



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Una aproximación a salud personalizada:
Identificación y validación de variantes genéticas
asociadas con respuesta a tamoxifeno en pacientes
con cáncer de seno atendidas en el HUSI.**

Yeimy Viviana Ariza Márquez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia
2018

**Una aproximación a salud personalizada:
Identificación y validación de variantes genéticas
asociadas con respuesta a tamoxifeno en pacientes
con cáncer de seno atendidas en el HUSI.**

Yeimy Viviana Ariza Márquez

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de: **Doctor en Biotecnología**

Director (a):

Ph.D., Fabio Ancizar Aristizabal Gutiérrez

Codirector (a):

Ph.D., Ignacio Briceño Balcázar

Línea de Investigación:

Biotecnología en salud

Grupo de Investigación:

Farmacogenética del cáncer

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de biotecnología
Bogotá, Colombia

2018

*A mis padres, esposo e hija por su apoyo
incondicional.*

Agradecimientos

A Dios, por concederme la oportunidad de tener un aprendizaje constante y en cada paso poner a las personas indicadas para fortalecer mi proceso.

Al Hospital Universitario San Ignacio (HUSI), y los doctores Liliam Torregrosa y Mauricio Tawil, mastólogos de dicha institución, por permitirme el acceso a las pacientes de su consulta.

A cada una de las pacientes por su participación voluntaria y disposición durante el seguimiento.

Al doctor Dennis D. Heath del Cancer Center, University of California, San Diego, Health Sciences Cancer Prevention and Control Program, Moores UCSD, por su generosa disposición en el procesamiento de los metabolitos intermediarios de tamoxifeno en plasma, de las pacientes.

Al doctor Edgar Benítez por sus aportes en el diseño y análisis estadístico.

Al grupo LISI bajo la dirección del doctor Luis Fernando Niño y particularmente a Juvenal Yosa por su apoyo en el modelamiento molecular y aportes a la tesis.

Al doctor Jorge Díaz, por su asesoría en el estudio fármaco-económico.

Al doctor Fabio Aristizabal, director de esta tesis por su apoyo continuo y visión crítica del trabajo, fue decisivo en la construcción de este proceso.

Al doctor Ignacio Briceño, codirector de esta tesis, por su disposición incondicional y por sus aportes en la tesis, sus palabras fueron trascendentales en momentos que el ánimo fue bajo.

Al Doctorado en biotecnología, su directora, doctora Sonia Ospina, también al comité tutorial, conformado por el doctor Gonzalo Arboleda y doctor Cesar Segura por tomar tiempo en sus agendas para asistir a mis comités, revisar las versiones de la tesis y aportar en mi formación, de igual forma a la doctora Martha Lucía Serrano, por participar como jurado en la defensa de mi tesis y realizar una minuciosa revisión y corrección del escrito.

A Raquel Noguera, secretaria del doctorado y gran amiga, por brindar siempre la información y direccionamiento claro, de cada trámite administrativo y académico.

A Ángela Beltrán, Elizabeth Méndez, Diana Vinchira, Jeimy Macías, compañeros del grupo de farmacogenética del cáncer, comunidad IBUN, demás compañer@s, amig@s y

personas que de una u otra manera me apoyaron y confiaron en mí, que por espacio no menciono, pero que cada uno sabe, les guardo inmensa gratitud, en mi corazón.

A mi familia por entender mis ausencias, apoyarme y acompañarme siempre.

A mi esposo Juan Carlos Méndez por su amor y paciencia, este logro, también es tuyo, vida mía y a Lina Juliana, nuestra bebe, quien con su llegada, está llenando de grandes alegrías cada día y con quien compartí la escritura de esta tesis, a los dos por ser mi inspiración, los amo!.

Resumen

El cáncer de seno está conformado por un grupo de enfermedades multigénicas con gran impacto a nivel mundial, además es el cáncer en mujeres con mayor tasa de mortalidad en Colombia. Para su tratamiento, existen diversas alternativas terapéuticas, una de ellas, la hormonoterapia; donde tamoxifeno (TAM) es el medicamento de primera elección. El tamoxifeno es un profármaco, que requiere la acción de diversas enzimas para su biotransformación y es conocido que la variabilidad genética de estas enzimas, condiciona la presencia de diversos fenotipos que inciden en la capacidad de metabolizar tamoxifeno. En este contexto, se propuso establecer y validar las frecuencias alélicas de variantes en Citocromos de la familia P450 (CYP450) en una muestra de 30 pacientes con cáncer ductal infiltrante que acuden al Hospital Universitario San Ignacio (HUSI) para establecer su asociación con respuesta a tratamiento con TAM, desenlace clínico y sobrevida de pacientes con cáncer de seno así como en 21 mujeres que no presentaban cáncer de seno, para la generación de un prototipo de prueba molecular basado en sondas taqman.

Se seleccionaron las variantes genéticas mediante revisión de la literatura. Posteriormente se tomó una muestra de sangre total, con el fin identificar los genotipos y metabolitos intermediarios de TAM (4 hidroxí TAM (4HT), endoxifeno, N desmetil TAM (ND TAM)) y TAM. Adicionalmente, las pacientes diligenciaron cuestionarios y se realizó seguimiento clínico a 12 meses, con el fin de evaluar respuesta al tratamiento y sobrevida.

Mediante el panel de Farmacogenética General de “QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System” y análisis de asociación, se identificó que los fenotipos de CYP2D6 tienen la mayor correlación con las concentraciones de endoxifeno. Las variantes funcionales con actividad normal en las pacientes fueron: CYP2D6*1, CYP2D6*2A y CYP2D6*35 mostraron frecuencias de 0,393, 0,295 y 0,032 respectivamente, para el caso de las variantes no funcionales se identificaron CYP2D6*3 y CYP2D6*4 con frecuencias de 0,032 y 0,016; finalmente para las variantes con actividad reducida se identificaron CYP2D6*9, CYP2D6*17 y CYP2D6*41 con frecuencias de 0,032, 0,016 y 0,016 respectivamente, siendo la primera vez que se identifica la variante CYP2D6*9 en población colombiana. Por otra parte, en las mujeres sin cáncer de seno se identificaron las variantes funcionales con actividad normal: CYP2D6*1, CYP2D6*2A y CYP2D6*35 con frecuencias 0,18, 0,14 y 0,02 respectivamente. Para el caso de las variantes no funcionales se identificó CYP2D6*4 con frecuencia de 0,06 y finalmente para las variantes con actividad reducida se identificaron CYP2D6*17 y

CYP2D6*29 con frecuencias de 0,01 cada uno. Es la primera vez que se identifica la variante CYP2D6*29 en población colombiana. Por otra parte el modelo usado para el análisis no encontró estadísticamente ninguna asociación entre el estado de los polimorfismos seleccionados y las características histopatológicas, así como tampoco se evidencio el fallecimiento de ninguna de las pacientes motivo por el cual no se evaluó sobrevida. Posteriormente, se generó un prototipo de prueba molecular para tamizaje rápido mediante el uso de sondas y primers que permitió comprobar los genotipos para las variantes CYP2D6*4, CYP2D6*9 y CYP2D6*29, este prototipo podría evaluarse para ser usado a futuro como una alternativa para la evaluación previa de pacientes candidatas a consumir tamoxifeno.

Palabras clave: Farmacogenética, Tamoxifeno, CYP2D6.

Abstract

Breast cancer is a group of multigenic diseases with global burden, being the type of cancer with the highest mortality rate in Colombia. Tamoxifen (TAM) is the first choice drug for hormone therapy. Since tamoxifen is a prodrug, it requires the action of several enzymes for biotransformation, and it is known that the genetic variability of these enzymes, conditions the presence of various phenotypes that affect the ability to metabolize tamoxifen. In this context it was proposed to establish and validate the allelic frequencies of variants in Cytochromes of the P450 family (CYP450) in a sample of 30 patients with infiltrating ductal cancer who come to the University Hospital San Ignacio (HUSI) to establish their association with response to treatment with TAM, clinical outcome and survival of patients with breast cancer as well as in 21 women who did not have breast cancer, for, to contrast its association with the response to TAM treatment, clinical outcome and survival of patients with breast cancer to generate a molecular test prototype based on taqman probes.

The genetic variants were selected by reviewing the literature. Subsequently a whole blood sample was taken, in order to identify the genotypes and intermediary metabolites of TAM (4 hydroxy TAM (4HT), endoxifen, N desmetil TAM (ND TAM)) and TAM. Additionally, the patients completed questionnaires and a 12-month clinical follow-up was carried out, in order to evaluate response to treatment and survival.

Through the General Pharmacogenetics panel of "QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System", it was identified that CYP2D6 phenotypes have the highest correlation with endoxifen concentrations. Functional variants with normal activity were identified; CYP2D6*1, CYP2D6*2A and CYP2D6*35 with frequencies of 0.393, 0.295 and 0.032 respectively. For the non-functional variants, CYP2D6*3 and CYP2D6*4 were identified with frequencies of 0.032 and 0.016. Finally, the variants with reduced activity identified were CYP2D6*9, CYP2D6*17 and CYP2D6*41 with frequencies of 0.032, 0.016 and 0.016 respectively, being the first time that the variant CYP2D6*9 was identified in Colombian population. When assigning genotypes it was established that 17 of the patients were intermediate metabolizers (MI), 10 extensive metabolizers (ME), 2 women as poor metabolizers (MP) and 1 ultra-fast metabolizer (MU). It was established that the concentration of endoxifen correlates with the patient's metabolizing state of extensive and poor metabolizers. For controls, functional variants with normal activity were identified; CYP2D6*1, CYP2D6*2A and CYP2D6*35 with frequencies 0.18, 0.14 and 0.02 respectively. For non-functional variant, CYP2D6*4 a frequency of 0.06 was identified. Finally, the variants CYP2D6*17 and CYP2D6*29 with reduced activity had frequencies of 0.01 and 0.01 respectively, being the

first time that the variant CYP2D6*29 was identified in Colombian population. After the identification of the variants, CYP2D6*4, CYP2D6*9, CYP2D6*17, CYP2D6*29 and CYP2D6*41 were chosen because for their mayor clinical relevance. They produce phenotypes of poor and intermediate metabolism, a test for rapid screening was generated using the probes and primers for variants CYP2D6*4, CYP2D6*9 and CYP2D6* 29, which is proposed as an alternative for the previous evaluation of the candidates to consume tamoxifen.

On the other hand, the model used for the analysis did not find statistically any association between the state of the selected polymorphisms and the histopathological characteristics, nor was the death of any of the patients, reason for which no survival was evaluated. Subsequently, a molecular test prototype was generated for rapid screening by using probes and primers that allowed to check the genotypes for the variants CYP2D6 * 4, CYP2D6 * 9 and CYP2D6 * 29, this prototype could be evaluated to be used in the future as an alternative for the previous evaluation of patients candidates to consume tamoxifen.

Key words: Pharmacogenetics, Tamoxifen, CYP2D6.

