclo	0,48	0,27	0,88	0,016
Sexo	0,52	0,14	2,00	0,344
Edad				
18 - 40 años	0,08	0,004	1,49	0,091
41 - 60 años	0,20	0,01	3,13	0,254
> 60 años	1,0	Referencia		
Inducción	0,75	0,10	5,74	0,781
Diagnóstico				
Leucemia linfoblástica aguda	1,0	Referencia		
Leucemia mieloblástica aguda	10,02	2,36	42,49	0,002
Otras leucemias	4,78	0,28	82,86	0,283
Linfoma	0,35	0,06	1,89	0,22
Días en neutropenia severa	1,09	1,00	1,19	0,04

En negrita $p < 0,05$

Al realizar el análisis de riesgo inverso se puede apreciar que el genotipo AA tiene 50 veces el riesgo de tener una infección con respecto al genotipo TT y 13 veces el riesgo comparado con el heterocigoto. El genotipo AA se asocia a un menor *clearance* de ciertos medicamentos (51), por lo que a través de ese mecanismo se podría explicar el mayor riesgo, dado que una menor funcionalidad de la proteína, implica mayor exposición a los medicamentos, lo que se traduce en un aumento de los efectos adversos dosis dependientes, a pesar de que en nuestro estudio el mismo genotipo fue asociado a una menor duración de la neutropenia.

Objetivo 4: Determinar asociaciones de riesgo entre variantes genéticas de las proteínas CARD8, IL-6, IL-1 β y TLR2 con la incidencia de infecciones en pacientes hematológicos en tratamiento antineoplásico.

7.3.3 Polimorfismos en TLR2 y su relación con el riesgo de infecciones

En el caso de las proteínas asociadas a respuesta inmune e inflamatoria, encontramos una relación en entre los genotipos del polimorfismo TLR2 rs4696480 y la presencia de infecciones, específicamente el genotipo TT se asoció a más de cuatro veces el riesgo de tener una infección con respecto a los genotipos AA y TA (OR: 4,2 IC95% 1,0 – 17,2). En la **Tabla 16** se resumen otros factores asociados, por los cuales fueron controlados los análisis previos. Otros factores, como el sexo, la edad y el ciclo, no resultaron estar asociados a una mayor incidencia de infecciones.

En nuestros análisis encontramos que el alelo TT se asoció a una mayor permanencia en neutropenia profunda y a un menor RAN, por lo que estos resultados son concordantes con lo esperado, el efecto biológico del polimorfismo aun es desconocido, pero el alelo A ha sido asociado a una mejor respuesta a inhibidores de TNF α para el tratamiento de la psoriasis y de la colitis ulcerosa (81, 90), para lograr esta mejor respuesta se necesita una mayor funcionalidad del receptor, por lo que se podría suponer que el alelo T, se asocia a una menor funcionalidad de TLR2 y a su vez con el menor nivel de RAN y el mayor riesgo de infecciones (91).

Tabla 16. Regresión logística multivariada para la relación entre el polimorfismo *TLR2* rs4696480 con la presencia de infecciones posterior a la quimioterapia.

Variable	Odds Ratio	Intervalo de confianza 95%		p value
<i>TLR2</i> TT	4,23	1,04	17,15	0,044
Ciclo	0,70	0,42	1,18	0,183
Sexo	0,60	0,20	1,84	0,371
Edad				
18 - 40 años	0,30	0,03	3,40	0,33
41 - 60 años	0,37	0,03	4,24	0,424
> 60 años	1,0	Referencia		
Inducción	0,52	0,08	3,44	0,498
Diagnóstico				
Leucemia linfoblástica aguda	1,0	Referencia		
Leucemia mieloblástica aguda	2,83	0,89	9,00	0,077
Otras leucemias	1,98	0,11	37,14	0,649
Linfoma	0,71	0,16	3,21	0,661
Días en neutropenia severa	1,08	1,00	1,17	0,065

En negrita p<0,05

7.3.4 Polimorfismos en IL-6 y su relación con el riesgo de infecciones

En el caso del polimorfismo *IL-6* rs1800796 los genotipos CC/CG se asoció a cinco veces el riesgo de tener una infección con respecto al genotipo GG (OR: 5,2 IC95% 1,1 – 25,2).

En la **Tabla 17** se resumen otros factores asociados, por los cuales fueron controlados los análisis previos. Otra de las variables asociadas a la infección fue la cantidad de días que el paciente estuvo en neutropenia profunda (RAN < 500 céls/mm³), en que al ser un OR mayor a 1, representa un factor de riesgo. Otros factores, como el sexo, la edad y el ciclo, no resultaron estar asociados a una mayor incidencia de infecciones en este análisis.

Tabla 17. Resumen regresión logística multivariada para la relación entre el polimorfismo *IL-6* rs1800796 con la presencia de infecciones posterior a la quimioterapia.

Variable	Odds Ratio	Intervalo de confianza 95%		p value
<i>IL-6</i> CC/CG	5,23	1,09	25,20	0,039
Ciclo	0,61	0,35	1,05	0,075
Sexo	0,51	0,16	1,63	0,252
Edad				
18 - 40 años	0,33	0,03	3,82	0,374
41 - 60 años	0,27	0,02	3,24	0,305
> 60 años	1,0	Referencia		
Inducción	0,42	0,07	2,40	0,331
Diagnóstico				
Leucemia linfoblástica aguda	1,0	Referencia		
Leucemia mieloblástica aguda	2,14	0,69	6,66	0,19
Otras leucemias	4,23	0,21	85,88	0,348
Linfoma	0,42	0,09	1,87	0,254
Días en neutropenia severa	1,12	1,02	1,22	0,012

En nuestro estudio el genotipo GG se asoció a un menor RAN y a un inicio más temprano de la neutropenia profunda, estos hallazgos parecen contrarios a los recién expresados, lo

que indica que hacen falta análisis más controlados para establecer la verdadera relación. La literatura indica que el genotipo GG se asocia a menores niveles de IL-6 circulante (92), lo que se relaciona a un proceso inflamatorio menos eficiente y por lo tanto a una menor sobrevida de los neutrófilos (93).

Objetivo 5: Determinar el valor predictivo de las variantes genéticas asociadas a las proteínas antes mencionadas (OE 1-4) utilizando modelos de regresión como aproximación preliminar de respuesta la clínica en pacientes hemato-oncológicos en tratamiento antineoplásico.

7.4 Construcción del modelo predictivo para infecciones

Para construir el modelo predictivo se utilizaron todas las variables genéticas que fueron previamente asociadas de manera estadísticamente significativa a la incidencia de infecciones, además se agregaron las variables clínicas, demográficas y terapéuticas por las cuales fueron ajustados los modelos previos. Además, se agregaron las variables que fueron asociadas significativamente a la neutropenia (ya sea al inicio como a la duración), siempre y cuando al agregarlas al modelo mejorara el ajuste, es decir aumentara el valor del pseudo R^2 .

En la **Tabla 18** se resumen las variables incluidas en el modelo predictivo, el OR representa el coeficiente que será utilizado para la construcción de la ecuación que permita predecir el outcome. A pesar de que no todas las variables se puedan asociar

significativamente en el modelo, el conjunto de ellas permite un análisis más controlado y un mejor ajuste.

Tabla 18. Resumen de modelo multi - génico para la predicción de infecciones durante la quimioterapia.

Variable	Odds Ratio	Intervalo de confianza		p value
		95%		
TLR2 TT	32,04	2,34	437,98	0,009
IL-6 CC/GC	9,33E-07	3,16E-12	0,28	0,031
OAT4 AT	4,44E-03	1,09E-04	0,18	0,004
OAT4 TT	2,70E-05	2,89E-08	0,03	0,003
ABCC2 GG	16,37	0,81	332,70	0,069
CYP3A4 CC	6,93E+04	2,73	1,76E+09	0,031
Ciclo	0,32	0,13	0,79	0,014
Sexo masculino	0,09	0,01	0,87	0,037
Edad				
18 - 40 años	31,29	0,01	1,31E+05	0,418
41 - 60 años	1,24E+04	0,50	3,08E+08	0,068
> 60 años	1,0	Referencia		
Inducción	0,83	0,02	39,38	0,926
Diagnóstico				
Leucemia linfoblástica aguda	1,0	Referencia		
Leucemia mieloblástica aguda	96,92	3,42	2742,60	0,007
Otras leucemias	3,67	0,03	443,64	0,595
Linfoma	1,51E+04	0,83	2,74E+08	0,054
Días en neutropenia profunda	1,61	1,22	2,12	0,001

En negrita p<0,05

El modelo anterior entrega un valor de Pseudo R² de 0,5327, lo que se puede interpretar como que el modelo explica un 53% de la variabilidad de la variable dependiente.

Una de las variables no genéticas que están asociadas a la incidencia de infecciones es el ciclo de quimioterapia, que aparece como un factor protector. Esta variable fue incorporada como continua al modelo y se interpreta como que con cada ciclo de quimioterapia que pasa el riesgo disminuye (dado que es un valor menor a 1), esto se

explica dado que, si el paciente presentó una infección en alguno de los ciclos previos, la profilaxis antimicrobiana se optimiza, lo que reduce el riesgo de infecciones. Sumado a que los esquemas iniciales suelen ser más agresivos, por ejemplo las inducciones y además a patología neoplásica de base se encuentra más descompensada, lo que también podría aumentar el riesgo de infección.

7.4.1 Calibración del modelo predictivo para infecciones

La calibración es el grado de similitud entre la probabilidad entregada por el modelo predictivo generado en el paso anterior y la observada. se realizó mediante la prueba de bondad de ajuste de *Hosmer – Lemeshow*. Esta prueba estadística se basa en la comparación de las frecuencias esperadas que entrega el modelo con respecto a las observadas en el set de datos, la diferencia se comprueba mediante el test de Chi^2 .

La interpretación de la prueba de *Hosmer – Lemeshow* es similar a la de Chi^2 , dado que entrega un valor de p, mientras más bajo el valor, quiere decir que la frecuencia predicha por el modelo y la frecuencia real de los datos es distinta. Mientras más alto el valor de p (con un límite de 1,0) más similar es la frecuencia predicha con la real.

En el caso del modelo anterior el valor de p entregado por la prueba de Hosmer – Lemeshow es de 0,923; por lo que la frecuencia de evento predicha por el modelo es suficientemente similar a la real, para que la diferencia no sea estadísticamente significativa.

7.4.2 *Discriminación del modelo predictivo para infecciones*

La discriminación es el grado en el modelo propuesto puede distinguir entre los pacientes a los que les ocurre el evento de los que no, es decir, la capacidad de indicar que un paciente experimentará una infección cuando efectivamente ocurrirá y, por otro lado, la capacidad de indicar cuando el paciente no la experimentará.

Una de las medidas más utilizadas para conocer la discriminación del modelo es el área bajo la curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*), que indica la probabilidad de, dado que seleccionamos un individuo con el evento y otro sin el evento, el modelo logre asignarle la probabilidad más alta al que presenta el evento (94).

La curva ROC es un método gráfico que compara por un lado la sensibilidad, es decir la capacidad de asignar correctamente el evento cuando este ocurrió en función de 1-especificidad, es decir falsos positivos o en otras palabras la proporción de pacientes que no presentaron una infección, pero que el modelo indicó que si la presentarían.

El área bajo la curva ROC puede tomar valores desde 0,5, que indica que el instrumento no es útil para discriminar, hasta 1,0, que sería un modelo que predice perfectamente la ocurrencia del evento. Aunque algunos autores indican que un área bajo la curva ROC mayor a un 0,7 indica una buena predicción del modelo propuesto , otros indican que un valor más adecuado es un 0,8 (95).

En la **Figura 13** se muestra la curva ROC para el modelo propuesto para predecir la incidencia de infecciones en la muestra, ahí se observa que tanto la sensibilidad como la especificidad son altas y que el ajuste es bueno dado que el área bajo la curva ROC es de 0,93.

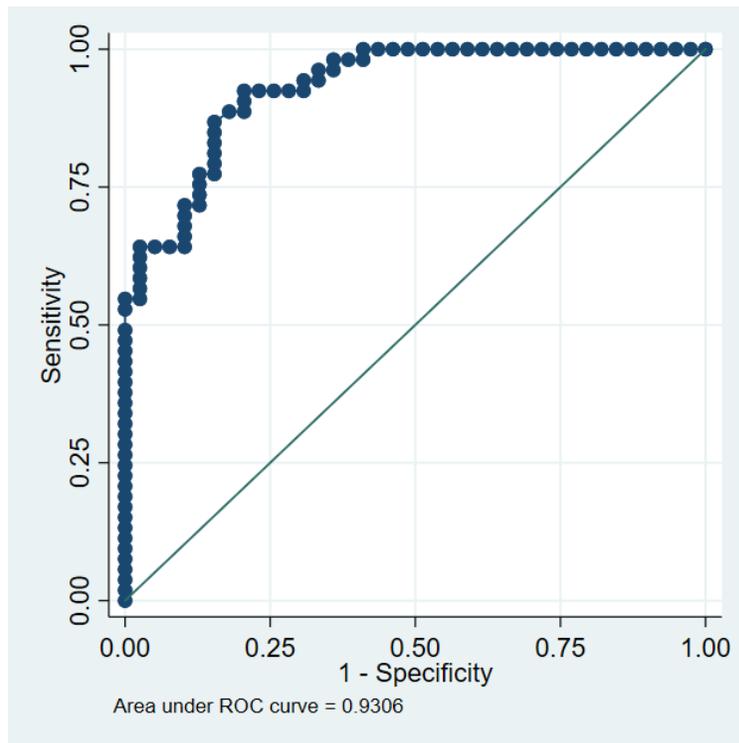


Figura 13. Curva ROC para el modelo propuesto para predicción de infecciones basado en la genética de los pacientes.

