

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

**“DETECCIÓN DE SNP EN GENES *CYP2C8* DE  
PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA QUE  
RECIBEN PACLITAXEL EN EL INSTITUTO  
NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS  
DE MARZO A DICIEMBRE 2013”**

TESIS

Para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutica

AUTOR

Carol Nathali Flores Fernández

ASESOR

Víctor Izaguirre Pasquel

Lima – Perú

2014

**Este trabajo de tesis está dedicado:**

*A mis padres Marilú y Pedro  
con mucho amor y gratitud  
por su sacrificio y el apoyo incondicional  
que siempre me han brindado.*

*A mis hermanos Mary y Cristhian  
a quienes quiero mucho y agradezco por enseñarme  
que a pesar de las dificultades que se nos presenten  
la vida está siempre llena de oportunidades y sueños.*

*A Erald  
por ser mi compañero y amigo  
y apoyarme en cada uno de mis proyectos.*

## **Agradecimientos**

*A Dios por ser mi guía y fortaleza para conseguir cada uno de los objetivos que me he trazado y porque sin el nada sería posible.*

*A la Virgen de la Puerta por cuidarme y protegerme siempre.*

*Al Dr. Víctor Izaguirre Pasquel por su confianza para desarrollar esta investigación.*

*Un agradecimiento especial a la Dra. Amparo Zavaleta Pesantes por fomentar en mí la investigación, por su paciencia y por sus enseñanzas tanto en lo profesional como en lo personal.*

*Al Dr. Carlos Castañeda Altamirano por el apoyo durante la ejecución de la presente investigación.*

***Este proyecto fue financiado parcialmente por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y por el Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.***

## ABREVIATURAS

<b>SNP:</b>	Polimorfismo de Nucleótido Simple
<b>INEN:</b>	Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas
<b>ADN:</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>BCI:</b>	<i>Bacillus caldolyticus</i>
<b><i>Pdml (Xmnl):</i></b>	<i>Pseudomonas diminuta</i>
<b>TGP:</b>	Transaminasa Glutámico Pirúvica
<b>TGO:</b>	Transaminasa Glutámico Oxalacética
<b>PCR:</b>	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
<b>RFLP:</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción)
<b>U:</b>	Unidades
<b>MINSA:</b>	Ministerio de Salud
<b>CDIS:</b>	Carcinoma Intraductal <i>In Situ</i>
<b>CLIS:</b>	Carcinoma Lobulillar <i>In Situ</i>
<b>CDI:</b>	Carcinoma Ductal Infiltrante
<b>CLI:</b>	Carcinoma Lobulillar Infiltrante
<b>AJCC:</b>	American Joint Committee on Cancer (Comité Americano Conjunto sobre el Cáncer)
<b>UICC:</b>	Union for International Cancer Control (Unión para el Control Internacional del Cáncer)
<b>C<sub>máx</sub>:</b>	Concentración Plasmática Máxima
<b>AUC:</b>	Concentración del Área Bajo la Curva
<b>ARN<sub>m</sub>:</b>	Ácido Ribonucleico Mensajero

<b>EDTA:</b>	Etilen Diamino Tetra Acético
<b>TBE:</b>	Tris Borato EDTA
<b>MP:</b>	Marcador de Peso Molecular
<b>pb:</b>	Pares de Bases
<b>CDS:</b>	Coding DNA Sequence (Secuencia de ADN Codificante)
<b>RE:</b>	Receptor de estrógenos
<b>RP:</b>	Receptor de Progesterona

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue detectar la frecuencia de los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* en genes *CYP2C8* de pacientes con cáncer de mama que recibieron quimioterapia neoadyuvante con paclitaxel en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN). Además, se asoció la presencia de estos SNP con la respuesta terapéutica y la toxicidad. Se incluyó en el estudio 39 mujeres con diagnóstico reciente de cáncer de mama localmente avanzado que acudieron al consultorio de oncología médica del INEN entre marzo y diciembre del 2013, quienes firmaron el consentimiento informado previo a la ejecución del estudio. Se tomaron muestras de sangre venosa para extraer el ADN genómico y se amplificaron regiones específicas del gen *CYP2C8* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores diseñados para detectar el SNP *CYP2C8\*2* en el exón 5 y el SNP *CYP2C8\*3* en el exón 8. Los productos amplificados fueron cortados con las enzimas de restricción *BclI* y *Pdml* (*XmnI*) para *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* respectivamente. La información clínica y patológica de las pacientes se obtuvo de las historias almacenadas en el archivo de historias clínicas del INEN mediante una ficha de recolección de datos. El SNP *CYP2C8\*2* no fue detectado en la población estudiada. El SNP *CYP2C8\*3* fue encontrado en 3 pacientes (7,7 %), dos homocigotos y un heterocigoto, con una frecuencia alélica de 6,4 %. Así mismo, se encontró que 56,5 % de las pacientes presentó neuropatía; 10,3 % leucopenia; 20,5 % anemia; 2,6 % trombocitopenia; 66,7 % incremento de los niveles de TGP y 46,2 % incremento de los niveles de TGO. No se encontró asociación entre el genotipo *CYP2C8\*3* y el riesgo de neuropatía inducida por paclitaxel ( $p > 0,05$ ). Las pacientes que presentaron el

genotipo AA para el SNP *CYP2C8*\*3 (1196 A>G) mostraron diferencias significativas en la reducción del tamaño clínico del tumor y del compromiso ganglionar después de la quimioterapia con paclitaxel ( $p<0,05$ ). Sin embargo, las pacientes con los genotipos AG y GG para este SNP, no mostraron diferencias significativas.

**Palabras clave:** Cáncer de mama, gen *CYP2C8*, SNP, PCR-RFLP.

## SUMMARY

The aim of this study was to detect the frequency of *CYP2C8\*2* and *CYP2C8\*3* single nucleotide polymorphisms (SNP) in *CYP2C8* genes of patients with breast cancer who received neoadjuvant chemotherapy with paclitaxel at the National Institute of Neoplastic Diseases (INEN). Furthermore, the presence of these SNP with therapeutic response and toxicity were associated. In the study were included 39 women with newly diagnosed of locally advanced breast cancer who attended the oncology doctor's office of the INEN between March and December 2013. All the patients signed informed consent before study entry. Venous blood samples were taken to extract the genomic DNA and specific regions of the *CYP2C8* gene were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) with primers designed to detect the *CYP2C8\*2* SNP in exon 5 and *CYP2C8\*3* SNP in exon 8. The amplified products were cut with restriction enzymes *BclI* and *Pdml (XmnI)* for *CYP2C8\*2* and *CYP2C8\*3*, respectively. Clinical and pathological information of the patients was obtained from the medical records stored at the INEN. The *CYP2C8\*2* SNP was not detected in the study population. The *CYP2C8\*3* SNP was found in 3 patients (7.7%), two homozygotes and one heterozygote, with an allele frequency of 6.4%. Also, it was found that 56.5% of patients had neuropathy; 10.3% leukopenia; 20.5% anemia; 2.6% thrombocytopenia; 66.7% increase in ALT levels and 46.2% increase in AST levels. No association between *CYP2C8\*3* genotype and risk of paclitaxel induced neuropathy ( $p > 0.05$ ) was found. The patients who had the AA genotype for *CYP2C8\*3* (1196 A>G) showed significant differences in the reduction of clinical tumor size and nodal involvement after chemotherapy with

paclitaxel ( $p < 0.05$ ). However, patients with AG and GG genotypes for this SNP showed no significant differences.

**Keywords:** Breast cancer, CYP2C8 gene, SNP, PCR-RFLP.



2.2.3.1. Química	29
2.2.3.2. Farmacocinética	30
2.2.3.3. Farmacodinamia	32
2.2.3.4. Reacciones adversas	34
2.2.3.5. Farmacogenética en el tratamiento con paclitaxel	36
2.2.4. Gen <i>CYP2C8</i>	37
2.2.5. Enzima <i>CYP2C8</i>	38
2.2.6. SNP del gen <i>CYP2C8</i>	40
2.2.6.1. <i>CYP2C8</i> *2	41
2.2.6.2. <i>CYP2C8</i> *3	42

### III. METODOLOGÍA

3.1. Lugar de ejecución del estudio	44
3.2. Diseño del estudio	44
3.3. Universo	44
3.4. Materiales	
3.4.1. Población	44
3.4.1.1. Criterios de inclusión	45
3.4.1.2. Criterios de exclusión	46
3.4.2. Muestra biológica	46
3.4.3. Reactivos	46
3.5. Métodos	
3.5.1. Determinación de los SNP <i>CYP2C8</i> *2 y <i>CYP2C8</i> *3 del gen <i>CYP2C8</i>	

3.5.1.1. Extracción de ADN genómico	47
3.5.1.2. PCR-RFLP de los exones 5 y 8 del gen <i>CYP2C8</i>	48
3.5.2. Análisis estadístico	49
<b>IV. RESULTADOS</b>	
4.1. Pacientes	51
4.2. Extracción de ADN genómico	53
4.3. PCR-RFLP del exón 5 del gen <i>CYP2C8</i> para detectar el SNP <i>CYP2C8*2</i>	54
4.4. PCR-RFLP del exón 8 del gen <i>CYP2C8</i> para detectar el SNP <i>CYP2C8*3</i>	55
4.5. Distribuciones genotípicas y alélicas de los SNP <i>CYP2C8*2</i> y <i>CYP2C8*3</i> del gen <i>CYP2C8</i>	59
4.6. SNP <i>CYP2C8*3</i> en relación a la toxicidad y efectividad del paclitaxel	60
4.7. Análisis de secuencias nucleotídicas	
4.7.1. SNP <i>CYP2C8*2</i>	62
4.7.2. SNP <i>CYP2C8*3</i>	65
<b>V. DISCUSIÓN</b>	67
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	70
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	71
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	72
<b>IX. ANEXOS</b>	82

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura N° 1.** Incidencia estimada y mortalidad del cáncer de mama a nivel mundial.
- Figura N° 2.** Incidencia estimada y mortalidad del cáncer de mama en Sudamérica.
- Figura N° 3.** Incidencia estimada y mortalidad de cáncer de mama en Perú.
- Figura N° 4.** Cáncer de mama invasivo e *in situ*. INEN 2010.
- Figura N° 5.** Distribución del cáncer de mama por estadíos. INEN 2010.
- Figura N° 6.** Clasificación de Nottingham del CDIS.
- Figura N° 7.** Clasificación del CLIS.
- Figura N° 8.** Estructura del paclitaxel.
- Figura N° 9.** 10- desacetilbacatin III, precursor del paclitaxel.
- Figura N° 10.** Biotransformación del paclitaxel.
- Figura N° 11.** Ciclo celular y mitosis.
- Figura N° 12.** Estructura de los microtúbulos.
- Figura N° 13.** Mecanismo de acción del paclitaxel.
- Figura N° 14.** Estructura del gen *CYP2C8*.
- Figura N° 15.** Estructura de la enzima *CYP2C8*.
- Figura N° 16.** Secuencia de aminoácidos de la enzima *CYP2C8*.
- Figura N° 17.** Representación esquemática del SNP *CYP2C8*\*2 en el gen *CYP2C8*.
- Figura N° 18.** Representación esquemática del SNP *CYP2C8*\*3 en el gen *CYP2C8*.
- Figura N° 19.** Gel de agarosa 1 % conteniendo el ADN genómico obtenido de pacientes con cáncer de mama participantes en el estudio.
- Figura N° 20.** Gel de agarosa 1,5 % conteniendo el exón 5 del gen *CYP2C8*.

**Figura N° 21.** Detección del SNP *CYP2C8\*2* del gen *CYP2C8*. Electroforesis en el de agarosa 3:1 3 %.

**Figura N° 22.** Gel de agarosa 1,5 % conteniendo el exón 8 del gen *CYP2C8*.

**Figura N° 23.** Detección del SNP *CYP2C8\*3* del gen *CYP2C8*. Electroforesis en el de agarosa 3:1 3,5 %.

**Figura N° 24.** Análisis de la secuencia nucleotídica del exón 5 del gen *CYP2C8*.

**Figura N° 25.** Sitio de restricción de la enzima *BclI* para la identificación del SNP *CYP2C8\*2* en el exón 5 del gen *CYP2C8*.

**Figura N° 26.** Análisis de la secuencia nucleotídica del exón 8 del gen *CYP2C8*.

**Figura N° 27.** Sitio de restricción de la enzima *Pdml (XmnI)* para la identificación del SNP *CYP2C8\*3* en el exón 8 del gen *CYP2C8*.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla N°1.** AJCC. Cancer Staging Handbook: TNM Classification of Malignant Tumors, 7th edition.

**Tabla N° 2.** AJCC. Estadíos clínicos del cáncer de mama.

**Tabla N° 3.** Agentes quimioterápicos y genes con variantes polimórficas asociados con su respuesta.

**Tabla N° 4.** Secuencia nucleotídica de los cebadores del gen *CYP2C8* utilizados.

**Tabla N° 5.** Características clínicas y patológicas de las pacientes con cáncer de mama tratadas con paclitaxel en el INEN de marzo a diciembre 2013.

**Tabla N° 6.** Tamaño de los fragmentos de ADN cortados por las enzimas de restricción según el SNP analizado.

**Tabla N° 7.** Distribución de genotipos y alelos para el SNP *CYP2C8\*2* del gen *CYP2C8* en pacientes con cáncer de mama que reciben paclitaxel.

**Tabla N° 8.** Distribución de genotipos y alelos para el SNP *CYP2C8\*3* del gen *CYP2C8* en pacientes con cáncer de mama que reciben paclitaxel.

**Tabla N° 9.** Pacientes que presentaron neuropatía en diferentes grados según genotipos para el SNP *CYP2C8\*3* (1196 A>G) del gen *CYP2C8*.

## ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO N° 1.** Fármacos metabolizados por CYP2C8.
- ANEXO N° 2.** Ficha de recolección de datos de las pacientes.
- ANEXO N° 3.** Formulario del consentimiento informado para la participación en el estudio de investigación.
- ANEXO N° 4.** Secuencia de los nueve exones del gen *CYP2C8*.
- ANEXO N° 5.** Secuencia del ADN codificante (CDS) del gen *CYP2C8*.
- ANEXO N° 6.** Secuencia de aminoácidos de la proteína CYP2C8.
- ANEXO N° 7.** Esquema de análisis para el SNP *CYP2C8*\*2.
- ANEXO N° 8.** Esquema de análisis para el SNP *CYP2C8*\*3.
- ANEXO N° 9.** Frecuencia alélica de los SNP *CYP2C8*\*2 y *CYP2C8*\*3 en estudios realizados en diferentes poblaciones.

## I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el más frecuente a nivel mundial y constituye la primera causa de muerte en la mujer. En el Perú, es la segunda causa de cáncer en mujeres después del de cuello uterino y constituye la tercera causa de muerte (1). En los últimos 3 años la tasa de mortalidad se ha incrementado a 10,8 por 100 000 y la tasa de incidencia a 34,0 por 100 000 mujeres, siendo Lima y Arequipa los departamentos con mayor incidencia. La casuística del INEN revela que se reciben en promedio 1 200 casos nuevos de cáncer de mama anualmente, siendo los estadios II y III los predominantes en frecuencia (2) (3). Como parte del esquema del tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama localmente avanzado se emplea el paclitaxel, un taxano que actúa estabilizando la polimerización de la tubulina e impidiendo la división celular. Los principales efectos adversos de este fármaco son toxicidad hematológica y neuropatía, los cuales pueden afectar el cumplimiento de la terapia (4). Así mismo, se ha descrito la existencia de una gran variabilidad interindividual en la respuesta terapéutica y toxicidad al paclitaxel y se han propuesto varias causas a esta variabilidad, siendo una la presencia de SNP en el gen que codifica la enzima citocromo P450 2C8 (*CYP2C8*), responsable de metabolizarlo a 6  $\alpha$ -hidroxipaclitaxel, su principal metabolito inactivo (5). Las variantes *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* del gen *CYP2C8* han sido asociados con una actividad catalítica menor de la enzima *CYP2C8* en el metabolismo del fármaco (6). Además, se ha descrito que pacientes que presentan la variante *CYP2C8\*3* tienen mayor probabilidad de lograr respuesta completa, de igual forma mayor riesgo de presentar neurotoxicidad (7).

“Detección de SNP en genes *CYP2C8* de pacientes con cáncer de mama que reciben paclitaxel en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas de marzo a diciembre 2013”.

---

El estudio de estos polimorfismos en el gen *CYP2C8* podría contribuir a individualizar la terapia, optimizando la respuesta y disminuyendo la toxicidad, lo cual tendría un impacto positivo en la reducción de costos en el tratamiento del cáncer. En el Perú, hasta la fecha no se han realizado estudios sobre polimorfismos del gen *CYP2C8* asociados a la quimioterapia con paclitaxel, por lo que en este estudio se busca detectar los SNP *CYP2C8*\*2 y *CYP2C8*\*3 del gen *CYP2C8* en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado que reciben tratamiento neoadyuvante con paclitaxel y determinar la asociación entre la presencia de estos SNP, la respuesta terapéutica y la toxicidad.

## 1.1. OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar la presencia de SNP en genes *CYP2C8* de pacientes con cáncer de mama que reciben paclitaxel del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas de marzo a diciembre 2013.

### Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de los SNP *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* en pacientes con cáncer de mama del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas mediante técnicas moleculares.
2. Determinar si la presencia de los SNP *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* está asociada con alteraciones en la respuesta terapéutica y la toxicidad al paclitaxel, mediante el análisis de datos clínicos y patológicos.

## 1.2. HIPÓTESIS

Las pacientes con cáncer de mama del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas con SNP en el gen *CYP2C8* presentan alteraciones en la respuesta terapéutica y reacciones adversas asociadas a la quimioterapia neoadyuvante con paclitaxel.

## II. GENERALIDADES

### 2.1. Antecedentes

En el 2001, Dai y col, realizaron por primera vez estudios sobre los SNP *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* del gen *CYP2C8*. En un estudio *in vitro* expresaron *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* en *E. coli* y evaluaron la actividad catalítica de estas enzimas en el metabolismo del paclitaxel. Encontraron que *CYP2C8\*2* presentaba dos veces el Km de la enzima de tipo salvaje y generaba un aclaramiento de paclitaxel dos veces menor. *CYP2C8\*3* también presentó un metabolismo defectuoso en el metabolismo del paclitaxel. Además, reportaron una frecuencia alélica para *CYP2C8\*2* de 18 y 0 % en afroamericanos y caucásicos respectivamente. En tanto, la frecuencia alélica para *CYP2C8\*3* fue de 2 y 13 % para afroamericanos y caucásicos respectivamente (8).

En el 2002, Bahadur y col, determinaron la frecuencia del polimorfismo *CYP2C8\*3* del gen *CYP2C8* en una población caucásica y su relación con la 6  $\alpha$ - hidroxilación del paclitaxel. La frecuencia alélica encontrada fue de 15 % y los heterocigotos para *CYP2C8\*3* mostraron actividad 6  $\alpha$ -hidroxilasa significativamente menor en relación a la enzima de tipo silvestre (6).

En el 2004, Martínez y col, reportaron una frecuencia alélica de 17 % para el SNP *CYP2C8\*3* en una población de 355 caucásicos españoles, la cual es mayor con respecto a la reportada en otros estudios (9).

En el 2005, Henningsson y col, realizaron un estudio con 97 pacientes caucásicos diagnosticados con cáncer con el objetivo de evaluar los efectos de las variantes alélicas *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* del gen *CYP2C8* en la farmacocinética del paclitaxel. Las frecuencias alélicas para *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* fueron de 0,7 y 9,2 % respectivamente y se encontró que estas variantes alélicas no explicaban la variabilidad interindividual en la farmacocinética del paclitaxel (4).

En el 2005, Gao y col, en un estudio *in vitro* caracterizaron funcionalmente el SNP 416 G>A (R139K) y el SNP 1196 A>G (K399R) de *CYP2C8\*3* para predecir los efectos dependientes del genotipo en el metabolismo de fármacos. Reportaron que K399R presentó menor actividad en la 6 $\alpha$ -hidroxilación del paclitaxel, mientras que R139K presentó una actividad igual o ligeramente menor en relación a la enzima de tipo salvaje (10).

En el 2007, Bravo-Villalta y col, estudiaron el SNP *CYP2C8\*3* en 102 individuos sudamericanos, entre ellos 5 argentinos, 81 bolivianos, 6 brasileños, 6 chilenos y 4 peruanos. Encontraron que 4 argentinos, 65 bolivianos, 5 brasileños, 6 chilenos y 4 peruanos fueron heterocigotos, mientras que sólo 1 sujeto de Bolivia fue homocigoto para el SNP *CYP2C8\*3* (11).

En el 2009, Kudzi y col, por su relevancia clínica, determinaron la prevalencia de las variantes *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* del gen *CYP2C8* en una población de Ghana constituida por 204 individuos sanos. Las frecuencias alélicas encontradas para *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* fueron de 17 y 0 % respectivamente (12).

En el 2009, Carmona y col, estudiaron las variantes alélicas del gen *CYP2C8* en 33 pacientes colombianos diagnosticados con malaria. Encontraron que sólo 1 de los pacientes fue heterocigoto para el SNP *CYP2C8\*2*, mientras que ninguno de ellos presentó el SNP *CYP2C8\*3* (13).

En el 2011, Leskela y col, estudiaron polimorfismos de los genes *CYP2C8*, *CYP3A4* y *CYP3A5* asociados a neurotoxicidad inducida por paclitaxel en 118 pacientes españoles diagnosticados con cáncer. Reportaron que el SNP *CYP2C8\*3* estaba asociado en forma estadísticamente significativa con un mayor riesgo a neurotoxicidad inducida por paclitaxel (14).

En el 2012, Paganotti y col, estudiaron la distribución del SNP *CYP2C8\*2* en 503 individuos jóvenes de tres poblaciones africanas: Senegal, Uganda y Madagascar. Las frecuencias alélicas reportadas fueron de 22, 10 y 15 % respectivamente. Así mismo, asociaron este SNP con pacientes metabolizadores lentos y el mayor riesgo de éstos a presentar efectos adversos (15).

En el 2012, Minhas y col, determinaron la prevalencia de los polimorfismos *CYP2C8* en una población del norte de la India. Las frecuencias alélicas encontradas para *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* fueron 3 y 4 % respectivamente (16).

En el 2012 y 2013, Hertz y col, encontraron en una población de 109 pacientes que recibían quimioterapia neoadyuvante con paclitaxel, que los pacientes que presentaban el SNP *CYP2C8\*3* del gen *CYP2C8* tenían mayores probabilidades

de lograr respuesta completa, pero también mayor riesgo de neurotoxicidad grave (7). Además, en otro estudio determinaron la asociación entre el SNP *CYP2C8\*3* y el incremento del riesgo de neuropatía en 209 pacientes europeos-americanos y 107 pacientes afroamericanos con cáncer de mama tratados con paclitaxel. Se encontró en ambas poblaciones, que la presencia del SNP *CYP2C8\*3* duplicaba el riesgo de presentar neuropatía inducida por paclitaxel (17).