Contenido

PUBLICACIONES	18
Introducción.....	29
Capítulo 1. Marco Teórico	33
Generalidades: Glándula mamaria.....	33
Cáncer de seno.....	33
Clasificación de cáncer de seno.....	34
Subtipos histológicos.....	34
Grado del tumor.....	34
Estadio de la enfermedad.....	35
Estado de los receptores.....	37
Parámetros pronósticos	37
Tamaño del tumor.....	37
Estado de ganglios linfáticos.....	37
Clasificaciones complementarias de cáncer de seno	38
Clasificación TGM.....	38
Clasificación subtipos moleculares	39
EPIDEMIOLOGÍA	39
TRATAMIENTO PARA CÁNCER DE SENO EN COLOMBIA	41
HORMONOTERAPIA.....	41
TAMOXIFENO	42
FARMACOCINÉTICA DE TAMOXIFENO	42
FARMACOGENÓMICA DE TAMOXIFENO	43
BIOLOGÍA DEL SISTEMA CITOCROMO P450	44
ESTRUCTURA SISTEMA CYP450.....	45
GENÉTICA SISTEMA CYP450.....	46
Objetivos.....	50
Objetivo General:	50
Objetivos específicos:	50
Capítulo 2. Objetivo 1: Determinar/Identificar las variantes genéticas que afectan el efecto de la hormonoterapia con tamoxifeno en pacientes con cáncer de seno, mediante revisión de la literatura.	53
Metodología:	53
Reconocimiento de variantes genéticas.....	53
Resultados.....	54
Discusión	56
Capítulo 3. Objetivo2: Determinar si los SNPs reportados en la literatura, están asociados a respuesta a tratamiento con tamoxifeno en pacientes colombianas con cáncer de seno.	60
Metodología:	60
Muestra	60

Población de Estudio.....	60
Selección de pacientes.....	61
Almacenamiento y conservación de las muestras	62
Análisis estadístico	63
Resultados:.....	64
Discusión:	82
Capítulo 4. Objetivo 3: Analizar si variantes genéticas se correlacionan con parámetros histopatológicos del tumor y respuesta a tratamiento de hormonoterapia con tamoxifeno para ser usados como parámetros pronósticos.	87
Metodología:	87
Resultados:.....	89
Discusión:	91
Capítulo 5. Objetivo 4: Determinar si existe correlación entre las variantes genéticas evaluadas y sobrevida de pacientes colombianas con cáncer de seno.	93
Metodología:	93
Resultados:.....	93
Discusión:	94
Capítulo 6. Objetivo 5: Seleccionar al menos 3 de las variantes genéticas más frecuentes en la muestra de población colombiana para la generación de una prueba de apoyo para la toma de decisiones en tratamiento con tamoxifeno.	96
Metodología:	96
Resultados:.....	98
Discusión	102
Discusión general	105
Conclusiones.....	107
Recomendaciones.....	109
Limitaciones	111
ANEXO 1: Descripción de los 17 artículos originales (en pacientes con cáncer de seno tratadas con tamoxifeno) seleccionados.....	112
ANEXO 2: Cuestionario- consentimiento	115
ANEXO 3: Modificaciones protocolo Mo bio	120
ANEXO 4: Variantes evaluadas en el panel QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System	122
ANEXO 5. Haplotipos identificados en las pacientes.	123
Se indica los haplotipos identificados para CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 y CYP3A5 seguidos de los estados metabolizadores asignados donde	123
ANEXO 6. Datos crudos variantes alélicas CYP2D6	124
ANEXO 7. Detalles modelamiento molecular.....	125
ANEXO 8. Análisis de sobrevida evaluando como desenlace tiempo de suspensión de tratamiento	128
ANEXO 9. Descripción sondas y primer diseñados.	130
ANEXO 10. Costos de prueba molecular que incluye 3 SNPs y de eventos asociados al tratamiento de cáncer de seno.	132
Asistencia a eventos.....	135
Bibliografía	137

Frequency of 14 Genetic Variants Associated with Breast Cancer Risk and Treatment in a Colombian Population



Yeimy Viviana Ariza Marquez^{1*}, Fabio Ancizar Aristizabal Gutierrez², Alberto Gómez Gutierrez^{3,4}, Piedad Elena Gómez³, María Consuelo Casas Gomez³ and Ignacio Briceño Balcázar^{3,5,6}

¹Universidad Nacional de Colombia, Colombia

²Director instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia

³Instituto de Referencia Andino, Colombia

⁴Director instituto de genética, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia

⁵Department of Medicin, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia

⁶Department of Medicina, Universidad de La Sabana, Colombia

Submission: November 29, 2017; Published: January 29, 2018

*Corresponding author: Yeimy Viviana Ariza Marquez, Universidad Nacional de Colombia, cPh D. Biotecnología, Bogotá, Colombia, Tel: +57 3112560355; Email: yvarizam@unal.edu.co

Abstract

Introduction: Genetic variations have been related to risk and treatment efficacy. Many polymorphisms in breast cancer are known to influence susceptibility, breast cancer risk and treatment outcome. Polymorphisms vary among populations; therefore, local studies are necessary.

Objective: To establish the frequency of polymorphisms associated to breast cancer risk and treatment pharmacogenomics in a group of Colombian individuals.

Methods: Data from microarray profiles that include associated polymorphisms with breast cancer treatment were retrospectively collected (Pathway Genomics®). The frequency of the CYP2D6 rs3892097, panel of breast cancer (CAS8 rs1045485, CHEK21100delC, ESR1 rs2046210, FGFR2rs1219648, intergenic_2q35rs13387042, intergenic_8q24 rs13281615, MSRP30 rs10941679, TNRC9 rs3803662, AKAP9 rs6964587, LSP1 rs3817198, MAP3K1rs889312, PALBS1592 delT, ESR1rs3020314) marker polymorphism was analyzed.

Results: Microarray data from 68 men and 92 women were analyzed. All polymorphisms were in Hardy Weinberg equilibrium. Comparisons of genotypes CYP2D6 rs3892097 C/T, CAS8 rs1045485 G/C, panel of breast cancer (CAS8 rs1045485, CHEK21100delC, FGFR2rs1219648, intergenic_2q35rs13387042, intergenic_8q24 rs13281615, MSRP30 rs10941679, TNRC9 rs3803662, LSP1 rs3817198, MAP3K1rs889312, PALBS1592 delT, ESR1rs3020314) were not significantly different to previously published data, the rare alleles found were ESR1 rs2046210 with allele frequencies of C=0.04 and T=0.02. AKAP9 rs6964587 showed a frequency of A=0.005.

Conclusion: The population studied was not significantly different in allele distribution with previously reported data from HAPMAP. Genotypes in Colombian population are similar to other previously studied groups of healthy subjects. The use of genotyping pharmacogenetic polymorphisms will prevent toxicity and adverse effects in tamoxifen treatment (for example in CYP2D6 rs3892097), therefore therapeutic alternatives should be evaluated based on individual pharmacogenetic studies.

Keywords: Colombian; Pharmacogenomics; Breast cancer

Introduction

Advances in technology have made multigene testing, or "panel testing," a practical option when looking for genetic variants that may be associated with a risk of breast cancer and outcome to treatment. Use of pharmacogenomics will optimize treatment and lower health costs. In this context, it is

necessary to study disease associations and pharmacogenetic polymorphisms in populations to optimize disease treatment. In the case of breast cancer, tamoxifen metabolism related polymorphisms are associated to treatment, but the frequency is not known in Colombian population.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Prevalence and Penetrance of *BRCA1* and *BRCA2* Germline Mutations in Colombian Breast Cancer Patients

Received: 28 February 2017

Accepted: 23 May 2017

Published online: 05 July 2017

D. Torres^{1,2}, J. Lorenzo Bermejo³, M. U. Rashid^{4,5}, I. Briceño^{2,5}, F. Gil⁶, A. Beltran⁷, V. Ariza⁷ & U. Hamann¹

Pathogenic *BRCA1/2* germline mutations confer high risks of breast and ovarian cancer to women of European ancestry. Characterization of *BRCA1/2* mutations in other ethnic groups is also medically important. We comprehensively screened 68 Colombian breast/ovarian cancer families for small-range mutations, 221 families for large-genomic rearrangements, and 1,022 unselected breast cancer cases for Colombian founder mutations in *BRCA1/2*. The risk of cancer among relatives of mutation carriers and the mutation penetrance were estimated by survival analysis. Identified *BRCA2* mutations included 6310delGA and the recurrent 1991del4 mutations. A novel large *BRCA2* deletion was found in 0.9% of the screened families. Among unselected breast cancer cases, 3.3% tested positive for *BRCA1/3450del4*, 2.2% for *BRCA1/A1708E*, 1.1% for *BRCA2/3034del4*, and 0.4% for *BRCA2/1991del4*. Female relatives of carriers of *BRCA1/2* founder mutations showed a 5.90 times higher risk of breast cancer, when the woman herself carried a *BRCA1* mutation compared to a non-carrier (95% CI 2.01–17.3). The estimated cumulative risk of breast cancer by age 70 years for *BRCA1* mutations carriers was 14% (95% CI 5–38) compared to 3% for the general Colombian population (relative risk of breast cancer 4.05). Together with known founder mutations, reported novel variants may ease a cost-effective *BRCA1/2* screening in women with Colombian ancestry.

About 10% of breast cancers are hereditary and can be attributed to germline mutations in breast cancer susceptibility genes, in particular *BRCA1* and *BRCA2* (*BRCA1/2*). Accurate estimates of the risk of breast and ovarian cancers for *BRCA1/2* mutation carriers are crucial for genetic counselling. Preventive measures can be offered to women at high risk, such as intensified surveillance, prophylactic mastectomy and oophorectomy, and in some cases chemoprevention¹. Several studies have investigated the risk of breast cancer in *BRCA1/2* mutation carriers. However, penetrances are usually estimated for mixtures of mutations found in women of European ancestry. Estimated cumulative risks for European women vary between 45% and 85% for breast cancer, and 10% and 65% for ovarian cancer by age 70 years, depending on the type of population and the type of case ascertainment^{2–8}. Examination of founder mutations in non-European ethnic groups permits to assess mutation-specific penetrance, and possible differences between them, which may be of clinical relevance.