Un modelo predictivo establecido a través de una regresión logística basa su predicción en una ecuación que se construye con los coeficientes (ln (OR)) entregados por el modelo logístico, la ecuación para este modelo corresponde a:

$$\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = 3,75 \times [TLR2 TT] + 18,2 \times [IL6 GG] - 7,7 \times [OAT4 AT] - 12,9 \times [OAT4 TT] + 3,6 \times [ABCC2 GG] + 13,8 \times [CYP3A4 CC] - 1,9 \times [IL1\beta AG \text{ o } GG] - 1,1 \times [Ciclo] - 2,9[Sexo masculino] + 5,1 \times [Edad entre 18 y 40 años] + 12,3 \times [Edad entre 41 y 60 años] + 0,46 \times [Inducción] + 5,8 \times [Leucemia mieloide aguda] + 0,97 \times [Otras leucemias] + 12,2 \times [Linfoma] + 0,5 \times [Días en neutropenia profunda] - 19,02$$

De la ecuación anterior se obtiene una probabilidad de ocurrencia del evento (p) que va desde 0 a 1 (o 0 a 100% de probabilidad), desde este punto es deber del investigador establecer el punto de corte, es decir que valor umbral, sobre el cual el paciente será catalogado como “caso” o bajo el cual será clasificado como que no presentará el evento.

Dependiendo del punto de corte que se fije van a cambiar los valores de sensibilidad y especificidad y se debe sopesar que parámetro se privilegiará sobre el otro o si se buscará un equilibrio entre ambos.

En la **Figura 14** se muestra el cambio de la sensibilidad (línea azul) y de la especificidad (línea roja) del modelo propuesto en función de distintos puntos de corte. Si se busca un

equilibrio entre sensibilidad y especificidad un buen punto de corte sería 0,6 (es decir, que sobre 0,6 será clasificado como que tendrá infección y bajo el valor, como sin infección), donde tanto la especificidad como la sensibilidad están en valores alrededor del 85%.

El valor del punto de corte se puede modificar en función de los objetivos del modelo, si, por ejemplo, se busca privilegiar que todos o gran parte de los posibles casos sean correctamente clasificados, se deberá elegir un punto de corte más bajo, aumentando la sensibilidad. En este caso, si se eligiera un punto de corte de 0,3 se obtiene una sensibilidad cercana al 100%, por lo que se asegura que la mayoría de los casos (verdaderos positivos) sean detectados, con la desventaja que algunos pacientes que no sufrirán una infección serán mal clasificados (falsos positivos). En el ejemplo anterior, el modelo podría utilizarse para que aquellos pacientes que tengan un muy bajo riesgo de infección puedan ser dados de alta tempranamente, dado que la probabilidad de que sufran una infección es baja.

Por otro lado, si se busca clasificar correctamente a todos los pacientes (o la gran mayoría) que no sufrirán una infección (verdaderos negativos) se deberá fijar un punto de corte más alto. En este caso, fijando un punto de corte de 0,9 nos aseguramos de que ningún paciente (o muy pocos) que no sufrirá una infección, sea clasificado como caso, la desventaja es que aumentaría la tasa de clasificados como no casos, cuando si presentarán una infección (falsos negativos). Esto podría servir para que los pacientes que estén en alto riesgo de infección puedan ser derivados a una sala de aislamiento o puedan recibir profilaxis antimicrobiana desde el inicio de la quimioterapia, dado que para que el modelo indique

que el paciente sufrirá una infección debe tener una probabilidad muy alta según la ecuación.

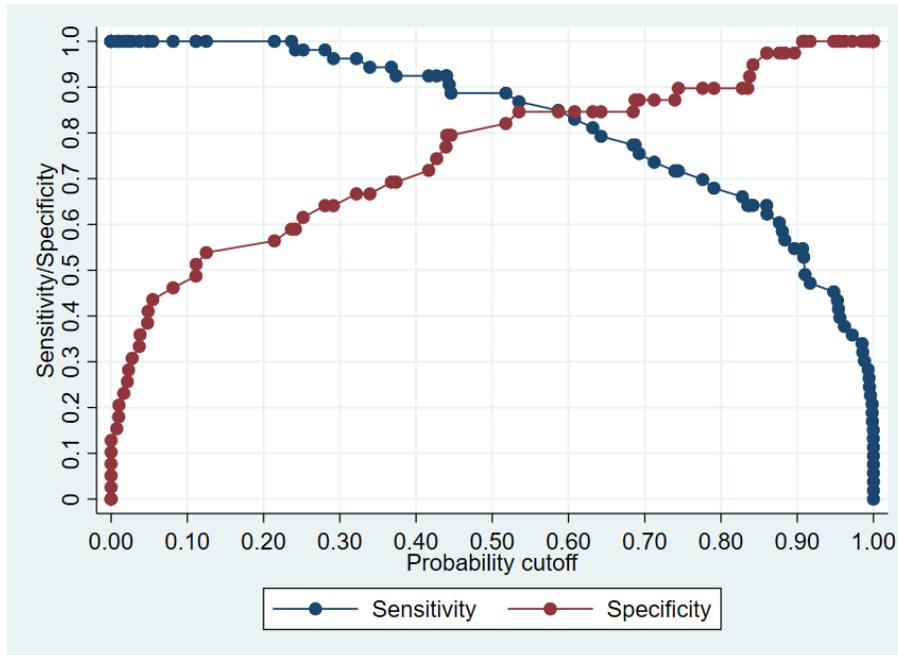


Figura 14. Cambio de la sensibilidad y especificidad del modelo propuesto respecto del punto de corte para definición de caso.

8. Discusión

La neutropenia es un fenómeno común en los pacientes tratados para una neoplasia hematológica y es un factor de riesgo conocido para las infecciones y probablemente sea el factor más asociado. Este es el primer estudio que busca predecir la respuesta al tratamiento antineoplásico a través de un conjunto de genes relacionados a distintos procesos del tratamiento, asociándolos tanto a la neutropenia como al riesgo de infecciones.

Los resultados de la relación de riesgo entre las variantes estudiadas y la duración o inicio de la neutropenia son coherentes entre ellos y con lo esperado por literatura.

Una de las proteínas que estuvieron asociadas a un distinto desenlace clínico en nuestro estudio fue el transportador ABCC2 o también conocido como MRP2, ya que es uno de los 13 miembros de la familia *multidrug - resistance associated proteins* (96). Este transportador que tiene como sustrato numerosas moléculas, participa en la eliminación de compuestos provenientes de la fase II de metabolismo (97) y se expresa predominantemente en el canalículo biliar, pero también en la vesícula biliar y en la membrana apical del túbulo renal proximal (98, 99).

El polimorfismo rs12762549 en el gen *ABCC2* se ha relacionado con un mayor riesgo de neutropenia en pacientes tratados con antineoplásicos de la familia de los taxanos (100, 101). El genotipo GG se ha asociado a un mayor clearance del medicamento, por lo que se podría suponer una mayor funcionalidad o expresión de la proteína (49), esto se corresponde con nuestros hallazgos en que aquellos pacientes con el genotipo GG tienen

un mayor recuento de neutrófilos (**Tablas 4 y 5**) y además están por un menor tiempo en neutropenia (**Figura 6**), esto se debe probablemente a que hay una menor acumulación de medicamentos dada la mayor funcionalidad del transportador, evitando que se produzcan reacciones adversas dosis – dependiente. Otro hallazgo asociado al alelo G y en concordancia con nuestros resultados, fue la protección a presentar anemia en pacientes con cáncer ovárico (102).

También se encontraron diferencias entre los genotipos de distintos polimorfismos en el gen que codifica para ABCB1 o glicoproteína - P. Respecto a la distribución tisular de ABCB1, además del tracto gastrointestinal, donde juega un rol en el eflujo de medicamentos administrados por vía oral, la ABCB1 se expresa a nivel renal en la membrana apical del túbulo proximal y en el lumen del canalículo biliar, por lo que se relaciona con la eliminación de sustancias desde la circulación sistémica (103).

El polimorfismo rs1045642, corresponde a un cambio de una guanina por una adenina en el exón 26 (G3435A), representando una sustitución sinónima (Ile1145Ile) y el genotipo AA fue asociado, en modelos celulares, con una menor funcionalidad con respecto a los otros genotipos (104) y con menor expresión duodenal de la proteína en pacientes (105). Lo anterior se condice con nuestros hallazgos, dado que una menor funcionalidad de la proteína implicará una menor eliminación de los fármacos permitiendo mayor acumulación y por lo tanto los efectos dosis dependientes serán más marcados.

Estudios previos han reportado asociaciones entre el polimorfismo rs1045642, tanto con toxicidad a ciertos medicamentos, como con la efectividad terapéutica. Zgheib y cols,

encontraron una relación entre el genotipo AA para esta variantes y mayores niveles del medicamento metotrexato asociado a mayor toxicidad evaluada por un menor recuento absoluto de neutrófilos, en pacientes leucemia linfoblástica, este mismo tratamiento es incluido en esquemas terapéuticos en la muestra estudiada (66). He y cols, encontraron que el mismo genotipo AA, está asociado a una mejor respuesta a antraciclinas y citarabina (mayor sobrevida y mayor tiempo a la recaída) en pacientes diagnosticados con leucemia mieloide aguda (106). El tratamiento “3 + 7” usado en nuestros pacientes, se basa en 3 días de antraciclinas seguidos de 7 días de citarabina, lo que representa la inducción, para seguir la consolidación basada solo en citarabina a altas dosis. La mayor efectividad se puede relacionar a una mayor acumulación de los medicamentos, por lo que una mayor neutropenia no implica solamente un peor desempeño clínico, en futuros estudios, se podrá analizar la asociación de esta variante con la efectividad del tratamiento.

El polimorfismo *ABCB1* rs2032582, corresponde a un cambio de citocina por una adenina en el exón 21 del gen (C2677A) y representa una sustitución de tipo *miss-sense* (Ala893Thr) y el genotipo AA se ha asociado a una menor expresión de la proteína (107). El genotipo AA fue asociado a una mejor respuesta a antraciclinas y citarabina en pacientes con leucemia mieloide aguda (106) también se asoció a una mejor respuesta en pacientes tratados con citarabina/idarrubicina o citarabina/daunorrubicina/dexrazorxane en pacientes diagnosticados con leucemia mieloide aguda (108), así como en pacientes con mieloma múltiple tratados con dexametasona, doxorubicina y vincristina (109). Por otro lado, el mismo genotipo AA fue asociado a una mayor toxicidad gastrointestinal en pacientes con cáncer de ovario tratados con taxanos o compuestos de platino (110). La

evidencia reportada concuerda con nuestros resultados en que el mismo genotipo se asocia a una mayor toxicidad, en este trabajo representada por un menor recuento de neutrófilos, dado posiblemente a una mayor acumulación.

Otro transportador en que encontramos asociación significativa en este estudio fue el *OAT4*, que es un transportador bidireccional altamente expresado en la membrana apical del túbulo renal proximal y participa tanto en la secreción como en la reabsorción de aniones orgánicos desde y hacia el lumen tubular (111).

En el caso del polimorfismo rs11231809 en el gen *SLC22A11* que codifica para el transportador OAT4, no existe suficiente información para comparar nuestros resultados. Pero ha sido asociado con variaciones en el clearance de ciertos medicamentos y con la efectividad de antineoplásicos (51). Dicha variante genética se encuentra río arriba del gen *SLC22A11* en el cromosoma 11 e implica un cambio de una (50), por lo que probablemente esté relacionado a la expresión del gen, aunque no se puede descartar que sea una variante que se herede ligada a otra con efecto en la funcionalidad de la proteína.

Los pacientes con el genotipo AA tienen un clearance disminuido del diurético torsemida y a su vez el mismo genotipo se asocia a una mayor respuesta a metotrexato (50, 51), esto se relaciona con nuestros hallazgos en que el genotipo AA tiene un mayor riesgo de infecciones en comparación a los otros genotipos (**Tablas 15 y 18**), este efecto se debe probablemente a una menor funcionalidad de la proteína transportadora, lo que implicaría una mayor acumulación de medicamentos conduciendo a un mayor efecto de los medicamentos, pero al mismo tiempo una mayor toxicidad. Sin embargo, no se condice

con la duración de la neutropenia, dado que el genotipo AA es el que se asocia a un menor tiempo en los estados neutropénico (**Figura 5**), sin embargo, este hallazgo no está controlado por confundentes, por lo que son necesarios análisis multivariados para establecer la verdadera relación.

El caso del polimorfismo rs15524 en el gen *CYP3A5*, necesitará de mayores análisis o análisis más controlados para asegurar una correcta relación. Dado que en nuestros hallazgos el genotipo AA se relacionó con un mayor tiempo a la neutropenia profunda (**Figura 4**), o en otras palabras los genotipos GG y GA tenían un mayor riesgo instantáneo de neutropenia con recuento absoluto de neutrófilos igual a 0 células/mm³. Lo anterior es contrario a lo esperado por literatura, ya que el mismo genotipo para el polimorfismo, se ha asociado a un mayor nivel plasmático de diversos fármacos, entre ellos tacrolimus (77, 112) y carbamazepina (113), ambos metabolizados por *CYP3A5*. Se esperaba que, si hubiera un menor metabolismo, aumentarían los niveles plasmáticos de los medicamentos y eso conllevará a un inicio más temprano de la neutropenia. Ningún otro outcome fue asociado a la variante, por lo que la asociación es débil y no se puede descartar que sea debida a confusores no controlados.