En el 2013, Yu y col, realizaron un estudio *in vitro* para determinar la influencia de los polimorfismos *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* del gen *CYP2C8* en las diferencias interindividuales de la farmacocinética del paclitaxel. Encontraron que la actividad catalítica de *CYP2C8\*3* en la 6 $\alpha$ -hidroxilación del paclitaxel fue de 64,3 % con respecto a *CYP2C8\*1*, la enzima de tipo salvaje. Así mismo, reportaron que *CYP2C8\*2* presentó menor actividad catalítica que *CYP2C8\*3* (18).

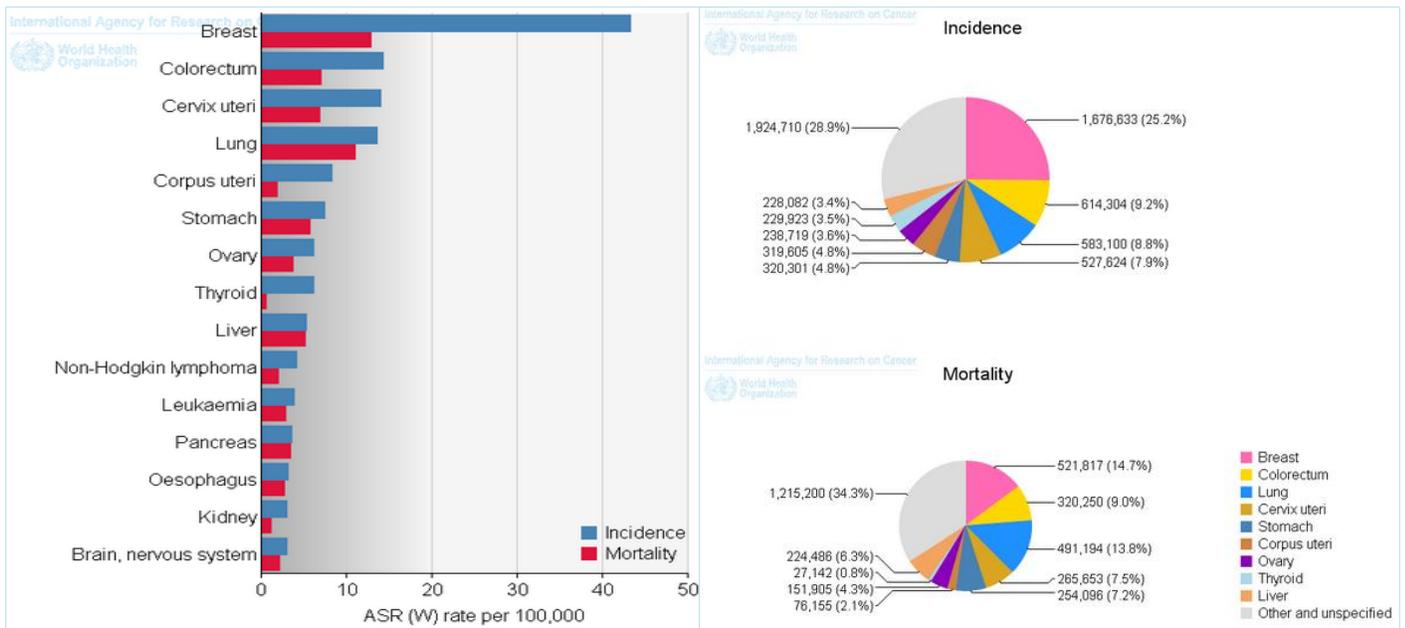
En el 2014, Vicente y col, realizaron un estudio comparativo entre 282 españoles y 297 ecuatorianos mestizos con respecto a polimorfismos en el gen *CYP2C8* entre ellos el SNP *CYP2C8\*3* del gen *CYP2C8*. La frecuencia alélica reportada para este SNP fue de 11,4 y 6,5 % para españoles y ecuatorianos mestizos respectivamente (19).

## 2.2. Marco teórico

### 2.2.1. Cáncer de mama

#### 2.2.1.1. Epidemiología

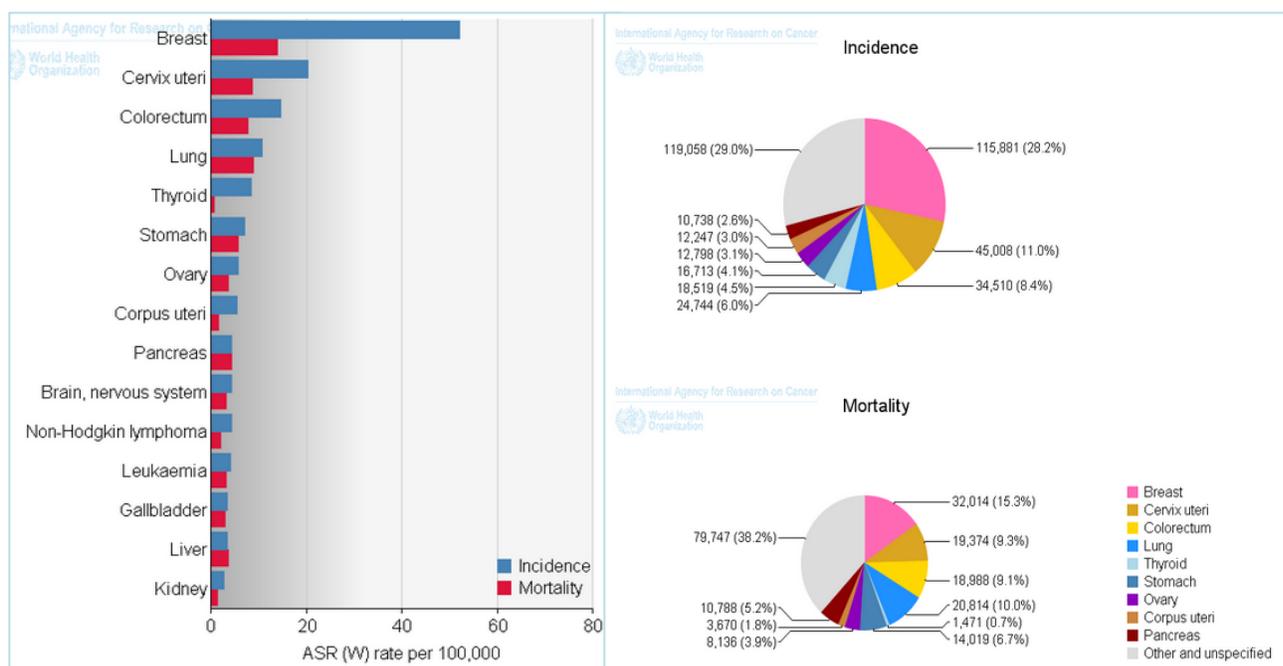
De acuerdo a la GLOBOCAN 2012, el cáncer de mama es el cáncer más frecuente en mujeres a nivel mundial, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, representando el 25,2 % de todos los cánceres femeninos. Así mismo, constituye la primera causa de muerte por cáncer en la mujer. Se estima una tasa de mortalidad estandarizada por edad de 12,9 por 100 000 mujeres y una tasa de incidencia estandarizada por edad de 43,3 por 100 000, lo que se traduciría en que anualmente fallecerían 521 817 (14,7 %) mujeres y se producirían 1 676 633 casos nuevos en mundo (1).



**Figura N° 1.** Incidencia estimada y mortalidad del cáncer de mama a nivel mundial.

Fuente: GLOBOCAN 2012.

En Sudamérica, representa el cáncer femenino más frecuente con un 28,2 % y constituye la primera causa de muerte. Se estima una tasa de mortalidad estandarizada por edad de 14,0 por 100 000 mujeres y una tasa de incidencia estandarizada por edad de 52,0 por 100 000, lo que se traduciría en que anualmente fallecerían 32 014 (15,3 %) mujeres y se producirían 115 881 casos nuevos en este continente (1) (20).

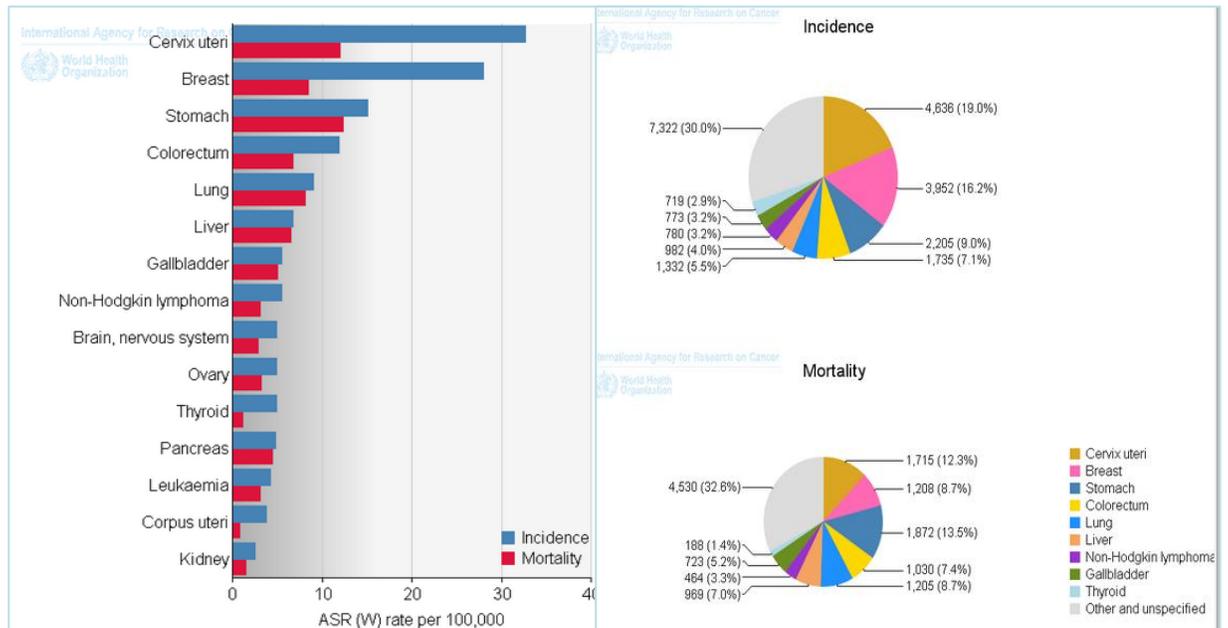


**Figura N° 2.** Incidencia estimada y mortalidad del cáncer de mama en Sudamérica.  
Fuente: GLOBOCAN 2012.

En el Perú, el cáncer de mama es la segunda causa de cáncer en mujeres con 16,6 %, después del cáncer de cérvix según datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud (MINSa). Así mismo, constituye la tercera causa de muerte. Se estima una tasa de mortalidad estandarizada por edad de 8,5 por 100

000 mujeres y una tasa de incidencia estandarizada por edad de 28,0 por 100 000, lo que se traduciría en que anualmente fallecerían 1 208 (8,7 %) y se producirían 3 952 casos nuevos (1) (21).

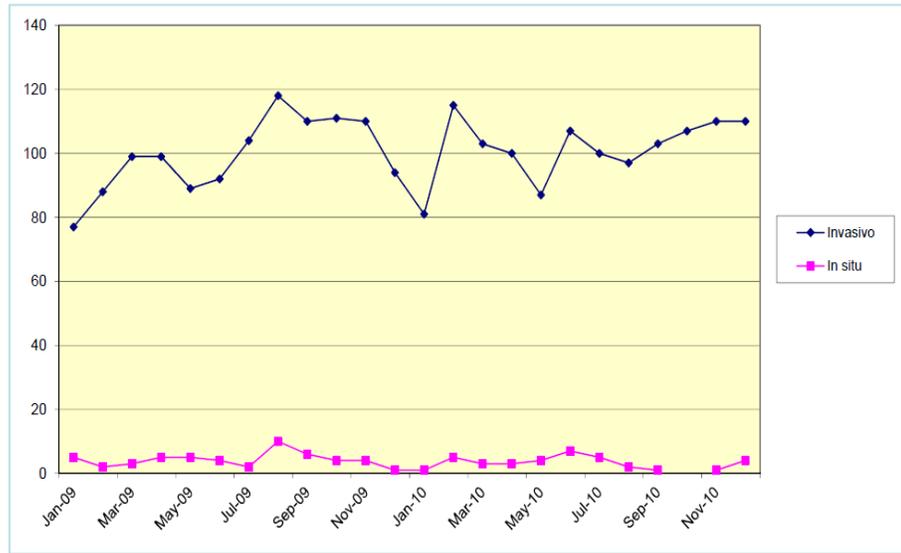
En los últimos 3 años la tasa de mortalidad se ha incrementado a 10,8 por 100 000 y la tasa de incidencia a 34,0 por 100 000 mujeres, siendo Lima y Arequipa los departamentos con mayor incidencia (2).



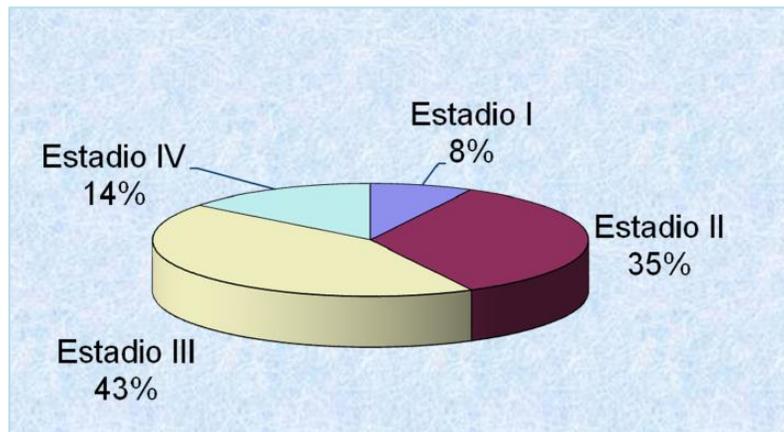
**Figura N° 3.** Incidencia estimada y mortalidad de cáncer de mama en Perú.

Fuente: GLOBOCAN 2012

La casuística del INEN revela se recibe en promedio 1 200 casos de cáncer de mama anualmente. El tipo más frecuente es el cáncer invasivo en estadio III de acuerdo al Departamento de Epidemiología y Estadística del INEN. Es así que el cáncer de mama representa un problema de salud pública a nivel mundial y en nuestro país, tanto por su incidencia como por su mortalidad (2) (3).



**Figura N° 4.** Cáncer de mama invasivo e *in situ*. INEN 2010.  
Fuente: INEN. Departamento de Epidemiología y Estadística.



**Figura N° 5.** Distribución del cáncer de mama por estadios. 2010.  
Fuente: INEN. Departamento de Epidemiología y Estadística.

## 2.2.1.2. Clasificación histológica

### A. No invasivos

#### a) Carcinoma Intraductal *In Situ* (CDIS)

El CDIS es una lesión intraductal neoplásica caracterizada por proliferación epitelial, atipia celular leve y tendencia inherente pero no necesaria de progresión a cáncer de mama invasivo. Es la proliferación clonal de células que parecen malignas y que se acumulan en el lumen del conducto mamario. No hay evidencia de invasión más allá de la membrana basal hacia el estroma mamario. Estas lesiones varían en su modo de presentación, apariencia histopatológica y su significado biológico (22) (23).

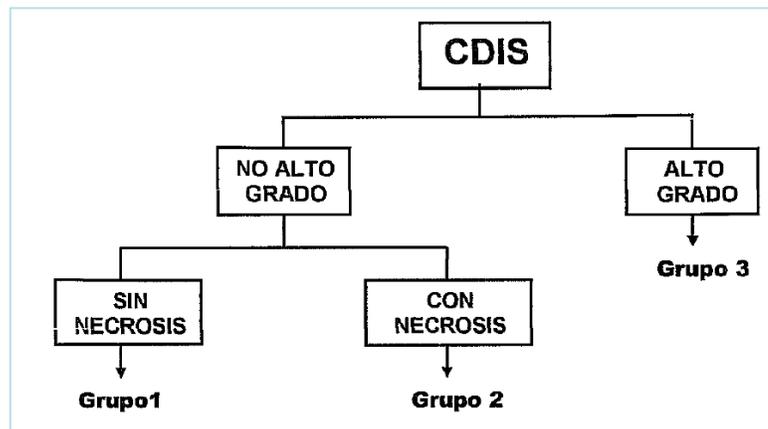
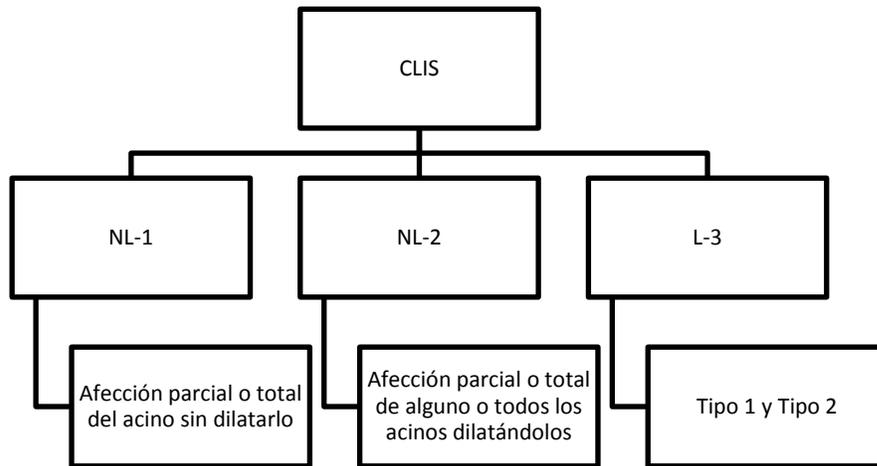


Figura N° 6. Clasificación de Nottingham del CDIS.

**b) Carcinoma Lobulillar *In Situ* (CLIS)**

El CLIS es una proliferación de células redondas, cuboidales, monótonas, de núcleo hipercromático que llenan completamente, distorsionan y pueden llegar a dilatar la mitad o más de un acino. Si el grado de proliferación es menor corresponde a hiperplasia lobulillar *in situ* (22) (23).



**Figura N° 7.** Clasificación del CLIS.

**B. Invasivos**

El cáncer invasivo es un grupo de tumores malignos epiteliales caracterizados por invasión de los tejidos adyacentes, con marcada tendencia a producir metástasis a lugares distantes. La gran mayoría de estos tumores son adenocarcinomas y derivan del epitelio parenquimal mamario. El cáncer de mama muestra un amplio rango de tipos histopatológicos específicos y fenotipos morfológicos con

características clínicas y pronósticos particulares. Los tipos más comunes de cáncer invasivo son el Carcinoma Ductal Invasivo o Infiltrante y el Carcinoma Lobulillar Invasivo o Infiltrante (23).

**a) Carcinoma Ductal Invasivo o Infiltrante (CDI)**

El CDI es el tipo más común de cáncer de mama. Incluye todas aquellas lesiones que no presentan características morfológicas específicas y que por lo tanto no se pueden agrupar en distintos grupos, de aquí el término NOS (not otherwise specified). Se asocia frecuentemente a la variedad no infiltrante, pero no necesariamente se origina en ella. Macroscópicamente, según el patrón de crecimiento, adopta dos formas. Estrellada con múltiples prolongaciones digitiformes dispuestas en forma estrellada, que se ven rodeadas de tejido fibroso. La otra forma es la circunscrita o multinodular, con límites tumorales bien definidos, debido al crecimiento más lento de tipo expansivo. Histológicamente, las células pueden aparecer en nido, cordones o grandes masas, pero en ocasiones adoptan estructuras tuboglandulares más o menos definidas. Las células son por lo general bastante uniformes en tamaño y forma aunque en algunos tumores pueden presentar marcado pleomorfismo celular, abundantes mitosis atípicas o incluso células gigantes. La necrosis es infrecuente pero a veces en los tumores con gran crecimiento está presente. El estroma es

abundante y contiene grandes cantidades de colágeno. En muchas ocasiones aparecen microcalcificaciones que están representadas por hidroxapatita. Los márgenes de lesión pueden ser infiltrantes o circunscritos. El método más aceptado para la clasificación del CDI es el grado histológico de Elston que se basa en la evaluación de estructuras tubulares, del pleomorfismo nuclear, así como de la actividad mitótica. Por último, en la descripción histológica del tumor deben proporcionarse los marcadores biológicos como por ejemplo los receptores estrogénicos, los receptores para progestágenos y la expresión del producto del gen *cerbB-2* (23) (24).

#### **b) Carcinoma Lobulillar Invasivo o Infiltrante (CLI)**

El CLI es el segundo tumor en incidencia del cáncer de mama. Esta neoplasia se asocia con una mayor frecuencia de multicentricidad y de bilateralidad. Desde el punto de vista microscópico, al originarse en los pequeños conductos terminales de la mama, está compuesto de células pequeñas y uniformemente redondeadas, que morfológicamente son distinguibles de los carcinomas no infiltrantes por el componente infiltrativo. La células están ampliamente dispersas o formando columnas de una sola célula. A veces, se organizan en círculos concéntricos alrededor de restos de un conducto normal, en otras ocasiones crecen en masas sólidas, y por último pueden ser

vistos de forma ocasional patrones túbulo-alveolares y alveolares. Las células presentan un citoplasma claro y débilmente eosinófilo, el núcleo es pequeño redondeado y moderada actividad mitótica. Existe una considerable cantidad de estroma que puede dar origen a problemas diagnósticos. La importancia de este tipo de carcinoma es el seguimiento por el posible cáncer contralateral de mama, así como por la diseminación metastásica (23) (25).

### **2.2.1.3. Estadificación**

La estadificación del cáncer describe la extensión o gravedad, proporciona información respecto al pronóstico y orienta el tratamiento. Los estudios de imagen en la actualidad son un complemento para evaluar el tamaño del tumor, la presencia de los ganglios y la metástasis. El sistema más usado para la estadificación del cáncer es el sistema TNM del American Joint Committee on Cancer (AJCC), el cual ha sido aceptado por la Union for International Cancer Control (UICC). El sistema de estadificación TNM clasifica los cánceres según las categorías T, N y M (26) (27) (28):

- La letra T seguida de un número del 0 al 4 describe el tamaño del tumor primario y su propagación a la piel o a la pared torácica debajo del seno. Los números T mayores indican un tumor más grande y/o una propagación más extensa a los tejidos adyacentes al seno.

- La letra N seguida de un número del 0 al 3 indica si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos vecinos al seno y, de ser así, cuántos ganglios linfáticos se encuentran afectados.
- La letra M seguida de un número del 0 al 1 indica si el cáncer se ha propagado o no a los órganos distantes.