In Colombia, breast cancer is the main cause of cancer-related death among women, with incidence and mortality age-standardised (world) rates of 35.7 and 10.8 cases per 100,000 person-years, respectively⁹. The genome of Colombian women is the result of genetic admixture between Native Americans, Spaniards who reached South America in the sixteenth century, Native African slaves who arrived in seventeenth century, and subsequent immigration, mainly from Europe¹⁰. Little is known about the contribution of *BRCA1/2* mutations to hereditary breast cancer in Colombia. In a study on 53 breast/ovarian cancer families, we previously identified three

¹Molecular Genetics of Breast Cancer, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany. ²Institute of Human Genetics, Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, Colombia. ³Institute of Medical Biometry and Informatics, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany. ⁴Department of Basic Sciences Research, Shaukat Khanum Memorial Cancer Hospital and Research Centre (SKMCH & RC), Lahore, Pakistan. ⁵Universidad de la Sabana, Bogota, Colombia. ⁶Unit of Clinical Epidemiology and Biostatistics, Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, Colombia. ⁷Universidad Nacional, Bogota, Colombia. D. Torres and J. Lorenzo Bermejo contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to U.H. (email: u.hamann@dkfz-heidelberg.de)

REVIEW ARTICLE

Diabetes-Related Neurological Implications and Pharmacogenomics

Camilo Andrés Rojas-Carranza^{1,†}, Rosa Helena Bustos-Cruz^{1,†,*}, Carmen Juliana Piño-Pinzón¹, Yeimy Viviana Ariza-Marquez², Rosa Margarita Gómez-Bello³ and Marisa Cañadas-Garre⁴

¹Universidad de la Sabana, Faculty of Medicine, Therapeutic Evidence Group, Chia, Colombia; ²Universidad Nacional de Colombia, Cancer Pharmacogenomics Group, Bogotá, Colombia; ³Neuroregeneration Foundation of Colombia, Bogotá, Colombia; ⁴Hospitalario Universitario de Granada, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, UGC Provincial de Farmacia de Granada, Pharmacogenetics Unit, 18014 Granada, Spain

Abstract: Diabetes mellitus (DM) is the most commonly occurring cause of neuropathy around the world and is beginning to grow in countries where there is a risk of obesity. DM Type II, (T2DM) is a common age-related disease and is a major health concern, particularly in developed countries in Europe where the population is aging. T2DM is a chronic disease which is characterised by hyperglycemia, hyperinsulinemia and insulin resistance, together with the body's inability to use glucose as energy. Such metabolic disorder produces a chronic inflammatory state, as well as changes in lipid metabolism leading to hypertriglyceridemia, thereby producing chronic deterioration of the organs and premature morbidity and mortality. The pathology's effects increase cerebral damage, leading to the rapid onset of neurodegenerative diseases. Hyperglycemia causes oxidative stress in tissues which are susceptible to the complications involved in diabetes, including peripheral nerves. Other additional mechanisms include activation of polyol aldose reductase signalling accompanied by protein kinase C (PKC)- β activation, poly(ADP ribose) polymerase activation, cyclooxygenase (COX) 2 activation, endothelial dysfunction, altered Na⁺/K⁺ ATPase pump function, dyslipidaemia and perturbation of calcium balance. All the foregoing has an impact on neuron activity, mitochondrial function, membrane permeability and endothelial function. These biochemical processes directly affect the neurons and endothelial tissue, thereby accelerating cerebral aging by means of peroxidation of the polyunsaturated fatty acids and thus injuring cell membrane integrity and inducing apoptosis in the glial cells. The central nervous system (CNS) includes two types of glial cells: microglia and macroglia (astrocytes, oligodendrocytes and radial cells which include Bergmann cells and Müller cells). Glial cells constitute more than 90% of the CNS cell population. Human studies have shown that some oral anti-diabetic drugs can improve cognition in patients suffering mild cognitive impairment (MCI) and dementia [1, 2]. While it is still unclear whether diabetes management will reduce MCI and Alzheimer's disease (AD), incidence, emerging evidence suggests that diabetes therapies may improve cognitive function. This review focuses three aspects: the clinical manifestation of diabetes regarding glial and neuronal cells, the association between neurodegeneration and diabetes and summarises some of the pharmacogenomic data obtained from studies of T2DM treatment, focusing on polymorphisms in genes affecting pharmacokinetics, pharmacodynamics and treatment outcome of the most commonly-prescribed oral anti-diabetic drugs (OADs).

ARTICLE HISTORY

Received: August 12, 2016
Accepted: October 12, 2016

DOI:
10.2174/1381612823666170317165350

Keywords: Nanotechnology, diabetes, pharmacogenomics, neurodegenerative diseases, anti-diabetes drugs.

1. INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is the most commonly occurring cause of neuropathy around the world and is beginning to grow in countries where there is a risk of obesity [3]. Diabetes prevalence in adults was 285 million people (6.4%) in 2010, such value being predicted to rise to around 439 million (7.7%) by 2030 [4]; however, the International Diabetes Federation suggests that this figure has already been surpassed (8.3% of the world's population) [5, 6]. Diabetes occurs most frequently amongst adults over 65 years-old (12%–25% prevalence) [7]. The greatest complication associated with DM is a group of chronic diseases called diabetic neuropathies (DN). DN prevalence ranges from 10% within 1 year of diabetes having been diagnosed up to 50% in diabetic patients who have been diagnosed for more than 25 years [8, 9]. DN includes different syndromes, including diabetic autonomic polyneuropathy (DAN) which is commonest, usually referred to as diabetic polyneuropathy (DPN). These syndromes affect peripheral nerves which produce rapid reversible manifestations and progressive chronic syndromes, such as symmetrical polyneuropathy and focal/multifocal diabetic

neuropathies [10]. Glycated haemoglobin (HbA1c) indicates the onset of diabetes and neuropathic risk. The ADA stated that a 6.5% HbA1c (48 mmol/mol) or greater was a diagnostic criterion for diabetes in its 2010 Clinical Practice Recommendations [11].

Two large types of DM have been recognised to date: type 1 (T1DM) and type 2 (T2DM). As T2DM affects ~90% of DM patients [12] this type of pathology is extremely relevant for study/research. Abnormally increased glycaemia levels define the appearance of diabetes and, depending on the pathological agent's mechanism, insulin cannot be produced in T1DM and T2DM involves receptor resistance to insulin [13].

Insulin is a powerful anabolic, anti-catabolic peptide which is exclusively secreted by β -cells in the islets of Langerhans; these cells accumulate in tiny groups scattered throughout the tissue of the pancreas. Insulin consists of two amino acid (aa) chains: the 21 aa α -chain and the 30 aa β -chain; both chains are linked together by two disulphide bridges. However, there is a third disulphide bridge within the α -chain, linking the β -chain's 6th and 11th residues [14]. These peptides form a heterotetramer holo receptor, consisting of a pair of α -subunits and a pair of β -subunits; these are mainly distributed throughout the neurons of the cortex and hippocampus. α -subunits bind insulin and two identical transmembrane β -subunits; they have intracellular tyrosine kinase activity [15]. Insulin action is

*Address correspondence to this author at the Clinical Pharmacology, Evidence-Based Therapeutics Group, Universidad de la Sabana, Chia, Colombia; E-mail: rosa.bustos@unisabana.edu.co

Tratamiento de cáncer de seno y farmacogenética

Treatment of breast cancer and pharmacogenetics

Yeimy Viviana Ariza Márquez*, Ignacio Briceño Balcázar**, Fabio Ancizar Aristizábal***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57723

Resumen

El cáncer de seno es un grupo de enfermedades con gran impacto a nivel mundial dado que es una de las patologías con mayor prevalencia en mujeres y el cáncer con mayor tasa de mortalidad en varios países (GLOBOCAN 2012). El uso de la farmacogenética y farmacogenómica, en pacientes con cáncer de seno tiene como fin, generar una salud personalizada que permita tratar a cada paciente como individuo y no como enfermedad, pues cada paciente tiene necesidades particulares a la hora de suministrarle un tratamiento. El propósito de esta revisión es identificar las variantes genéticas reportadas en la literatura científica, donde se evalúan diferentes poblaciones y su posible uso como herramienta para medicina de precisión. En población colombiana es poca la caracterización poblacional que existe y por tanto estudios poblacionales son necesarios para definir los perfiles genéticos que deberán implementarse en nuestra población.

Palabras clave: cáncer de seno, farmacocinética, tamoxifeno, hormonoterapia.

Abstract

Breast cancer is one of the most prevalent diseases in women with increasing mortality in several countries (GLOBOCAN 2012). The use of pharmacogenetics and pharmacogenomics in patients with breast cancer allows generating personalized health for treating each patient as an individual, as each patient has unique needs when supplying a treatment. The purpose of this review is to identify genetic variants reported in the scientific literature, where different populations are evaluated and for possible use as a tool for medical precision. Colombian population is unique and therefore population studies are needed to define the genetic profiles to be implemented.

Key words: breast cancer, pharmacokinetic, tamoxifen, hormone therapy.

Recibido: septiembre 18 de 2015

Aprobado: abril 12 de 2016

Definición y conceptos generales de cáncer de seno

El cáncer de seno esta conformado por un grupo de neoplasias malignas que tiene su origen en la proliferación acelerada a causa de pérdida del control del ciclo celular por alteración en al menos uno de los siguientes genes: *BRCA1*, *BRCA2*, *P53* y *PTEN*, y en otros casos por razones desconocidas (Dunning et al., 1999). Puede estar localizado a nivel de los ductos o los lobulillos siendo el ductal el más frecuente. El término «Carcinoma *in situ*» se refiere al tipo de cáncer que se encuentra confinado en la luz de los ductos o de los lobulillos glandulares, sin invadir los tejidos vecinos. Por su parte, el carcinoma invasivo prolifera hasta romper la llamada membrana basal y extender-

se infiltrando los tejidos que rodean a los ductos y lobulillos mamarios, penetrando así el tejido circundante (McCafferty et al., 2009).

Epidemiología

Se presenta tanto en hombres y mujeres, aunque el cáncer de mama femenino es más frecuente. Las cifras reportadas para mortalidad por cáncer de seno en el periodo del 2000-2006 en Colombia fueron de 12.287 personas, con una tasa cruda de 8,3 anual y una tasa ajustada por edad de 9,2 anual (Piñeros et al., 2010), adicionalmente, de acuerdo a lo reportado por GLOBOCAN (2012) la tasa de incidencia de cáncer de seno en mujeres para Colombia fue del 23,4% (8.686

* cPh.D Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá yvarizam@unal.edu.co

** Profesor titular, Universidad de la Sabana y Pontificia Universidad Javeriana, ignaciobb@unisabana.edu.co

*** Ph.D., Director Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, faaristizabal@unal.edu.co

Rol biológico y aplicaciones de los miRNAs en cáncer de seno

Biological role and applications of miRNAs in breast cancer

Yeimy Viviana Ariza Márquez*, Ángela Patricia Beltrán López**,
Ignacio Briceño Balcázar***, Fabio Ancízar Aristizábal****

Resumen

Los miRNAs son pequeños RNAs que participan en diversos procesos de regulación génica, mediante ribointerferencia y juegan un papel clave en diversos procesos biológicos, tales como proliferación celular, diferenciación y apoptosis. En consecuencia, la expresión alterada de miRNAs contribuye a la enfermedad humana, incluyendo cáncer. En esta revisión, nos centraremos en los recientes hallazgos de miRNAs que inciden en el desarrollo de cáncer y particularmente en cáncer de seno, simultáneamente evaluaremos sus mecanismos de regulación, su clasificación, su uso como marcadores de invasión tumoral, de sensibilidad a fármacos y adicionalmente exploraremos la utilidad de los miRNAs en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento individualizado. Finalmente encontramos que los miRNAs representan una gran alternativa para entender las bases moleculares de los procesos tumorales implícitos en cáncer de seno y una vez se conozcan todas sus dianas, será posible dilucidar al menos en parte este proceso complejo y multigénico, ayudado mediante herramientas como la generación de bases de datos, para reportar la expresión diferencial de miRNAs, elementos que nos permitirán realizar medicina preventiva y mejorar la calidad de vida de los pacientes y sus familias.

Palabras clave: cáncer de seno, miRNAs, anti-oncomir, oncomir, regulación post-transcripcional, RNAm.