Con respecto a la interleuquina 6, es una citoquina con propiedades anti y proinflamatorias participa en algunos procesos como la hematopoyesis, la inflamación y la respuesta inmune. Algunas células secretan IL-6 como respuesta a infecciones, golpes, quemaduras y otras injurias que causen inflamación (56, 114). Las señales mediadas por IL-6 en respuesta a un infección o inflamación incluyen, entre otras, la estimulación y

movilización de neutrófilos en la médula ósea (115, 116), por lo que baja producción de la proteína o un bloqueo de su señal puede causar un decaimiento de la población circulante de neutrófilos (56, 57, 116).

El polimorfismo rs1800796 (-572C>G), una variante ubicada en el promotor del gen que codifica para IL-6, afecta la expresión de la proteína (85, 86), por lo que nuestros hallazgos se correlacionan con los encontrados en la literatura, ya que la presencia del alelo G en forma homocigota se asoció a un inicio más rápido de la neutropenia profunda (**Figura 11**). Dado que el alelo G se relaciona a una menor expresión de IL-6, genera un menor estímulo de formación y supervivencia de neutrófilos frente al estímulo inflamatorio (quimioterapia), lo que conlleva a que la neutropenia comience antes.

Además, el genotipo GG se asoció a un mayor riesgo de tener una infección durante la quimioterapia (**Tabla 18**), lo que se asocia a la menor respuesta inmune provocada por el polimorfismo -572C>G, mediada por una reducción en la expresión del gen que codifica para IL-6, lo que permite una mayor proliferación microbiana con insuficiente respuesta sistémica contra ella (92).

En el caso del polimorfismo rs4696480 en el gen *TLR2* en la **Figura 8** se muestra la relación entre el genotipo AA y una menor duración del período de neutropenia profunda con respecto a los genotipos TA y TT, además estos últimos dos genotipos fueron asociados a un mayor RAN, a la vista de estos resultados se esperaría que el genotipo AA sea un factor protector frente a las infecciones. En la **Tabla 16** se observa que los pacientes portadores del genotipo TT, presentan más de 4 veces el riesgo de tener una infección con

respecto a los otros genotipos, lo que es concordante con que estos pacientes tengan un recuento de neutrófilos menor y estén más tiempo neutropénicos con respecto a los otros genotipos.

El receptor TLR2 es parte de una familia de receptores que participan en la respuesta inmune innata y reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés), en el caso particular de TLR2 reconoce polipéptidos bacterianos (117-119). TLR2 puede formar heterodímeros con TLR1 o TLR6 y reconocer otros patrones como lipopéptidos, ácido lipoteicoico y peptidoglicano (120-122). Además, la expresión de TLR2 aumenta en presencia citoquinas inflamatorias y un amplio rango de fragmentos bacterianos (123, 124).

Los receptores TLR, en respuesta a estímulos microbianos como lipopolisacáridos, aumentan la supervivencia de neutrófilos, efecto que también se observa con la adición de agonistas específicos (63, 125). Además, se aumenta el reclutamiento de polimorfonucleares al sitio de inflamación, mediado por señales de este receptor (126).

Si hay un defecto en las señales mediadas por TLR2 el reconocimiento de patógenos podría verse perjudicado y se podría retrasar la señalización de respuesta inmune. Además, los neutrófilos y monocitos que logren ser reclutados podrían tener una respuesta alterada, lo que conlleva un mayor riesgo de infecciones (127). Sumado a que se favorecerá la apoptosis de neutrófilos, conduciendo a una neutropenia más rápida, con el consecuente aumento del riesgo de infecciones (61).

El polimorfismo rs4696480 es una variante ubicada en un intrón del gen que codifica para el TLR2 (c.-373+1614T>A) y aunque su efecto final sobre la proteína no se conoce actualmente, el alelo T se asocia a una menor funcionalidad del receptor (81).

El alelo A se ha asociado a una mayor efectividad de tratamientos para enfermedades autoinmunes tratadas con medicamentos anti-TNF α (81, 90), también se conoce que existe un mecanismo de activación sinérgica de TNF α mediado por TLR2 (128), por lo que la efectividad de los tratamientos anteriormente mencionados se relacionan a que haya una adecuada actividad de TNF α y por lo tanto de TLR2. El alelo T se ha asociado a una menor funcionalidad del receptor (91), lo que se relaciona a una menor respuesta a los medicamentos anti- TNF α .

El polimorfismos en el gen *TLR2* se han asociado a un mayor riesgo de infecciones en neonato prematuros (129) y a mayor riesgo de sepsis urinaria tanto en adultos como en niños (127, 130). Además, se han asociado a mayor susceptibilidad a cáncer (131), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (132) y psoriasis (133), lo que deja la oportunidad de seguir investigando esta proteína y variantes genéticas con otros outcomes de interés.

Con respecto al modelo final que busca predecir la incidencia de infecciones durante la quimioterapia, logra explicar más del 55% de la variabilidad en la respuesta en nuestra muestra y representa al primer modelo de este tipo que utiliza tanto variables clínicas, como demográficas, sumadas a la genéticas, que por su lado representan dos factores que afectan la respuesta al tratamiento; por un lado se consideran proteínas relacionadas a la

farmacocinética de los medicamentos utilizados en el tratamiento, como transportadores, y por otro lado se consideran variables asociadas a la respuesta inmune e inflamatoria, como interleuquinas y otros mediadores.

Además, de la curva ROC y el área bajo la curva (**Figura 13**), se obtiene que el modelo puede discriminar de forma correcta a los pacientes casos (es decir que presentan infección) de los no casos. Lo que se asocia a una adecuada sensibilidad y especificidad.

Si bien el modelo propuesto no puede ser aplicado directamente a la práctica clínica representa una buena aproximación a la generación de un algoritmo de predicción que permita optimizar la seguridad del tratamiento y la calidad de vida de los pacientes.

Una de las limitaciones principales del modelo propuesto es que usa como una variable explicativa el número de días en que el paciente estuvo en neutropenia profunda, dato que nosotros pudimos obtener directamente de la ficha clínica y los hemogramas realizados durante la hospitalización, sin embargo, si el modelo se quisiera usar al inicio del ciclo sería imposible tener este dato, haciendo que el modelo pierda potencia. Una solución a este problema es que se pueda generar un segundo modelo, que pueda predecir la duración de la neutropenia y que por lo tanto pueda alimentar al modelo anterior para predecir el riesgo de infección.

En el presente trabajo de tesis se muestran sólo aquellos resultados que tuvieron una asociación estadísticamente significativa. Sin embargo, existen otras relaciones genéticas omitidas en los resultados en que se observa una tendencia con una significancia cercana

al límite de 0,05, las cuales podrán ser comprobadas una vez que se disponga de un mayor número de datos.

Si bien no se ha alcanzado el tamaño de muestra originalmente estipulado, este se calculó en base al polimorfismo de frecuencia más baja (menos de un 3%) el cual no fue incluido en estos resultados; el resto de las variantes tiene al menos un 10% en su alelo menos frecuente, por lo que para otras variantes el tamaño de muestra es suficiente para demostrar la asociación con la variable de respuesta. Sin perjuicio de lo anterior, mayores tamaños de muestra permitirán confirmar nuestros hallazgos y realizar asociaciones múltiples con mayor poder estadístico.

9. Conclusiones

1. Los polimorfismos *CYP3A4* rs2242480C>T y *OAT4* rs11231809T>A, relacionados a la farmacocinética de medicamentos y los polimorfismos *TLR2* rs4696480T>A e *IL-6* rs1800796C>G, asociados a la respuesta inmune/inflamatoria; se asociaron significativamente a la incidencia de infecciones.

Este hallazgo permitirá a futuro optimizar la seguridad del tratamiento, específicamente lo que esté asociado a la presencia de infecciones, se podrán optimizar las profilaxis y asignación de aislamiento, lo que podría reducir tanto la morbilidad como los costos asociados a la hospitalización.

2. Los polimorfismos *CYP3A5* rs15524, *SLC22A11* (*OAT4*) rs11231809, *ABCC2* rs12762549, *IL-1 β* rs1143627, *TLR2* rs4696480, se asocian al inicio y/o la duración de la neutropenia profunda.

Este hallazgo podrá ser utilizado para optimizar tanto la seguridad como la efectividad del tratamiento, al ayudar a predecir la variabilidad en la respuesta.

3. Los polimorfismos *IL-6* rs1800796, *CARD8* rs2043211, se asocian a un mayor recuento absoluto de neutrófilos, probado en un modelo multinivel.

Este resultado también ayudará a predecir la respuesta, tomando en cuenta el tiempo desde el inicio de la quimioterapia y la administración de otros medicamentos.

4. En conclusión, la genética puede ayudar a predecir la respuesta a la quimioterapia en pacientes diagnosticados con neoplasias hematológicas.

10. Proyecciones futuras

Los resultados mostrados en esta tesis deben ser validados en cohortes prospectivas con tamaños de muestra mayores. Esto permitirá mejorar la validez externa del modelo y permitirá que se pueda adaptar a la práctica clínica.

Así mismo, la incorporación de nuevas variables o metodologías de descubrimiento de variables genéticas como el estudio de asociación de genoma completo podrán establecer de mejor forma cuales son las variantes que se asocian a una mejor o peor respuesta o a la incidencia de un evento adverso como la infección.

Por otro lado, es interesante que se generen nuevos modelos que puedan predecir con mayor precisión el momento en que se presentará la infección, esto se podría lograr incorporando la temporalidad en la que se produce el evento y tratar de predecir el marco temporal en que el paciente tiene un riesgo mayor de infectarse.

En la misma línea, se pueden generar modelos que ayuden a predecir cuanto durará la neutropenia profunda, siendo este uno de los factores más asociados a la incidencia de infección y que según nuestros resultados por cada día extra de neutropenia aumenta un 60% el riesgo de tener una infección. La construcción de este modelo permitiría alimentar al modelo propuesto en este trabajo para la predicción de infecciones y ayudaría a aumentar la precisión de la medición.

La extrapolación de estos resultados a otros tipos de cáncer no se recomienda. Se puede utilizar esta investigación como sustrato o base, pero cualquier resultado debe ser validado en el escenario específico donde desea ser aplicado.

11. Productos derivados de esta tesis

11.1 Presentaciones a Congresos, Jornadas o reuniones científicas

1. Enzo Alveal, **Matías Martínez**, Eva Bustamante, Fernanda Ávila, Ivonne Flores, Claudia Benavides, Luis Quiñones. Asociación del polimorfismo genético en el gen Toll Like Receptor 2 (TLR2) a períodos prolongados de neutropenia en pacientes con cáncer hematológico en tratamiento con quimioterapia. 3er Congreso Latinoamericano de Farmacogenética y Medicina Personalizada. Cusco, Perú. 24 – 26 de octubre, 2019.
2. Impacto económico de las infecciones durante la hospitalización de pacientes hemato-oncológicos en quimioterapia. Benavides Claudia, Flores Ivonne, Morales Ricardo, Bustamante Eva, Quiñones Luis, Alveal Enzo, **Martínez Matías**. XXXV Congreso chileno de Infectología. 21-24 de noviembre, 2018. Coquimbo, Chile.
3. Polimorfismo genético en glicoproteína-p (ABCB1) asociado con la duración de neutropenia profunda en pacientes con neoplasia hematológica en tratamiento. Jara S, **Martínez M**, Alveal E, Bustamante E, Varela N, Quiñones L. XL Congreso anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. 13-16 noviembre, 2018. Santa Cruz, Chile.
4. Association between Toll Like receptor 2 (TLR2) and caspase recruitment domain 8 (CARD8) polymorphisms with length of neutropenia period in patients with hematologic cancer under treatment. Enzo Alveal, **Matías Martínez**, Scarlette Jara, Eva Bustamante, Luis Quiñones. XXII

Congreso Internacional de Genética. 10-14 de septiembre, 2018. Foz de Iguazú, Brasil.

5. Configuración e implementación de un biobanco de muestras de DNA para estudios farmacogenómicos, su importancia e impacto en la investigación en Latinoamérica. **Martínez Matías**, Alveal Enzo, Suárez Marcelo, Varela Nelson, Quiñones Luis. Segundo congreso de la Sociedad Latinoamericana de Farmacogenética y Medicina Personalizada. Octubre 2017. Durango, México
6. Estudio de asociación de riesgo entre el polimorfismo CYP1A1*2A y la ocurrencia de Cáncer Testicular. **Martínez M.** Cayún JP. Roco A. García E. Agúndez JA. Cerda B. Peña K, Acevedo C, Cáceres D, Varela N, Quiñones L. XXXVIII Congreso anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. 26-29 noviembre, 2016. Castro, Chiloé, Chile.

11.2 Publicaciones y capítulos de libros.

1. **Martínez MF.**, Alveal E., Soto T., Ávila T., Flores I., Benavides C., Morales R., Bustamante E., Bangdiwala S., Varela N., Quiñones L.A. Pharmacogenetics-based preliminary algorithm to predict the incidence of infections in patients receiving cytotoxic chemotherapy for hematological malignancies: a discovery cohort. Submitted to *Frontiers in Pharmacology*.
2. **Matías F. Martínez**, Enzo Alveal, Tomas Soto, Eva Bustamante, Fernanda Ávila, Shrikant I. Bangdiwala, Ivonne Flores, Claudia Benavides, Ricardo Morales, Nelson M. Varela, Luis A. Quiñones. IL-6 -572C>G and CARD8 304T>A genetic polymorphisms are associated with the absolute neutrophil count in patients with hematological malignancies under chemotherapy: An application of multilevel

models to a preliminary pharmacogenetic study. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2020. 337-343. DOI: <https://doi.org/10.2147/PGPM.S261208>.