En la tabla N° 1 se describe el sistema de estadificación TNM de la AJCC y en la tabla N° 2 la agrupación.

**Tabla N° 1.** AJCC. Cancer Staging Handbook: TNM Classification of Malignant Tumors, 7<sup>th</sup> edition.

T: Tumor primario		
<b>Tx</b>	Tumor primario no puede ser evaluable	
<b>T0</b>	No hay evidencia de tumor primario	
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>In Situ</i>	
<b>Tis (CDIS)</b>	Carcinoma Ductal <i>In Situ</i>	
<b>Tis (CLIS)</b>	Carcinoma Lobulillar <i>in situ</i>	
<b>Tis (Paget)</b>	Enfermedad de Paget del pezón sin tumor	
<b>T1</b>	Tumor de diámetro hasta 2 cm	
<b>T1mi</b>	Microinvasión de 0,1cm o menos en el diámetro mayor	
<b>T1a</b>	Diámetro mayor del tumor de más de 0,1 cm hasta 0,5 cm	
<b>T1b</b>	Diámetro mayor del tumor de más de 0,5 hasta 1 cm	
<b>T1c</b>	Diámetro mayor del tumor más de 1 cm hasta 2 cm	
<b>T2</b>	Diámetro mayor del tumor más de 2 cm hasta 5cm	
<b>T3</b>	Diámetro mayor del tumor de más de 5 cm	
<b>T4</b>	Tumor de cualquier tamaño con compromiso directo de la pared torácica o piel	
<b>Nota:</b> Pared torácica incluye costillas, músculos intercostales y músculo serrato anterior, pero no el músculo pectoral.		
	T4a	Compromiso de la pared torácica
	T4b	Edema (incluyendo piel de naranja), o ulceración de la piel de la mama o nódulos dérmicos satélites confinados a la misma mama.
	T4c	Ambos 4a y 4b
	T4d	Carcinoma inflamatorio

<b>N: Ganglios linfáticos regionales</b>	
<b>Nx</b>	Ganglios linfáticos regionales no puede ser evaluable
<b>N0</b>	Ausencia de compromiso ganglionar regional
<b>N1</b>	Metástasis a ganglios linfáticos axilares ipsilaterales móviles
<b>N2</b>	Metástasis a ganglios linfáticos ipsilaterales fijos o metástasis clínicamente evidente a ganglios linfáticos de mamaria interna ipsilateral en ausencia de metástasis ganglionar axilar clínicamente evidente
<b>N2a</b>	Metástasis a ganglios linfáticos axilares fijos a otro ganglio o a otra estructura
<b>N2b</b>	Metástasis solo a ganglios linfáticos clínicamente comprometidos, de la cadena mamaria interna en ausencia de compromiso axilar evidente
<b>N3</b>	Metástasis a ganglio linfático infraclavicular ipsilateral con o sin compromiso ganglionar axilar , o a ganglios linfáticos, clínicamente comprometidos, de la mamaria interna ipsilateral con presencia de compromiso clínico a ganglios axilares ; o metástasis a ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales con o sin compromiso ganglionar evidente axilar o de la mamaria interna
<b>N3a</b>	Metástasis a ganglios linfáticos infraclaviculares ipsilaterales
<b>N3b</b>	Metástasis a ganglios linfáticos axilares y de mamaria interna
<b>N3c</b>	Metástasis a ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales
<b>Nota :</b> Clínicamente evidente: Detectado por examen clínico o por estudios de imágenes	

<b>M : Metástasis a distancia</b>	
<b>Mx</b>	No se puede evaluar la metástasis a distancia
<b>M0</b>	No metástasis a distancia
<b>M1</b>	Metástasis a distancia

**Tabla N ° 2.** AJCC. Estadíos clínicos del cáncer de mama.

Estadío	T	N	M
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1	N0	M0
<b>IB</b>	T0	N1M1	M0
	T1	N1M1	M0
<b>IIA</b>	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
<b>IIB</b>	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>IIIA</b>	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
<b>IIIB</b>	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
<b>IIIC</b>	Cualquier T	N3	M0
<b>IV</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

#### 2.2.1.4. Grado del tumor

El grado de un tumor es la descripción de un tumor que se basa en la forma como se ven las células y el tejido de un tumor al microscopio. Es una indicación de la rapidez con la que probablemente crecerá y se extenderá el tumor. Si las células del tumor y la organización del tejido

del tumor se asemejan a las células y a los tejidos normales, el tumor se llama "bien diferenciado". Estos tumores tienden a crecer y a extenderse a un paso más lento que los tumores que son "indiferenciados" o "escasamente diferenciados", los cuales tienen células que se ven anormales y a los que les pueden faltar las estructuras de tejido normal.

El sistema de gradación usado con más frecuencia es el sistema Nottingham (llamado también modificación de Elston-Ellis del sistema de gradación de Scarff-Bloom-Richardson) para cáncer de mama. Este sistema da un grado a los tumores de seno basándose en las siguientes características:

- Formación tubular: Cantidad del tejido del tumor que tiene estructuras normales de conductos del seno.
- Grado nuclear: Evaluación del tamaño y forma del núcleo en las células tumorales.
- Rango mitótico: Medida de la rapidez con la que las células del tumor están creciendo y se están dividiendo.

A cada una de las categorías se asigna una puntuación del 1 al 3, una puntuación de "1" significa que las células y el tejido del tumor se ven en su mayoría como las células y el tejido normal, y una puntuación de "3" significa que las células y el tejido se ven anormales en su mayoría. Las puntuaciones para las tres categorías

se añaden luego, lo que da un resultado del 3 al 9. Hay tres grados posibles (26):

- Grado bajo o bien diferenciado (G1): Puntuación total = 3–5.
- Grado intermedio o moderadamente diferenciado (G2): Puntuación total = 6–7.
- Grado alto o escasamente diferenciado (G3): Puntuación total = 8–9.

#### **2.2.1.5. Tratamiento**

El tratamiento integral del cáncer de mama es multidisciplinario, los manejos locorreccionales son cirugía y radioterapia en cualquiera de sus tres modalidades (neoadyuvante, adyuvante y paliativa) y el tratamiento sistémico incluye la quimioterapia, la terapia endocrina y la terapia dirigida a blancos moleculares.

#### **A. Tratamiento local**

##### **a) Cirugía**

La cirugía en la actualidad se divide en conservadora y mastectomía con sus múltiples variedades. El objetivo es lograr el mejor control oncológico, para lo cual deben tenerse en consideración factores propios del paciente como edad, género, comorbilidades, relación mama-tumor y antecedentes de radioterapia, así como también factores biológicos del tumor como

el componente intraductal extenso >25 %, multicentricidad y tamaño tumoral (28).

#### **b) Radioterapia**

La radioterapia se administra después de la cirugía de conservación y puede administrarse después de una mastectomía en las mujeres que tienen un alto riesgo de recurrencia, con el fin de destruir las células cancerosas que quizás queden en los tejidos cerca de la mama, tal como la pared del pecho o los ganglios linfáticos cercanos (29).

### **B. Tratamiento sistémico**

#### **a) Tratamiento adyuvante**

La terapia adyuvante es cualquier tratamiento que se administra después de la terapia principal para aumentar la posibilidad de supervivencia prolongada sin recurrencia. El objetivo de la quimioterapia adyuvante es eliminar la enfermedad micrometastásica antes del desarrollo de clones resistentes, pues se ha demostrado que la recurrencia sistémica es la principal causa de muerte en estas pacientes. El tratamiento adyuvante puede darse con quimioterapia, terapias biológicas (Trastuzumab), terapia endocrina (tamoxifeno, inhibidores de la aromatasa) o radioterapia (30).

**b) Tratamiento neoadyuvante**

La terapia neoadyuvante es tratamiento que se administra antes de la terapia principal. Una paciente recibe quimioterapia neoadyuvante para reducir el tamaño del tumor que no puede ser operado en su estadio actual. Una mujer cuyo tumor puede ser extirpado por mastectomía podría también recibir terapia neoadyuvante con el fin de reducir el tamaño del tumor para realizar cirugía de conservación de la mama. Si un tumor no se reduce de tamaño o continúa creciendo durante la quimioterapia neoadyuvante, se puede detener el tratamiento e intentar otro tipo de quimioterapia o realizar cirugía, dependiendo del estadio del cáncer. Esta modalidad terapéutica se considera el estándar en los tumores localmente avanzados. Se recomienda un esquema basado en taxanos y antraciclinas. El objetivo principal es facilitar las diferentes modalidades quirúrgicas (31) (32).

**2.2.1.6. Farmacogenética en el tratamiento del cáncer de mama**

Los tratamientos sistémicos para el cáncer de mama pueden dividirse en terapia hormonal, quimioterapia y terapias dirigidas. La actividad antitumoral y la seguridad de los agentes específicos puede depender no solo de la dosis de la droga o del régimen de utilización, sino también de dianas funcionales, enzimas metabolizadoras de fármacos y transportadores. Así mismo, algunos agentes actúan como profármacos, con uno o más metabolitos, que pueden contribuir a la

actividad antitumoral del fármaco o a efectos secundarios específicos.

La determinación prospectiva de las variantes genéticas de enzimas metabolizadoras, transportadores de fármacos o dianas de fármacos podría emplearse para determinar la posibilidad de respuesta y/o propensión a efectos adversos.

En el tratamiento del cáncer de mama se observa que existe una heterogeneidad significativa en la eficacia y toxicidad de los agentes quimioterápicos entre las distintas poblaciones humanas. La administración de la misma dosis de un cierto agente a una población de pacientes da lugar a un amplio abanico de toxicidades, desde pacientes que apenas se ven afectados hasta otros en los que éstas pueden ser fatales. Muchas variables clínicas han sido asociadas con la respuesta al fármaco (edad, género, dieta, función orgánica, biología del tumor), las diferencias genéticas pueden tener también un gran impacto en la misma. Además de la tolerancia reducida a la quimioterapia, los determinantes genéticos pueden afectar también en la respuesta al fármaco y en la supervivencia del paciente. La identificación de razones genéticas subyacentes en los problemas de toxicidad o falta de respuesta del tumor, reducirán de forma importante la frecuente impredecibilidad del tratamiento anticancerígeno.

La estratificación genotípica de los pacientes, podría identificar subgrupos con un mejor perfil pronóstico y aquellos con alelos asociados con una respuesta reducida a ciertos fármacos, lo cual podría servir de guía para la selección de terapias alternativas. La

necesidad de optimización de la quimioterapia es urgente. El ajuste de la dosis por superficie corporal no corrige las diferencias interindividuales en la biodisponibilidad del fármaco (33) (34) (35).

En la tabla N° 3 se muestran los agentes más usados en la actualidad para el tratamiento del cáncer de mama, así como los genes con variantes polimórficas relacionados con su respuesta farmacológica.

**Tabla N° 3.** Agentes quimioterápicos y genes con variantes polimórficas asociados con su respuesta.

<b>Fármaco</b>	<b>Gen</b>	<b>Función del gen</b>
<b>Tamoxifeno</b>	<i>CYP2D6</i> <i>SULT1A1</i>  <i>ER</i>	Metabolismo Eliminación de metabolitos activos  Diana
<b>Inhibidores de la aromatasa</b>	<i>CYP19</i> <i>CYP1A2</i> <i>CYP2C9</i> <i>CYP3A</i>	Diana  Metabolismo
<b>Paclitaxel</b>	<i>CYP2C8</i> <i>MDR1</i>	Metabolismo Transportador
<b>Decetaxel</b>	<i>CYP3A4</i> <i>CYP3A5</i> <i>MDR1</i>	Metabolismo Transportador
<b>Doxorrubicina</b>	<i>MDR1</i>	Transportador
<b>Ciclofosfamida</b>	<i>GST</i>	Detoxificación de metabolitos
<b>Metotrexato</b>	<i>MTHFR</i>	Regulación folatos intracelulares

### **2.2.2. Cáncer de mama localmente avanzado**

El cáncer de mama localmente avanzado abarca un grupo heterogéneo de neoplasias de la mama. Según el sistema de clasificación de la AJCC, se considera dentro de este grupo a los estadios IIB, IIIA, IIIB y IIIC. El pronóstico depende del tamaño del tumor, grado de compromiso de los ganglios linfáticos y presencia de componente inflamatorio. Las pacientes con este diagnóstico reciben tratamientos neoadyuvantes como quimioterapia a fin de reducir el tamaño del tumor para posteriormente ser sometidas a cirugía (36).

#### **2.2.2.1. Quimioterapia neoadyuvante**

La quimioterapia neoadyuvante es el tratamiento estándar en el cáncer de mama localmente avanzado e inflamatorio. Los principales objetivos de esta terapia son conseguir una cirugía conservadora, controlar de forma temprana la enfermedad micrometastásica, disminuir el tamaño tumoral (downstaging) y evaluar la quimiosensibilidad del tumor *in vivo* (37).

Se empezó a utilizar en la década de 1980 en las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado, y su objetivo era convertir los tumores inoperables en operables. Dados los buenos resultados que se obtuvieron, se empezó a realizar estudios en pacientes con enfermedad en estadios iniciales. Los primeros estudios clínicos tenían como objetivo determinar si el tratamiento sistémico de inicio resultaba superior en términos de supervivencia libre de enfermedad y

supervivencia global (38). La respuesta clínica tumoral se ha observado hasta en un 90 % de los pacientes, la cual varía en función al fármaco utilizado y el número de ciclos. Hasta el momento, el esquema óptimo de quimioterapia neoadyuvante no está establecido, sin embargo estudios realizados indican que el esquema secuencial de antraciclinas y taxanos se asocia a mejores resultados (38) (40). Así mismo, en cuanto a la histología, se ha encontrado que el CLI presenta bajos porcentajes de respuesta patológica completa, comparado con el CDI, pero que a largo plazo se obtienen mejores resultados (41). Es por ello que debe conseguirse poder identificar factores pronósticos que nos ayuden a individualizar el régimen de quimioterapia neoadyuvante apropiado para cada paciente con la mínima toxicidad.

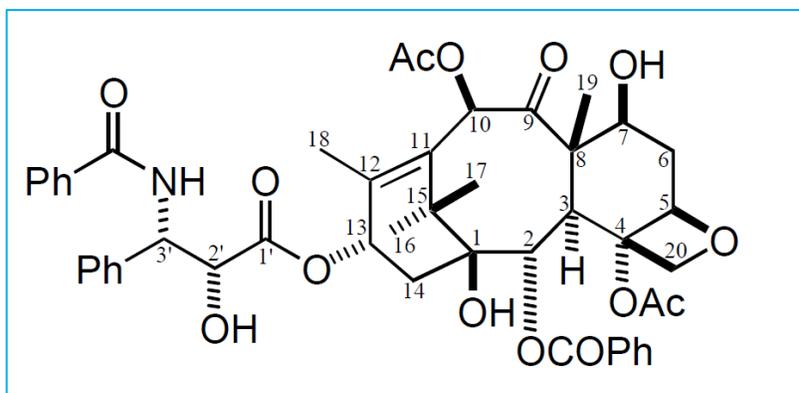
### **2.2.3. Paclitaxel**

El paclitaxel, inicialmente fue aislado de un extracto de la corteza del “Tejo del Pacífico” *Taxus brevifolia*, en donde se encontraba en pequeñas cantidades. Actualmente es uno de los agentes quimioterapéuticos más ampliamente utilizados y efectivos para una variedad de tumores sólidos como cáncer de mama, pulmón y ovario (42). Actúa promoviendo el ensamblaje de microtúbulos y la estabilización de su formación, alterando la motilidad, transporte y división celular, y en consecuencia, produciendo la muerte de la célula (43). La dosis administrada es normalizada el área de la superficie corporal del paciente, sin embargo este criterio de dosificación es

cuestionable. Este fármaco es metabolizado principalmente en el hígado por enzimas del citocromo P450 (44).

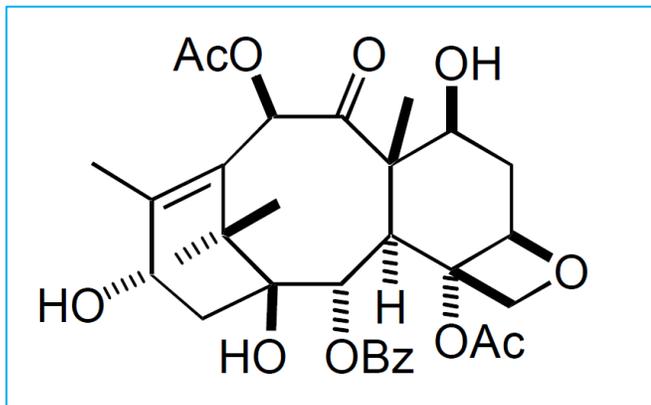
### 2.2.3.1. Química

El paclitaxel es un compuesto diterpenoide cuyo núcleo es un anillo de taxano complejo de ocho miembros y tiene un anillo de oxetano vinculado a C4 y C5. Se caracteriza también por tener un grupo cetona en C9 y la cadena lateral unida al anillo taxano en C13 es esencial para su actividad antitumoral.



**Figura N° 8.** Estructura del paclitaxel.

En la actualidad con fines comerciales se obtiene mediante semisíntesis a partir del 10-desacetilbacatin III, un precursor que se encuentra en las hojas de *Taxus brevifolia* y *Taxus baccata*, a través de una reacción de acoplamiento con la cadena lateral obtenida sintéticamente. También se ha logrado sintetizar por una serie compleja de reacciones (45).



**Figura N° 9.** 10- desacetilbacatin III, precursor del paclitaxel.

### 2.2.3.2. Farmacocinética

El paclitaxel se administra en venoclisis semanal de 80 a 100mg/m<sup>2</sup> durante 1 hora o cada tres semanas de 135 a 175 mg/m<sup>2</sup> durante 3 horas. El fármaco es metabolizado principalmente en el hígado por la CYP2C8 a un metabolito inactivo mayor que es el 6 $\alpha$ -hidroxipaclitaxel y a dos metabolito inactivos menores que son el 3 - p- hidroxipaclitaxel y el 6 $\alpha$ ,3-p-dihidroxipaclitaxel (46) (47) (48). En el 2005, Taniguchi R y col, demostraron que la producción del metabolito 6 $\alpha$ -hidroxipaclitaxel por CYP2C8 era 2,3 veces mayor que la producción del metabolito 3-p-hidroxipaclitaxel por CYP3A4, siendo CYP2C8 la vía metabólica primaria del paclitaxel (44). El paclitaxel y sus metabolitos pueden ser difundidos al plasma o secretados al canalículo biliar por la glicoproteína P (42).

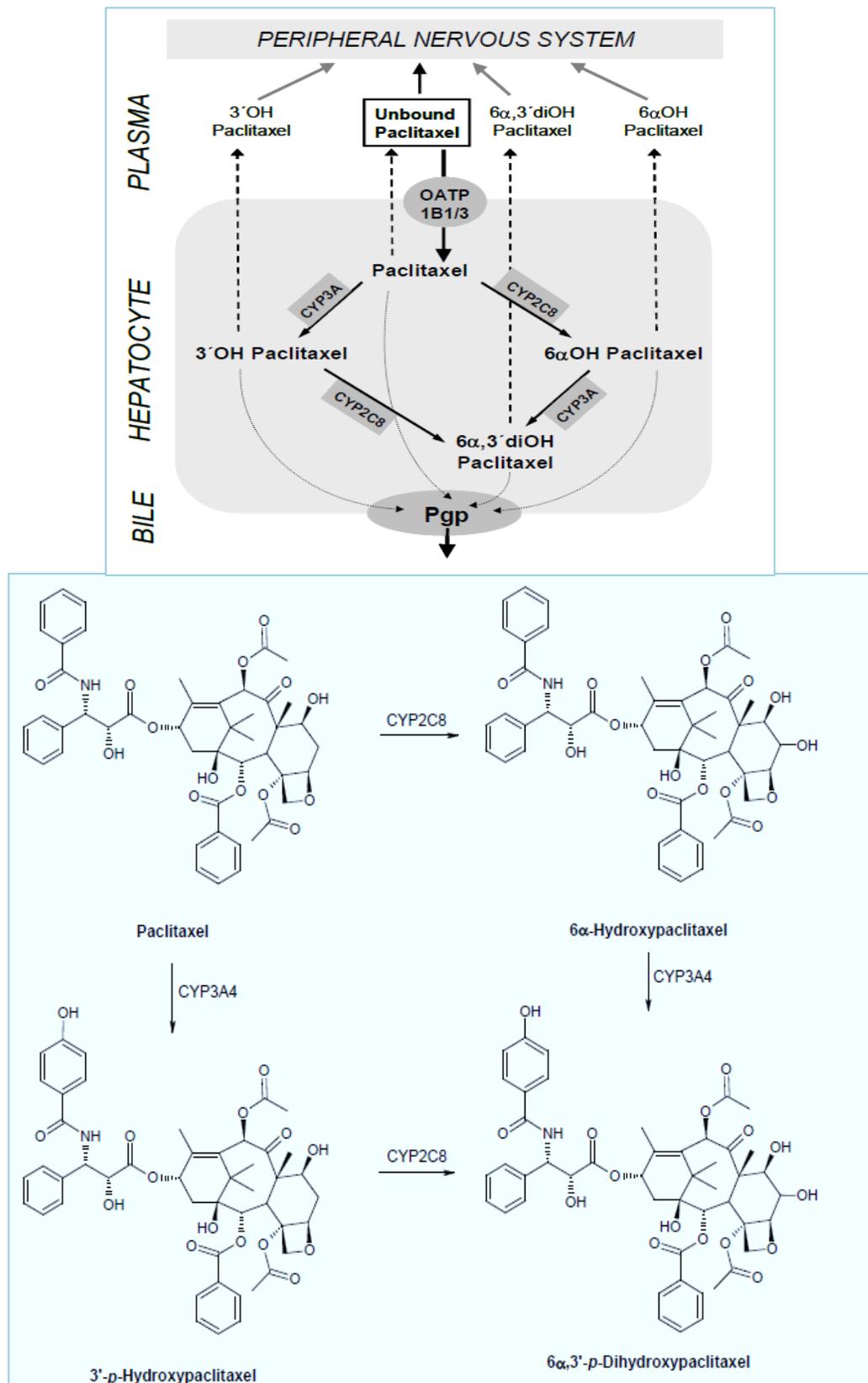
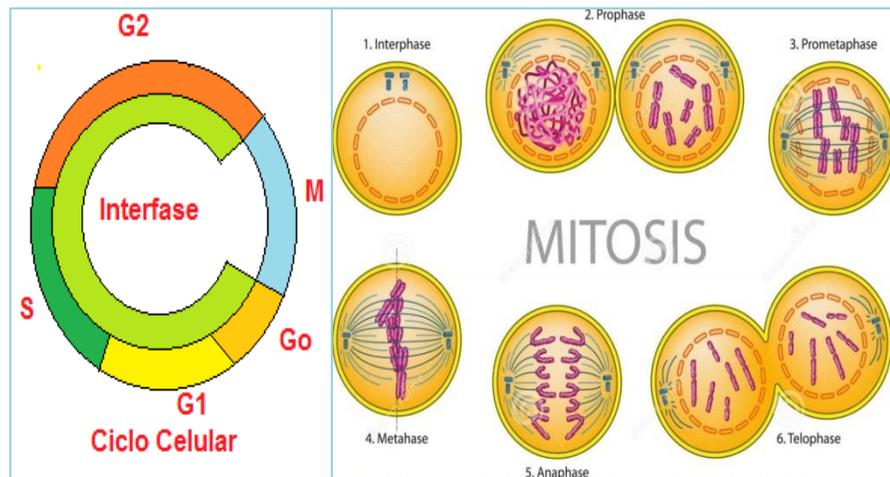


Figura N° 10. Biotransformación del paclitaxel.