Abstract

MiRNAs are small RNAs that are involved in various processes of gene regulation by RNAi and play a key role in various biological, such as cell proliferation, differentiation and apoptosis processes. Consequently, the altered expression of miRNAs contribute to human disease, including cancer. In this review, we will focus on the recent findings of miRNAs that affect the development of cancer, particularly breast cancer, simultaneously evaluate their regulatory mechanisms, their classification, their use as markers of tumor invasion, drug susceptibility and further explore the utility of miRNAs in the diagnosis, monitoring and individualize treatment. Finally found that miRNAs represent a great alternative for understanding the molecular basis of implicit tumor processes in breast cancer and once all targets are known, it will be possible to elucidate at least in part this complex and multigenic process, aided by tools such as generation of databases, to report the differential expression of miRNAs, elements that allow us to preventive medicine and improve the quality of life of patients and their families.

Key words: breast cancer, miRNAs, anti-oncomir, Oncomir, post-transcriptional regulation, RNAm.

Recibido: abril 24 de 2013

Aprobado: abril 4 de 2014

Introducción

En octubre de 2001 tres publicaciones de la revista "Science", indicaron el rol de pequeños ncRNAs o sRNAs (non coding o small RNAs, RNAs no codificantes o pequeños, por sus siglas en inglés) en el desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Lagos-Quintana

et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee y Ambros 2001). Posteriormente el Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 2006 fue concedido a Andrew Fire y Craig Mello por su descubrimiento de los RNAs de interferencia (RNAi) dentro de los que identificaron los siRNAs, (*small interfering RNA*, en español ARN pequeño de interferencia o ARN de silenciamiento), los micro

* Bacterióloga y laboratorista clínica UCMC, cPhD biotecnología Universidad Nacional de Colombia, yvarizam@unal.edu.co

** Bacterióloga y laboratorista clínica UCMC, cPhD biotecnología Universidad Nacional de Colombia, apbeltran@unal.edu.co

*** Profesor titular Universidad de la Sabana y profesor Pontificia Universidad Javeriana, ibriceno@javeriana.edu.co

**** Director Instituto de Biotecnología de Universidad Nacional de Colombia, faaristizabal@unal.edu.co

Lista de figuras

Figura 1-1. Clasificación histopatológica del cáncer de seno.....	38
Figura 1-2. Tasa de mortalidad por cáncer de mama en mujeres durante el periodo 2005 al 2014. 40	40
Figura 1-3. Metabolismo del tamoxifeno. Metabolitos primarios y secundarios.....	44
Figura 2-1. Descripción de las temáticas de los artículos seleccionados.	55
Figura 3-1. Concentración en ng/ml de los 4 metabolitos intermedios evaluados	68
Figura 3-2. Concentración de endoxifeno y 4 hidroxi-tamoxifeno (4HT-TAM) en las 30 pacientes.....	69
Figura 3-3. Concentración de endoxifeno para los genotipos de CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A5.....	70
Figura 3-4. Análisis de asociación CYP2C9 versus probabilidad de respuesta a tratamiento con tamoxifeno.	77
Figura 3-5. Estructura CYP2D6 nativa.....	79
Figura 3-6. Estructura de CYP2D6 en interacción con una molécula de Tamoxifeno.....	80
Figura 3-7. Raíz media cuadrada de las fluctuaciones (RMSF) para todos los residuos de CYP2D6 nativa y de las dos pacientes metabolizadoras pobres.....	81
Figura 3-8. Túneles de CYP2D6 nativa.....	81
Figura 3-9. Modelamiento molecular computacional de los túneles de CYP2D6 nativa.	82
Figura 3-10. Comportamiento dinámico de los túneles de CYP2D6 en la paciente P28.	82
Figura 3-11. Comportamiento dinámico de los túneles de CYP2D6 en la paciente P30.....	83
Figura 4-1. Asociación de los fenotipos CYP2C9 con grado histológico II y III	90
Figura 4-2. Asociación de los fenotipos CYP3A5 con grado histológico II y III	90
Figura 6-1. Curva de amplificación de CYP2D6*3 a 530nm.....	99
Figura 6-2. Electroferograma de corrido donde se identifican el pico para TCT.....	99
Figura 6-3. Árbol de decisión de hormonoterapia propuesto con la implementación de la prueba de apoyo	101
Figura 6-4. Costos asociados a efectos adversos a la hormonoterapia con y sin genotipificación	102

Lista de tablas

Tabla 1-1. Resumen de actividad metabolizadora generada por las principales variantes alélicas de los genes CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 y CYP3A5.....	49
Tabla 2-1. Ecuaciones de búsqueda y número de artículos en las diferentes bases de datos.....	53
Tabla 3-1. Descripción de la población. Se indican las principales características de casos y mujeres sin cáncer evaluadas	64
Tabla 3-2. Asignación de fenotipo de acuerdo a las variantes alélicas para cada gen.....	65
Tabla 3-3. Genotipos para los genes evaluados en casos y mujeres sin cáncer evaluadas.....	66
Tabla 3-4. Fenotipos identificados para cada gen para pacientes y mujeres sin cáncer evaluadas.....	67
Tabla 3-5. Resumen de los fenotipos para los genes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A5, concentraciones de metabolitos intermediarios tamoxifen, ND tamoxifen (N- des metil tamoxifeno), 4HT (4 hidroxitamoxifeno) y endoxifeno	70
Tabla 3-6. Comparación de concentración de endoxifeno en diversos estudios. En cada una de las columnas se muestra estado metabolizador	73
Tabla 3-7. Resumen frecuencias alélicas CYP2D6 para pacientes y mujeres sin cáncer evaluadas.....	74
Tabla 3-8. Genotipos presentes en cada grupo metabolizador para las pacientes de este estudio.....	75
Tabla 3-9. Valores de p para cada uno de los genes y presencia de efectos secundarios.....	76
Tabla 3-10. Datos regresión logística para evaluación de fenotipos versus respuesta a tamoxifeno.....	76
Tabla 3-11. Descripción de frecuencias alélicas para el gen CYP2D6 en población Colombiana	78
Tabla 4-1. Estudios revisados a partir de los cuales se identificaron las variables histopatológicas y demográficas.....	87
Tabla 4-2. Codificación de fenotipos y datos histopatológicos evaluados.....	88
Tabla 4-3. Datos regresión logística fenotipo de genes evaluados versus grado histológico, con IMC como covariable.	89
Tabla 6-1. Descripción de los primers y sondas diseñados.....	97
Tabla 6-2. Concentraciones y volúmenes del mix de reacción para los ensayos y protocolo de amplificación.....	98
Tabla 6-3. Volúmenes de reacción para 1 muestra y 4 muestras.....	98
Tabla 6-4. Comparación de genotipos obtenidos con las técnicas empleadas.....	100

Lista de Símbolos y abreviaturas

4HT: Z-4-hidroxitamoxifeno

ABCB1 o MDR: (proteína de resistencia a múltiples drogas): ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1, Cassete de union a ATP, B1

ATLAS: Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter, ensayo clínico mundial para evaluación de dosis de tamoxifeno.

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

BRCA1: Breast cáncer 1, «cáncer de mama 1»

BRCA2: Breast cáncer 2, «cáncer de mama 2»

CDIS: Carcinoma Ductal *in situ*

CVN: Copy number variation «Variación en el número de copias».

CYP2B6: Citocromo P450 2B6

CYP2C9: Citocromo P450 2C9

CYP2C19: Citocromo P450 2C19

CYP2D6: Citocromo P450 2D6

CYP3A4: Citocromo P450 3A4

CYP3A5: Citocromo P450 3A5

DANE: Departamento Administrativo Nacional de Estadística.

EM: Estado metabolizador

ER α : Receptor de estrógenos alfa

ESR1: Gen del receptor de estrógeno 1

FDA: Food and Drug Administration «Agencia Administración de Drogas y Alimentos»

FMO1: Flavina monooxigenasa 1

FMO3: Flavina monooxigenasa 3

GPC: Guía Práctica Clínica

HPLC: High-performance liquid chromatography -Cromatografía líquida de alta resolución»

HUSI: Hospital Universitario San Ignacio

IBCSG: Grupo Internacional de Estudio sobre el Cáncer de Mama

IGF-1: Insulin-like growth factor I, Factor de crecimiento insulínico tipo 1-

IMC: Índice de Masa Corporal.

IPC: Índice de Precios al Consumidor.

Kb: Kilo bases

kDa: Kilo Daltons

ME: Metabolizador extensivo

MI: Metabolizador intermedio

MP: Metabolizador pobre

MU: Metabolizador Ultrarrápido

ND TAM: N-desmetiltamoxifeno.

PDB: Protein Data Bank

SERM: Moduladores Selectivos del Receptor de Estrógeno

SISPRO: Sistema Integral de Información de la Protección Social

UGT: Glucuronosil transferasa

UGT1A1: UDP-glucuronosiltransferasa 1A1

UGT2B15: UDP Glucuronosiltransferasa 2B15

Introducción

En Colombia la principal causa de muerte por cáncer, en mujeres, tiene como origen el cáncer de seno, así mismo, las cifras de incidencia anuales cada vez son más altas (1), como lo muestran las cifras reportadas por GLOBOCAN, donde para el 2012, se reportaron 8.686 casos, representando un 12,2%, dejando en evidencia un aumento constante en los casos, al comparar estas cifras, con las de años anteriores. Pese a estrategias implementadas por el gobierno nacional en el sistema de salud de tamizaje, constituidas por mamografías y ecografías, los esfuerzos hacia la disminución de las cifras continúan siendo insuficientes, de modo que la investigación está encaminada hacia la identificación de nuevos biomarcadores que permitan detección temprana, direccionamiento terapéutico y pronóstico de respuesta a tratamiento (2, 3).

En contraste, las alternativas que existen para el tratamiento, se han mantenido en el tiempo, permitiendo que en la actualidad se empleen intervenciones estándar, que van desde el abordaje local: con intervenciones quirúrgicas y sesiones de radioterapia, seguidas de alternativas sistémicas como: quimioterapia, hormonoterapia y terapia dirigida. En este contexto, la hormonoterapia; opción que se aplica a cerca del 95% de las pacientes, con un tiempo duración que puede oscilar entre 5 hasta 10 años, se cuenta con dos alternativas, primero, Inhibidores de aromatasas, dentro de las que están: anastrozol, letrozol y exemestane y segundo, los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos, donde se cuentan: tamoxifeno (TAM), toremifeno y raloxifeno. Siendo tamoxifeno, el tratamiento de primera elección, debido a su efectividad y mayor tiempo libre de enfermedad, disminuyendo la posibilidad de recaída y cáncer contralateral (4). Pese a sus conocidas ventajas, también se han identificado efectos secundarios, que van desde problemas tromboembólicos llegando hasta cáncer de endometrio, situación que no solo afecta la calidad de vida de las pacientes sino que adicionalmente implican un aumento en los costos de atención clínica a causa de la presentación de efectos secundarios, lo que implica realizar intervenciones adicionales (5-8), llegando en algunos casos a evidenciar que los efectos tóxicos superan los beneficios terapéuticos experimentados por los pacientes.

Así mismo, es importante mencionar que a partir del año 1998, tamoxifeno fue aprobado por la agencia para la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA: Food and Drug Administration) para ser suministrado como profiláctico a mujeres con riesgo alto de presentar cáncer de seno, tal es el caso, de mujeres portadoras de mutaciones en el gen de susceptibilidad a cáncer de seno 1 "Breast cancer 1" (*BRCA1*) y gen de susceptibilidad a cáncer de seno 2- "Breast cancer 2" (*BRCA2*).