3. **Matías F. Martínez** & Luis A. Quiñones. Relationship Between Pharmacokinetics and Pharmacogenomics and Its Impact on Drug Choice and Dose Regimens. ADME Processes in Pharmaceutical Sciences: Dosage, Design, and Pharmacotherapy Success. ISBN:978-3-319-99592-2. Talevi A. Ed., Editorial Springer Nature.
4. Juan P. Cayún, Carla E. Miranda, María A. Lavanderos, **Matías F. Martínez**, Paula I. Escalante, Marcelo I. Suárez, Roberto A. Cerro, Christopher A. Sandoval, Leslie C. Cerpa and Paulina A. Moreno. Clinical pharmacogenomics in South America. (2017). En Quiñones L. (1a ED), *Pharmacogenomics in Latin America: Challenges and opportunities*. Published by Nova Science Publishers, Inc. New York.
5. Arsenic exposure, profiles of urinary arsenic species, and polymorphism effects of glutathione-s-transferase and metallothioneins. Farith González-Martínez.; Daniel Sánchez-Rodas; Dante Cáceres; **Matías F Martínez**; Luis A Quiñones. *Chemosphere*. 212 (2018). 927 – 936.

12. Referencias

1. Yılmaz Ş, Ören H, Demircioğlu F, İrken G. Assessment of febrile neutropenia episodes in children with acute leukemia treated with BFM protocols. *Pediatr Hematol Oncol.* 2008;25(3):195-204.
2. Dutronc H, Billhot M, Dupon M, Eghbali H, Donamaria C, Dauchy F-A, et al. Prise en charge de 315 épisodes neutropéniques fébriles dans un centre anticancéreux. *Med Mal Infect.* 2009;39(6):388-93.
3. Castagnola E, Fontana V, Caviglia I, Caruso S, Faraci M, Fioredda F, et al. A prospective study on the epidemiology of febrile episodes during chemotherapy-induced neutropenia in children with cancer or after hemopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 2007;45(10):1296-304.
4. Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang & Dale's Pharmacology: With student consult online access: Elsevier Health Sciences; 2014.
5. Weycker D, Barron R, Edelsberg J, Kartashov A, Legg J, Glass AG. Risk and consequences of chemotherapy-induced neutropenic complications in patients receiving daily filgrastim: the importance of duration of prophylaxis. *BMC Health Serv Res.* 2014;14(1):189.
6. Perry MC, Doll DC, Freter CE. Perry's The Chemotherapy Source Book: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
7. Furie B CP, Atkins MB and Mayer RJ. Clinical haematology and oncology: presentation, diagnosis, and treatment. first ed. Churchill Livingstone, Philadelphia 2003. p. 636-47.
8. Barreto JN, McCullough KB, Ice LL, Smith JA. Antineoplastic agents and the associated myelosuppressive effects: a review. *J Pharm Pract.* 2014;27(5):440-6.
9. Hansen B-A, Wendelbo Ø, Bruserud Ø, Hemsing AL, Mosevoll KA, Reikvam H. Febrile Neutropenia in Acute Leukemia. *Epidemiology, Etiology, Pathophysiology and Treatment. Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2020;12(1).
10. Chandran R, Hakki M, Spurgeon S. Infections in leukemia. *Sepsis-An Ongoing and Significant Challenge.* 2012.
11. Rose-Inman H, Kuehl D. Acute leukemia. *Hematology/Oncology Clinics.* 2017;31(6):1011-28.
12. Arellano-Galindo J, Barrera AP, Jiménez-Hernández E, Zavala-Vega S, Campos-Valdéz G, Xicohtencatl-Cortes J, et al. Infectious Agents in Childhood Leukemia. *Arch Med Res.* 2017;48(4):305-13.
13. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Rev.* 2017;31(1):63-76.
14. Pui C-H, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2006;354(2):166-78.
15. Chatelut E, Delord J-P, Canal P. Toxicity patterns of cytotoxic drugs. *Invest New Drugs.* 2003;21(2):141-8.
16. Keng MK, Sekeres MA. Febrile neutropenia in hematologic malignancies. *Curr Hematol Malig Rep.* 2013;8(4):370-8.
17. Abaza Y, M. Kantarjian H, Faderl S, Jabbour E, Jain N, Thomas D, et al. Hyper-CVAD plus nelarabine in newly diagnosed adult T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-lymphoblastic lymphoma. *Am J Hematol.* 2018;93(1):91-9.

18. Kantarjian HM, O'Brien S, Smith TL, Cortes J, Giles FJ, Beran M, et al. Results of treatment with hyper-CVAD, a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2000;18(3):547-.
19. Banck JC, Görlich D. In-silico comparison of two induction regimens (7+ 3 vs 7+ 3 plus additional bone marrow evaluation) in acute myeloid leukemia treatment. *BMC Syst Biol*. 2019;13(1):18.
20. Ministerio de Salud C. Guía Clínica Leucemia en Personas de 15 años y más. Santiago: Minsal, 2013. Todos los derechos reservados. Este material puede ser reproducido total o parcialmente para fines de diseminación y capacitación. .
21. US Department of Health. National Institutes of Health National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.0. Published: May 28, 2009 (v4. 03: June 14, 2010)[Z]. 2017.
22. Li Y, Klippel Z, Shih X, Reiner M, Wang H, Page JH. Relationship between severity and duration of chemotherapy-induced neutropenia and risk of infection among patients with nonmyeloid malignancies. *Support Care Cancer*. 2016;24(10):4377-83.
23. Innes H, Lim SL, Hall A, Chan SY, Bhalla N, Marshall E. Management of febrile neutropenia in solid tumours and lymphomas using the Multinational Association for Supportive Care in Cancer (MASCC) risk index: feasibility and safety in routine clinical practice. *Support Care Cancer*. 2008;16(5):485-91.
24. Bitar RA. Utility of the Multinational Association for Supportive Care in Cancer (MASCC) risk index score as a criterion for nonadmission in febrile neutropenic patients with solid tumors. *The Permanente journal*. 2015;19(3):37.
25. Lalami Y, Paesmans M, Muanza F, Barette M, Plehiers B, Dubreucq L, et al. Can we predict the duration of chemotherapy-induced neutropenia in febrile neutropenic patients, focusing on regimen-specific risk factors? A retrospective analysis. *Ann Oncol*. 2005;17(3):507-14.
26. Pastura PSVC, Land MG, Santoro-Lopes G. Predictive Model for the Length of Hospital Stay of Children With Hematologic Malignancies, Neutropenia, and Presumed Infection. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2004;26(12):813-6.
27. Lu D-Y, Lu T-R, Xu B, Ding J. Pharmacogenetics of cancer therapy: breakthroughs from beyond? *Future science OA*. 2015;1(4).
28. Martínez MF, Quiñones LA. Relationship Between Pharmacokinetics and Pharmacogenomics and Its Impact on Drug Choice and Dose Regimens. *ADME Processes in Pharmaceutical Sciences: Springer*; 2018. p. 169-202.
29. Ritter JM, Flower RJ, Henderson G, Loke YK, MacEwan D, Rang HP. Rang Y Dale. *Farmacología: Elsevier*; 2020.
30. Hsu M-H, Johnson EF. Active-site differences between substrate-free and ritonavir-bound cytochrome P450 (CYP) 3A5 reveal plasticity differences between CYP3A5 and CYP3A4. *J Biol Chem*. 2019;294(20):8015-22.
31. Lolodi O, Wang Y-M, Wright WC, Chen T. Differential regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and its implication in drug discovery. *Current drug metabolism*. 2017;18(12):1095-105.
32. Kacevska M, Robertson GR, Clarke SJ, Liddle C. Inflammation and CYP3A4-mediated drug metabolism in advanced cancer: impact and implications for chemotherapeutic drug dosing. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008;4(2):137-49.

33. Lin L, Yee SW, Kim RB, Giacomini KM. SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nature reviews Drug discovery*. 2015;14(8):543.
34. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human genomics*. 2009;3(3):281.
35. van der Schoor LW, Verkade HJ, Kuipers F, Jonker JW. New insights in the biology of ABC transporters ABCC2 and ABCC3: impact on drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2015;11(2):273-93.
36. Li Q, Shu Y. Role of solute carriers in response to anticancer drugs. *Molecular and cellular therapies*. 2014;2(1):1-14.
37. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999;234(2):177-86.
38. Ahmed S, Zhou Z, Zhou J, Chen S-Q. Pharmacogenomics of drug metabolizing enzymes and transporters: relevance to precision medicine. *Genomics, proteomics & bioinformatics*. 2016;14(5):298-313.
39. Li J, Bluth MH. Pharmacogenomics of drug metabolizing enzymes and transporters: implications for cancer therapy. *Pharmgenomics Pers Med*. 2011;4:11.
40. Daly AK. Polymorphic variants of cytochrome P450: relevance to cancer and other diseases. *Adv Pharmacol*. 74: Elsevier; 2015. p. 85-111.
41. Lee JS, Cheong HS, Kim LH, Kim JO, Seo DW, Kim YH, et al. Screening of genetic polymorphisms of CYP3A4 and CYP3A5 genes. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*. 2013;17(6):479-84.
42. Wang C-e, Lu K-P, Chang Z, Guo M-L, Qiao H-L. Association of CYP3A4* 1B genotype with Cyclosporin A pharmacokinetics in renal transplant recipients: A meta-analysis. *Gene*. 2018;664:44-9.
43. Birdwell KA, Decker B, Barbarino JM, Peterson JF, Stein CM, Sadee W, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guidelines for CYP3A5 genotype and tacrolimus dosing. *Clin Pharmacol Ther*. 2015;98(1):19-24.
44. Lamba J, Hebert JM, Schuetz EG, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP3A5. *Pharmacogenet Genomics*. 2012;22(7):555.
45. Park J-Y, Cha Y-J, Kim K-A. CYP3A5* 3 polymorphism and its clinical implications and pharmacokinetic role. *Translational and Clinical Pharmacology*. 2014;22(1):3-7.
46. Miura M, Satoh S, Kagaya H, Saito M, Numakura K, Tsuchiya N, et al. Impact of the CYP3A4* 1G polymorphism and its combination with CYP3A5 genotypes on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant patients. *Pharmacogenomics*. 2011;12(7):977-84.
47. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim I-W, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*. 2007;315(5811):525-8.
48. Gervasini G, Carrillo JA, Garcia M, San Jose C, Cabanillas A, Benitez J. Adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1)(multidrug resistance 1) G2677T/A gene polymorphism is associated with high risk of lung cancer. *Cancer*. 2006;107(12):2850-7.
49. Lewis LD, Miller AA, Owzar K, Bies RR, Markova S, Jiang C, et al. The relationship of polymorphisms in ABCC2 and SLCO1B3 with docetaxel pharmacokinetics and neutropenia: CALGB 60805 (Alliance). *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(1):29.
50. Vormfelde SV, Schirmer M, Hagos Y, Toliat MR, Engelhardt S, Meineke I, et al. Torsemide renal clearance and genetic variation in luminal and basolateral organic anion transporters. *Br J Clin Pharmacol*. 2006;62(3):323-35.

51. Lima A, Bernardes M, Azevedo R, Medeiros R, Seabra V. Pharmacogenomics of methotrexate membrane transport pathway: can clinical response to methotrexate in rheumatoid arthritis be predicted? *International journal of molecular sciences*. 2015;16(6):13760-80.
52. Vogels M, Eling W, Otten A, Van Der Meer J. Interleukin-1 (IL-1)-induced resistance to bacterial infection: role of the type I IL-1 receptor. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(8):1744-7.
53. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014:a016295.
54. Kämäräinen O-P, Solovieva S, Vehmas T, Luoma K, Riihimäki H, Ala-Kokko L, et al. Common interleukin-6 promoter variants associate with the more severe forms of distal interphalangeal osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(1):R21.
55. Abu-Maziad A, Schaa K, Bell EF, Dagle JM, Cooper M, Marazita ML, et al. Role of polymorphic variants as genetic modulators of infection in neonatal sepsis. *Pediatr Res*. 2010;68(4):323.
56. Rose-John S, Winthrop K, Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(7):399.
57. Wright HL, Cross AL, Edwards SW, Moots RJ. Effects of IL-6 and IL-6 blockade on neutrophil function in vitro and in vivo. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(7):1321-31.
58. Veltkamp M, Wijnen PA, Van Moorsel CH, Rijkers GT, Ruven HJ, Heron M, et al. Linkage between Toll-like receptor (TLR) 2 promoter and intron polymorphisms: functional effects and relevance to sarcoidosis. *Clin Exp Immunol*. 2007;149(3):453-62.
59. Bairagya BB, Bhattacharya P, Bhattacharya SK, Dey B, Dey U, Ghosh T, et al. Genetic variation and haplotype structures of innate immunity genes in eastern India. *Infect Genet Evol*. 2008;8(3):360-6.
60. Purdue MP, Lan Q, Wang SS, Kricker A, Menashe I, Zheng T-Z, et al. A pooled investigation of Toll-like receptor gene variants and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis*. 2008;30(2):275-81.
61. Sabroe I, Dower SK, Whyte MK. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis*. 2005;41(Supplement_7):S421-S6.
62. Prince LR, Allen L, Jones EC, Hellewell PG, Dower SK, Whyte MK, et al. The role of interleukin-1 β in direct and Toll-like receptor 4-mediated neutrophil activation and survival. *The American journal of pathology*. 2004;165(5):1819-26.
63. Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, et al. Selective roles for Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol*. 2003;170(10):5268-75.
64. Martinez MF, Alveal E, Soto TG, Bustamante EI, Ávila F, Bangdiwala SI, et al. IL-6- 572C> G and CARD8 304T> A Genetic Polymorphisms are Associated with the Absolute Neutrophil Count in Patients with Hematological Malignancies Under Chemotherapy: An Application of Multilevel Models to a Preliminary Pharmacogenetic Study. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2020;13:337-43.
65. Suthandiram S, Gan G-G, Zain SM, Bee P-C, Lian L-H, Chang K-M, et al. Effect of polymorphisms within methotrexate pathway genes on methotrexate toxicity and plasma levels in adults with hematological malignancies. *Pharmacogenomics*. 2014;15(11):1479-94.