La depuración del paclitaxel no es lineal, tiene un aumento desproporcionado de la concentración plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) y la concentración del área bajo la curva (AUC) con el incremento de la dosis, lo que sugiere una saturación de la eliminación a elevadas concentraciones. Es decir, su depuración disminuye con el incremento de la dosis o la velocidad de administración. Se une a proteínas en el plasma, tejidos y tubulina en un 98 % y el volumen de distribución va desde  $50L/m^2$  a más de  $650L/m^2$  dependiendo de la infusión. Este fármaco desaparece del compartimento plasmático con una semivida de 10 a 14 horas y tiene una depuración de 15 a  $18 L/h/m^2$ . La mayor ruta de eliminación es la excreción biliar y un quinto de la dosis es recuperada de la bilis dentro de las 24 horas de administración. La excreción renal y otras formas de excreción extrahepática constituyen menos del 10 % de la eliminación del fármaco; sin embargo, se sugiere que la dosis sea reducida en pacientes con insuficiencia renal crónica y pacientes con hiperbilirrubinemia y elevación de las transaminasas hepáticas (43).

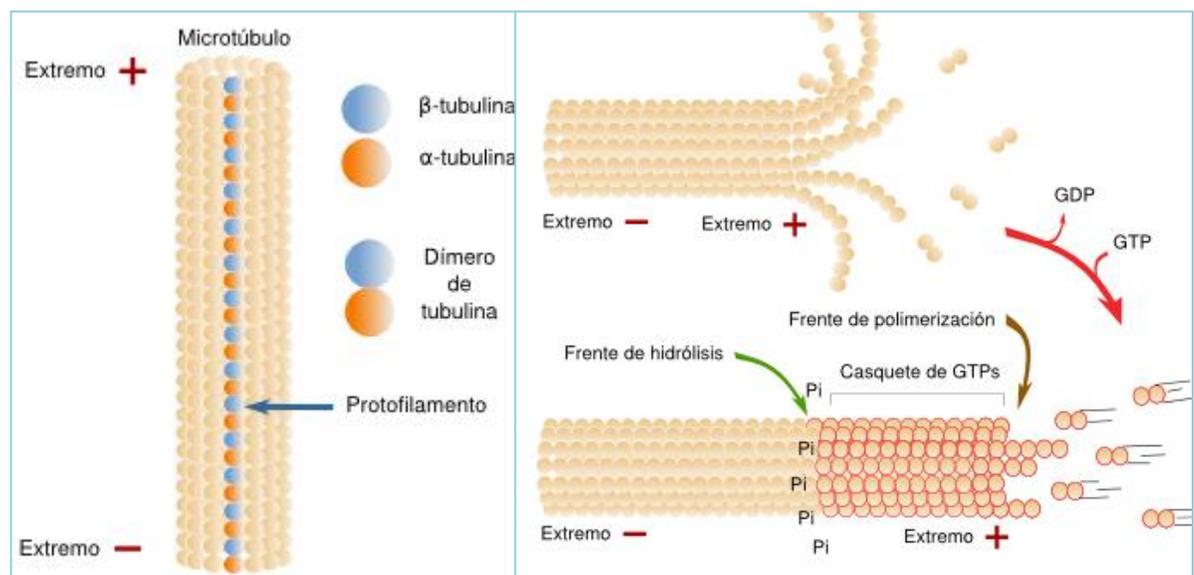
### **2.2.3.3. Farmacodinamia**

En la fase G2 del ciclo celular se sintetizan proteínas entre ellas la tubulina, la cual forma los microtúbulos componentes del huso mitótico. En la fase M del ciclo durante anafase es necesario la despolimerización de la tubulina de los microtúbulos para que las cromátidas migren hacia los centrosomas respectivos.



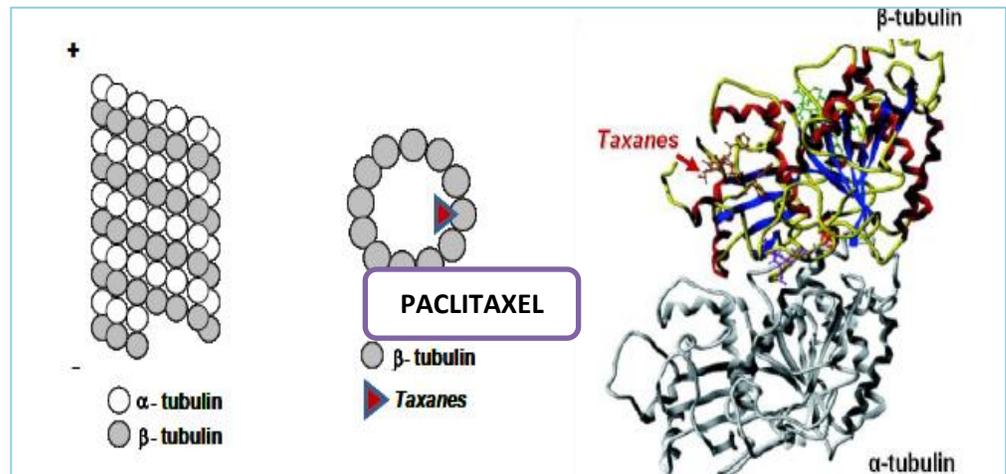
**Figura N° 11.** Ciclo celular y mitosis.

Los microtúbulos son heteropolímeros de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina, los cuales forman dímeros que son su unidad estructural. Los dímeros polimerizan en 13 protofilamentos, que luego se agregan lateralmente para formar estructuras cilíndricas huecas.



**Figura N° 12.** Estructura de los microtúbulos.

El paclitaxel actúa promoviendo estabilización de los microtúbulos, uniéndose de manera específica a la subunidad  $\beta$  de la tubulina antagonizando su despolimerización, lo que da por resultado la aparición de haces de microtúbulos y estructuras aberrantes en las fases G2 y M del ciclo celular. Es así que el fármaco inhibe la síntesis de tubulina en la fase G2 del ciclo celular, bloquea el paso de metafase a anafase en la mitosis y produce la muerte de la célula. La destrucción celular depende tanto de la concentración del fármaco como del tiempo de exposición a las células (14) (42) (45).



**Figura N° 13.** Mecanismo de acción del paclitaxel.

#### 2.2.3.4. Reacciones adversas

Los principales efectos adversos del paclitaxel son toxicidad hematológica y neuropatía (4). La toxicidad hematológica se ha reducido significativamente en los últimos años mediante la administración del fármaco durante tiempos de infusión más cortos.

Por otro lado, la neuropatía no se puede prevenir ni tratar, puede durar meses y en casos graves puede causar daño nervioso irreversible (14). Se manifiesta típicamente con una sensación de hormigueo o ardor en las extremidades que puede progresar a la pérdida de la función que puede ser irreversible si se continúa con el tratamiento, es por ello que la terapia con paclitaxel es frecuentemente descontinuada cuando la paciente presenta neurotoxicidad mayor al grado 2. La naturaleza progresiva de la neuropatía inducida por paclitaxel sugiere el desarrollo de toxicidad que puede ser atribuida a la exposición de la droga acumulada y un aumento en el tiempo en que la concentración de fármaco se mantiene por encima del umbral para una dosis determinada (17). Se ha reportado que hasta un 50-60 % de los pacientes que reciben paclitaxel desarrollan neuropatía periférica, por ello constituye el factor principal para limitar la dosis (49) (50). Además, se ha reportado que muchos pacientes sufren mialgias durante varios días después de recibir paclitaxel y pueden presentar reacciones de hipersensibilidad asociadas al vehículo con el cual se administra. Muchas de las pacientes no reciben los ciclos completos de la quimioterapia debido a la presentación de estos efectos adversos. Aunque la toxicidad inducida por paclitaxel es dosis dependiente, la susceptibilidad individual para los efectos adversos varía considerablemente (4).

### **2.2.3.5. Farmacogenética del tratamiento con paclitaxel**

La farmacogenética es el estudio de la interacción entre la genética y la respuesta terapéutica de los fármacos y está orientada a la comprensión de como la variación genética contribuye a la variabilidad interindividual en la farmacocinética y farmacodinamia de un medicamento. La variación genética puede influir en el tratamiento por diversos mecanismos, de modo que variantes en los genes relacionados con el metabolismo pueden modular la exposición del paciente al fármaco, mientras que los genes que están implicados en la acción del fármaco pueden influir en la sensibilidad del paciente (7). Es así que se ha descrito la existencia de una gran variabilidad interindividual en la respuesta terapéutica y toxicidad del paclitaxel en el tratamiento del cáncer de mama, la cual constituye un problema relevante con implicaciones en la supervivencia y la calidad de vida de las pacientes y conlleva a retrasos y reducción de dosis o suspensión del tratamiento. Se han propuesto varias causas a esta variabilidad, siendo una de ellas la presencia de SNP en el gen que codifica la *CYP2C8*, enzima responsable de metabolizar el paclitaxel a 6 $\alpha$ -hidroxipaclitaxel, su principal metabolito inactivo (5). Las variantes alélicas *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* del gen *CYP2C8* han sido asociadas con un metabolismo defectuoso del paclitaxel (6). Las razones para la intervariabilidad de respuesta aún no han sido determinadas con exactitud, por ello estos polimorfismos deben ser estudiados para determinar si hay asociación entre su presencia y los efectos en la

respuesta terapéutica y toxicidad, de este modo se podrán desarrollar estrategias para individualizar la terapia maximizando la respuesta y minimizando la toxicidad.

#### 2.2.4. Gen *CYP2C8*

El gen *CYP2C8* está localizado en el brazo largo del cromosoma 10 en el sector 10q24.1. Este gen abarca 32 726 pares de bases, tiene 9 exones y transcribe un ARNm de 1 924 bases (51). Se expresa en el hígado, sin embargo ARNm de *CYP2C8* ha sido también detectado en tejidos extrahepáticos incluyendo el riñón, glándula suprarrenal, útero, glándula mamaria, ovario y duodeno (52). El gen de tipo salvaje es llamado *CYP2C8\*1* o *\*1A* y codifica a la enzima *CYP2C8* (53).

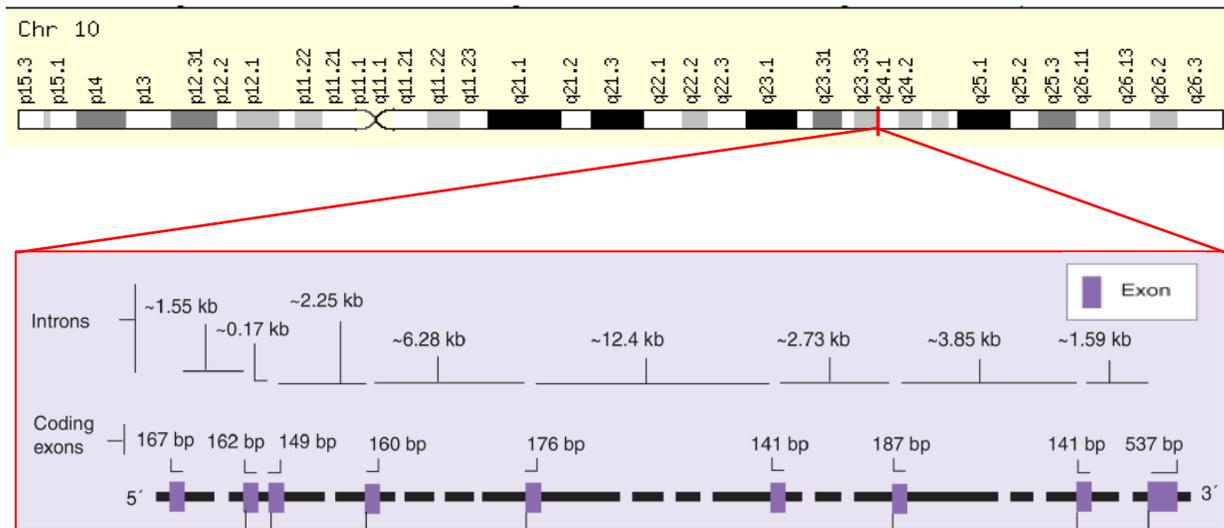
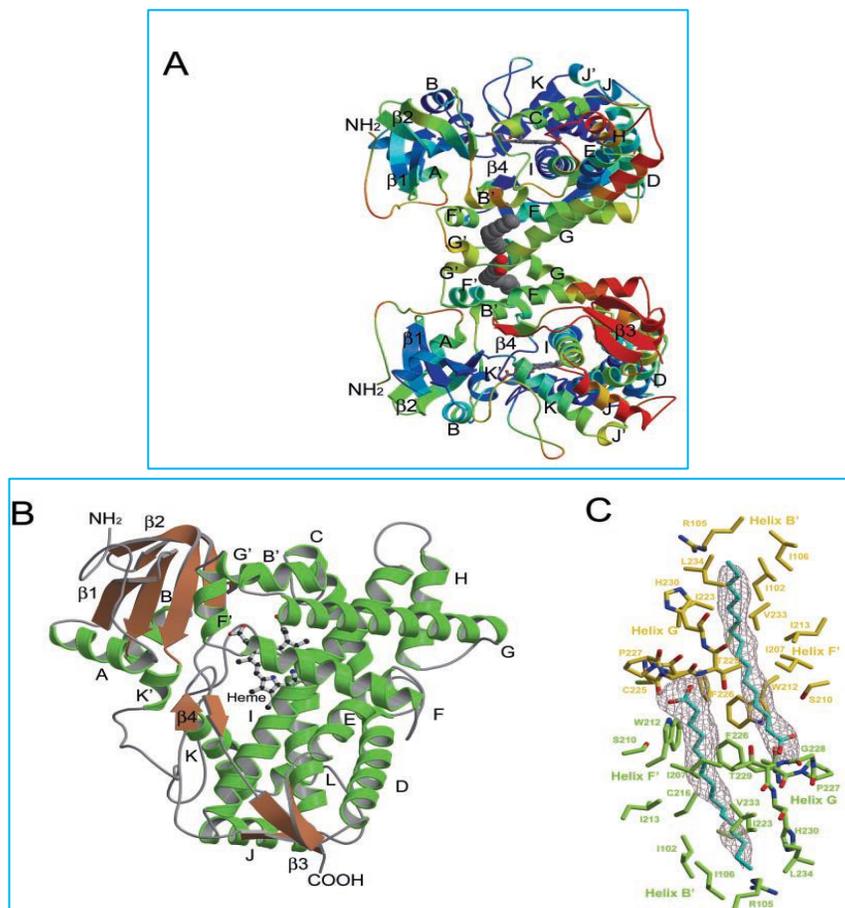


Figura N° 14. Estructura del gen *CYP2C8*.

### **2.2.5. Enzima CYP2C8**

La subfamilia CYP2C comprende a las enzimas CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 y CYP2C19, y representa el 20 % de todas las CYP expresadas en el hígado (52). La enzima CYP2C8 comprende el 7 % del contenido total de CYP hepático y desempeña un papel fundamental en el metabolismo de más de 60 fármacos, entre los cuales están incluidos anticancerígenos, antimaláricos, hipoglucemiantes, estatinas, opioides y fármacos como diclofenaco e ibuprofeno (51) (53) (54). Esta enzima además de metabolizar xenobióticos es responsable del metabolismo de compuestos endógenos como retinoides y ácido araquidónico (18) (55) (56). La CYP2C8 es una enzima de 490 aminoácidos (55825 Da), dimérica, formada por  $\alpha$  hélices, hojas  $\beta$  y giros y vueltas. Tiene como grupo prostético al grupo hemo y está unida a dos moléculas de ácido palmítico las cuales favorecen su dimerización. En la estructura de la CYP2C8 la gran cavidad del sitio activo muestra una tipología trifurcada que se aproxima a la forma de una T o Y, lo cual permite que la enzima pueda oxidar de manera relativamente eficiente grandes sustratos como paclitaxel.



**Figura N° 15.** Estructura de la enzima CYP2C8

La cavidad del sitio activo contiene 48 residuos aminoacídicos: I50, F54, F69, N72, I74, R97, G98, N99, S100, I102, S103, I106, T107, I113, S114, R200, F201, N202, N204, F205, L208, N209, I213, Q214, N217, N218, V233, N236, V237, T240, R241, G289, A292, D293, C296, A297, T301, L361, V362, T364, G365, V366, P367, T386, M388, G475, I476, V477. Además, existen interacciones hidrofóbicas importantes entre residuos aminoacídicos que no forman parte del sitio activo y los sustratos, que facilitan la orientación de éstos y permiten su unión al sitio activo. Los complejos que la enzima forma con sustratos estructuralmente distintos muestran la capacidad de

adaptabilidad conformacional de los residuos aminoacídicos del sitio activo (46) (55). Diversos estudios han demostrado que existe una gran variación interindividual en la expresión de la enzima y en el metabolismo de sus sustratos, lo cual puede influir en la respuesta terapéutica o en los efectos adversos de los fármacos metabolizados por *CYP2C8* (47).

10	20	30	40	50	60
MEPFVVLVLC	LSFMLLFSW	RQSCRRRRLP	PGTIPPLPIIG	NMLQIDVKDI	CKSFTNFSKV
70	80	90	100	110	120
YGPVFTVYFG	MNPIVVFHGY	EAVKEALIDN	GEEFSGRGN	PISQRITKGL	GISSNGKRW
130	140	150	160	170	180
KEIRRFSLIT	LRNFGMGKRS	IEDRVQEEAH	CLVEELRKT	ASPCDPTFIL	GCAPCNVICS
190	200	210	220	230	240
VVFQKRFDYK	DQNFLILMKR	FNENFRILNS	PWIQVCNNFP	LLIDCFPGTH	NKVLKNVALT
250	260	270	280	290	300
RSYIREKVKE	HQASLDVNNP	RDFIDCFLIK	MEQEKNQKS	EFNIENLVGT	VADLFVAGTE
310	320	330	340	350	360
TTSTTLRYGL	LLLLKHPEVT	AKVQEEIDHV	IGRHRSPCMQ	DRSHMPYTD	VVHEIQRYSD
370	380	390	400	410	420
LVPTGVPHAV	TTDTKFRNYL	IPKGTTIMAL	LTSVLHDDKE	FPNPNIIDPG	HFLDKNGNFK
430	440	450	460	470	480
KSDYFMPFSA	GKRICAGEGL	ARMELFLFLT	TILQNFNLKS	VDDLKLNLT	AVTKGIVSLP
490					
PSYQICFIPV					

Figura N° 16. Secuencia de aminoácidos de la enzima *CYP2C8*.

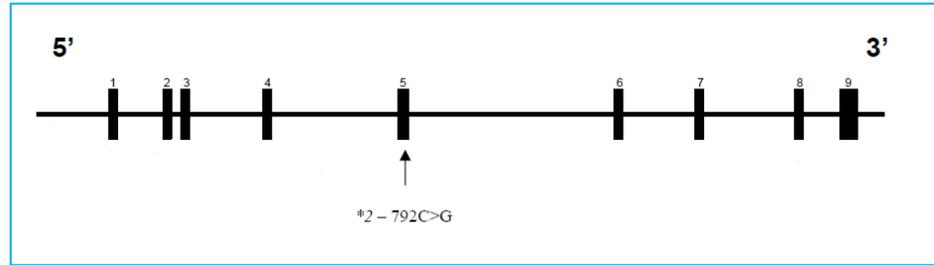
### 2.2.6. SNP del gen *CYP2C8*

Han sido encontrados 897 SNP en toda la secuencia del gen *CYP2C8* en humanos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, fecha de acceso: 26 de julio del 2014). Entre éstos, se encuentran 8 SNP no sinónimos en los exones 2, 3, 4, 5, 7 y 9, los cuales incluyen 244 G>T (A82S), 416 G>A (R139K), 541 G>A

(V181I), 730 A>G (I244V), 792 C>G (I264M), 805 A>T (I269F), 1081 C>T (L361F), 1196 A>G (K399R). Los SNP no sinónimos más frecuentes encontrados en todo el mundo son 805 A>T (*CYP2C8*\*2) y 416 G>A y 1196 A>G (*CYP2C8*\*3), los cuales han sido reportados por codificar una enzima con actividad diferente en relación a la enzima de tipo salvaje (46) (51) (57). En estudios *in vitro*, los SNP *CYP2C8*\*2 y *CYP2C8*\*3 han sido asociados con una actividad metabólica reducida de la enzima para sustratos como el paclitaxel, aunque estudios *in vivo* sugieren que la actividad metabólica es sustrato específica, es decir aumenta o disminuye de acuerdo al ligando (58). La frecuencia de los alelos de *CYP2C8* polimórficos difiere según la raza y el origen étnico y pueden influir en el metabolismo de los agentes terapéuticos causando variación interindividual en la respuesta a los fármacos y toxicidad (53) (59).

#### **2.2.6.1. *CYP2C8*\*2 (805 A>T, I269F)**

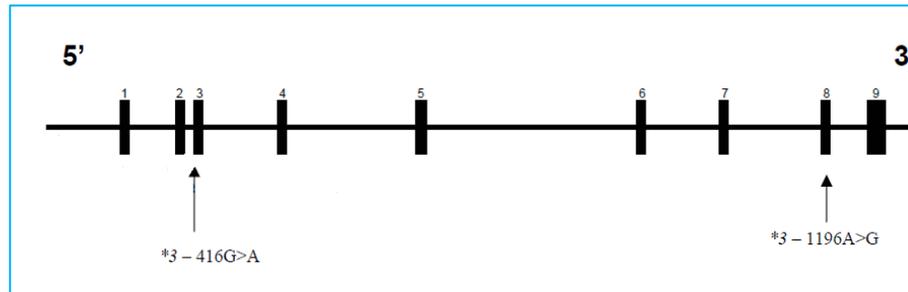
El alelo *CYP2C8*\*2 resulta del SNP 805 A>T en el exón 5 del gen *CYP2C8* y codifica a una proteína con la sustitución del aminoácido isoleucina 269 por fenilalanina (Ile269Phe). En estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que *CYP2C8*\*2 reduce el aclaramiento intrínseco del paclitaxel y ha sido asociado con la disminución de la afinidad de la enzima por este fármaco (52). *CYP2C8*\*2 es común en poblaciones africanas con frecuencias alélicas de hasta 22 %, pero poco frecuente en caucásicos y asiáticos (15).