En consecuencia, es necesario mencionar que tamoxifeno al ser un profármaco, involucra en su metabolismo la actividad de diversas enzimas y se hace necesario generar herramientas que permitan evaluar el estado metabolizador de cada paciente para poder direccionar el esquema de tratamiento hacia la alternativa más adecuada (9-11). En este campo, la salud personalizada busca tratamientos que se ajusten a las necesidades de cada paciente, minimizando fallos terapéuticos, efectos secundarios y toxicidad (12), mediante la predicción de respuesta al tratamiento, progresión de la enfermedad y pronóstico (13).

Por otra parte la genotipificación y caracterización molecular en farmacogenómica se ha desarrollado rápidamente gracias a la aparición de técnicas de Secuenciación de Nueva Generación (Next Generation Sequencing -NGS) existiendo en el mercado alternativas de tamizaje molecular, que suponen costos superiores a los que el sistema de salud puede costear por paciente, de forma que el abordaje para identificación de estados metabolizadores en las pacientes está dado por aplicación de microarray y evaluación de paneles usando diferentes reacciones de PCR, que tienen en cuenta para su diseño la información de la presencia de variantes para poblaciones locales, que si bien, aparentemente podría dejar sin evaluación, particularidades genéticas claramente identificadas como asociadas con variación interindividual en seguridad y eficacia de fármacos, en la práctica, hace factible su aplicación a costos bajos. Por otra parte el tiempo que requiere obtener resultados de paneles farmacogenómicos está mediado por el envío de la muestra fuera del país o en el mejor de los casos, si un laboratorio local se hace cargo de su procesamiento, se deberá esperar a completar un número mínimo de muestras para realizar el procesamiento, siendo una limitante, pues el personal médico requiere resultados rápidos que le permita hacer intervenciones oportunas sobre las decisiones terapéuticas apropiadas para los pacientes.

En este contexto, este estudio tuvo como objetivo, analizar variantes en genes asociados en la literatura internacional especializada, con la capacidad de metabolizar tamoxifeno (farmacogenética) sobre 30 muestras de ADN de pacientes diagnosticadas con cáncer de seno ductal infiltrante, atendidas en el Hospital Universitario San Ignacio (HUSI), y 21 mujeres sin diagnóstico de cáncer de seno. Para esto se seleccionó la plataforma de genotipado, "panel de Farmacogenética General de QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System". Adicionalmente se cuantificaron 4 metabolitos intermediarios de TAM; 4 hidroxil TAM (4HT), endoxifeno, N desmetil TAM (ND TAM) y TAM, mediante HPLC, con la intención de identificar correlación de los fenotipos y las concentraciones de metabolitos intermediarios activos de tamoxifeno, así como, establecer la presencia de efectos secundarios atribuibles al consumo de tamoxifeno, correlación de los datos histopatológicos, supervivencia y genotipo en las pacientes incluidas en este estudio, con la consecuente identificación de variantes genéticas frecuentes en la población estudiada, para generar un piloto de prueba molecular, tipo panel a medida, que permitan proponer una alternativa de

tamizaje mediante el uso de PCR en tiempo real empleando sondas taqman, que a futuro pueda implementarse y ofrecerse a costos razonables, mediante el uso de técnicas de rutina en laboratorios de diagnóstico.

Capítulo 1. Marco Teórico

Como punto de partida es importante abordar generalidades que nos permitirán identificar la pregunta de investigación que dio origen al desarrollo de esta tesis doctoral.

Generalidades: Glándula mamaria

La glándula mamaria tiene su origen en la capa embrionaria del ectodermo, siendo su histología prácticamente la misma en todas las especies: constituida por un parénquima glandular, compuesto de alvéolos y ductos, y un estroma de soporte. Cada célula alveolar se comporta como una unidad de secreción (14). La base de la glándula mamaria se extiende, en la mayoría de los casos, desde la segunda hasta la sexta costilla, desde el borde externo del esternón hasta la línea axilar media. La mayor parte de la masa de la mama, está constituida por tejido glandular y adiposo. El máximo desarrollo de estas glándulas se produce durante el embarazo y especialmente en el periodo posterior al parto, específicamente durante la lactancia, aumentando de tamaño debido al crecimiento del tejido glandular (15).

En condiciones fisiológicas el desarrollo y diferenciación celular del tejido mamario esta mediado por estrógenos y progestágenos, adicionalmente, señales dirigidas a factores de transcripción como: factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, insulin-like growth factor) y proteína p53 (16). Estos últimos son proporcionados tanto por la matriz extracelular como mediante la comunicación célula-célula (17), su acción está íntimamente conectada en una cascada de eventos que conducen al equilibrio homeostático a nivel génico entre genes supresores de tumor y proto-oncogenes, garantizando el correcto desarrollo del tejido.

A su vez, la estructura morfológica básica se caracteriza por presentar una membrana basal bien definida, recubierta por una capa sencilla de tejido mioepitelial, tapizada por una capa simple de tejido epitelial luminal.

Cáncer de seno

En contraste, el cáncer de seno está conformado por un grupo de enfermedades que se caracterizan por crecimiento descontrolado de células del tejido mamario. Proceso en el que proto-oncogenes y genes supresores de tumor pierden su balance, a causa de mutaciones germinales o/y somáticas, que desencadena un proceso tumoral. Este proceso conlleva un crecimiento paulatino hasta generar una estructura conformada por clones de células tumorales incapaces de repararse o entrar en apoptosis, que con el paso del tiempo genera una estructura tumoral. En la glándula mamaria el proceso tumoral, está conformado por diversas etapas que se emplean para denominar los estadios de la enfermedad, dentro de las que podemos encontrar: carcinoma *In situ*, caracterizado por el aumento del tejido

epitelial luminal sin compromiso de la membrana basal, el carcinoma invasivo, en el cual la membrana basal desaparece y se evidencia aumento de tejido epitelial luminal, sin llegar a diseminarse a tejidos distales y finalmente el carcinoma metastásico, en el cual se presenta diseminación distal, con la posibilidad de infiltrar diversos órganos.

Teniendo en cuenta características de los tumores de mama, se han generado diversas clasificaciones que revisaremos a continuación:

Clasificación de cáncer de seno.

Dentro de los criterios para clasificar el cáncer de seno se encuentran datos histopatológicos como: subtipo histopatológico, grado del tumor, estado de la enfermedad y estado de receptores hormonales (18). Por su parte, para pronóstico, diversos parámetros son tenidos en cuenta, de los que cabe mencionar, tamaño del tumor y estado de ganglios linfáticos (19).

Subtipos histológicos

Dentro de esta clasificación se tiene en consideración las características del tipo de tejido sobre el cual tiene origen el tumor, clasificándose en: epiteliales, no epiteliales y especiales. La clasificación de tejido epitelial, puede ser de tipo invasivo/infiltrante, estratificándose a su vez en carcinoma papilar, tubular, ductal, lobulillar y medular, por otra parte, puede ser de tipo no infiltrante en cuyo caso se encuentra carcinoma *in situ*, lobulillar y ductal. En el grupo de los no epiteliales se encuentran los sarcomas, linfomas y carcinomas metastásicos. Finalmente, en el grupo denominado especiales se encuentra, enfermedad de Paget de pezón, carcinoma inflamatorio y filoides. El mayor número de casos está representado por los carcinomas de tipo no infiltrante de origen ductal, le sigue en orden de aparición los de origen lobulillar, por otra parte y en menor proporción los subtipos tubular, mucoide y medular, en la Figura 1-1, se resumen los subtipos descritos estratificándoles en infiltrantes y no infiltrantes.

Grado del tumor

Es la descripción de un tumor, basada en la morfología celular e histológica al microscopio, es decir; si las células del tumor y la organización del tejido tumoral se asemejan a las células y a los tejidos normales, el tumor se denomina "bien diferenciado", en presencia de células que difieren de las normales en algunas características se dice que es "moderadamente diferenciado", y finalmente, cuando las células son altamente inmaduras se les conoce como "escasamente diferenciado". El grado de un tumor es una

indicación de la rapidez con la que probablemente crecerá y se extenderá el tumor, siendo los carcinomas bien diferenciados los de crecimiento lento y mejor pronóstico (20).

Si no se especifica un sistema de gradación para un tipo de tumor, generalmente se usa el siguiente sistema (21):

G1 (I) (grado bajo o bien diferenciado)

G2 (II) (grado intermedio o moderadamente diferenciado)

G3 (III) (grado alto o escasamente diferenciado)

Estadio de la enfermedad

El estadio hace referencia al tamaño o extensión (etapa) del tumor original (primario) y a si las células cancerosas se han diseminado en el cuerpo, generando procesos metastásicos. El estadio del cáncer se basa en factores como el lugar del tumor primario, el tamaño del tumor, si están afectados los ganglios linfáticos regionales (la extensión del cáncer a los ganglios linfáticos cercanos), y al número de tumores presentes (20).

La clasificación más usada es en la que estadifica de 0-IV. A continuación una breve descripción de los estadios que conforman esta clasificación:

Estadio 0: se utiliza para describir los casos de cáncer de mama no invasivos, como el CDIS (carcinoma ductal *in situ*).

Estadio I: describe el cáncer de mama invasivo (las células cancerígenas invaden el tejido mamario normal que las rodea). El estadio I está dividido en subcategorías, conocidas como IA y IB.

El estadio IA describe el cáncer de mama invasivo en el que: el tumor mide hasta 2 cm y el cáncer no se ha extendido más allá de la mama; no hay ganglios linfáticos afectados.

El estadio IB describe el cáncer de mama invasivo en el que: puede no presentar tumor en la mama o evidenciarse un tumor, inferior a 2cm, sumado a la presencia de pequeños grupos de células cancerígenas superiores a 0,2 mm, pero inferiores a 2 mm en los ganglios linfáticos.

Estadio II: El estadio II se divide en las subcategorías IIA y IIB.

El estadio IIA describe el cáncer de mama invasivo en el que: no hay ningún tumor en la mama, pero se detectan células cancerígenas (que superan los 2 mm) en 1-3 ganglios linfáticos axilares (debajo del brazo) o en los ganglios linfáticos cerca del esternón (encontrado durante una biopsia del ganglio centinela) o el tumor mide 2 cm o menos, y se

ha propagado hacia los ganglios linfáticos axilares o por otra parte el tumor mide entre 2 y 5 cm, y no se ha propagado hacia los ganglios linfáticos axilares.

El estadio IIB describe el cáncer de mama invasivo en el que: el tumor mide entre 2 y 5 cm, y se observan en los ganglios linfáticos pequeños grupos de células cancerígenas superiores a 0,2 mm, pero inferiores a 2 mm o casos en los que el tumor mide entre 2 y 5 cm, y el cáncer se ha propagado en 1-3 ganglios linfáticos axilares o en los ganglios linfáticos cercanos al esternón y otros casos en los que el tumor mide más de 5 cm, pero no se ha propagado hacia los ganglios linfáticos axilares.

Estadio III: se divide en las subcategorías IIIA, IIIB y IIIC.