66. Zgheib NK, Akra-Ismaïl M, Aridi C, Mahfouz R, Abboud MR, Solh H, et al. Genetic polymorphisms in candidate genes predict increased toxicity with methotrexate therapy in Lebanese children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics*. 2014;24(8):387-96.
67. Gregers J, Green H, Christensen I, Dalhoff K, Schroeder H, Carlsen N, et al. Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *The pharmacogenomics journal*. 2015;15(4):372.
68. Ceppi F, Langlois-Pelletier C, Gagné V, Rousseau J, Ciolino C, Lorenzo SD, et al. Polymorphisms of the vincristine pathway and response to treatment in children with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics*. 2014;15(8):1105-16.
69. Wu H, Kang H, Liu Y, Xiao Q, Zhang Y, Sun M, et al. Association of ABCB1 genetic polymorphisms with susceptibility to colorectal cancer and therapeutic prognosis. *Pharmacogenomics*. 2013;14(8):897-911.
70. Megias-Vericat J, Herrero M, Rojas L, Montesinos P, Bosó V, Moscardó F, et al. A systematic review and meta-analysis of the impact of WT1 polymorphism rs16754 in the effectiveness of standard chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia. *The pharmacogenomics journal*. 2016;16(1):30.
71. Green H, Falk I, Lotfi K, Paul E, Hermansson M, Rosenquist R, et al. Association of ABCB1 polymorphisms with survival and in vitro cytotoxicity in de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype. *The pharmacogenomics journal*. 2012;12(2):111.
72. Perez-Ramirez C, Canadas-Garre M, Molina MÁ, Robles AI, Faus-Dáder MJ, Calleja-Hernández MÁ. Contribution of genetic factors to platinum-based chemotherapy sensitivity and prognosis of non-small cell lung cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2017;771:32-58.
73. Harivenkatesh N, Kumar L, Bakhshi S, Sharma A, Kabra M, Velpandian T, et al. Do polymorphisms in MDR1 and CYP3A5 genes influence the risk of cytogenetic relapse in patients with chronic myeloid leukemia on imatinib therapy? *Leuk Lymphoma*. 2017;58(9):2218-26.
74. Zuo X-c, Ng CM, Barrett JS, Luo A-j, Zhang B-k, Deng C-h, et al. Effects of CYP3A4 and CYP3A5 polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics in Chinese adult renal transplant recipients: a population pharmacokinetic analysis. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(5):251-61.
75. Uesugi M, Hosokawa M, Shinke H, Hashimoto E, Takahashi T, Kawai T, et al. Influence of cytochrome P450 (CYP) 3A4* 1G polymorphism on the pharmacokinetics of tacrolimus, probability of acute cellular rejection, and mRNA expression level of CYP3A5 rather than CYP3A4 in living-donor liver transplant patients. *Biol Pharm Bull*. 2013;36(11):1814-21.
76. Staatz CE, Taylor PJ, Lynch SV, Willis C, Charles BG, Tett SE. Population pharmacokinetics of tacrolimus in children who receive cut-down or full liver transplants. *Transplantation*. 2001;72(6):1056-61.
77. Wang P, Mao Y, Razo J, Zhou X, Wong ST, Patel S, et al. Using genetic and clinical factors to predict tacrolimus dose in renal transplant recipients. *Pharmacogenomics*. 2010;11(10):1389-402.
78. Liu J, Ouyang Y, Chen D, Yao B, Lin D, Li Z, et al. Donor and recipient P450 gene polymorphisms influence individual pharmacological effects of tacrolimus in Chinese liver transplantation patients. *Int Immunopharmacol*. 2018;57:18-24.

79. König J. Uptake transporters of the human OATP family. *Drug Transporters*: Springer; 2011. p. 1-28.
80. PharmGKB. Clinical Annotation for rs12762549 (ABCC2); docetaxel; (level 3 Toxicity/ADR, Metabolism/PK) [12/02/2019]. Available from: www.pharmgkb.org/variant/PA166154154/clinicalAnnotation/1444607697.
81. Loft N, Skov L, Iversen L, Gniadecki R, Dam T, Brandslund I, et al. Associations between functional polymorphisms and response to biological treatment in Danish patients with psoriasis. *The pharmacogenomics journal*. 2018;18(3):494.
82. Shiotani A, Sakakibara T, Yamanaka Y, Nishi R, Imamura H, Fujita M, et al. The preventive factors for aspirin-induced peptic ulcer: aspirin ulcer and corpus atrophy. *J Gastroenterol*. 2009;44(7):717-25.
83. Paramel G, Sirsjö A, Fransén K. Role of genetic alterations in the NLRP3 and CARD8 genes in health and disease. *Mediators Inflamm*. 2015;2015.
84. García-Bermúdez M, López-Mejías R, González-Juanatey C, Corrales A, Castaneda S, Ortiz AM, et al. CARD8 rs2043211 (p. C10X) polymorphism is not associated with disease susceptibility or cardiovascular events in Spanish rheumatoid arthritis patients. *DNA Cell Biol*. 2013;32(1):28-33.
85. Tang S, Yuan Y, He Y, Pan D, Zhang Y, Liu Y, et al. Genetic polymorphism of interleukin-6 influences susceptibility to HBV-related hepatocellular carcinoma in a male Chinese Han population. *Hum Immunol*. 2014;75(4):297-301.
86. Badawy A, Othman G, Elabbasy L, Abd Elsalam M, Shrief R, Fahmy E, et al. IL-6- 572G/C and- 174G/C polymorphisms association with hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Br J Biomed Sci*. 2019:1-4.
87. Zhang T, Wang Z, Xiao W. A meta-analysis of interleukin-6-572G> C polymorphism and coronary heart disease susceptibility. *Cardiol J*. 2017;24(1):107-10.
88. Jeon J-Y, Kim H-A, Kim S-H, Park H-S, Suh C-H. Interleukin 6 gene polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in Koreans. *The Journal of rheumatology*. 2010;37(11):2251-8.
89. Yee LJ, Im K, Borg B, Yang H, Liang TJ. Interleukin-6 haplotypes and the response to therapy of chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun*. 2009;10(4):365.
90. Bank S, Andersen P, Burisch J, Pedersen N, Roug S, Galsgaard J, et al. Associations between functional polymorphisms in the NFκB signaling pathway and response to anti-TNF treatment in Danish patients with inflammatory bowel disease. *The pharmacogenomics journal*. 2014;14(6):526.
91. Bielinski SJ, Hall JL, Pankow JS, Boerwinkle E, Matijevic-Aleksic N, He M, et al. Genetic variants in TLR2 and TLR4 are associated with markers of monocyte activation: the Atherosclerosis Risk in Communities MRI Study. *Hum Genet*. 2011;129(6):655-62.
92. Sharma A, Singh K, Biswas A, Ranjan R, Kishor K, Pandey H, et al. Impact of interleukin 6 promoter polymorphisms (- 174 G> C,- 572 G> C and- 597 G> A) on plasma IL-6 levels and their influence on the development of DVT: a study from India. *Hematology*. 2018;23(10):833-8.
93. Johnston A, Uetrecht J. Current understanding of the mechanisms of idiosyncratic drug-induced agranulocytosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2015;11(2):243-57.
94. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*. 1982;143(1):29-36.

95. Harrell Jr FE. Regression modeling strategies: with applications to linear models, logistic and ordinal regression, and survival analysis: Springer; 2015.
96. Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*. 2003;22(47):7537.
97. König J, Nies AT, Cui Y, Keppler D. MRP2, the apical export pump for anionic conjugates: Academic Press, London; 2003.
98. Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer HK. Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2006;2(3):351-66.
99. Jemnitz K, Heredi-Szabo K, Janossy J, Iojă E, Vereczkey L, Krajcsi P. ABCC2/Abcc2: a multispecific transporter with dominant excretory functions. *Drug Metab Rev*. 2010;42(3):402-36.
100. Choi JR, Kim J-O, Kang DR, Shin J-Y, Zhang XH, Oh JE, et al. Genetic variations of drug transporters can influence on drug response in patients treated with docetaxel chemotherapy. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*. 2015;47(3):509.
101. Kiyotani K, Mushiroda T, Kubo M, Zembutsu H, Sugiyama Y, Nakamura Y. Association of genetic polymorphisms in SLCO1B3 and ABCC2 with docetaxel-induced leukopenia. *Cancer Sci*. 2008;99(5):967-72.
102. Lambrechts S, Lambrechts D, Despierre E, Van Nieuwenhuysen E, Smeets D, Debruyne PR, et al. Genetic variability in drug transport, metabolism or DNA repair affecting toxicity of chemotherapy in ovarian cancer. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 2015;16(1):2.
103. Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(8):423-9.
104. Drescher S, Schaeffeler E, Hitzl M, Hofmann U, Schwab M, Brinkmann U, et al. MDR1 gene polymorphisms and disposition of the P-glycoprotein substrate fexofenadine. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;53(5):526-34.
105. Hoffmeyer S, Burk O, Von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johné A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(7):3473-8.
106. He H, Yin J, Li X, Zhang Y, Xu X, Zhai M, et al. Association of ABCB1 polymorphisms with prognostic outcomes of anthracycline and cytarabine in Chinese patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Clin Pharmacol*. 2015;71(3):293-302.
107. Lamba J, Strom S, Venkataramanan R, Thummel KE, Lin YS, Liu W, et al. MDR1 genotype is associated with hepatic cytochrome P450 3A4 basal and induction phenotype. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;79(4):325-38.
108. Kim DH, Park JY, Sohn SK, Lee NY, Baek JH, Jeon SB, et al. Multidrug resistance-1 gene polymorphisms associated with treatment outcomes in de novo acute myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 2006;118(9):2195-201.
109. Maggini V, Buda G, Martino A, Presciuttini S, Galimberti S, Orciuolo E, et al. MDR1 diplotypes as prognostic markers in multiple myeloma. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18(5):383-9.
110. Kim HS, Kim TJ, Chung HH, Kim JW, Kim BG, Park NH, et al. In vitro extreme drug resistance assay to taxanes or platinum compounds for the prediction of clinical outcomes in epithelial ovarian cancer: a prospective cohort study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009;135(11):1513-20.

111. Burckhardt G. Drug transport by organic anion transporters (OATs). *Pharmacol Ther.* 2012;136(1):106-30.
112. Tamashiro EY, Felipe CR, Genvigir FD, Rodrigues AC, Campos AB, Hirata RD, et al. Influence of CYP3A4 and CYP3A5 polymorphisms on tacrolimus and sirolimus exposure in stable kidney transplant recipients. *Drug metabolism and personalized therapy.* 2017;32(2):89-95.
113. Ping W, Tao Y, HongYing M, DanQi L, Yanghao S, BoTing Z. First analysis of the association between CYP3A4/5, ABCB1 genetic polymorphisms and oxcarbazepine metabolism and transport in chinese epileptic patients with oxcarbazepine monotherapy and bitherapy. *J Pharm Pharm Sci.* 2015;18(3):256-85.
114. Wilkinson AN, Gartlan KH, Kelly G, Samson LD, Olver SD, Avery J, et al. Granulocytes are unresponsive to IL-6 due to an absence of gp130. *J Immunol.* 2018;200(10):3547-55.
115. Chiba Y, Mizoguchi I, Hasegawa H, Ohashi M, Orii N, Nagai T, et al. Regulation of myelopoiesis by proinflammatory cytokines in infectious diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(8):1363-76.
116. Moots RJ, Sebba A, Rigby W, Ostor A, Porter-Brown B, Donaldson F, et al. Effect of tocilizumab on neutrophils in adult patients with rheumatoid arthritis: pooled analysis of data from phase 3 and 4 clinical trials. *Rheumatology (Oxford).* 2016;56(4):541-9.
117. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124(4):783-801.
118. Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, et al. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:353-89.
119. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007;449(7164):819.
120. Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol.* 2000;165(2):618-22.
121. Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *The EMBO journal.* 2000;19(13):3325-36.
122. Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, et al. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol.* 2001;166(1):15-9.
123. Kurt-Jones EA, Mandell L, Whitney C, Padgett A, Gosselin K, Newburger PE, et al. Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood.* 2002;100(5):1860-8.
124. Kobayashi SD, Braughton KR, Whitney AR, Voyich JM, Schwan TG, Musser JM, et al. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003;100(19):10948-53.
125. Sabroe I, Prince L, Dower S, Walmsley S, Chilvers E, Whyte M. What can we learn from highly purified neutrophils? : Portland Press Limited; 2004.
126. Malcolm KC, Arndt PG, Manos EJ, Jones DA, Worthen GS. Microarray analysis of lipopolysaccharide-treated human neutrophils. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2003;284(4):L663-L70.

127. Hawn TR, Scholes D, Li SS, Wang H, Yang Y, Roberts PL, et al. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to urinary tract infections in adult women. *PLoS One*. 2009;4(6):e5990.
128. Chang YL, Chen TH, Wu YH, Chen GA, Weng TH, Tseng PH, et al. A novel TLR 2-triggered signalling crosstalk synergistically intensifies TNF-mediated IL-6 induction. *J Cell Mol Med*. 2014;18(7):1344-57.
129. Esposito S, Zampiero A, Pugin L, Tabano S, Pelucchi C, Ghirardi B, et al. Genetic polymorphisms and sepsis in premature neonates. *PLoS One*. 2014;9(7):e101248.
130. Tabel Y, Berdeli A, Mir S. Association of TLR2 gene Arg753Gln polymorphism with urinary tract infection in children. *Int J Immunogenet*. 2007;34(6):399-405.
131. de Barros Gallo C, Marichalar-Mendia X, Setien-Olarrá A, Acha-Sagredo A, Bediaga NG, Gainza-Cirauqui ML, et al. Toll-like receptor 2 rs4696480 polymorphism and risk of oral cancer and oral potentially malignant disorder. *Arch Oral Biol*. 2017;82:109-14.
132. Budulac SE, Boezen HM, Hiemstra PS, Lapperre TS, Vonk JM, Timens W, et al. Toll-like receptor (TLR2 and TLR4) polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*. 2012;7(8):e43124.
133. Sabah-Özcan S, Gürel G. The polymorphism rs4696480 in the TLR2 gene is associated with psoriasis patients in the Turkish population. *Immunol Lett*. 2019;211:28-32.