**Figura N° 17.** Representación esquemática del SNP *CYP2C8*\*2 en el gen *CYP2C8*.

#### 2.2.6.2. *CYP2C8*\*3 (416 G>A, R139K y 1196 A>G, K399R)

El alelo *CYP2C8*\*3 incluye el SNP 416 G>A en el exón 3 y el SNP 1196 A>G en el exón 8 del gen *CYP2C8*. *CYP2C8*\*3 codifica a una proteína con dos sustituciones aminoacídicas, arginina 139 por lisina (Arg139Lys) y lisina 399 por arginina (Lys399Arg), las cuales están estrechamente ligadas (>95 %) (59). *CYP2C8*\*3 ha sido asociado con una disminución de la actividad catalítica de la enzima en el metabolismo del paclitaxel en estudios *in vitro* e *in vivo* (52). Se ha reportado que *CYP2C8*\*3 codifica a una enzima con hasta 50 % de actividad catalítica en la 6 $\alpha$ -hidroxilación del paclitaxel en comparación con la enzima de tipo salvaje (46). Si bien este SNP no altera los aminoácidos del sitio activo de la enzima, puede afectar la capacidad de la unión del sustrato a la enzima. Según estudios realizados, se ha descrito que *CYP2C8*\*3 es común en caucásicos con una frecuencia alélica de hasta 17 %, pero poco frecuente en africanos y asiáticos (9).



**Figura N° 18.** Representación esquemática del SNP *CYP2C8*\*3 en el gen *CYP2C8*.

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Lugar de ejecución del estudio**

- El estudio clínico se realizó en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.
- El estudio molecular se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### **3.2. Diseño del estudio**

Es un estudio Descriptivo Prospectivo - Serie de casos.

#### **3.3. Universo**

Pacientes mujeres con diagnóstico reciente de cáncer de mama localmente avanzado que acudieron al consultorio de oncología del INEN entre marzo y diciembre del 2013.

#### **3.4. Materiales**

##### **3.4.1. Población**

Se seleccionaron a 39 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama localmente avanzado (estadio IIB, IIIA, IIIB y IIIC) que recibieron quimioterapia neoadyuvante con el esquema estándar del INEN, el cual consiste en 12 ciclos semanales de paclitaxel, administrado como infusión a

una dosis de 80 mg/m<sup>2</sup> por 1h, seguidos de 4 ciclos de doxorubicina ciclofosfamida cada 21 días.

Se obtuvo información clínica y patológica de cada paciente de las historias clínicas almacenadas en el archivo de historias clínicas del INEN mediante una ficha de recolección de datos (ANEXO N° 2). La información consignada en la ficha incluye: estadio del cáncer de mama, tipo histológico, grado tumoral, tamaño clínico tumoral y compromiso clínico ganglionar antes y después de la quimioterapia con paclitaxel. El tamaño del tumor y el compromiso ganglionar fueron medidos clínicamente por el médico oncólogo. Se calcularon los promedios de las medidas antes de iniciar la quimioterapia neoadyuvante con el fármaco y al concluirla, para determinar si hubo diferencia significativa en la reducción del tamaño clínico del tumor y del compromiso ganglionar. Además, se registraron los efectos adversos durante la quimioterapia con este fármaco, los cuales incluyeron: neuropatía, leucopenia, anemia, trombocitopenia e incremento de los niveles de transaminasas.

El estudio fue aprobado por el comité de ética del INEN y se obtuvo el consentimiento informado de todas las pacientes para el uso de muestras de sangre y el análisis de la información clínica (ANEXO N° 3).

#### **3.4.1.1. Criterios de inclusión**

- Pacientes con diagnóstico reciente de cáncer de mama localmente avanzado sin tratamiento quimioterápico previo

que acudieron al consultorio de oncología médica del INEN entre marzo y diciembre de 2013.

- Pacientes sin contraindicaciones para el uso de quimioterapia neoadyuvante con taxanos.

#### **3.4.1.2. Criterios de exclusión**

- Pacientes con predisposición o que presenten enfermedades hepáticas, neurológicas o hematológicas, las cuales no permitan que puedan recibir quimioterapia a dosis estándar.

#### **3.4.2. Muestra biológica**

De cada paciente se extrajo 2,5 ml de sangre venosa, en tubos vacutainer con EDTA, las muestras fueron transportadas en refrigeración al laboratorio, en donde se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

#### **3.4.3. Reactivos**

- “DNA Blood GF-1 Extraction Kit” (Vivantis)
- Agarosa I (BIO-RAD)
- Agarosa NuSieve® 3:1 (Lonza)
- Fluorescent DNA Loading dye (GeneON)
- Buffer TBE 0,5X (BIO –RAD)
- Marcador de peso molecular Mass Rulers (BIO-RAD)

- Marcador de peso molecular 50 bp DNA Ladder (GeneON)
- Enzimas de restricción *BclI* y *Pdml* (*XmnI*) (Thermo SCIENTIFIC)

### 3.5. Métodos

#### 3.5.1. Determinación de los SNP *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* del gen *CYP2C8*

##### 3.5.1.1. Extracción de ADN genómico

Se extrajo el ADN genómico de las muestras de sangre total mediante el kit “DNA Blood GF-1 Extraction Kit” aplicando el siguiente protocolo. En un tubo de microcentrífuga de 2 mL se agregó 200  $\mu$ L de buffer BB a 200  $\mu$ L de muestra de sangre, se mezcló hasta homogenizar, se adicionó 20  $\mu$ L de proteinasa K y se mezcló nuevamente. Posteriormente la mezcla se llevó a incubación a 65 °C por 10 min. Trascurrido el tiempo se adicionó 200  $\mu$ L de etanol absoluto, se mezcló hasta obtener una solución homogénea y se transfirió la mezcla a una columna colocada sobre un tubo limpio. Luego se centrifugó a 5 000 g por 1 min. Posteriormente se desechó el centrifugado, se lavó la columna con 500  $\mu$ L de buffer 1 y se centrifugó a 5 000 g por 1 min. Se descartó el centrifugado, se lavó la columna con 500  $\mu$ L de buffer 2 y se centrifugó a 5 000 g por 1 min. Se lavó nuevamente la columna con 500  $\mu$ L de buffer 2 y se centrifugó a 13 000 g por 3 min. La columna lavada se transfirió a un microtubo limpio, se adicionó 100  $\mu$ L de buffer de elución previamente calentado en un

baño a 65 °C, se esperaron 2 min y se centrifugó a 5 000 g por 1 min para eluir el ADN. El ADN extraído fue almacenado a -20 °C.

### **3.5.1.2. PCR-RFLP de los exones 5 y 8 del gen *CYP2C8***

Se diseñaron cebadores específicos entre los exones 5 y 8 del gen *CYP2C8* para su amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerasa Chain Reaction, PCR) (13). El volumen de reacción fue de 25 µL contenía: ADN 2 µL (50 ng), cebadores forward y reverse 0.5 µM (Tabla N°4), Taq ADN polimerasa 1 U, desoxinucleótido trifosfato 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y buffer de enzima. Las condiciones de PCR fueron desnaturalización a 94 °C por 30 s, hibridación a 55 °C por 30 s y polimerización a 72 °C por 30 s, las cuales se repitieron por 35 ciclos. La polimerización final se realizó a 72 °C por 7 min. Los productos amplificados por PCR fueron cortados con las enzimas de restricción *BclI* y *Pdml* (*Xmnl*) para los SNP *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* respectivamente. La temperatura de incubación fue de 55 °C para *BclI* y de 37 °C para *Pdml* (*Xmnl*), con un tiempo de incubación de 8 h para ambas enzimas.

**Tabla N° 4.** Secuencia nucleotídica de los cebadores del gen *CYP2C8* y enzimas de restricción utilizadas.

Variante gen <i>CYP2C8</i>	Exón	Secuencia nucleotídica de los cebadores	Enzima de restricción	Secuencia de reconocimiento
<b><i>CYP2C8*2</i></b>	5	F: 5'-AAGATACATATATCTTATGACATG-3' R: 5'-ATCCTTAGTAAATTACAGAAGG-3'	<i>BclI</i>	T <sup>↓</sup> GATCA
<b><i>CYP2C8*3</i></b>	8	F: 5'-CTTCCGTGCTACATGATGAC <u>G</u> -3' R: 5'-CTGCTGAGAAAGGCATGAAG-3'	<i>Pdml</i> ( <i>XmnI</i> )	GAANN <sup>↓</sup> NNTTC

Luego de la digestión, los fragmentos cortados fueron separados mediante electroforesis en gel de Agarosa NuSieve® 3:1 al 3 % para *CYP2C8\*2* y al 3,5 % para *CYP2C8\*3* con buffer de corrida TBE 0,5X. Se utilizó el marcador de peso molecular 50 bp DNA Ladder y como buffer de carga el Fluorescent DNA Loading dye para visualizar el ADN en luz UV.

### 3.5.2. Análisis estadístico

La información obtenida fue procesada con el programa SPSS versión 16,0. La asociación entre el genotipo *CYP2C8\*3* (1196 A>G) y los efectos adversos se determinó mediante la prueba chi cuadrado ( $\chi^2$ ) con un intervalo de confianza de 95 % ( $p < 0,05$ ). Para las variables cuantitativas se calcularon las medidas estadísticas de resumen y se compararon las medias del tamaño clínico tumoral y el compromiso

“Detección de SNP en genes *CYP2C8* de pacientes con cáncer de mama que reciben paclitaxel en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas de marzo a diciembre 2013”.

---

ganglionar antes y después de la quimioterapia neoadyuvante con paclitaxel mediante la prueba t de Student, con un intervalo de confianza de 95 % ( $p < 0,05$ ) para la hipótesis de una cola.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Pacientes

Se estudiaron a 39 pacientes con diagnóstico reciente de cáncer de mama localmente avanzado cuya edad promedio fue de 49 años (rango entre 30 y 75 años). Las características clínicas y patológicas de las pacientes son presentadas en la tabla N° 5.

**Tabla N° 5.** Características clínicas y patológicas de las pacientes con cáncer de mama tratadas con paclitaxel en el INEN de marzo a diciembre 2013.

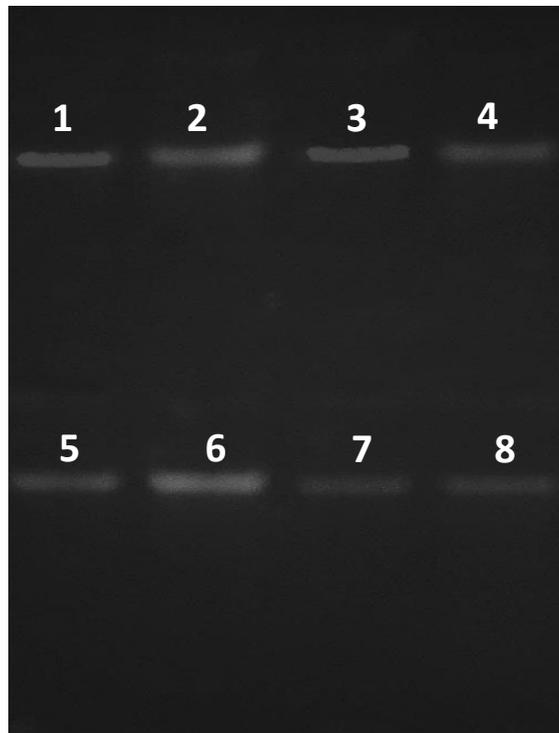
Características	N° de pacientes	Porcentaje
<b>Estadío del cáncer</b>		
IIB	4	10,3
IIIA	4	10,3
IIIB	28	71,8
IIIC	3	7,7
<b>Tipo histológico</b>		
CDI	38	97,4
CLI	1	2,6
<b>Grado tumoral</b>		
1	1	2,6
2	2	23,1
3	29	74,4

<b>Fenotipo</b>		
<b>Hormonales</b>	12	31,6
<b>HER 2 positivos</b>	8	21,1
<b>Positivos para todo</b>	3	7,9
<b>Triple negativos</b>	15	39,5
<b>Ciclos de paclitaxel recibidos</b>		
<b>12</b>	35	89,7
<b>Menos de 12</b>	4	10,3
<b>Presentación de efectos adversos</b>		
<b>Si</b>	34	87,2
<b>No</b>	5	12,8

Los efectos adversos se evaluaron de los datos obtenidos de las historias clínicas. Se encontró que el 56,5 % de las pacientes presentó neuropatía; el 10,3 % leucopenia; el 20,5 % anemia; el 2,6 % trombocitopenia; el 66,7 % incremento en los niveles de TGP y el 46,2 % incremento de los niveles de TGO. Además, se encontró que el 87,2 % de las pacientes presentó al menos uno de los efectos adversos antes mencionados. En relación al número de ciclos de paclitaxel recibidos, el 10,3 % de las pacientes recibió menos de 12 ciclos, es decir abandonó la quimioterapia con este fármaco debido a la presentación de efectos adversos.

#### 4.2. Extracción de ADN genómico

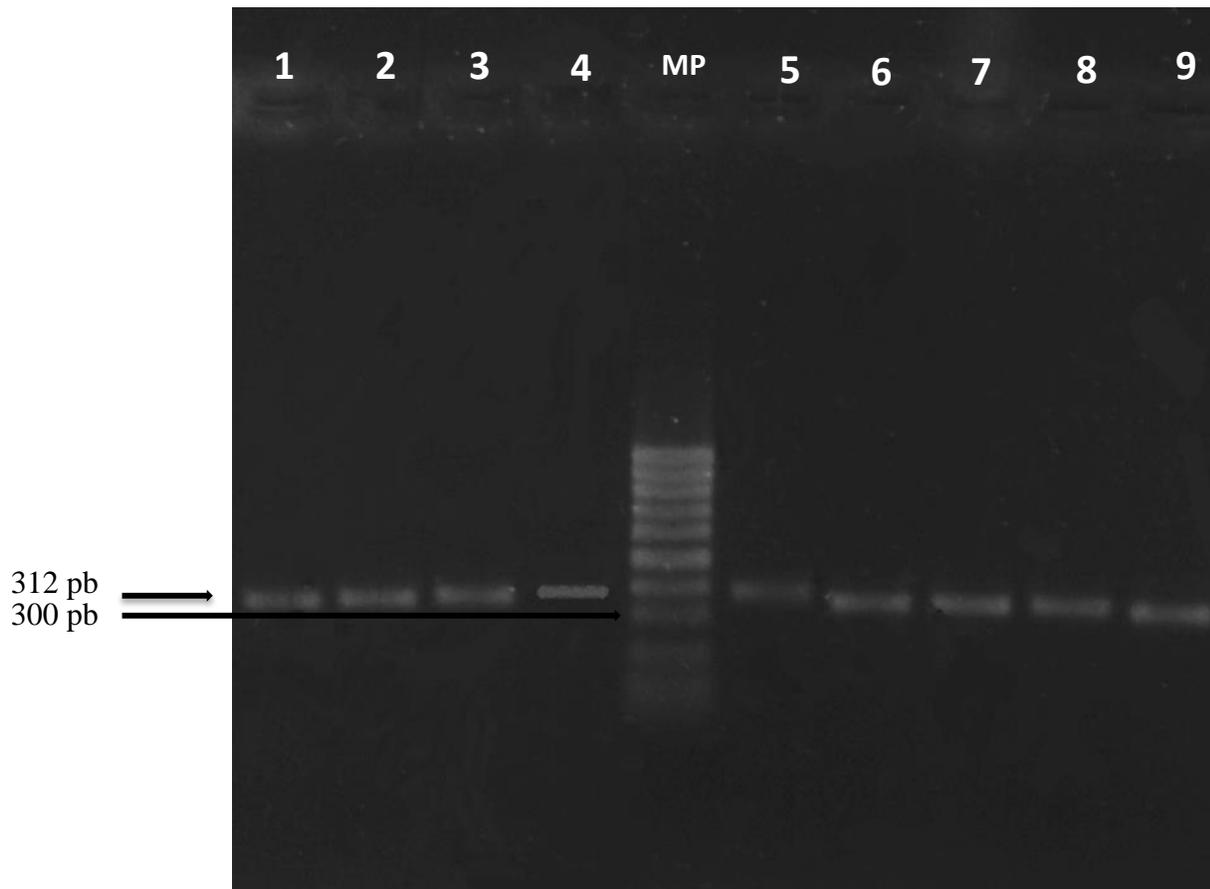
La concentración, pureza e integridad del ADN genómico extraído son características fundamentales para la realización de las pruebas moleculares que permitirán identificar los SNP en estudio. El ADN genómico extraído de cada una de las muestras mediante el “DNA Blood GF-1 Extraction Kit” se observa en la figura N° 19, en donde la obtención de una sola banda bien definida indica la presencia y calidad del mismo.



**Figura N° 19.** Gel de agarosa 1 % conteniendo el ADN genómico obtenido de las pacientes con cáncer de mama participantes en el estudio.

#### 4.3. PCR-RFLP del exón 5 del gen *CYP2C8* para detectar el SNP *CYP2C8\*2*

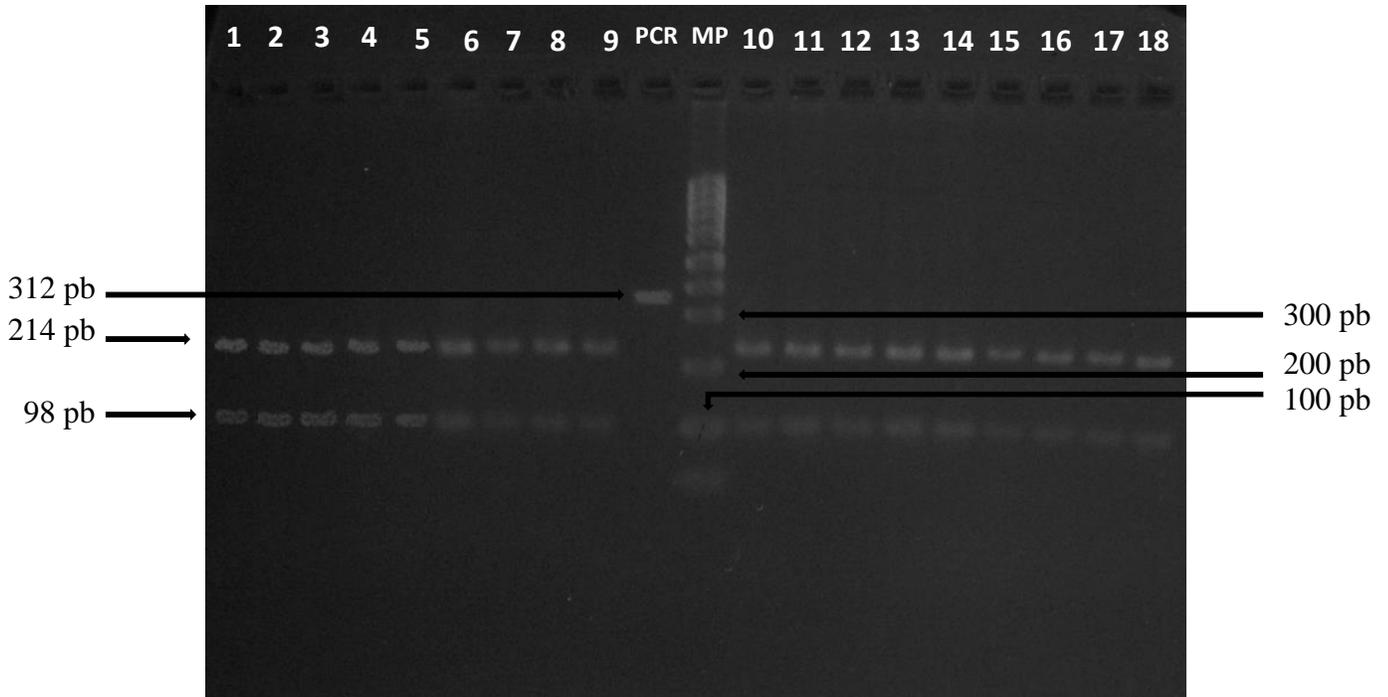
Para amplificar el exón 5 del gen *CYP2C8* se emplearon los cebadores descritos en la tabla N° 4. El producto amplificado se separó por electroforesis en gel de agarosa 1,5 %, utilizando el marcador de peso molecular 50 bp DNA Ladder. El producto amplificado midió 312 pb (figura N° 20).



**Figura N° 20.** Gel de agarosa 1,5 % conteniendo el exón 5 del gen *CYP2C8*. Líneas del 1 al 9 se presentan los productos de PCR ; MP, marcador de peso molecular 50 bp Ladder.

“Detección de SNP en genes *CYP2C8* de pacientes con cáncer de mama que reciben paclitaxel en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas de marzo a diciembre 2013”.

Al digerir el producto de PCR con la enzima de restricción *BclI*, se observaron dos fragmentos de 214 y 98 pb en todos los pacientes, como se muestra en la figura N° 21. Esto indica que todos presentaron el genotipo silvestre AA. No se detectó el SNP *CYP2C8\*2*.