El estadio IIIA describe el cáncer de mama invasivo en el que: no hay tumor en la mama o el tumor puede tener cualquier tamaño, y se detectó la presencia de cáncer en 4-9 ganglios linfáticos axilares o en los ganglios linfáticos cercanos al esternón o el tumor mide más de 5 cm, y se observan en los ganglios linfáticos pequeños grupos de células cancerígenas superiores a 0,2 mm, pero inferiores a 2 mm o casos en los que el tumor mide más de 5 cm, y el cáncer se ha propagado en 1-3 ganglios linfáticos axilares o en los ganglios linfáticos cercanos al esternón.

El estadio IIIB describe el cáncer de mama invasivo en el que: el tumor tiene un tamaño indefinido y se ha propagado hacia la pared torácica o la piel de la mama, y ha provocado inflamación o una úlcera y pudo haberse propagado hacia 9 ganglios linfáticos axilares o pudo haberse propagado hacia los ganglios linfáticos cercanos al esternón. En este estadio se encuentra el cáncer de mama inflamatorio.

El estadio IIIC describe el cáncer de mama invasivo en el que: en algunos casos puede que no haya indicios de la enfermedad en la mama o, en otros, si hay un tumor, puede tener cualquier tamaño y haberse propagado hacia la pared torácica o a la piel de la mama. Para este estadio el cáncer se ha propagado en 10 o más ganglios linfáticos axilares o casos en los que el cáncer se ha propagado hacia los ganglios linfáticos ubicados sobre o debajo de la clavícula o pacientes en los que el cáncer se ha propagado hacia los ganglios linfáticos axilares o los ganglios linfáticos cercanos al esternón.

Estadio IV:

El estadio IV describe el cáncer de mama invasivo que se ha propagado más allá de la mama y los ganglios linfáticos circundantes hacia otros órganos del cuerpo, como los pulmones, ganglios linfáticos distantes, la piel, los huesos, el hígado y el cerebro (22)

Estado de los receptores.

Los receptores hormonales son proteínas que se encargan de activar factores de transcripción que actúan a nivel de proliferación celular, generando crecimiento de las células mamarias. En el tejido mamario se encuentran los receptores de estrógenos (RE), receptores de progestágenos (RP) y el oncogen HER2 (HER2). Estos receptores son evaluados de rutina en pacientes con cáncer de seno, mediante tinciones inmunohistoquímicas generando un reporte cualitativo donde se pueden reportar como positivos (+), donde indica que están presentes, o negativos (-) donde representan ausencia, adicionalmente se puede determinar los niveles de expresión mediante el porcentaje de receptores presentes en células de los pacientes, lo cual se hace mediante el recuento de un número de campos a nivel microscópico y se estima un promedio, el cual se reporta en porcentaje cuantitativo que va de 1 hasta el 100%, de acuerdo a esta información se direcciona terapia hormonal (23, 24).

Parámetros pronósticos

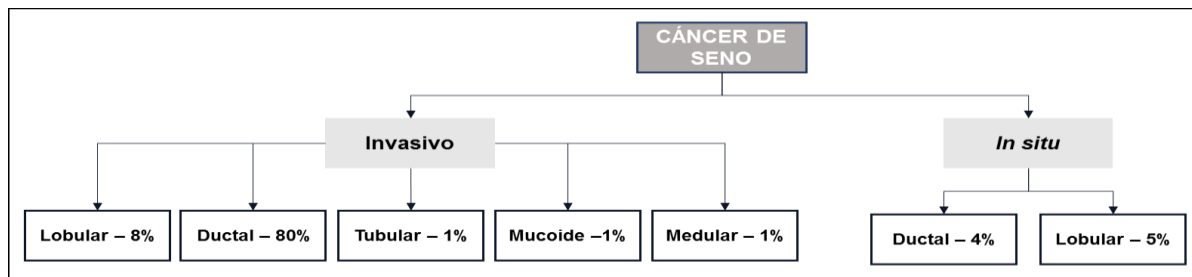
Por otra parte en el diagnóstico de cáncer de seno, se cuentan con parámetros pronósticos como:

Tamaño del tumor.

Hace referencia a la extensión transversal del tumor en su punto más ancho. Se mide habitualmente en milímetros o centímetros. Este parámetro también se utiliza para determinar el estadio del cáncer (25). Adicionalmente se ha establecido que a mayor tamaño tumoral más frecuencia de invasión ganglionar axilar; encontrando que en presencia de tumores menores de 3 cm, se presenta diseminación axilar en un tercio de los casos, y con tumores de más de 3 cm aparecen metástasis axilares en más de la mitad de las pacientes (26). La frecuencia de metástasis ganglionar axilar en ausencia de otros factores pronósticos se ha establecido en el 11 % si el tamaño tumoral es de 5 a 10 mm y de un 17 % si el tamaño tumoral es de 10 a 20 mm (27).

Estado de ganglios linfáticos.

Los ganglios linfáticos son órganos del sistema inmunitario con forma circular pequeña, ampliamente distribuidos por todo el cuerpo, unidos mediante los vasos linfáticos. Contienen linfocitos y se inflaman o se alargan en presencia de diversas afecciones, que pueden ir desde trastornos simples pasando por diversas enfermedades, como cáncer (28). Constituyen factores de mal pronóstico, asociados a mayor recurrencia y mortalidad, tanto para las pacientes tratadas con cirugía conservadora de mama, como para las pacientes tratadas con mastectomía. Como se describió en los estadios de la enfermedad, se utiliza para asignar la etapa y grado de diseminación en la que se encuentra el cáncer, determinándose así, el tratamiento a emplear y el pronóstico de la enfermedad.

Figura1-1 Clasificación histopatológica del cáncer de seno.

Se muestra la clasificación histopatológica basada en carcinoma infiltrante y no infiltrante, indicando el porcentaje de casos que se presenta para cada categoría. Siendo el ductal invasivo, el más frecuente.

Clasificaciones complementarias de cáncer de seno

Adicionalmente, a las clasificaciones comentadas, existen estratificaciones complementarias que toman más de uno de parámetros mencionados y generan diversos subgrupos de diagnóstico, dentro de los que se cuentan la clasificación TGM y de subtipos moleculares.

Clasificación TGM.

La clasificación TGM (T:Tamaño, G:Ganglios, M:Metastasis), o Classification of Malignant Tumours por sus siglas en inglés TNM (Tumor, lymph Nodes, Metastasis), es la base para calcular el índice pronóstico de Nottingham (NPI) que se calcula utilizando estos tres criterios, mediante la ecuación $NPI = (0.2 \times S) + N + G$, donde: S, representa el tamaño de la lesión en centímetros, N representa el número de ganglios, donde a 0 ganglios se le asigna el número 1, entre 1-4 ganglios se codifica como 2, y >4 ganglios se le asigna 3, una vez aplicada la fórmula se interpreta el resultado: valores entre ≥ 2.0 hasta ≤ 2.4 se estima una supervivencia a 5 años de 93%, valores de > 2.4 hasta ≤ 3.4 , supervivencia del 85%, cifras de > 3.4 hasta ≤ 5.4 supervivencia de 70% y finalmente, cifras > 5.4 una supervivencia del 50% de las pacientes (29), siendo una de las herramientas de pronóstico estandarizado usado clínicamente, con evidencia científicamente sólida y ampliamente reproducible (18, 30, 31).

A su vez cada uno de estos parámetros presenta diferentes categorías:

Para la categoría T (tamaño) que describe el tumor original (primario): se subdivide en: **TX** que significa que no es posible medir o hallar el tumor. **T0**, representa que no hay indicio alguno del tumor primario. **Tis** significa que el cáncer se encuentra "in situ". Finalmente, **T1**, **T2**, **T3** y **T4**, donde estos números se basan en el tamaño del tumor y en qué medida ha tomado tejido mamario circundante. Cuanto más alto es el número T, más grande es el tumor o más tejido mamario podría estar comprometido.

Por su parte, la categoría G (compromiso de los ganglios linfáticos) indica si el cáncer ha llegado a los ganglios linfáticos cercanos, donde **GX** significa que no es posible medir o hallar los ganglios linfáticos cercanos. **G0** representa que los ganglios linfáticos cercanos no presentan cáncer, finalmente **G1, G2 y G3** se basan en la cantidad de ganglios linfáticos afectados y qué nivel de cáncer presentan. Cuanto más alto es el número G, mayor es el nivel de afectación de los ganglios linfáticos.

Y finalmente la categoría M (metástasis) indica si hay o no indicios de que el cáncer se ha propagado hacia otras partes del cuerpo. Donde **MX** significa que no es posible medir o hallar metástasis, en consecuencia **M0** representa que no hay metástasis distante y **M1** significa que se ha detectado metástasis distante.

En consecuencia, una vez que el patólogo conoce los factores T, G y M, puede utilizarlos para asignarle un estadio a la enfermedad. Por ejemplo, un cáncer de mama T1 G0 M0 significa que el tumor primario mide menos de 2 centímetros (T1), no ha afectado a los ganglios linfáticos (G0) ni se ha propagado hacia partes distantes del cuerpo (M0). Este cáncer puede clasificarse como de estadio I.

Así mismo, una vez diagnosticada una paciente por alguna o la combinación de las diferentes clasificaciones; se procede a realizar un abordaje terapéutico que dependerá de cada paciente, encontrando que los estadios *in situ*, son los de mejor pronóstico y menor intervención, seguidos de los estadios invasivos, en los que se encuentran; los localmente diseminados y metastásicos con pronósticos reservados.

Clasificación subtipos moleculares

Por último, existe una clasificación en la que se tienen en consideración rasgos moleculares y el inmunofenotipo de cada grupo tumoral, estratificándolos en: primero, subtipo luminal A, cuya característica es tumores con receptores hormonales: RE(+) y/o RP(+);HER2(-), segundo, subtipo luminal B con tumores con receptores hormonales: RE(+) y/o RP(+); HER2 (+), tercero, el subtipo Basal con tumores con receptores hormonales: RE y RP(-) CK5/6(+) y/o EGFR(+) y finalmente el subtipo HER2+/RE-, con receptores hormonales: RE(-), RP(-) y HER2(+). Donde cada subtipo, presentara mejor o peor pronóstico de acuerdo a la combinación de receptores presentes y será decisivo a la hora de seleccionar el tratamiento a implementar sobre cada paciente (32).

EPIDEMIOLOGÍA

En mujeres colombianas, el cáncer de mama es la primera causa de nuevos casos y mortalidad en el país. De acuerdo al reporte de GLOBOCAN para el año 2012 la tasa de

incidencia de cáncer de seno en Colombia fue del 21,5% (6.655 casos) y la tasa de mortalidad fue de 12,2% (2.120 defunciones) (1). De igual forma, según datos del Sistema Integral de Información de la Protección Social (SISPRO) del Ministerio de Salud en el periodo: 2005-2014, las cifras de mortalidad por cáncer de seno mostraron un aumento paulatino desde el 2012, se indican las cifras históricas en la Figura 1-2.

Por otra parte según los datos de Así Vamos en Salud, en Colombia, para el año 2015 se presentó una tasa de mortalidad por cáncer de seno de 11,45 por 100.000 habitantes, presentando un aumento de dos puntos por cada 100.000 mujeres, respecto al año anterior.