13. Anexos

13.1 Anexo 1. Consentimiento informado FALP Aprobado por Servicio de Salud Metropolitano Oriente.



Fundación Arturo López Pérez
Comité de Ética
CONSENTIMIENTO INFORMADO



PROYECTO: Estudio de la asociación entre polimorfismos genéticos y la respuesta clínica a β -Lactámicos y Quinolonas y susceptibilidad a infecciones en pacientes con tratamiento antineoplásico.

PATROCINANTE: Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética
Nombre del Investigador principal: Luis Quiñones S. / Matías Martínez O.
Institución: Facultad de medicina, Universidad de Chile.
Teléfonos: 29770741-29770744.

Invitación a participar: Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación "Estudio de la asociación entre polimorfismos genéticos y la respuesta clínica a β -Lactámicos y Quinolonas y susceptibilidad a infecciones en pacientes con tratamiento antineoplásico", debido a la alta tasa de variabilidad de respuesta a los tratamientos farmacológicos y la falta de conocimiento de los factores de relevancia clínica involucrados en esta respuesta.

Objetivos: Este proyecto tiene por objetivo Establecer asociaciones entre variantes genéticas individuales o múltiples de proteínas involucradas en la farmacocinética y farmacodinamia de antibióticos, en la respuesta al tratamiento de infecciones en pacientes oncológicos. Con esto buscamos optimizar la terapia antimicrobiana, tanto en efectividad como en seguridad, favoreciendo los resultados clínicos positivos.

Procedimientos: Si Ud. acepta participar será sometido, solamente una vez a:

- Extracción de **1 (una) muestra de sangre** de aproximadamente 1 cucharadita, la cual será realizada con un sistema estéril y por personal calificado, de tal manera de evitar cualquier riesgo y **5 (cinco) muestras** de menos de 1/2 cucharadita para medición de niveles sanguíneos de antibióticos (para casos: pacientes **con infección**).
- Extracción de **1 (una) muestra de sangre** de aproximadamente 1 cucharadita, la cual será realizada con un sistema estéril y por personal calificado, de tal manera de evitar cualquier riesgo (para controles: pacientes **sin infección**).
- Llenado de una ficha clínica que incluye datos de identificación personal e historia médica. Tanto la información de la ficha, como los resultados obtenidos en este estudio son absolutamente confidenciales y pueden ser dados a conocer solamente a usted, una vez se encuentren disponibles.
- Seguimiento durante la hospitalización, incluyendo exámenes realizados, medicamentos administrados, procedimientos médicos/quirúrgicos y resultado de imágenes.



Riesgos: La única molestia eventual que se prevé derivado de su participación la constituye la eventual aparición de hematoma en la zona de toma de muestra. El equipo de investigación tomará las medidas necesarias para minimizar la aparición de cualquier problema.

Cualquier otro efecto que Ud. considera que puede derivarse de la toma de la muestra deberá comunicarlo a Dr. Luis A. Quiñones en el teléfono 29770741 o 90158341.

Costos: El procedimiento se realizará sin costo alguno para Ud. durante el desarrollo de este proyecto. El proyecto no contempla la toma de exámenes para alguna patología en particular.

Beneficios: Además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes, su participación en este estudio no contempla otros beneficios directos que el de aumentar la información con respecto a su posible respuesta al tratamiento antibiótico.

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, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima. Las muestras serán analizadas utilizando solo un código y el listado que relaciona nombres con códigos se mantendrá guardada con acceso solo al investigador principal.

Usos potenciales de los resultados de la investigación: los resultados de esta investigación podrán ser utilizados para en un futuro optimizar las pautas terapéuticas del tratamiento de las infecciones en pacientes con tratamiento antineoplásico.

Información adicional: Ud. o su médico tratante para cualquier tratamiento farmacológico que a futuro pudiese tener, podrán ser informados si lo requieren, con objeto de disponer de nuevos conocimientos o cautelar potenciales complicaciones que puedan afectar sus tratamientos con medicamentos.

Voluntariedad: Se reitera que su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y puede solicitar de manera escrita que se retire su muestra y datos personales de la base de datos generada siempre y cuando su muestra no haya sido ya procesada. Ello no significará ningún perjuicio a su persona.

Derechos del participante: Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con:

Luis Quiñones S. Teléfono: 29770741 o 90158341, mail: lquinone@med.uchile.cl
Matías Martínez Olguín. Teléfono: 9 1817236, mail: matiasmartinez@ug.uchile.cl
Otros Derechos del participante

Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética Científico del Instituto Oncológico de la Fundación Arturo López Pérez y del CEC del S.S.M. Oriente.

Presidente Comité ético científico FALP:
Dra. Eva Bustamante, +569 7 499 57 45
Presidenta CEC S.S.M. Oriente
Dra. Sara Chernilo S. 225756735



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 **“Estudio de la asociación entre polimorfismos genéticos y la respuesta clínica a antibióticos en pacientes con tratamiento antineoplásico”**.

Anexo:

Acepto que mi muestra pueda ser utilizada en nuevos estudios relacionados con esta investigación (no se tomará una nueva muestra)

SI _____

NO _____

Nombre del participante o testigo: _____

RUT _____ Firma _____ Fecha _____

Nombre del Investigador designado _____

RUT _____ Firma _____ Fecha _____

Nombre del Delegado del Director o Ministro de Fe _____

RUT _____ Firma _____ Fecha _____

13.2 Anexo 2. Consentimiento informado HCUCH, aprobado por el Comité Ético Científico del HCUCH.

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
CASOS

Estudio de la asociación entre polimorfismos genéticos y la respuesta clínica a β -Lactámicos y Quinolonas y susceptibilidad a infecciones en pacientes con tratamiento antineoplásico

Nombre del Investigador Principal: Dr. Luis Quiñones S, Prof. Titular Facultad de Medicina.
Nombre Investigadora Responsable HCUCH: QF. Fernanda Avila
Institución: Hospital Clínico de la Universidad de Chile.
Teléfono(s): 29770743
Servicio o Departamento: Sección de Infectología y Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética.

Invitación a participar: Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación "Estudio de la asociación entre polimorfismos genéticos y la respuesta clínica a β -Lactámicos y Quinolonas y susceptibilidad a infecciones en pacientes con tratamiento antineoplásico", debido a la alta tasa de variabilidad de respuesta a los tratamientos farmacológicos y la falta de conocimiento de los factores de relevancia clínica involucrados en esta respuesta.

Antes de tomar la decisión de participar lea atentamente este documento.

Introducción: En el presente estudio de buscamos establecer una relación entre el perfil genético del paciente con la susceptibilidad a presentar una infección posterior a recibir quimioterapia y en el caso de presentarla, buscamos estudiar los genes que permitan predecir la respuesta a los antibióticos, basados igualmente en la genética individual de cada participante.

Objetivos: Esta investigación tiene por objetivos establecer asociaciones entre variantes genéticas individuales o múltiples de proteínas involucradas en la farmacocinética de antibióticos, en la respuesta al tratamiento de infecciones en pacientes oncológicos. Con esto buscamos optimizar la terapia antimicrobiana, tanto en efectividad como en seguridad, favoreciendo los resultados clínicos positivos.
El estudio incluirá a un número total de 160 sujetos, de dos hospitales o centros de salud de Santiago.

Procedimientos: Si Ud. acepta participar será sometido, solamente una vez a:

- Extracción de **1 (una) muestra de sangre** de 5 mL aproximadamente, la cual será realizada con un sistema estéril y por personal calificado, de tal manera de evitar cualquier riesgo y **5 (cinco) muestras** de 1 mL para medición de niveles sanguíneos de antibióticos
- Llenado de una ficha clínica que incluye datos de identificación personal e historia médica. Tanto la información de la ficha, como los resultados obtenidos en este estudio



son absolutamente confidenciales y pueden ser dados a conocer solamente a usted, una vez se encuentren disponibles.

- Seguimiento durante la hospitalización, incluyendo exámenes, realizados, medicamentos administrados, procedimientos médicos/quirúrgicos y resultado de imágenes.

Riesgos: La única molestia eventual que se prevé derivado de su participación la constituye la eventual aparición de hematoma en la zona de toma de muestra. El equipo de investigación tomará las medidas necesarias para minimizar la aparición de cualquier problema. Cualquier otro efecto que Ud. considera que puede derivarse de la toma de la muestra deberá comunicarlo a Dr. Luis A. Quiñones en el teléfono 29770741 o 90158341.

Costos: El procedimiento se realizará sin costo alguno para Ud. durante el desarrollo de este proyecto. El proyecto no contempla la toma de exámenes para alguna patología en particular.

Beneficios: Además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes, su participación en este estudio no contempla otros beneficios directos que el de aumentar la información con respecto a su posible respuesta al tratamiento antibiótico.

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, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima. Las muestras serán analizadas utilizando solo un código y el listado que relaciona nombres con códigos se mantendrá guardada con acceso solo al investigador principal.

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. Ud. o su médico tratante para cualquier tratamiento farmacológico que a futuro pudiese tener, podrán ser informados si lo requieren, con objeto de disponer de nuevos conocimientos o cautelar potenciales complicaciones que puedan afectar sus tratamientos con medicamentos.

Voluntariedad y Revocación: Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador (mediante un formulario de revocación del consentimiento opcional) y a su médico tratante, sin que ello signifique sanciones o pérdida de beneficios en nuestra institución o modificaciones en el tratamiento habitual 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.



Derechos del participante: Usted recibirá una copia de este documento firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con:

Luis Quiñones S. Teléfono: 29770741 o 90158341, mail: lquinone@med.uchile.cl

Matías Martínez Olguín. Teléfono: 9 1817236, mail: matiasmartinez@ug.uchile.cl

Otros Derechos del participante

En caso de duda sobre sus derechos comunicarse con el Comité Ético Científico o de Investigación del Hospital Clínico Universidad de Chile, Teléfono: 229789008, Email: comiteetica@hcuch.cl, ubicado en Santos Dumont N° 999, 4 Piso Sector D, Comuna de Independencia, Santiago.

Este estudio cuenta, además, con la aprobación del Comité de Ética Científico del Instituto Oncológico de la Fundación Arturo López Pérez y del CEC del S.S.M. Oriente.

Presidente Comité ético científico FALP:

Dra. Eva Bustamante, +569 7 499 57 45

Presidenta CEC S.S.M. Oriente:

Dra. Sara Chernilo S. 225756735

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 "Estudio de la asociación entre polimorfismos genéticos y la respuesta clínica a antibióticos en pacientes con tratamiento antineoplásico".

Nombre del participante o testigo: _____

RUT _____ Firma _____ Fecha _____

Nombre del Investigador designado _____

RUT _____ Firma _____ Fecha _____

Nombre del Delegado del Director o Ministro de Fe _____

RUT _____ Firma _____ Fecha _____



13.3 Anexo 3. Acta de aprobación del proyecto por Comité de Ética Científico del Servicio de Salud Metropolitano Oriente.



Servicio de Salud Metropolitano Oriente
Comité de Ética Científico

PROTOCOLO DE APROBACIÓN DE PROYECTOS CLÍNICOS

Con fecha 04 de Julio de 2017, el CEC del S.S.M. Oriente analizó y aprobó el Proyecto de Investigación, patrocinado por la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, titulado:

“Estudio de la asociación entre polimorfismos genéticos y la respuesta clínica a β -Lactámicos y Quinolonas, y susceptibilidad a infecciones en pacientes con tratamiento antineoplásico”,

y que conducirá como Investigador Principal QF **Matías Martínez O.** y la tutoría del **Dr. Luis Quiñones S.**, para ser llevado a cabo en la **Fundación Arturo López Pérez** ubicada en Rancagua 878, Providencia, Santiago de Chile.

Se analizó y aprobó los siguientes documentos del Proyecto:

- Proyecto de Investigación in extenso “Estudio de la asociación entre polimorfismos genéticos y la respuesta clínica a β -Lactámicos y Quinolonas, y susceptibilidad a infecciones en pacientes con tratamiento antineoplásico”,
- Consentimiento Informado para el estudio, “Estudio de la asociación entre polimorfismos genéticos y la respuesta clínica a β -Lactámicos y Quinolonas, y susceptibilidad a infecciones en pacientes con tratamiento antineoplásico”, Versión 2.0, fechado por el CEC del S.S.M. Oriente el 04 de Julio de 2017.

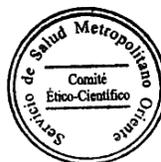
Tomó conocimiento de:

- Carta de compromiso del Tutor Dr. Luis Quiñones Sepúlveda, de fecha 05 de Mayo de 2017.
- Carta de compromiso del Investigador Principal de fecha 05 de Mayo de 2017.
- Autorización del Dr. Hugo Marsiglia, Director Médico de la Fundación Arturo López Pérez (FALP) de fecha 14 Junio 2017.
- CV del Investigador Principal: QF Matías Martínez Olguín.