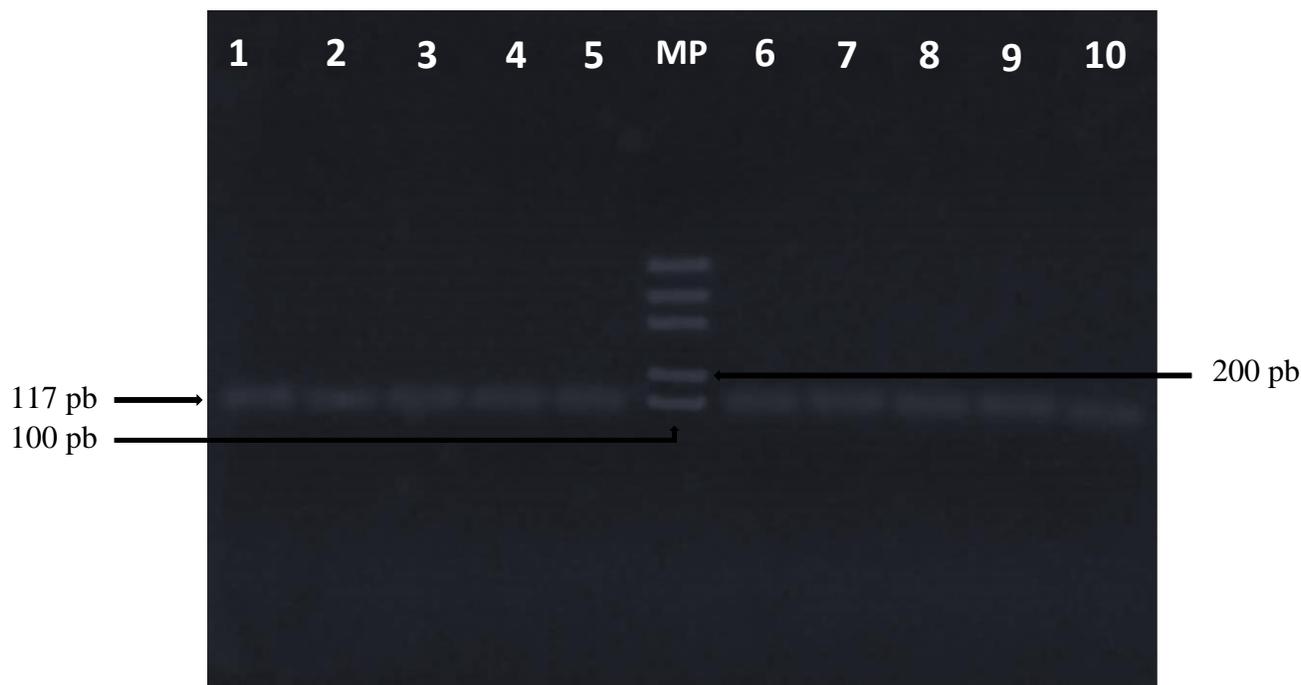
**Figura N° 21.** Detección del SNP *CYP2C8\*2* del gen *CYP2C8*. Electroforesis en el de agarosa 3:1 3 %. Líneas del 1 al 18, genotipo silvestre AA; PCR, producto de PCR sin digerir; MP, marcador de peso molecular 50 bp Ladder.

#### 4.4. PCR-RFLP del exón 8 del gen *CYP2C8* para detectar el SNP *CYP2C8\*3*

Para amplificar el exón 8 del gen *CYP2C8* se emplearon los cebadores descritos en la tabla N°4. El producto amplificado se separó por electroforesis en gel de

“Detección de SNP en genes *CYP2C8* de pacientes con cáncer de mama que reciben paclitaxel en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas de marzo a diciembre 2013”.

agarosa 1,5 %, utilizando el marcador de peso molecular Mass Rulers. El producto amplificado midió 117 pb (figura N° 22).

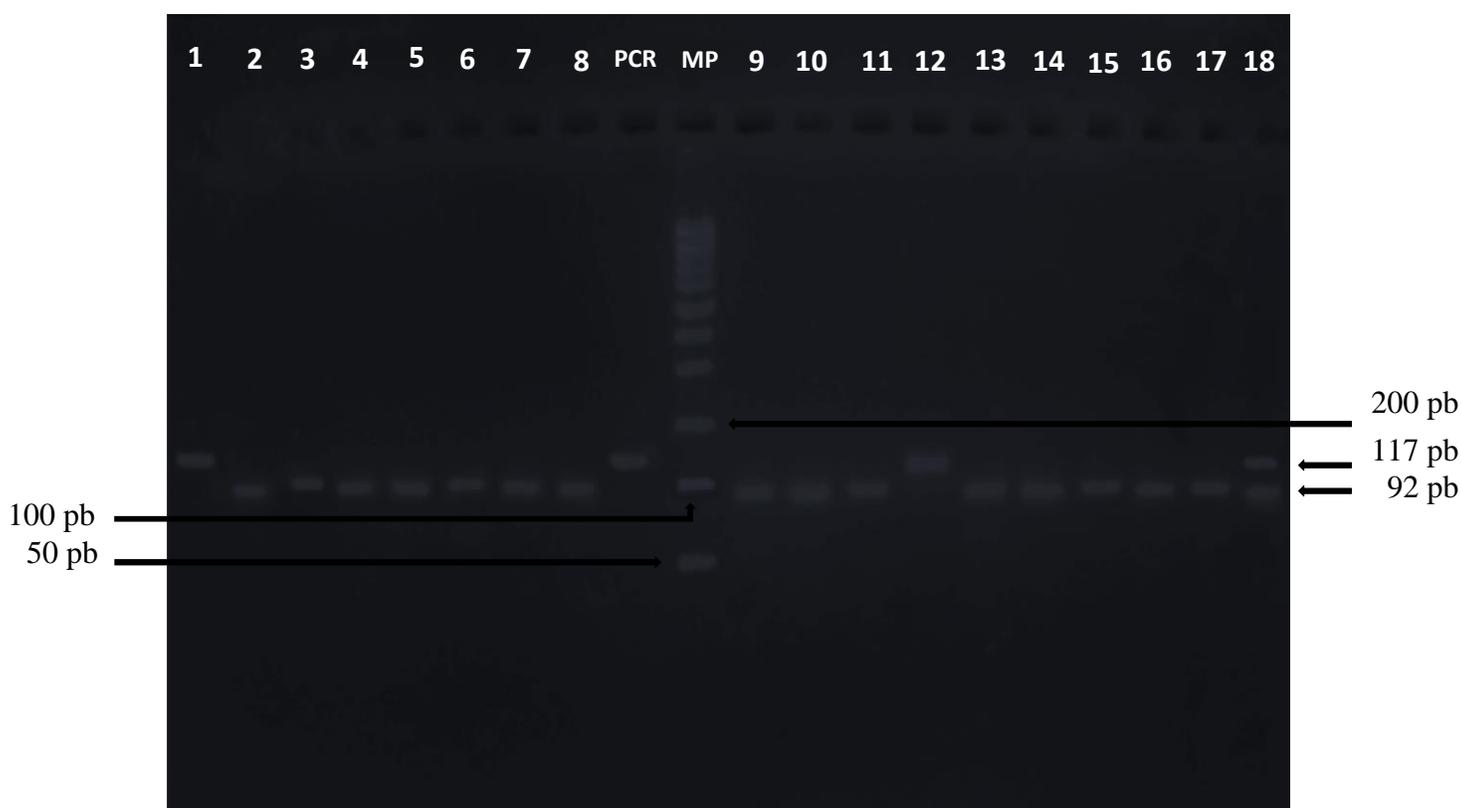


**Figura N° 22.** Gel de agarosa 1,5 % conteniendo el exón 8 del gen *CYP2C8*.

Líneas del 1 al 10 se presentan los productos de PCR; MP, marcador de peso molecular Mass Rulers.

En la figura N° 23, al digerir el producto de PCR con la enzima de restricción *Pdml(XmnI)*, se observa que en las líneas 1 y 12 se obtuvo un fragmento del mismo tamaño que el producto de PCR sin digerir, de 117 pb , lo cual indica que no hubo punto de corte para la enzima. Estas dos líneas corresponden a pacientes con el genotipo GG, es decir son homocigotos para el SNP *CYP2C8*\*3. En la línea 18 se observan dos fragmentos de 117 y 92 pb , lo cual indica que corresponde a

un paciente con el genotipo AG, es decir es heterocigoto para el SNP *CYP2C8*\*3. En las demás líneas ( 2-8, 9-11,13-17) , se observa un solo fragmento de 92 pb, lo cual indica que corresponden a pacientes con el genotipo silvestre AA. El fragmento de 25 pb en las líneas correspondientes al genotipo heterocigoto AG y silvestre AA , es imperceptible debido a su bajo peso molecular.



**Figura N° 23.** Detección del SNP *CYP2C8*\*3 del gen *CYP2C8*. Electroforesis en el de agarosa 3:1 3,5 %. Líneas del 1 y 12, genotipo homocigoto GG para *CYP2C8*\*3; línea 18, genotipo heterocigoto AG para *CYP2C8*\*3; líneas 2-8, 9-11, 13-17, genotipo silvestre AA, PCR, producto de PCR sin digerir; MP, marcador de peso molecular 50 bp Ladder.

En la tabla N° 6 se resumen los tamaños de los fragmentos de ADN obtenidos al digerir los productos de PCR con las enzimas de restricción *BclI* y *Pdml (XmnI)* para la detección de los SNP *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* respectivamente. Se muestran los tamaños de los fragmentos de ADN para los alelos mutados y los silvestres.

**Tabla N° 6.** Tamaño de los fragmentos de ADN cortados por las enzimas de restricción según el SNP analizado.

Variante gen <i>CYP2C8</i>	Tamaño del fragmento amplificado (pb)	Enzima de restricción	Tamaño del fragmento digerido		
			Alelo mutado		Alelo silvestre (pb)
			Homocigoto (pb)	Heterocigoto (pb)	
<b><i>CYP2C8*2</i></b>	312	<i>BclI</i>	312	312 214 98	214 98
<b><i>CYP2C8*3</i></b>	117	<i>Pdml (XmnI)</i>	117	117 92 25 <sup>(a)</sup>	92 25 <sup>(a)</sup>
<sup>(a)</sup> Este fragmento es imperceptible en la electroforesis debido a su bajo peso molecular					

#### 4.5. Distribuciones genotípicas y alélicas de los SNP *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* del gen *CYP2C8*

Las tablas N° 7 y 8 resumen las distribuciones genotípicas y alélicas de los SNP *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* del gen *CYP2C8* en un total de 78 alelos correspondientes a 39 pacientes. Para el SNP *CYP2C8\*2* (805 A>T) se encontró que el 100 % de los pacientes presentó el genotipo silvestre con el alelo 805A. Para el SNP *CYP2C8\*3* del gen *CYP2C8* la distribución de genotipos fue: AA= 92,3 %; AG= 2,6 % y GG= 5,1 %. La frecuencia para el alelo mutado 1196 G fue de 6,4 %, encontrándose en 5 alelos.

**Tabla N° 7.** Distribución de genotipos y alelos para el SNP *CYP2C8\*2* del gen *CYP2C8* en pacientes con cáncer de mama tratadas con paclitaxel en el INEN de marzo a diciembre 2013.

<i>CYP2C8*2</i> (805 A>T)		
Genotipo	N° de pacientes	Frecuencia relativa (%)
AA	39	100
AT	0	0
TT	0	0
Alelos	N° de alelos	Frecuencia relativa (%)
A	78	100
T	0	0

**Tabla N° 8.** Distribución de genotipos y alelos para el SNP *CYP2C8*\*3 del gen *CYP2C8* en pacientes con cáncer de mama tratadas con paclitaxel en el INEN de marzo a diciembre 2013.

CYP2C8*3 (1196 A>G)		
Genotipo	N° de pacientes	Frecuencia relativa (%)
AA	36	92,3
AG	1	2,6
GG	2	5,1
Alelos	N° de alelos	Frecuencia relativa (%)
A	73	93,6
G	5	6,4

#### 4.6. SNP *CYP2C8*\*3 en relación a la toxicidad y efectividad del paclitaxel

El grado de neuropatía fue registrado en la historia clínica de acuerdo a la evaluación médica clínica en función a los síntomas referidos por las pacientes. Se encontró que del 100 % (n=22) de las pacientes que presentaron neuropatía, sólo 4,5 % presentó el genotipo homocigoto GG para el SNP *CYP2C8*\*3 y 4,5 % presentó el genotipo heterocigoto AG para el SNP *CYP2C8*\*3 (Tabla N° 9). Así mismo, se determinó que no existe asociación entre el genotipo para el SNP *CYP2C8*\*3 (1196 A>G) y la neuropatía inducida por paclitaxel ( $p = 0,98$ ) en la población estudiada.

**Tabla N° 9.** Pacientes que presentaron neuropatía en diferentes grados

según n genot ipos para el SNP	<b>CYP2C8*3 (1196 A&gt;G) Genotipo</b>	<b>Grado de neuropatía</b>					<b>Porcentaje</b>
		<b>0*</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Total</b>	
	<b>AA</b>	16	18	1	1	36	<b>92,3</b>
	<b>AG</b>	0	1	0	0	1	<b>2,6</b>
	<b>GG</b>	1	1	0	0	2	<b>5,1</b>
	<b>Total</b>	17	20	1	1	<b>39</b>	<b>100</b>
	<b>Porcentaje</b>	<b>43,6</b>	<b>51,3</b>	<b>2,6</b>	<b>2,6</b>	<b>100</b>	

*CYP2C8\*3 (1196 A>G) del gen CYP2C8.*

\*Pacientes que no presentaron neuropatía

Al determinar el incremento de los niveles de transaminasas en relación al genotipo del SNP *CYP2C8\*3 (1196 A>G)* se encontró que del 100 % (n=26) de las pacientes que presentaron incremento de los niveles de TGP el 3,8 % presentó en genotipo homocigoto GG para el SNP *CYP2C8\*3*. Del mismo modo, del 100 % (n=18) de las pacientes que presentaron incremento en los niveles de TGO el 5,5 % presentó el genotipo homocigoto GG para el SNP *CYP2C8\*3*. No se encontró asociación entre el genotipo para el SNP *CYP2C8\*3 (1196 A>G)* y el incremento de los niveles de transaminasas causado por la quimioterapia con paclitaxel en la población estudiada ( $p>0,05$ ).

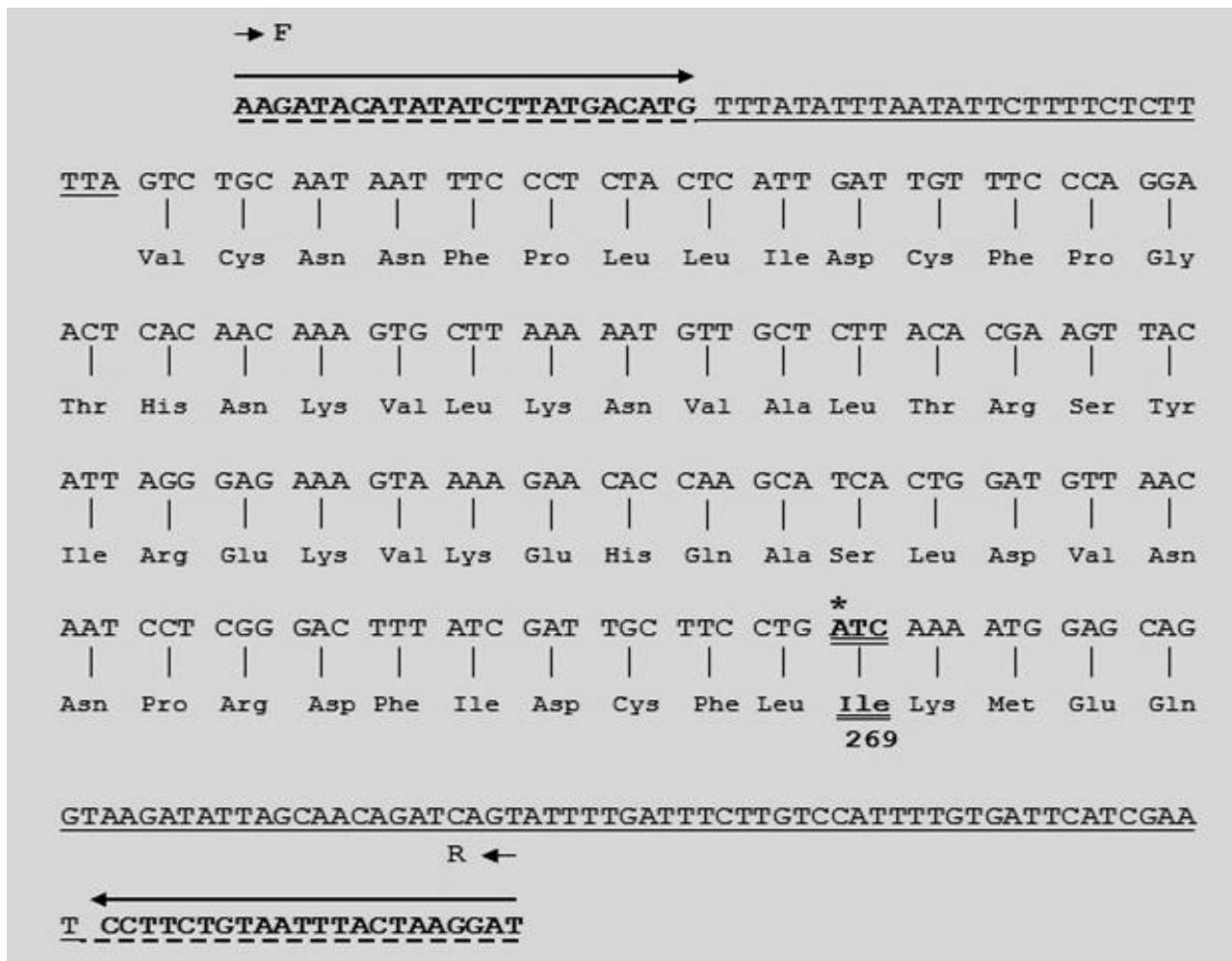
Al comparar las medias del tamaño clínico tumoral y compromiso ganglionar antes y después de la quimioterapia neoadyuvante con paclitaxel en las pacientes con el genotipo silvestre AA para el SNP *CYP2C8\*3 (1196 A>G)*, se encontró que existen diferencias significativas en la reducción del tamaño clínico del tumor y del compromiso ganglionar después de la quimioterapia con paclitaxel ( $p<0,05$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en las pacientes con los

genotipos AG y GG, heterocigoto y homocigoto respectivamente para el SNP *CYP2C8*\*3 (1196 A>G).

#### **4.7. Análisis de secuencias nucleotídicas**

##### **4.7.1. SNP *CYP2C8*\*2**

En la figura N°24, se muestra el producto de amplificación para la identificación del SNP *CYP2C8*\*2, obtenido usando los cebadores F y R descritos en la tabla N°4 los cuales se encuentran el intrón 4 y 5 respectivamente. El producto de PCR incluye la secuencia completa del exón 5 en donde se encuentra el SNP *CYP2C8*\*2. Este SNP se produce por el cambio del nucleótido adenina en la posición 805 de la CDS del ARNm por timina (805 A>T), lo cual genera que el codón ATC que codifica para el aminoácido isoleucina 269 de la proteína *CYP2C8*, sea cambiado por el codón TTC que codifica para el aminoácido fenilalanina.



**Figura N° 24.** Análisis de la secuencia nucleotídica del exón 5 del gen *CYP2C8*. El nucleótido marcado con \* es cambiado dando lugar al SNP *CYP2C8*\*2 (805 A>T), generando la sustitución I269F. Los nucleótidos subrayados corresponden a la parte intrónica, en donde se encuentran los cebadores F y R marcados por una flecha.

En la figura N° 25, se observa el sitio de restricción de la enzima *BclI* para la identificación del SNP *CYP2C8*\*2 en el exón 5 del gen *CYP2C8*. El alelo silvestre presenta la secuencia de reconocimiento para la enzima, lo cual genera en el producto amplificado un punto de corte con fragmentos de 214 y

98 pb. El alelo mutado no presenta la secuencia de reconocimiento para la enzima, por lo tanto no se genera punto de corte en el producto amplificado, el cual se mantiene con un tamaño de 312 pb.

I

*cyp2c8\*1*

AAGATACATATATCTTATGACATGTTTATATTTAATATTCCTTTCTCTTTTAGGTCTGCAATAATTTCCCTCTA  
CTCATTGATTGTTTCCCAGGAACTCACAACAAAGTGCTTAAAAATGTTGCTCTTACACGAAGTTACATTAGGGA  
GAAAGTAAAAGAACACCAAGCATCACTGGATGTTAACAATCCTCGGGACTTTATCGATTGCTTCCT GATCA<sup>\*</sup>  
AAATGGAGCAGGTAAGATATTAGCAACAGATCAGTATTTTGATTTCTTGTCCATTTTGTGATTTCATCGAATCCT  
TCTGTAATTTACTAAGGAT

II

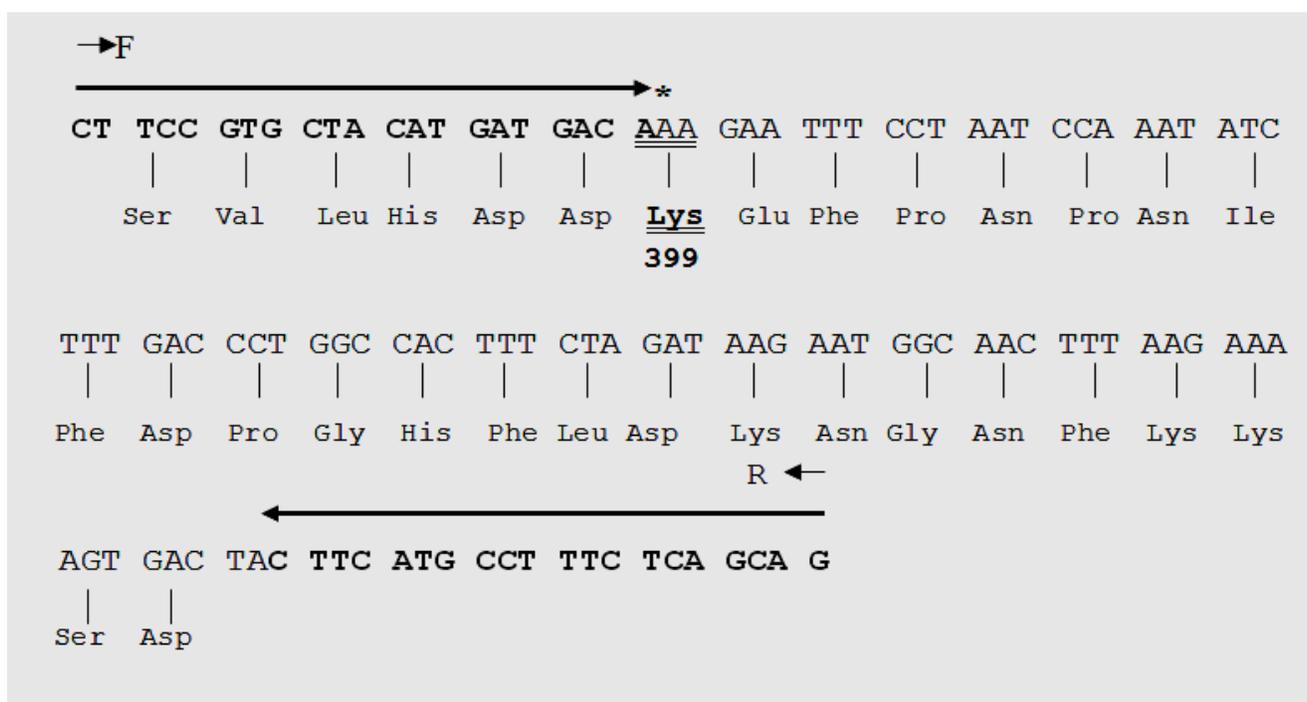
*cyp2c8\*2*

AAGATACATATATCTTATGACATGTTTATATTTAATATTCCTTTCTCTTTTAGGTCTGCAATAATTTCCCTCTA  
CTCATTGATTGTTTCCCAGGAACTCACAACAAAGTGCTTAAAAATGTTGCTCTTACACGAAGTTACATTAGGGA  
GAAAGTAAAAGAACACCAAGCATCACTGGATGTTAACAATCCTCGGGACTTTATCGATTGCTTCCTGTTC<sup>\*</sup>AAAA  
TGGAGCAGGTAAGATATTAGCAACAGATCAGTATTTTGATTTCTTGTCCATTTTGTGATTTCATCGAATCCTTCT  
GTAATTTACTAAGGAT

**Figura N° 25.** Sitio de restricción de la enzima *BclI* para la identificación del SNP *CYP2C8\*2* en el exón 5 del gen *CYP2C8*. I. Alelo silvestre con la secuencia de reconocimiento para la enzima (subrayado) generando un punto de corte con fragmentos de 214 y 98 pb. II. Alelo mutado sin la secuencia de reconocimiento para la enzima. El nucleótido marcado con \* corresponde al SNP.