Figura 1-2. Tasa de mortalidad por cáncer de mama en mujeres durante el periodo 2005 al 2014.



Fuente: SISPRO. 2014. Cifra de casos por cada 100.000 habitantes en Colombia desde 2005 hasta 2014.

Es conocida la existencia de factores de riesgo asociados a presentar esta enfermedad, tal es el caso de: antecedentes familiares, es decir casos en la familia encontrando que si ha tenido un familiar de primer grado (hermana, madre, hija) diagnosticado con cáncer de seno, su riesgo se duplica. Si se ha diagnosticado a dos parientes de primer grado, su riesgo es 5 veces mayor que el promedio (33), por otra parte, en mujeres con menarquia a temprana edad, antes de los 12 años, y lo mismo aplica para las mujeres que presentan menopausia después de los 55 años. Adicionalmente la nuliparidad o primer embarazo después de los 30 años, el uso de anticonceptivos y terapia hormonal de reemplazo también aumenta el riesgo (34), de manera que todos estos factores deben ser considerados a la hora implementar medidas preventivas.

TRATAMIENTO PARA CÁNCER DE SENO EN COLOMBIA

Según la Guía de Práctica Clínica (GPC) para la detección temprana, tratamiento integral, seguimiento y rehabilitación del cáncer de mama del Ministerio de Salud y Protección Social -Departamento Administrativo de Ciencia Tecnología e Innovación en Salud (COLCIENCIAS) se proponen protocolos de manejo que incluyen abordaje local: con intervenciones quirúrgicas y sesiones de radioterapia, seguidos de alternativas sistémicas dentro de las que se cuentan quimioterapia, hormonoterapia y terapia dirigida, para el tratamiento de carcinoma ductal *in situ* (CDIS), cáncer de mama temprano, carcinoma localmente avanzado y finalmente para el carcinoma metastásico o recurrente, donde adicionalmente para cada subtipo se tiene en cuenta el estado menopáusico de las pacientes, estratificándolas en pre-menopáusicas y post-menopáusicas para la asignación de tratamiento hormonal (4).

Dentro de los tratamientos sistémicos, la hormonoterapia es la alternativa que implica mayor tiempo de duración en el tratamiento debido a, que se suministra de 5 hasta 10 años, según las recomendaciones del Grupo Internacional de Estudio sobre el Cáncer de Mama (IBCSG), basadas en el estudio aleatorio ATLAS (Adjuvant Tamoxifen: Longer. Against Shorter) donde se encontró que el uso durante 10 años de tamoxifeno (TAM), aumenta la sobrevida libre de enfermedad de pacientes con cáncer de seno (35-37). Adoptando estas recomendaciones, en Colombia, TAM es el tratamiento de primera línea para mujeres premenopáusicas y postmenopáusicas diagnosticadas con cáncer de seno, de igual forma es la alternativa profiláctica en pacientes con riesgo alto de presentar cáncer de seno; tal es el caso de mujeres portadoras de mutaciones en el gen de susceptibilidad a cáncer de seno 1, Breast cancer 1 (*BRCA1*) y gen de susceptibilidad a cáncer de seno 2-Breast cancer 2 (*BRCA2*).

HORMONOTERAPIA

Dentro de los esquemas de hormonoterapia existen medicamentos que actúan a nivel de la síntesis de estrógeno, como es el caso de anastrozol, mediante la inhibición de las aromatasas, por otra parte, existen Moduladores Selectivos del Receptor de Estrógeno (SERM) donde se encuentra el tamoxifeno, cuyo mecanismo es bloquear el receptor específico de estrógeno, al acoplarse a éste mediante un efecto agonista en endometrio o un efecto antagonista en la mama, de tal forma que el efecto terapéutico dependerá del tejido sobre el cual actúe.

Se ha establecido en estudios poblacionales que tamoxifeno muestra mayores tasas de supervivencia libre de enfermedad y disminución de recaídas al ser contrastado con

anastrozol (35, 38). Adicionalmente en la evaluación de costo efectividad realizada por Gamboa y colaboradores en el año 2010, donde se comparó tamoxifeno versus Anastrozol (39) se midió la efectividad en tiempo libre de enfermedad y se estableció, que resulta recomendable para Colombia continuar con el tamoxifeno por cinco años. Argumentos que refuerzan la prescripción de TAM como hormonoterapéutico de primera línea.

En consecuencia, en Colombia se prescribe de primera línea a todas las pacientes con cáncer de seno con receptores hormonales positivos, premenopaúsicas y postmenopáusicas, el consumo de tamoxifeno como hormonoterapéutico durante un periodo de 5 hasta 10 años, tiempo en el cual las pacientes son monitoreadas para controlar la aparición de eventos adversos como lo son: eventos tromboembólicos, cataratas, engrosamiento de endometrio o cáncer de endometrio (40).

TAMOXIFENO

La denominación química es citrato de tamoxifeno o Citrato de (Z)-2-4-(1,2-difenil-1-butenil) fenoxi-N, Ndimetiletanamina, y ejerce su mecanismo de acción sobre los receptores de estrógenos, induciendo un cambio conformacional. En consecuencia, la expresión de los genes que dependen de estos receptores queda bloqueada o alterada. El resultado final es una reducción de la actividad de la DNA-polimerasa, un deterioro en la utilización de timidina, así como un bloqueo de la captación de estradiol y una respuesta estrogénica disminuida. La mayor parte de la actividad del tamoxifeno se observa cuando la célula tumoral se encuentra en la fase G-2 del ciclo, comportándose como un citostático (41).

Además, el tamoxifeno reduce los niveles del factor de crecimiento similar a la insulina-tipo 1, factor que estimula la proliferación de las células tumorales e induce la secreción del factor de transformación del crecimiento (TGF-b), factor que actúa como inhibidor del crecimiento de las células tumorales. Por otra parte, debido a sus efectos estrogénicos, estimula la producción hipotalámica de hormona liberadora de gonadotropina, lo que permite que sea usado para inducir la ovulación en mujeres anovulatorias (42, 43).

FARMACOCINÉTICA DE TAMOXIFENO

El tamoxifeno se administra vía oral y se absorbe rápidamente por el tracto digestivo. Las concentraciones máximas en plasma se observan a las 4-5 horas. La biodisponibilidad de dos dosis de 10 mg distribuidas a lo largo del día es equivalente a una dosis de 20 mg, motivo por el cual se suministra una dosis diaria de 20mg. Se debe administrar a la misma hora todos los días, pasar los comprimidos enteros con ayuda de agua. Una vez absorbido, el fármaco se distribuye ampliamente por todo el organismo y se metaboliza extensamente

en el hígado por el citocromo P450. El metabolito más importante es el N-desmetiltamoxifeno, con propiedades terapéuticas similares al tamoxifeno. Después de dosis repetidas, el tamoxifeno alcanza un estado de equilibrio al cabo de 8 semanas, lo que sugiere que su metabolito más importante tendría una vida media de 14 días. El tamoxifeno experimenta circulación enterohepática y tanto el fármaco inicial como sus metabolitos, se excretan sobre todo en heces. La mayor parte de los productos de eliminación son conjugados, siendo sólo del 30% sin conjugar. Debido a que no hay excreción renal, no son necesarios reajustes de las dosis en los pacientes renales. Por el contrario, pacientes con éstasis biliar pueden necesitar una reducción de la dosis (44).

Para convertir el tamoxifeno en su forma activa se requiere la acción de diversos citocromos y existen dos factores que pueden afectar la capacidad metabólica, primero: defectos en las enzimas asociadas al metabolismo y segundo, el uso concomitante de ciertos medicamentos que bloquean la eficacia de estas enzimas, constituidas en mayor proporción por moléculas inhibitoras que al ser metabolizadas por dichas enzimas generan un efecto de competencia que disminuye la capacidad de metabolizar, en el caso de CYP2D6 se conoce que los principales inhibidores son: citalopram, fluoxetina, paroxetina, terbinafina, quinidina, amiodarona, clorfenamina, difenhidramina, pimozide, tioridazina, clorpromazina, haloperidol, bupropion, celecoxib, cimetidina, clomipramina, cloranfenicol, cocaína, doxorubicina, metoclopramida, metadona, moclobemida, quinidina, ranitidina, ranolazina, ritonavir, doxepina, halofantrina, imipramina y levomepromazina.

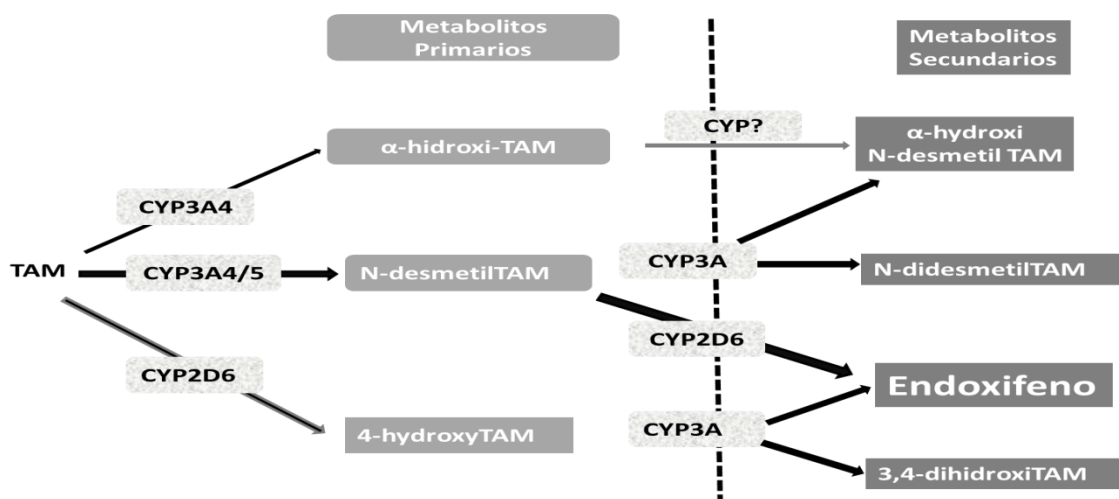
FARMACOGENÓMICA DE TAMOXIFENO

El tamoxifeno es un profármaco, debido a que requiere ser transformado a sus respectivos metabolitos, primarios y secundarios (Figura 1-3), los cuales son los responsables de la actividad farmacológica. El metabolismo de este fármaco se lleva a cabo en el hígado, principalmente por enzimas del citocromo P450 (CYP450), a través de dos vías, 4-hidroxilación y N-desmetilación, que resultan en un metabolito secundario muy potente, el endoxifeno. En presencia de la enzima CYP2D6, el metabolito inmediatamente resultante, es 4 hidroxitamoxifeno (4-hidroxit-TAM), cuya particularidad es ser aproximadamente 30 a 100 veces más potente antiestrógeno, que el tamoxifeno. Por otra parte la N-desmetilación catalizada principalmente por los citocromos: CYP3A4 y CYP3A5, produce N-desmetiltamoxifeno, que se oxida, adicionalmente a una serie de metabolitos, siendo el más importante el endoxifeno. De manera que el endoxifeno, se forma a partir de N-desmetiltamoxifeno mediante hidroxilación por CYP2D6, y de 4-hidroxit-TAM a través de desmetilación por CYP3A4, en consecuencia el 4-hidroxitamoxifeno y el endoxifeno tienen potencias similares en términos de actividad antiestrogénica. Las concentraciones plasmáticas de endoxifeno en quienes reciben terapia con tamoxifeno son, en promedio,

diez veces superiores a las del 4-hidroxitamoxifeno. Adicionalmente los citocromos CYP2C9 y CYP2C19, desempeñan un papel en estas vías metabólicas al metabolizar tamoxifeno a 4-hidroxi-TAM o N-desmetiltamoxifeno. Por otra parte, la acción de las glicoproteínas ABCB1 y ABCB2 se ha visto asociada a transporte y mecanismos de resistencia a tratamiento con tamoxifeno (45), de igual forma las glucuronil transferasas (UGT) y sulfotransferasas (SULT) son determinantes en el proceso de excreción. El metabolismo de tamoxifeno continúa siendo estudiado y se siguen identificando proteínas involucradas en su metabolismo tal es el caso de las monooxigenasas: flavina monooxigenasa 1 (FMO1) y flavina monooxigenasa 3 (FMO3) (46).