Envío a usted la nómina de los miembros permanentes del CEC del S.S.M. Oriente al 04 de Julio de 2017:

Dra. Sara Chernilo S.	Broncopulmonar (Presidente)	Inst. Nacional del Tórax
Dra. M. Esther Meroni L.	Geriatra (Secretaria)	Inst. Nac. de Geriatria
Dr. Ricardo Vacarezza	Asesor en Bioética	No institucional
EU Elena Núñez M.	Coordinadora	No institucional
Dr. Carlos Rey C.	Cardiólogo	Hospital del Salvador
Dr. Rómulo Melo Monsalve	Neurocirujano	Inst. Nac. de Neurocirugia
Dr. Manuel Sedano Lorca	Gineco-Obstetra	Hospital Dr. Luis Tisné
Dr. Lientur Taha M.	Neurocirujano	Inst. Nac. de Neurocirugia
Dr. Jorge Plasser Troncoso	Cirujano- Oncólogo	Hospital del Salvador
Sra. Angélica Sotomayor	Abogado	No institucional
Sr. Hugo Gutiérrez Guerra	Miembro de la Comunidad	No institucional


Dra. María Esther Meroni Layes
 Secretaria



Santiago, 04 de Julio de 2017

13.4 Anexo 4. Aprobación Comité Ético Científico del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

ACTA DE APROBACION N° 42

Santiago, 18 julio de 2018.

El Comité Ético Científico o de Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Sra. Verónica Anguita Mackay. Presidente
Dra. Ana María Madrid S. Médico Gastroenterólogo. Vicepresidente
Dr. Sergio Valenzuela P. Médico Gineco-Obstetra
Dr. Juan Carlos Prieto D. Médico Farmacología Clínica
Srta. Rina Sepúlveda A. Abogado.
Dra. Gloria López Stewart. Médico Endocrinóloga.
Dra. Teresa Massardo Vega. Médico Cirujano.
Dr. Juan Jorge Silva. Médico Cirujano.
Dr. Luis Michea Acevedo. Médico Cirujano.
Dra. Aída Verónica Araya. Médico Endocrinóloga.
Srta. María Gloria Montalva Herrerros. Miembro de la comunidad.

Ha analizado el Proyecto: "**Estudio de la asociación entre polimorfismos genéticos y la respuesta clínica a β -Lactámicos y Quinolonas y susceptibilidad a infecciones en pacientes con tratamiento antineoplásico**", cuyo investigador principal es el Dr. Luis Quiñones Sepúlveda de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Participa como investigadora responsable de proyecto, la Dra. Fernanda Avila Oesterle, de la Sección de Infectología. El proyecto será realizado en esta misma sección del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Para estos efectos se tuvo a la vista los siguientes documentos:

- Carta de presentación a Comité
- Formulario de Solicitud para Evaluación de Proyectos.
- Curriculum vitae del investigador.
- Carta de compromiso del investigador.
- Protocolo de estudio.
- Documento de Consentimiento Informado Casos Versión 1.0, fechado mayo de 2018.
- Documento de Consentimiento Informado Controles Versión 2.0, fechado mayo de 2018.
- Revocación del Consentimiento Informado Versión 1.0, fechado mayo de 2018.

El Proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres humanos CIOMS 2002, de las Guías de Buenas Prácticas Clínicas de ICH y Normativa Nacional Vigente.



a) Carácter de la población estudiada

No cautiva, no terapéutica.

b) Utilidad del Proyecto

Adecuada.

c) Riesgos

Controlados.

d) Beneficios

Adecuados.

e) Confidencialidad del Estudio

El investigador principal asegura la confidencialidad de todos los datos.

Por lo tanto, el Comité estima que el Estudio propuesto estuvo bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores.

Los consentimientos informados son adecuados en forma y fondo.

En virtud de las consideraciones anteriores, el Comité otorga la Aprobación Ética para la realización del Estudio propuesto el día 18 de julio de 2018, la que se extiende por un plazo de 12 meses a contar de esta fecha. Se adjunta nómina de los integrantes del Comité presentes en la sesión y Declaración de Cumplimiento de las Buenas Prácticas Clínicas.

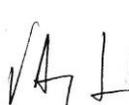
Se debe tener presente que se debe realizar:

- Envío para aprobación o toma de conocimiento de nueva documentación relacionada al estudio.
- Cambio en los Delegados del Director de la Institución.
- Notificación de reacciones adversas serias o no serias, en que las serias deben ser notificadas en un plazo de 72 horas hábiles de ocurrido el evento.
- Enviar anualmente avances del Proyecto.
- Solicitud de Extensión de plazo de aprobación.
- Enviar Informe Final del Proyecto.

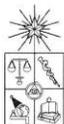
Los ítems mínimos que deben contener los informes semestrales y finales, son los siguientes:

- Cumplimiento de los objetivos
- Numero de Sujetos enrolados
- Número y motivo de los sujetos que abandonan o se retiran

Saluda atentamente a Ud.




Verónica Anguita Mackay
Presidente del Comité Ético Científico
Hospital Clínico Universidad de Chile



- 13.5 Anexo 5. Publicación derivada de esta tesis: IL-6 -572C>G and CARD8 304T>A Genetic Polymorphisms are Associated with the Absolute Neutrophil Count in Patients with Hematological Malignancies Under Chemotherapy: An Application of Multilevel Models to a Preliminary Pharmacogenetic Study. Pharmacogenomics and personalized medicine. 2020. 337-343. DOI: <https://doi.org/10.2147/PGPM.S261208>.

IL-6 -572C>G and CARD8 304T>A Genetic Polymorphisms are Associated with the Absolute Neutrophil Count in Patients with Hematological Malignancies Under Chemotherapy: An Application of Multilevel Models to a Preliminary Pharmacogenetic Study

This article was published in the following Dove Press journal:
Pharmacogenomics and Personalized Medicine

Matías F Martínez,^{1,2} Enzo Alveal,¹ Tomás G Soto,^{1,2} Eva I Bustamante,³ Fernanda Ávila,⁵ Shrikant I Bangdiwala,^{6,7} Ivonne Flores,⁴ Claudia Benavides,⁴ Ricardo Morales,⁸ Nelson M Varela,^{1,2} Luis A Quiñones^{1,2}

¹Laboratory of Chemical Carcinogenesis and Pharmacogenetics (CQF), Department of Basic and Clinical Oncology (DOBO), Faculty of Medicine, University of Chile, Santiago, Chile; ²Latin American Network for the Implementation and Validation of Pharmacogenomic Clinical Guidelines (RELNAF-CYTED), Madrid, Spain; ³Departamento de Ciencias Básicas Santiago, Facultad de Ciencias, Universidad Santo Tomás, Santiago, Chile; ⁴Cancer Institute Arturo López Pérez Foundation, Santiago, Chile; ⁵Infectology Section, Medicine Department, Clinical Hospital of the University of Chile, Santiago, Chile; ⁶Population Health Research Institute, McMaster University, Hamilton, ON, Canada; ⁷Department of Health Research Methods, Evidence, and Impact, McMaster University, Hamilton, ON, Canada

Correspondence: Luis A Quiñones; Nelson M Varela
Laboratory of Chemical Carcinogenesis and Pharmacogenetics (CQF), Department of Basic and Clinical Oncology (DOBO), Faculty of Medicine, University of Chile, Santiago, Chile
Tel +56-2-29770741;
Tel +56-2-29770743
Email lquinone@med.uchile.cl; nvarela@med.uchile.cl

Purpose: Neutropenia is a common event in patients undergoing cytotoxic chemotherapy for the treatment of a hematological malignancy. Some polymorphisms, as *IL-6* -572C>G (rs1800796), *IL-1β* -31 G>A (rs1143627), and *CARD8* 304T>A (rs2043211), in genes related to the inflammatory process, could affect the level of absolute neutrophil count (ANC) after chemotherapy. Since an efficient inflammatory process enhances neutrophil survival, we hypothesize that these polymorphisms are associated with ANC.

Patients and Methods: We carried out a prospective cohort study in two hospitals in Santiago, Chile. The patients included were adults diagnosed with acute myeloblastic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, or non-Hodgkin's lymphoma, undergoing cytotoxic chemotherapy. We use a multilevel linear regression model to test our hypothesis. The best model was selected using the Akaike's information criterion (AIC).

Results: We analyzed 1726 hemograms and ANCs from 172 hospitalizations from 32 patients. The results show that CC and CG genotypes of *IL-6* -572 C>G polymorphism are associated with higher ANCs compared with the GG genotype (Ln (ANC) ~ 0.81 IC95% 0.02–1.55). Similarly, TT and AT genotypes of *CARD8* 304T>A polymorphism were related to higher ANCs compared with AA (Ln (ANC) ~ 0.95 IC95% 0.02–1.82). *IL-1β* genetic polymorphism had no statistically significant association with ANC.

Conclusion: *IL-6* rs1800796 -572C>G and *CARD8* rs2043211 304T>A polymorphisms are associated with the absolute neutrophil count in patients undergoing cytotoxic chemotherapy for treatment of hematological malignancies. Our findings might be useful to improve the safety of chemotherapy through predictive ANC models.

Keywords: pharmacogenetics, neutropenia, hematological neoplasms, leukemia, lymphoma, interleukin-6, CARD8 protein

Introduction

The primary treatment of hematological malignancies (HM) is cytotoxic chemotherapy, whose goal is to suppress the bone marrow to make the cancer cells disappear or to avoid the formation of new ones. Severe neutropenia, defined as an absolute neutrophil count (ANC) lower than 500 cells/mm³,¹ is common in these

patients (30% prevalence) and makes them more susceptible to life-threatening infections (11% of mortality).^{2,3} The earlier neutropenia starts, and the longer it lasts, the higher the risk.^{1,4,5} Currently, it is not possible to predict the value of ANC, so we cannot know the start or length of neutropenia.

Chemotherapy involves inflammation due to cell destruction; neutrophils maturation, release, and survival depend on an efficient response.^{6,7} Some proteins involved in the inflammatory response, as Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 1 β (IL-1 β), and caspase recruitment domain family, member 8 (CARD8), had polymorphic variants that can explain the interindividual variability of chemotherapy.

IL-6 participates in the regulation of hematopoiesis, inflammation, and immune response,^{8,9} and stimulates the production and mobilization of neutrophils in the bone marrow.^{10,11} Moreover, CARD8 is a crucial component in the regulation of nuclear signaling and the activation of IL-1 β .¹² The reduced expression of IL-1 β and IL-1R and the structural alteration of CARD attenuate the immune system through poor neutrophil recruitment.¹³

An essential problem in pharmacogenetic studies, particularly in developing countries, is to reach an appropriate sample size for robust results. However, there are statistical methods that allow making preliminary and well-controlled analyses, whether enough information from every patient is available. Multilevel models (MM) allow us to analyze repeated measures and grouped data in a reduced sample of patients.

We hypothesize that genetic polymorphisms on *IL-6*, *IL-1 β* , and *CARD8* are associated with the ANC value in patients with HM receiving cytotoxic drugs using an MM to control by correlation and confounding variables.

Patients and Methods

We carried out a prospective cohort study from October 2017 to November 2018 at the Oncologic Hospital “Fundación Arturo Lopez Pérez” (FALP) and the Clinical Hospital of the University of Chile (HCUCH) in Santiago, Chile.

We included adult patients diagnosed with acute myeloblastic leukemia, acute lymphoblastic leukemia or non-Hodgkin’s lymphoma, and had neutropenia after cytotoxic chemotherapy. They were enrolled before the first chemotherapy cycle and followed up during everyone. We excluded patients regularly taking immunosuppressive

medication, pregnant women, and patients with a diagnosis of immunodeficiency.

ANC was treated as a continuous variable, and it was obtained from hemograms directly when the laboratory provided it. When not provided, it was calculated using the following formula:¹⁴

$$ANC = \text{White blood cells count} * \left(\frac{(\% \text{ polymorphonuclear neutrophils} + \% \text{ bands})}{100} \right)$$

All patients signed a written informed consent and an agreement to participate in this study. The study was carried out following the strict ethical procedures recommended by the Ethics Committee of the Clinical Hospital of the University of Chile (approval received on July 18th, 2018) and the Eastern Metropolitan Health Service (approval received on July 4th, 2017), following the procedures suggested in the Declaration of Helsinki, with Chilean Laws 20.120, 20.584 and 19.628 and with the guidelines of the Good Clinical Practices.

Genotyping Analysis

DNA was isolated from peripheral blood samples using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Catalog Number, 11,796,828,001; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

IL-6 rs1800796, *IL-1 β* rs1143627, and *CARD8* rs2043211 polymorphism were analyzed using TaqMan[®] SNP Genotyping Assay (Catalog number, 4,362,691; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) in a Stratagene Mx3000p real-time PCR system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States). Every sample was analyzed in triplicate to ensure reliability (Laboratory Protocol [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bfuujnww](https://doi.org/10.17504/protocols.io.bfuujnww)).

Statistical Analysis

We use a multilevel linear regression model, which allowed us to account for intraindividual variability regarding the chemotherapy scheme and cycle and to use correlated outcome data. The unit of observation was the ANC, not the patient.