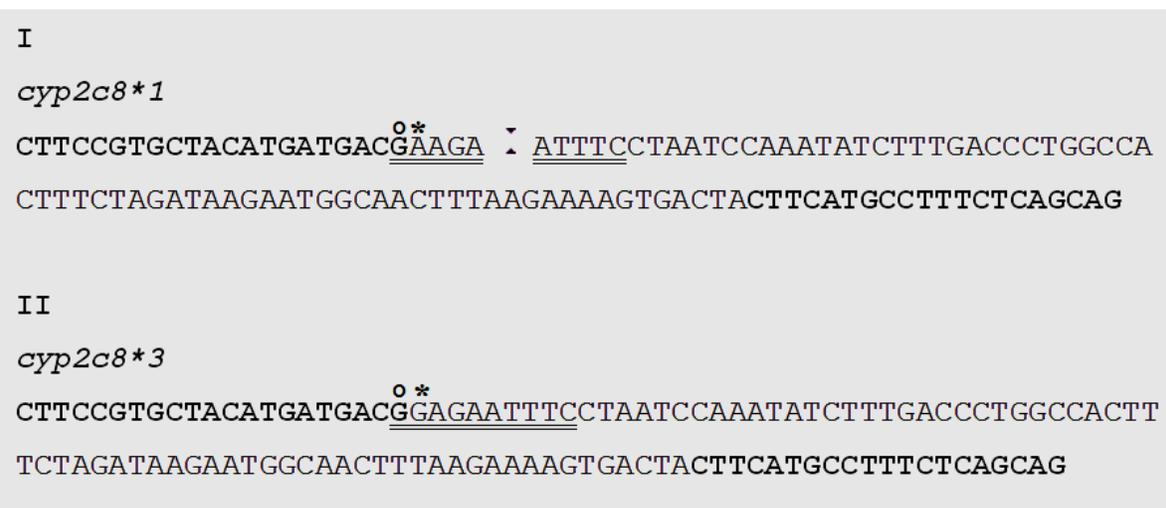
#### 4.7.2. SNP *CYP2C8*\*3

En la figura N° 26, se muestra el producto de amplificación para la identificación del SNP *CYP2C8*\*3 obtenido usando los cebadores F y R descritos en la tabla N°4. El producto de PCR incluye parte de la secuencia del exón 8 en donde se encuentra el SNP *CYP2C8*\*3. Este SNP se produce por el cambio del nucleótido adenina en la posición 1196 de la CDS del ARNm por guanina (1196 A>G), lo cual genera que el codón AAA que codifica para el aminoácido lisina 399 de la proteína *CYP2C8*, sea cambiado por el codón AGA que codifica para el aminoácido arginina.



**Figura N° 26.** Análisis de la secuencia nucleotídica del exón 8 del gen *CYP2C8*. El nucleótido marcado con \* es cambiado dando lugar al SNP *CYP2C8*\*3 (1196 A>G), generando la sustitución K399R. Las secuencias de los cebadores F y R están marcadas por una flecha.

En la figura N° 27, se observa el sitio de restricción de la enzima *Pdml* (*Xmnl*) para la identificación del SNP *CYP2C8\*3* en el exón 8 del gen *CYP2C8*. El alelo silvestre presenta la secuencia de reconocimiento para la enzima, lo cual genera en el producto amplificado un punto de corte con fragmentos de 92 y 25 pb. El alelo mutado no presenta la secuencia de reconocimiento para la enzima, por lo tanto no se genera punto de corte en el producto amplificado, el cual se mantiene con un tamaño de 117 pb. El nucleótido G de la secuencia del cebador F es un mismatch con la secuencia del exón 8 del gen *CYP2C8*, para crear un sitio de restricción para la enzima *Pdml* (*Xmnl*) en el producto de PCR del alelo silvestre.



**Figura N° 27.** Sitio de restricción de la enzima *Pdml* (*Xmnl*) para la identificación del SNP *CYP2C8\*3* en el exón 8 del gen *CYP2C8*. I. Alelo silvestre con la secuencia de reconocimiento para la enzima (subrayado) generando un punto de corte con fragmentos de 92 y 25 pb. II. Alelo mutado sin la secuencia de reconocimiento para la enzima. El nucleótido marcado con \* corresponde al SNP y el nucleótido marcado con ° se ha usado para la mismatch PCR-RFLP.

## V. DISCUSIÓN

A nivel mundial, el cáncer de mama constituye un problema de salud pública y en nuestro país, su incidencia y mortalidad se están incrementando por falta de estudios que contribuyan a optimizar e individualizar la terapia. La quimioterapia neoadyuvante tiene como objetivo reducir el tamaño tumoral previo a la cirugía y constituye la base del manejo del cáncer de mama localmente avanzado. El paclitaxel es el fármaco de primera línea empleado en la quimioterapia neoadyuvante del cáncer de mama localmente avanzado, sin embargo presenta gran intervariabilidad en la respuesta terapéutica y la presentación de efectos adversos. Las variantes *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* del gen *CYP2C8*, que codifica la principal enzima implicada en el metabolismo de este fármaco, la *CYP2C8*, han sido asociados con esta variabilidad. Por ello, se estudió la presencia de SNP en el gen *CYP2C8* en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado del INEN que recibieron quimioterapia neoadyuvante con paclitaxel. El SNP *CYP2C8\*2* (805 A>T), no fue encontrado en ninguna de las pacientes de la población estudiada. Este resultado se asemeja a la baja frecuencia encontrada por Carmona y col, en un estudio realizado en una población colombiana, en el cual reportaron una frecuencia alélica de 1,5 % (13). *CYP2C8\*2* ha sido reportado principalmente en poblaciones africanas con frecuencias alélicas de 10, 15, 17, 18 y 22 %, siendo esta última la mayor reportada, la cual fue descrita en un estudio realizado por Paganotti y col, en una población de Senegal (8) (12) (15). Frecuencias alélicas menores han sido descritas poblaciones de la India (3 %) (16), Malasia (0,8 %)

(60) y población caucásica (0,7 %) (4). La frecuencia alélica encontrada para el SNP *CYP2C8*\*3 (1196 A>G), fue de 6,4 %. Este resultado coincide con el reportado por Vicente y col, quienes encontraron una frecuencia alélica de 6,5 % en una población ecuatoriana mestiza. En una población española se encontró una frecuencia alélica de 11,4 % (19). *CYP2C8*\*3 ha sido descrito principalmente en poblaciones caucásicas con frecuencias alélicas de 9,2; 13; 15 y 17 %, siendo esta última la mayor reportada, la cual fue descrita por Martínez y col, en una población de españoles caucásicos (4) (6) (8) (9). Frecuencias alélicas menores han sido encontradas en poblaciones de la India (4 %) y Malasia (1,2 %) (16) (60). Las menores frecuencias alélicas han sido descritas en poblaciones africanas (2 y 0 %) (8) (12). La frecuencia alélica variable reportada anteriormente para cada uno de los SNP estudiados (ANEXO N° 8), se debe a que ésta difiere según la raza y el origen étnico; en tanto, la población peruana es producto de un mestizaje entre españoles, africanos, asiáticos y amerindios; existiendo variaciones de una región a otra en relación al componente étnico que predomina en cada zona. En cuanto a los efectos adversos del paclitaxel, los principales son la neuropatía y la toxicidad hematológica. En este estudio, se encontró que el 56,5 % de las pacientes presentaron neuropatía, sin embargo la toxicidad hematológica se evidenció en menor porcentaje. Además, las pacientes presentaron incremento de los niveles de TGP y TGO en el 66,7 y 46,2 % de los casos respectivamente. La presentación de efectos adversos asociados a la quimioterapia conlleva a retrasos o abandono del tratamiento, es así que el 10,3 % de las pacientes abandonó la quimioterapia con este fármaco debido a la presentación de efectos adversos. La presencia de los SNP *CYP2C8*\*2 y *CYP2C8*\*3 han sido asociados

con una menor actividad catalítica de la enzima *CYP2C8* en el metabolismo del paclitaxel, lo cual resultaría en un incremento de la concentración plasmática del fármaco y una mayor exposición de éste al paciente, induciendo de esta manera la presentación de efectos adversos. Sin embargo, no se encontró asociación entre el genotipo del SNP *CYP2C8\*3* y los efectos adversos del fármaco, principalmente la neuropatía periférica, en la población estudiada. Henningsson y col, reportaron que estos SNP no explican la variabilidad interindividual en la farmacocinética del paclitaxel (4). En tanto, Hertz y col y Leskela y col, encontraron que el SNP *CYP2C8\*3* estaba asociado con neurotoxicidad inducida por paclitaxel (7) (14) (17). En relación al efecto de *CYP2C8\*3* en la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante con paclitaxel, un hallazgo fue la relación observada entre el alelo 1196 G y la falla en la respuesta terapéutica clínica en las pacientes portadoras de esta variante. Se encontró que estas pacientes no presentaron reducción del tamaño clínico tumoral ni del compromiso ganglionar después de la quimioterapia con paclitaxel como si la presentaron las pacientes portadoras del alelo silvestre 1196 A. Estos resultados difieren de los reportados por Hertz y col, quienes encontraron que los pacientes que presentaban el SNP *CYP2C8\*3* tenían mayor probabilidad de lograr respuesta completa a la quimioterapia neoadyuvante con paclitaxel (7).

## VI. CONCLUSIONES

1. Las frecuencias alélicas de *CYP2C8*\*2 (805 T) y *CYP2C8*\*3 (1196 G) en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado del INEN que recibieron quimioterapia neoadyuvante con paclitaxel fueron de 0 y 6,4 % respectivamente.
2. No se encontró asociación entre el genotipo *CYP2C8*\*3 (1196 G) y los efectos adversos presentados por el paclitaxel, principalmente la neuropatía periférica. Las pacientes con el alelo *CYP2C8*\*3 (1196 G), no presentaron reducción significativa del tamaño clínico tumoral ni del compromiso ganglionar después de la quimioterapia neoadyuvante con paclitaxel.

## VII. RECOMENDACIONES

Continuar con los estudios de detección de SNP en el gen *CYP2C8* en mayor número de pacientes con cáncer de mama localmente avanzado y determinar la asociación entre la presencia de éstos y la farmacocinética del paclitaxel, riesgo de presentación de efectos adversos, respuesta terapéutica y supervivencia. Así mismo, estudiar otros marcadores genéticos asociados con el metabolismo y transporte del paclitaxel. Estos estudios permitirán individualizar la terapia, para de este modo optimizar la respuesta terapéutica, reducir la toxicidad, mejorar la calidad de vida de las pacientes y reducir los costos de la quimioterapia en cáncer de mama.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GLOBOCAN. IARC. 2012.
2. Departamento de Epidemiología y Estadística del Cáncer. Instituto Nacional de enfermedades neoplásicas. 2013.
3. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Guía de práctica clínica: cáncer de mama. 2011.
4. Henningsson A, Marsh S, Loos WJ, Karlsson MO, Garsa A, Mross K, et al. Association of *CYP2C8*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, and *ABCB1* polymorphisms with the pharmacokinetics of paclitaxel. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(22):8097–8104.
5. Bergmann TK, Brasch-Andersen C, Gréen H, Mirza M, Pedersen RS, Nielsen F, et al. Impact of *CYP2C8*\*3 on paclitaxel clearance: a population pharmacokinetic and pharmacogenomic study in 93 patients with ovarian cancer. *Pharmacogenomics J*. 2011; 11(2):113–120.
6. Bahadur N, Leathart JBS, Mutch E, Steimel-Crespi D, Dunn SA, Gilissen R, et al. *CYP2C8* polymorphisms in caucasians and their relationship with paclitaxel 6alpha-hydroxylase activity in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol*. 2002; 64(11):1579–1589.

7. Hertz DL, Motsinger-Reif AA, Drobish A, Winham SJ, McLeod HL, Carey LA, et al. *CYP2C8\*3* predicts benefit/risk profile in breast cancer patients receiving neoadjuvant paclitaxel. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 134 (1):401–410.
8. Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, Chanas B, Coulter SJ, Ghanayem BI, et al. Polymorphisms in human *CYP2C8* decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics.* 2001; 11(7):597–607.
9. Martínez C, García-Martín E, Blanco G, Gamito FJG, Ladero JM, Agúndez JAG. The effect of the cytochrome P450 *CYP2C8* polymorphism on the disposition of (R)-ibuprofen enantiomer in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2005; 59 (1):62–68.
10. Gao Y, Liu D, Wang H, Zhu J, Chen C. Functional characterization of five *CYP2C8* variants and prediction of *CYP2C8* genotype-dependent effects on *in vitro* and *in vivo* drug-drug interactions. *Xenobiotica.* 2010; 40(7):467–475.
11. Bravo-Villalta HV, Yamamoto K, Nakamura K, Bayá A, Horiuchi R. A novel intronic mutation that may affect genotyping result of *CYP2C8* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) is strongly associated with *CYP2C8\*3* in a South American population. *J Hum Genet.* 2007; 52(2):195–199.

12. Kudzi W, Dodoo AN, Mills JJ. Characterisation of *CYP2C8*, *CYP2C9* and *CYP2C19* polymorphisms in a Ghanaian population. *BMC Med Genet* .2009; 10:124 -129.
  
13. Carmona J, Guzmán V, Maestre A. Malaria: eficacia de amodiaquina-sulfadoxina-pirimetamina, estado nutricional y variantes alélicas del gen *CYP2C8* \*. *Colomb Med*. 2009; 40:103–113.
  
14. Leskelä S, Jara C, Leandro-García LJ, Martínez a, García-Donas J, Hernando S, et al. Polymorphisms in cytochromes P450 2C8 and 3A5 are associated with paclitaxel neurotoxicity. *Pharmacogenomics J*. 2011; 11(2):121–129.
  
15. Paganotti GM, Gramolelli S, Tabacchi F, Russo G, Modiano D, Coluzzi M, et al. Distribution of human *CYP2C8\*2* allele in three different African populations. *Malaria Journal*. 2012; 11(1):125-129.
  
16. Minhas S, Setia N, Pandita S, Saxena R, Verma IC, Aggarwal S. Prevalence of *CYP2C8* polymorphisms in a North Indian population. *Genet Mol Res*. 2013; 12(3):2260–2266.
  
17. Hertz DL, Roy S, Motsinger-Reif AA, Drobis A, Clark LS, McLeod HL, et al. *CYP2C8\*3* increases risk of neuropathy in breast cancer patients treated with paclitaxel. *Ann Oncol*. 2013; 24(6):1472–1478.

18. Yu L, Shi D, Ma L, Zhou Q, Zeng S. Influence of *CYP2C8* polymorphisms on the hydroxylation metabolism of paclitaxel, repaglinide and ibuprofen enantiomers *in vitro*. *Biopharm Drug Dispos.* 2013; 34:278–287.
  
19. Vicente J, González-Andrade F, Soriano A, Fanlo A, Martínez-Jarreta B, Sinués B. Genetic polymorphisms of *CYP2C8*, *CYP2C9* and *CYP2C19* in Ecuadorian Mestizo and Spaniard populations: a comparative study. *Mol Biol Rep.* 2014; 41(3):1267–1272.
  
20. Ministerio de Salud de Chile. Guía Clínica: Cáncer de mama. 2011.
  
21. Ministerio de Salud. Análisis de la situación de cáncer en el Perú. 2013.
  
22. Ministerio de Salud. Protocolo de manejo Multidisciplinario del cáncer de mama. 2005.
  
23. Jiménez MM. Cáncer de mama. España: Arán Ediciones S. L; 2009.
  
24. Abeloff MD, Wolff AC, Weber BL, Armitage JO, Lichter AS. Breast Cancer. *Clin Oncol*; 2008: 1875–1943.
  
25. Girish C, Vijayalakshmi P, Mentham R, Rao CB, Nama S. A Review of Breast Cancer. *Int J Pharm Bio Sc.* 2014; 4(2): 47-54.

26. American Joint Committee on Cancer. AJCC Cancer Staging Manual, 7<sup>th</sup> Ed. New York: Springer; 2010.
27. Edges SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17(6):1471–1474.
28. Arce C, Bargalló E, Villaseñor Y, Gamboa C, Lara F, Pérez V, et al. Cáncer de Mama. *Cancerología*. 2011; 6:77-86.
29. Gómez –Iturriaga A, Moreno MJ Martínez – Monge R. Tratamiento radioterápico del cáncer mama : estándares y nuevas tendencias. Irradiación parcial acelerada de la mama. *Rev Med Univ Navarra*. 2008; 52 (1):25–36.
30. Early Breast Cancer Trialists’ Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365(9472):1687–1717.
31. Van Der Hage JA, Van De Velde CJ, Julien JP. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 10902. *Journal of Clinical Oncology* 2001; 19(22):4224–4237.

32. Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JP. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 2005; 97(3):188–194.
  
33. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets and side effects. *N Engl J Med*. 2003; 348(6): 538-549.
  
34. Novell S. Association between sulfotransferasa 1A1 genotype and survival of breast cancer patients receiving tamoxifen therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94: 1635-1640.
  
35. Tanus – Santos JE. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release and interactions with estradiol. *Pharmacogenetics*. 2002; 12: 407-413.
  
36. Franceschini T , Terribile D , Fabbri C , Magno S , D'Alba P , Chiesa F , et al. Management of locally advanced breast cancer. *Minerva Chir*. 2007; 62 (4): 249-255.
  
37. Zaharia M, Gómez H. Neoadjuvant chemotherapy in the treatment of locally breast cancer. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2013; 30 (1):73–78.

38. Velasco M, Martínez S, Cerdá P, Estival A, Fernández M, Lianes P, et al. Quimioterapia neoadyuvante en el cáncer de mama localmente avanzado. *Rev Senol Patol Mamar*. 2012; 25(1):14–21.
39. Untch M, Konecny G, Ditsch N, Sorokina Y, Moebus V, Muck B, et al. Dose-dense sequential epirubicin and paclitaxel as preoperative treatment of breast cancer: results of a randomized AGO study. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2002; 21: 133-137.
40. Green MC, Buzdar AU, Smith T, Ibrahim NK, Valero V, Rosales MF, et al. Weekly paclitaxel improves pathologic complete remission in operable breast cancer when compared with paclitaxel once every 3 weeks. *J Clin Oncol*. 2005; 23:5983-5992.
41. Cristofanilli M, Gonzalez-Angulo A, Sneige N, Kau SW, Broglio K, Theriault RL, et al. Invasive lobular carcinoma classic type: Response to primary chemotherapy and survival outcomes. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 41-48.
42. Leskelä S. Pharmacogenetics of taxanes: Identification and characterization of molecular mechanisms underlying toxicity and lack of response [tesis doctoral]. España: Universidad Autónoma de Madrid Facultad de Ciencias; 2009.

43. Spratlin J, Sawyer MB. Pharmacogenetics of paclitaxel metabolism. *Oncology/Hematology*. 2007; 61: 222-229.
44. Taniguchi R, Kumai T, Matsumoto N, Watanabe M, Kamio K, Suzuki S. Utilization of Human Liver Microsomes to Explain Individual Differences in Paclitaxel Metabolism by CYP2C8 and CYP3A4. *J Pharmacol Sci*. 2005; 97:83–90.
45. Haiqing Y. Studies on the chemistry of paclitaxel [tesis doctoral]. Virginia: Virginia Polytechnic Institute and State University; 1998.
46. Lai X-S, Yang L-P, Li X-T, Liu J-P, Zhou Z-W, Zhou S-F. Human CYP2C8: structure, substrate specificity, inhibitor selectivity, inducers and polymorphisms. *Curr Drug Metab*. 2009; 10(9):1009–1047.
47. Rodríguez-Antona C, Niemi M, Backman JT, Kajosaari LI, Neuvonen PJ, Robledo M, et al. Characterization of novel CYP2C8 haplotypes and their contribution to paclitaxel and repaglinide metabolism. *Pharmacogenomics J*. 2008; 8 (4):268–277.
48. Quiñones L, Rosero M, Roco A, Moreno I, Sasso J, Varela N, et al. Role of cytochrome P450 enzymes in the metabolism of antineoplastic drugs. *Rev Méd Chile*. 2008; 136: 1327-1335.

49. Cardona AF, Ortiz LD, Reveiz L, Becerra A, Arango N, Santacruz JG, et al. Neuropatía inducida por el tratamiento médico del cáncer. *Med Vis.* 2010; 23(1): 103-127.
50. Velasco R, Bruna J. Neuropatía inducida por quimioterapia: un problema no resuelto. *Neurología.* 2010; 25(2):116–131.
51. Gil JP, Gil Berglund E. *CYP2C8* and antimalaria drug efficacy. *Pharmacogenomics* 2007; 8(2):187–198.
52. Hruska MW. Characterization of cytochrome P450 2C8 activity *in vivo*: pharmacogenetic and pharmacokinetic studies of rosiglitazone metabolism [tesis doctoral]. Pittsburgh: University of Pittsburgh; 2004.
53. Daily EB, Aquilante CL. Cytochrome P450 2C8 pharmacogenetics: a review of clinical studies. *Pharmacogenomics.* 2010; 10(9):1489–1510.
54. Ferguson SS, Chen Y, Lecluyse EL, Negishi M, Goldstein JA. Human *CYP2C8* Is Transcriptionally Regulated by the Nuclear Receptors Constitutive Androstane Receptor, Pregnane X Receptor, Glucocorticoid Receptor, and Hepatic Nuclear Factor 4 $\alpha$ . *Mol Pharmacol.* 2005; 68(3):747–757.

55. Schoch GA, Yano JK, Wester MR, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF. Structure of human microsomal cytochrome P450 2C8. Evidence for a peripheral fatty acid binding site. *J Biol Chem.* 2004; 279(10):9497–9503.
56. Chen Y, Coulter S, Jetten AM, Goldstein JA. Identification of Human *CYP2C8* as a Retinoid-Related Orphan Nuclear Receptor Target Gene. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2009; 329(1):192–201.
57. Muthiah YD, Lee WL, Teh LK, Ong CE, Ismail R. Genetic polymorphism of *CYP2C8* in three Malaysian ethnics: *CYP2C8\*2* and *CYP2C8\*3* are found in Malaysian Indians. *J Clin Pharm Ther.* 2005; 30(5):487–490.
58. Tornio A. Studies on *CYP2C8*-mediated drug interactions [tesis doctoral]. Finland: University of Helsinki; 2008.
59. Kaspera R, Naraharisetti S, Evangelista E, Marciante K, Psaty B, Totah R. Drug metabolism by *CYP2C8.3* is determined by substrate dependent interactions with cytochrome P450 reductase and cytochrome b5 $\dagger$ . *Biochem Pharmacol.* 2011; 82 (6):681–691.
60. Muthiah YD, Lee WL, Teh LK, Ong CE, Ismail R. Genetic polymorphism of *CYP2C8* in three Malaysian ethnics: *CYP2C8\*2* and *CYP2C8\*3* are found in Malaysian Indians. *J Clin Pharm Ther.* 2005; 30 (5):487–490.

## IX. ANEXOS

### ANEXO N° 1

#### FÁRMACOS METABOLIZADOS POR CYP2C8

Specific drugs	Drug class	Treatment indication	Other CYP enzymes that play a role in metabolism
<i>Major contribution of CYP2C8 to metabolism</i>			
All- <i>trans</i> -retinoic acid	Vitamin A derivative	Promyelocytic leukemia	CYP2C9
Amiodarone	Class III antiarrhythmic	Supraventricular and ventricular arrhythmias	CYP3A4, CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6
Amodiaquine	4-aminoquinoline	Malaria	CYP3A4, CYP1A1, CYP1B1
Cerivastatin*	HMG-CoA reductase inhibitor	Hyperlipidemia	CYP3A4
Chloroquine	4-aminoquinoline	Malaria	CYP3A4, CYP2D6
Paclitaxel	Taxane	Solid malignant tumors (e.g., breast, ovarian, lung)	CYP3A4, CYP3A5
Repaglinide	Meglitinide	Type 2 diabetes	CYP3A4
Rosiglitazone	Thiazolidinedione	Type 2 diabetes	CYP2C9, CYP3A4
Pioglitazone	Thiazolidinedione	Type 2 diabetes	CYP3A4, CYP1A1
Tazarotenic acid	Retinoid derivative	Acne and psoriasis	–
Troglitazone*	Thiazolidinedione	Type 2 diabetes	CYP3A4
<i>Intermediate or minor contribution of CYP2C8 to metabolism</i>			
Carbamazepine	Anticonvulsant	Epilepsy	CYP3A4 (major)
Cyclophosphamide	Nitrogen mustard alkylating agent	Lymphoma, leukemia, solid tumors	CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A
Dapsone	Antibacterial sulfone	Leprosy and pneumocystis pneumonia	CYP2C9 (major)
Diclofenac	NSAID	Pain and inflammation	CYP2C9 (major), CYP3A4, and CYP2C19
Diltiazem	Calcium channel blocker	Hypertension, arrhythmias, angina	CYP3A4, CYP2C9
Fluvastatin	HMG-CoA reductase inhibitor	Hyperlipidemia	CYP2C9 (major), CYP3A4
Ibuprofen	NSAID	Pain and inflammation	CYP2C9
Ifosfamide	Nitrogen mustard alkylating agent	Various cancers	CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A
Loperamide	μ-opioid receptor agonist	Antidiarrheal	CYP2B6, CYP2D6, CYP3A4
Methadone	Opioid antagonist	Pain and addiction to opioids	CYP3A4, CYP2D6, CYP2B6
Morphine	Opioid agonist	Pain	CYP3A4
Simvastatin acid	HMG-CoA reductase inhibitor	Hyperlipidemia	CYP3A4 (major)
Tenoxicam	NSAID	Pain and inflammation	CYP2C9 (major)
Torsemide	Loop diuretic	Edema	CYP2C9 (major)
Verapamil	Calcium channel blocker	Hypertension, arrhythmias, angina	CYP3A4 (major), CYP3A5
Zopiclone	Nonbenzodiazepine sedative hypnotic	Insomnia	CYP3A4 (major)

\*

## ANEXO N° 2

### FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LAS PACIENTES

Ficha N°: ..... Fecha: .....

Historia Clínica N°: .....

#### DATOS DE LA PACIENTE

Nombres y Apellidos: .....

Edad:..... Lugar de Nacimiento: .....

Fecha de diagnóstico: .....

#### CÁNCER DE MAMA

Tipo histológico: ..... Estadío: .....

Grado Tumoral: .....

Receptor de Estrógeno: .....

Receptor de Progesterona: .....

#### GENOTIPO

SNP *CYP2C8*\*2 (805 A>T): .....

SNP *CYP2C8*\*3 (1196 A>G): .....

### TAMAÑO CLÍNICO TUMORAL Y COMPROMISO GANGLIONAR

Fecha de consulta	Tamaño clínico tumoral	Compromiso ganglionar

### CICLOS DE PACLITAXEL

N° de ciclo	Fecha	Dosis	Observaciones

### EFFECTOS ADVERSOS

#### Neuropatía

Fecha	Síntomas / Grado de neuropatía según la evaluación clínica

### Toxicidad hematológica

Pruebas hematológicas	Prueba / Fecha						
	Leucocitos						
	Hemoglobina						
	Hematocrito						
	Eosinófilos						
	Basófilos						
	Monocitos						
	Linfocitos						
	Neutrófilos						
	Nº. Metamielocitos						
	Nº. Abastionados						
	Nº. Segmentados						
	Plaquetas						

### Toxicidad hepática

<b>Prueba / Fecha</b>						
TGP						
TGO						

### **ANEXO N° 3**

#### **FORMULARIO DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN**

Usted ha sido diagnosticada de un tumor de mama no metastásico. Como le han explicado sus médicos, se trata de una enfermedad que es potencialmente curable y en la que se sugiere la administración de quimioterapia endovenosa con la finalidad de controlar la enfermedad. Los estudios indican que un tratamiento adecuado para usted sería administrar un tratamiento de quimioterapia inicial para luego ser sometida a la extirpación quirúrgica del tumoral.

El tratamiento que recibirá incluye paclitaxel debido a que este agente presenta una actividad antitumoral importante y su uso en el cáncer de mama ha demostrado reducir las posibilidades de que esta enfermedad se disemine. Sin embargo, este agente produce efectos tóxicos de tipo neurológico entre otros. Las alteraciones neurológicas se caracterizan por alteraciones en la sensibilidad de las palmas y de las plantas que pueden producir dolor en algunos casos; y en algunos casos alteraciones en la motilidad. Este agente también produce otros tipos de alteraciones tales como caída de defensas, inflamación hepática o reacciones alérgicas.

No existe un método infalible de identificar que paciente alcanzará una desaparición del tumor en la mama o desarrollará toxicidad severa, sin embargo estudios con muestra sanguínea de pacientes de raza caucásica con cáncer de mama encuentran que aquellas pacientes que cuentan con algunas variantes

genéticas tendrían predisposición para alcanzar respuesta adecuada a quimioterapia o para presentar efectos colaterales serios a paclitaxel.

Es por ello que estamos desarrollando el presente trabajo, que trata de evaluar mediante técnicas de biología molecular muy complejas variantes genéticas en muestras de sangre. Por otro lado, se realizarán evaluaciones clínicas exhaustivas durante sus visitas al hospital.

Los resultados del análisis molecular y los resultados del análisis de los datos clínicos serán comparados y correlacionados gracias a la ayuda de un sistema informático complejo. Tras ello, se intentará sacar conclusiones sobre el valor predictivo de algunas variantes genéticas en el desarrollo de respuesta antineoplásica adecuada o de toxicidad a paclitaxel en pacientes peruanas con cáncer de mama.

Con ello podremos muy probablemente en un futuro cercano mejorar el manejo de las pacientes peruanas con cáncer de mama.

La información obtenida de las muestras de sangre, de la evaluación durante la consulta médica y de su historia clínica será utilizada exclusivamente con fines científicos. Toda la información que se obtengan de este estudio, será totalmente confidencial, de modo que su anonimidad estará garantizada en todo momento. Los investigadores tomarán las medidas oportunas para protegerlos y evitar el acceso a los mismos de terceros no autorizados. Los resultados del estudio serán publicados únicamente en ámbitos científicos, bajo la responsabilidad de los investigadores del estudio.

“Detección de SNP en genes *CYP2C8* de pacientes con cáncer de mama que reciben paclitaxel en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas de marzo a diciembre 2013”.

---

Usted puede denegar o declinar su consentimiento cuando lo desee sin que ello repercuta negativamente en su tratamiento o controles médicos.

### **Consentimiento del paciente**

Yo \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, autorizo a que se extraiga una muestra de sangre, a que se realice una evaluación médica exhaustiva durante mis consultas médicas y a que se analice la información clínica contenida en mi Historia Clínica, para los fines y objetivos que se han señalado en este proyecto.

**FIRMA DEL PACIENTE**  
**FECHA**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**FIRMA DEL INVESTIGADOR**

**FECHA**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## ANEXO N° 4

### SECUENCIA DE LOS NUEVE EXONES DEL GEN *CYP2C8*

```
1  acatgtcaaa gagacacaca ctaaattagc agggagtgtt ataaaaactt tggagtgcaa
61  gctcacagct gtcttaataa gaagagaagg cttcaatgga accttttgtg gtcoctggtgc
121 tgtgtctctc ttttatgctt ctcttttcac tctggagaca gagctgtagg agaaggaagc
181 tccctcctgg ccccaactcct ctccctatta ttggaaatat gctacagata gatgttaagg
241 acatctgcaa atctttcacc aatctctcaa aagtctatgg tcoctgtgttc accgtgtatt
301 ttggcatgaa toccatagtg gtgtttcatg gatatgaggc agtgaaggaa gcoctgattg
361 ataatggaga ggagttttct ggaagaggca attccccaat atctcaaaga attactaaag
421 gacttggaaat cattttcagc aatggaaaaga gatggaagga gatccggcgt ttctccctca
481 caacottgcg gaatthttggg atggggaaga ggagcattga ggaccgtgtt caagaggaag
541 ctcaactgcct tgtggaggag ttgagaaaaa ccaaggcttc acctgtgat cccactttca
601 tcoctgggctg tgctccctgc aatgtgatct gctccgttgt tttccagaaa cgatttgatt
661 ataaagatca gaatthttct accctgatga aaagattcaa tgaaaacttc aggattctga
721 actccccatg gatccaggtc tgcaataatt tccctctact cattgattgt ttcccaggaa
781 ctcaacaaca agtgcttaaa aatgttgctc ttacacgaag ttacattagg gagaaagtaa
841 aagaacacca agcatcactg gatgttaaca atcctcgga ctttatcgat tgcttctga
901 tcaaaatgga gcaggaaaag gacaaccaa agtcagaatt caatattgaa aacttggttg
961 gcaactgtagc tgatctatth gttgtctgga cagagacaac aagcaccact ctgagatag
1021 gactcctgct cctgctgaag caccagagg tcacagctaa agtccaggaa gagattgatc
1081 atgtaattgg cagacacagg agcccctgca tgcaggatag gagccacatg ccttacactg
1141 atgctgtagt gcacgagatc cagagataca gtgaocctgt ccccaccggt gtgccccatg
1201 cagtgaccac tgatactaag ttcagaaact acctcatccc caaggcaca accataatgg
1261 gattactgac tccgtgcta catgatgaca aagaatttcc taatccaaat atctttgacc
1321 ctggccactt tctagataag aatggcaact ttaagaaaag tgactacttc atgcctttct
1381 gaggcaggaaa acgaatttgt gcaggagaag gacttgcccg catggagcta tttttatttc
1441 taaccacaat tttacagaac tttaacctga aatctgttga tgatttaaag aacctcaata
1501 ctactgcagt taccaaaggg attgtttctc tgcccacctc ataccagatc tgcttcatcc
1561 ctgtctgaag aatgctagcc catctggctg ccgatctgct atcacctgca actctthttt
1621 tatcaaggac attcccacta ttatgtcttc tctgacctct catcaaatct tcccattcac
1681 tcaatatccc ataagcatcc aaactccatt aaggagagtt gttcaggtea ctgcacaaat
1741 atatctgcaa ttattcatac tctgtaacac ttgtattaat tgctgcatat gctaatactt
1801 ttctaattgct gactthtttaa tatgttatca ctgtaaaaca cagaaaagtg attaataaat
1861 gataatttag atccatttct tttgtgaatg tgctaaataa aaagtgttat taattgctgg
1921 ttca
```

Exón 1:1-263  
Exón 2:264-426  
Exón 3:427-576  
Exón 4:577-737  
Exón 5:738-914  
Exón 6:915-1056  
Exón 7:1057-1244  
Exón 8:1245-1386  
Exón 9:1387-1924

## ANEXO N° 5

### SECUENCIA DEL ADN CODIFICANTE (CDS) DEL GEN *CYP2C8*

```
1 atggaacott ttgtggtcct ggtgctgtgt ctctctttta tgcttctctt ttcactctgg
61 agacagagct gtaggagaag gaagctcctt cctggcccca ctctcttctt tattattgga
121 aatatgctac agatagatgt taaggacatc tgcaaatctt tcaccaattt ctcaaaagtc
181 tatggtcctg tgttcaccgt gtatcttggc atgaatocca tagtgggtgtt tcatggatat
241 gaggcagtga aggaagccct gattgataat ggagaggagt tttctggaag aggcaattcc
301 ccaatatctc aaagaattac taaaggactt ggaatcattt ccagcaatgg aaagagatgg
361 aaggagatcc ggcgtttctc cctcacaacc ttgcggaatt ttgggatggg gaagaggagc
421 attgaggacc gtgttcaaga ggaagctcac tgccttgtgg aggagttgag aaaaaccaag
481 gtttcaccct gtgatccac tttcactctg ggetgtgctc cctgcaatgt gatctgctcc
541 gttgttttcc agaaaagatt tgattataaa gatcagaatt ttctcaccct gatgaaaaga
601 ttcaatgaaa acttcaggat totgaactcc ccatggatcc aggtctgcaa taatttcctt
661 ctactcattg attgtttccc aggaactcac aacaaagtgc ttaaaaatgt tgctcttaca
721 cgaagttaca ttagggagaa agtaaaagaa caccaagcat cactggatgt taacaatctt
781 cgggacttta tcgattgctt cctgatcaaa atggagcagg aaaaggacaa ccaaaagtca
841 gaattcaata ttgaaaactt ggttggcact gtagctgac tatttgttgc tggaacagag
901 acaacaagca ccaactctgag atatggactc ctgctcctgc tgaagcacc agaggtcaca
961 gctaaagtcc aggaagagat tgatcatgta attggcagac acaggagccc ctgcatgcag
1021 gataggagcc acatgoccta cactgatgct gtagtgcaag agatocagag atacagtgac
1081 cttgtcccca ccggtgtgcc ccatgcagtg accactgata ctaagttcag aaactacctc
1141 atccccaag gcacaaccat aatggcatta ctgacttccc tgctacatga tgacaagaa
1201 ttcttaato caaatatctt tgacctggc cactttctag ataagaatgg caactttaag
1261 aaaaagtgact acttcatgcc tttctcagca gaaaaagaa tttgtgcagg agaaggactt
1321 gccgcgatgg agctatcttt atttctaacc acaatcttac agaactttaa cctgaaatct
1381 gttgatgatt taagaacct caatactact gcagttacca aagggttgt ttctctgcca
1441 ccctcatacc agatctgctt catccctgtc tga
```

Exón 1:1-263  
Exón 2:264-426  
Exón 3:427-576  
Exón 4:577-737  
Exón 5:738-914  
Exón 6:915-1056  
Exón 7:1057-1244  
Exón 8:1245-1386  
Exón 9:1387-1924

## ANEXO N° 6

### SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA PROTEINA *CYP2C8*

MEPFVVLVLCLSFMLLFSLWRQSCRRRKLPPGPTPLPIIGNMLQIDVKDICKSFTNFSKVY  
GPVFTVYFGMNPVVVFHGYEAVKEALIDNGEEFSGRGNSPISQRITKGLGISSNGKRWKE  
IRRFSLTTLRNFGMGKRSIEDRVQEEAHCLVEELRKTASPCDPTFILGCAPCNVICSVVF  
QKRFDYKDQNF~~LTLMKRFNENFRILNSPWIQVCNNFLLIDCFPGTHNKVLKNVALTRSYI~~  
REKVKEHQASLDVNNPRDFIDCF~~L~~I~~K~~MEQEKDNQKSEFNIE~~N~~LVGTVADLFVAGTETTSTT  
LRYGLLLLLLKHPEVTAKVQEEIDHVI~~GRHRS~~PCMQDRSHMPYTD~~AVVHEI~~QRYSDLVPTGV  
PHAVTTDTKFRNYLIPKGTTIMALLT~~SVLHDD~~K~~E~~F~~P~~N~~P~~N~~I~~FDPGHFLDKNGNF~~FKKSDY~~FMP  
FSAGKRICAGEGLARMEFLFLFTTILQNFNLKSVDDLK~~NLNTTAV~~TKGIVSLPPSYQICFI  
PV

\*Los aminoácidos subrayados son codificados por la secuencia nucleotídica de los exones 5 y 8 en donde se encuentran los SNP *CYP2C8*\*2 (I269F) y *CYP2C8*\*3 (K399R).

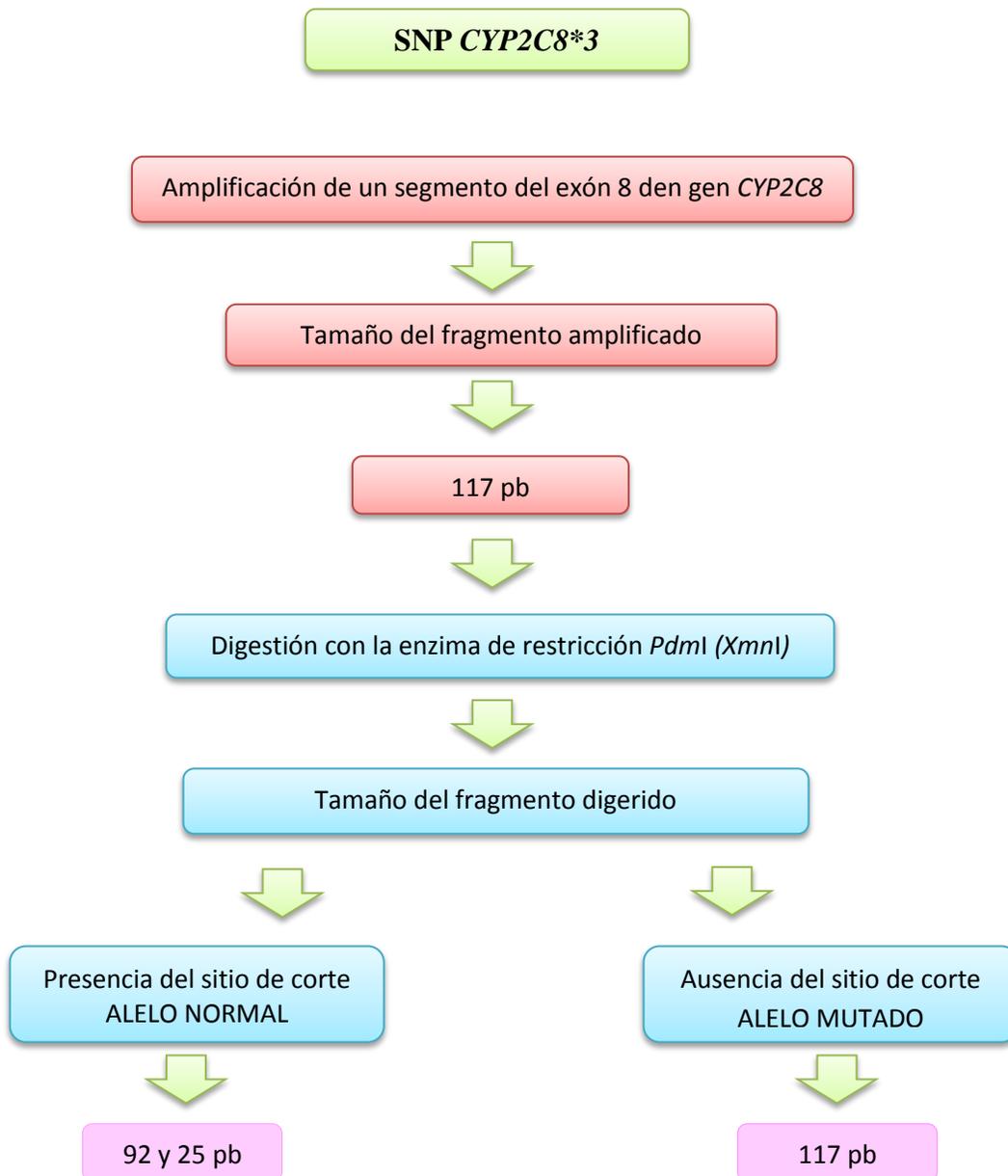
## ANEXO N° 7

### ESQUEMA DE ANÁLISIS PARA EL SNP *CYP2C8*\*2



## ANEXO N° 8

### ESQUEMA DE ANÁLISIS PARA EL SNP *CYP2C8*\*3



**ANEXO N° 9**

**FRECUENCIA ALÉLICA DE LOS SNP *CYP2C8\*2* Y *CYP2C8\*3* EN ESTUDIOS REALIZADOS EN DIFERENTES POBLACIONES**

Población	N°	Frecuencia alélica (%)		Autores
		<i>CYP2C8*2</i>	<i>CYP2C8*3</i>	
Afroamericanos	82	18	2	Dai y col <sup>8</sup>
Caucásicos	170	0	13	Dai y col <sup>8</sup>
Caucásicos	72	-	15	Bahadur y col <sup>6</sup>
Caucásicos españoles	355	-	17	Martínez y col <sup>9</sup>
Caucásicos	97	0,7	9,2	Henningsson y col <sup>4</sup>
Africanos (Ghana)	204	17	0	Kudzi y col <sup>12</sup>
Colombianos	33	1,5	0	Carmona y col <sup>13</sup>
Africanos	503			Paganotti y col <sup>15</sup>
-Senegal		22	-	
-Uganda		10	-	
-Madagascar		15	-	
India	251	3	4	Minhas y col <sup>16</sup>
Europeos-Americanos	209	-	13,6	Hertz y col <sup>17</sup>
Afroamericanos	107	-	2,8	Hertz y col <sup>17</sup>
Espanoles	282	-	11,4	Vicente y col <sup>19</sup>
Ecuatorianos mestizos	297	-	6,5	Vicente y col <sup>19</sup>