Our MM had four levels¹⁵ (Table 1), 1) “Patient,” the upper level, where genetic variables were assessed; 2) “Scheme” with eight possibilities, depending on the treatment; 3) “cycle” level and 4) “time” level, where the daily ANC and the administration of Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) were measured. Moreover,

Table 1 Multilevel Diagram

Name of Level	Subscript to Index the Level	Member Categories in Each Level	Variables Measured on Each Member of the Level
Patient	$i = 1, \dots, 32$	ID (1–32)	Diagnosis, IL-6 Genotype, IL-1 β Genotype, CARD8 Genotype, Hospital
Scheme	$j = 1, \dots, 9$	<ul style="list-style-type: none"> • Hyper CVAD phase I^a, • Hyper CVAD phase II^b, • 15–30 induction^c, • 15–30 consolidation^d, • 3 + 7 (induction)^e, • Cytarabine (consolidation), • R BAC^f, • FLAG – Ida^g, • ARCHIMBAUD^h 	No variables measured at this level
Cycle	$k = 1, \dots, 6$	Cycle (1–6)	No variables measured at this level
Time	$t = 0, \dots, 50$	Day (0–50)	ANC _{15t} , G-CSF _{15t} , G-CSFxDay _{15t} , G-CSFxHospital _{15t}

Notes: The Multilevel diagram shows the organization of data, the lower level is contained or nested in the upper level, ie, every patient could have different schemes, every scheme could have different cycles, and in every cycle, there are several time measurements. The multilevel diagram also indicates what explanatory variables are measured at each level. ^aHyper CVAD phase I: cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, dexamethasone. ^bHyper CVAD phase II: methotrexate, cytarabine. ^c15–30 induction: dexamethasone, vincristine, daunorubicin, L-asparaginase. ^d15–30 consolidation: 6-mercaptopurine, cyclophosphamide, cytarabine, vincristine, L-asparaginase. ^e3 + 7 (induction): cytarabine, daunorubicin. ^fR BAC: rituximab, bendamustine, cytarabine. ^gFLAG – Ida: fludarabine, Ara-C (cytarabine), G-CSF, idarubicin. ^hARCHIMBAUD: mitoxantrone, cytarabine, etoposide. G-CSFxDay: Interaction between the administration of G-CSF and the time. G-CSFxHospital: Interaction between the administration of G-CSF and the hospital where it was administered.

Abbreviations: IL6, Interleukin 6; CARD8, caspase recruitment domain family, member 8; ANC, absolute neutrophil count; G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor.

Table 2 Absolute Neutrophil Count by Genotype and Therapeutic/Morbid Characteristics

	Total	IL6 GG	IL6 CC/CG	p – value	CARD8 AA	CARD8 TT/TA	p-value
ANC Mean \pm SD ANC Median (IQR)	1726.1 \pm 90.6 326 (0–1980)	1299.3 \pm 175.7 207 (0–1420)	1798.2 \pm 108.1 407 (0–2184)	0.038 ^{††}	1424.3 \pm 93.1 146.5 (0–1980)	2059.8 \pm 155.3 418 (0–1997)	0.001 ^{††}
Diagnosis, ANC Mean \pm SD • ALL • AML • NHL	1784.5 \pm 3431.2 1042.0 \pm 2078.9 3183.1 \pm 6112.9	1530.0 \pm 355.1 1139.5 \pm 205.4 2171.4 \pm 459.1	1842.4 \pm 154.9 1015.0 \pm 75.2 3463.7 \pm 396.2	0.404 [†] 0.487 [†] 0.103 [†]	2207.2 \pm 354.4 889.9 \pm 75.1 2382.4 \pm 210.1	1660.0 \pm 151.8 1270.1 \pm 145.1 3749.4 \pm 534.8	0.107 ^{††} 0.012 ^{††} 0.039 ^{††}
Scheme, ANC Mean \pm SD • Hyper CVAD phase I ^a • Hyper CVAD phase II ^b • 15 – 30 induction ^c • 15 – 30 consolidation ^d • 3 + 7 (induction) ^e • Cytarabine (consolidation) ^f • R BAC ^f • FLAG – Ida ^g	3348.9 \pm 7001.1 2177.7 \pm 3887.4 450.1 \pm 589.0 1436.3 \pm 1886.8 1095.8 \pm 2778.1 1225.9 \pm 1852.2 2602.3 \pm 2255.2 585.4 \pm 1545.9	2497.4 \pm 1146.0 2888.4 \pm 647.4 292.0 \pm 64.1 1655.5 \pm 500.0 1019.0 \pm 192.2 1340.6 \pm 202.3 372.7 \pm 160.4	3434.4 \pm 461.2 2035.1 \pm 199.7 586.0 \pm 95.8 894.1 \pm 167.6 1275.8 \pm 102.5 2857.4 \pm 243.7 645.2 \pm 166.3	0.533 [†] 0.109 [†] 0.016 ^{††} 0.064 [†] 0.263 [†] 0.007 ^{††} 0.404 [†]	2041.3 \pm 502.9 2358.1 \pm 396.7 445.1 \pm 146.9 633.9 \pm 143.3 1216.0 \pm 111.8 2857.4 \pm 243.7 296.4 \pm 116.7	3743.8 \pm 538.7 2114.8 \pm 229.7 451.7 \pm 65.9 1796.1 \pm 392.3 1239.6 \pm 151.4 1340.6 \pm 202.3 715.5 \pm 186.8	0.096 ^{††} 0.5932 ^{††} 0.963 ^{††} 0.002 ^{††} 0.898 ^{††} 0.007 ^{††} 0.150 ^{††}

Notes: [†]p-value <0.05. ^{††}Tested using the Mann-Whitney test ^{†††}Tested using an independent samples t-test. ANC: absolute neutrophil count. ALL: acute lymphoblastic leukemia. AML: acute myeloblastic leukemia. NHL: non-Hodgkin's lymphoma. ^aHyper CVAD phase I: cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, dexamethasone. ^bHyper CVAD phase II: methotrexate, cytarabine. ^c15 – 30 induction: dexamethasone, vincristine, daunorubicin, L-asparaginase. ^d15 – 30 consolidation: 6-mercaptopurine, cyclophosphamide, cytarabine, vincristine, L-asparaginase. ^e3 + 7 (induction): cytarabine, daunorubicin. ^fR BAC: rituximab, bendamustine, cytarabine. ^gFLAG – Ida: fludarabine, Ara-C, G-CSF, idarubicin. ^hARCHIMBAUD: mitoxantrone, cytarabine, etoposide.

Abbreviations: SD, standard deviation; IQR, interquartile range; IL6, Interleukin 6; CARD8, caspase recruitment domain family, member 8.

normal levels. This polynomial fit is the best model to explain the curve of neutrophils after chemotherapy administration (Supplementary Table 1).

The interaction of time with the G-CSF administration had a positive association, indicating that, while time increases, the medication's effect is more significant due to the effect reaches its maximum some days after the first dose.^{23,24} Besides, the negative association between hospitals and G-CSF administration may be explained because, at HCUCH, G-CSF was used at the beginning of the neutropenia period, whereas at FALP, toward the end of the period; hence, it was more common to have lower levels of ANC during medication administration at HCUCH than at FALP.²⁵

Multilevel modeling allows us to work with correlated data and meets the assumption of linear regression, generating a proper way to obtain more reliable results. However, despite our analysis, the main limitation of this study is the small sample size, because it does not allow carry out combinatorial analyses; the low number of patients examined could mask potential associations, especially for low-frequency polymorphisms. Thus, our results should be used only to help to demonstrate the association between ANC and polymorphisms, not the effect in the outcome. Moreover, future studies should consider the effect of other actors in the inflammatory response and also focus on a specific chemotherapy scheme or diagnosis.

In the future, our results could be used to generate or improve predictive models to enhance the safety of chemotherapy for HM. Prediction of the ANC lower than 500 cells/mm³ could help to improve antimicrobial prophylaxis, preventive isolation, and early discharge, decreasing the morbidity of patients and improving their quality of life.

Conclusion

In conclusion, *IL-6* -572 C>G polymorphism was associated with a lower neutrophil count, similarly to *CARD8* 304T>A polymorphism. Non-genetic factors associated were the administration of G-CSF, the hospital, and the time. The multilevel analysis allows us to manage correlated data and to have more reliable results.

Acknowledgments

We acknowledge to oncologic hematology department of the Hospital Clínico de la Universidad de Chile, mainly to Rebeca Aguayo.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Klastersky J, De Naurois J, Rolston K, et al. Management of febrile neutropenia: ESMO clinical practice guidelines. *Ann Oncol*. 2016;27(suppl_5):v111-v118. doi:10.1093/annonc/mdw325
- Yılmaz Ş, Ören H, Demircioğlu F, I' Rken G. Assessment of febrile neutropenia episodes in children with acute leukemia treated with BFM protocols. *Pediatr Hematol Oncol*. 2008;25(3):195-204. doi:10.1080/08880010801938231
- Castagnola E, Fontana V, Caviglia I, et al. A prospective study on the epidemiology of febrile episodes during chemotherapy-induced neutropenia in children with cancer or after hemopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2007;45(10):1296-1304. doi:10.1086/522533
- Lehrnbecher T, Robinson P, Fisher B, et al. Guideline for the management of fever and neutropenia in children with cancer and hematopoietic stem-cell transplantation recipients: 2017 update. *J Clin Oncol*. 2017;35(18):2082-2094. doi:10.1200/JCO.2016.71.7017
- Taplitz RA, Kennedy EB, Bow EJ, et al. Outpatient management of fever and neutropenia in adults treated for malignancy: American Society of Clinical Oncology and Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2018;36(14):1443-1453. doi:10.1200/JCO.2017.77.6211
- van der Most RG, Currie AJ, Robinson B, Lake RA. Decoding dangerous death: how cytotoxic chemotherapy invokes inflammation, immunity or nothing at all. *Cell Death Differ*. 2008;15(1):13. doi:10.1038/sj.cdd.4402255
- Vyas D, Lagut G, Vyas AK. Chemotherapy-enhanced inflammation may lead to the failure of therapy and metastasis. *Oncol Targets Ther*. 2014;7:1015. doi:10.2147/OTT.S60114
- Rose-John S, Winthrop K, Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(7):399. doi:10.1038/nrrheum.2017.83
- Wilkinson AN, Gartlan KH, Kelly G, et al. Granulocytes are unresponsive to IL-6 due to an absence of gp130. *J Immunol*. 2018;200(10):3547-3555. doi:10.4049/jimmunol.1701191
- Chiba Y, Mizoguchi I, Hasegawa H, et al. Regulation of myelopoiesis by proinflammatory cytokines in infectious diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(8):1363-1376. doi:10.1007/s00018-017-2724-5
- Panayides A, Ioakeimidou A, Karmouzou V, et al. -572 G/C single nucleotide polymorphism of interleukin-6 and sepsis predisposition in chronic renal disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(12):2439-2446. doi:10.1007/s10096-015-2500-0
- Gros Lambert M, Py BF. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. *J Inflamm Res*. 2018;11:359. doi:10.2147/JIR.S141220
- Miller LS, Pietras EM, Uricchio LH, et al. Inflammasome-mediated production of IL-1 β is required for neutrophil recruitment against *Staphylococcus aureus* in vivo. *J Immunol*. 2007;179(10):6933-6942. doi:10.4049/jimmunol.179.10.6933
- Al-Gwaiz LA, Babay HH. The diagnostic value of absolute neutrophil count, band count and morphologic changes of neutrophils in predicting bacterial infections. *Med Princ Pract*. 2007;16(5):344-347. doi:10.1159/000104806
- Bangdiwala SI. The multilevel diagram. *Int J Inj Contr Saf Promot*. 2012;19(4):388-390. doi:10.1080/17457300.2012.734040
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *arXiv Preprint arXiv*. 2014.
- Friberg LE, Henningsson A, Maas H, Nguyen L, Karlsson MO. Model of chemotherapy-induced myelosuppression with parameter consistency across drugs. *J Clin Oncol*. 2002;20(24):4713-4721. doi:10.1200/JCO.2002.02.140

18. Akpek G, Knight RD, Wright DG. Use of oral mucosal neutrophil counts to detect the onset and resolution of profound neutropenia following high-dose myelosuppressive chemotherapy. *Am J Hematol*. 2003;72(1):13–19. doi:10.1002/ajh.10250
19. Sharma A, Singh K, Biswas A, et al. Impact of interleukin 6 promoter polymorphisms (-174 G> C,-572 G> C and-597 G> A) on plasma IL-6 levels and their influence on the development of DVT: a study from India. *Hematology*. 2018;23(10):833–838. doi:10.1080/10245332.2018.1483546
20. Lok LS, Farahi N, Juss JK, et al. Effects of tocilizumab on neutrophil function and kinetics. *Eur J Clin Invest*. 2017;47(10):736–745. doi:10.1111/eci.12799
21. Paramel G, Sirsjö A, Fransén K. Role of genetic alterations in the NLRP3 and CARD8 genes in health and disease. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:1–10. doi:10.1155/2015/846782
22. Pathan N, Marusawa H, Krajewska M, et al. TUCAN, an antiapoptotic caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer. *J Biol Chem*. 2001;276(34):32220–32229. doi:10.1074/jbc.M100433200
23. Melhem M, Delor I, Pérez Ruixo JJ, et al. Pharmacokinetic–pharmacodynamic modelling of neutrophil response to G-CSF in healthy subjects and patients with chemotherapy-induced neutropenia. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(5):911–925. doi:10.1111/bcp.13504
24. Craig M, Humphries AR, Nekka F, Bélair J, Li J, Mackey MC. Neutrophil dynamics during concurrent chemotherapy and G-CSF administration: mathematical modelling guides dose optimisation to minimise neutropenia. *J Theor Biol*. 2015;385:77–89. doi:10.1016/j.jtbi.2015.08.015
25. Ludwig H, Bokemeyer C, Aapro M, et al. Chemotherapy-induced neutropenia/febrile neutropenia prophylaxis with biosimilar filgrastim in solid tumors versus hematological malignancies: MONITOR-G-CSF study. *Future Oncol*. 2019;15(8):897–907. doi:10.2217/fon-2018-0814

Pharmacogenomics and Personalized Medicine

Dovepress

Publish your work in this journal

Pharmacogenomics and Personalized Medicine is an international, peer-reviewed, open access journal characterizing the influence of genotype on pharmacology leading to the development of personalized treatment programs and individualized drug selection for improved safety, efficacy and sustainability. This journal is indexed

on the American Chemical Society's Chemical Abstracts Service (CAS). The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/pharmacogenomics-and-personalized-medicine-journal>