En consecuencia, el mecanismo de acción de tamoxifeno está dado por la inhibición del receptor de estrógenos causada por el endoxifeno, de manera específica al unirse al ER α (receptor de estrógenos alfa) codificado por el gen ESR1 (Receptor de estrógeno 1) para la degradación proteasomal. El endoxifeno causa una disminución en los niveles de ER α mientras que los otros metabolitos del tamoxifeno, simplemente los estabilizan (45, 47, 48).

Figura 1 3. Metabolismo del tamoxifeno. Metabolitos primarios y secundarios.



Fuente: (49). TAM: Tamoxifeno, CYP3A4/5: CYP3A4 y CYP3A5 simultáneamente, CYP?: Citocromos aún no identificados, CYP3A: CYP3A4 o CYP3A5 solo uno a la vez.

BIOLOGÍA DEL SISTEMA CITOCROMO P450

Se han identificado más de 7.700 secuencias de CYP450 distribuidas en 866 familias, que presentan amplia versatilidad funcional, siendo capaces de catalizar gran cantidad de procesos y unirse a un número elevado de sustratos. Entre las reacciones catalizadas por citocromos se encuentran principalmente reacciones de oxidación (N-oxidaciones, S-oxidaciones, epoxidaciones), hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, desalquilaciones, desulfuraciones, desaminaciones y deshalogenaciones. Este gran número de reacciones

metabólicas hace que el citocromo P450 sea una herramienta fundamental en la comprensión de la respuesta individual a los fármacos, permitiendo comprender determinados efectos beneficiosos, tóxicos, o adversos que experimenta un paciente.

La variabilidad de los genes y la presencia de diversos alelos están reguladas por polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) o por inserciones/deleciones también conocidas como INDELS, que afectan la proteína y por ende la capacidad metabolizadora del individuo que las presenta. Existe una codificación oficial que consiste en la sigla rs (reference SNP) seguida de un número identificativo. El número identificador rs# proporciona una ubicación precisa en el genoma, de la variante genética que representa, adicionalmente se puede complementar la información mostrando el cambio de nucleótido para lo cual, se indica el que está presente, seguido del alelo de referencia, separado por un /, por ejemplo la variante alélica CYP2C9*2 se caracterizado por presentar en el rs1799853 el alelo T, siendo C el de referencia, de forma abrevada: rs1799853 T/C (50).

ESTRUCTURA SISTEMA CYP450

Las estructuras de enzima libre del sistema CYP450, vistas con cristalografía, muestran que están conformadas por un grupo hemo, en el cual el hierro se encuentra unido a un grupo tiol (-SH) de una cisteína y a una molécula de agua (51). La estructura secundaria del P450 consiste en aproximadamente 12 alfa hélices, de las cuales las hélices I y L, altamente conservadas, están en contacto directo con el grupo hemo (52). La hélice I contiene también residuos críticos implicados en el suministro de protones a los intermediarios del ciclo catalítico. La zona del núcleo está constituida por cuatro hélices (α D, α E, α I y α L), hélices J y K, dos láminas β , y una espiral denominada serpiente, abarca entre 7-10 residuos de aminoácidos y se cree, juega un papel en la unión del grupo hemo, y en la estabilización de la estructura terciaria de la proteína (53).

En consecuencia, estas enzimas están constituidas por una combinación de regiones α -hélice y de hojas (láminas β), fundamentalmente en la región de la proteína que rodea al grupo hemo, mientras que las regiones más variables son las que constituyen los lugares de anclaje a la membrana o de unión y reconocimiento de sustratos. La alta conservación de la región del grupo hemo, corresponde con el centro catalítico de la enzima, esto refleja un mecanismo común de transferencia de electrones y de protones, así como activación de oxígeno (54). La enzima permanece anclada a la membrana a través de una hélice hidrofóbica cercana al extremo N-terminal, por lo que la mayor parte de la proteína se sitúa en la cara citosólica de la membrana. Esta hélice transmembrana está seguida, por regla general, por una serie de aminoácidos básicos cuyos residuos interactúan con las cargas negativas de los lípidos de la membrana. Finalmente la interacción con el sustrato se da

mediante su paso por diferentes túneles que son generados en el proceso de interacción molecular, siendo las puertas de ingreso al sitio activo (55).

Las enzimas citocromo p450 (CYP-450) se identifican con las siglas CYP seguido de un número que designa la familia, una letra que identifica la subfamilia y otro número que corresponde al gen, en algunos casos esta seguido de una letra que representa variantes del gen. Ejemplo: CYP2D6*2A, que corresponde a la proteína de la familia 2D6 gen 2A. De los CYPs que intervienen en el metabolismo de TAM, se comentará las particularidades de cada uno.

CYP2C9: Cuenta con 490 aminoácidos y 55,6kDa se ubica en el cromosoma 10q24, se localiza a nivel de retículo endoplasmático. Presenta más de 60 variantes alélicas (56).

CYP2C19: Cuenta con 490 aminoácidos y 55,9kDa se ubica en el cromosoma 10q23.33, se localiza a nivel de retículo endoplasmático. Presenta 36 variantes alélicas (57).

CYP2D6: Proteína conformada por 497 aminoácidos y 55,8 kDa, ubicada en el cromosoma 22q13.2, se localiza en mitocondria y retículo endoplásmico, de tejido hepático y en menor proporción en útero, tejido adiposo y endocrino, también a nivel gastrointestinal, se sabe que metaboliza el 25% de los fármacos comúnmente recetados. Exhibe alto polimorfismo, se han descrito más de 120 variantes alélicas que generan diferentes fenotipos, los cuales son particulares a la población sobre la que se evalúe, razón por la cual su caracterización y genotipado ha sido muy empleada en farmacogenómica, adicionalmente cuenta con dos pseudogenes: CYP2D7 y CYP2D8 (58).

CYP3A4/5: La familia CYP3A comprende cuatro genes que codifican las enzimas funcionales: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A43. Estos genes a menudo se consideran colectivamente como "CYP3A" debido a su especificidad de sustrato y la dificultad de discernir el papel relativo de cada isoforma en el metabolismo de drogas. Se conoce que las enzimas CYP3A4/5 son responsables de metabolizar el mayor número de fármacos prescritos, que sufren metabolismo oxidativo (más del 50%). Las enzimas CYP3A4/5 están conformadas por 27,2 Kb y 52 kDa, se ubican en el cromosoma 7q22.1, son las más abundantes en el hígado humano y también tienen expresión en el tracto gastrointestinal, y en menor proporción en intestino delgado, riñón y otros órganos. El metabolismo que tiene lugar a nivel gastrointestinal contribuye a la baja disponibilidad de muchos fármacos que se administran por vía oral (41).

GENÉTICA SISTEMA CYP450

Como se comentó las enzimas de la familia CYP450 se caracterizan por presentar alta variabilidad genética y han sido ampliamente estudiadas, generando una descripción robusta de los fenotipos basados en el genotipo de los individuos, en consecuencia, se

cuenta con la base de datos The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database, <http://www.cypalleles.ki.se/> donde se encuentran las enzimas de esta familia, los diversos alelos reportados para cada una, su respectiva actividad enzimática y efecto, si lo tuviera según lo reportado por diversos estudios realizados en pacientes con cáncer de seno y población sana (59-61).

Por otra parte cabe recordar que cada individuo puede tener dos copias del mismo alelo (homocigoto) o una copia de dos alelos diferentes (heterocigoto) condiciones que son fundamentales a la hora de establecer el fenotipo. De igual forma los alelos que difieren de la forma nativa o silvestre (wt), se conocen como polimorfismos variante (vt), teniendo en cuenta esta información y la reportada en diversos artículos, se procederá a describir las clasificaciones fenotípicas de estas enzimas.

Para CYP2C9, el alelo asociado con función normal es CYP2C9*1, por otra parte, dentro de los alelos vt están: CYP2C9*2 (rs1799853 T/C), CYP2C9*3 (rs1057910 A/C), CYP2C9*4 (rs56165452 T/C), CYP2C9*5 (rs28371686 C/G), CYP2C9*6 (rs9332131 -/A), CYP2C9*7 (rs67807361 C/A), CYP2C9*9 (rs2256871 A/T), CYP2C9*11 (rs28371685 C/T), CYP2C9*13 (rs72558187 T/C) y CYP2C9*46 (rs754487195 G/A) y hacen parte de los alelos que se les ha atribuido asociación con respuesta a diversos fármacos (56). En población colombiana se ha evaluado las frecuencias genotípicas de CYP2C9*2 y CYP2C9*3 sobre 145 individuos en tratamiento con warfarina (62).

Por otra parte, para CYP2C19 el alelo silvestre es CYP2C19*1 y se han descrito alelos relacionados con un fenotipo de metabolismo disminuido, dentro de estos están: CYP2C19*2 (rs12769205 A/G) y CYP2C19*3 (rs4986893 A/G) (63). Adicionalmente se ha descrito que el alelo CYP2C19*17 (rs11188072 G/T) está relacionado con el fenotipo de metabolizador ultrarrápido (64). En población colombiana existe el reporte de la evaluación en 189 pacientes tratados con omeprazol, a quienes se realizó identificación genotípica de CYP2C19*1 y CYP2C19*2 (65).

De otro lado, para CYP2D6, la variante genética asociada con alelo silvestre es CYP2D6*1, así mismo, algunos de los alelos asociados con metabolismo normal son CYP2D6*2 (rs1058164 G/C), CYP2D6*35 (rs769258 T/C), en contraste, algunos de los alelos asociados con metabolismo reducido son: CYP2D6*10 (rs1065852 A/G), CYP2D6*17 (rs28371706 A/G), CYP2D6*41 (rs75276289 G/C) y finalmente algunos de los alelos asociados a un función nula son: CYP2D6*3 (rs35742686 -/T), CYP2D6*4 (rs1065852 A/G) y CYP2D6*5 (delección CYP2D6).

En consecuencia para la enzima CYP2D6 en presencia de más de dos alelos funcionales a causa de duplicaciones, se da origen a un fenotipo ultra metabolizador, de otro lado en presencia de los alelos vt con pérdida de función y los vt con función disminuida

dependiendo de la combinación de estos alelos, cada individuo podrá ser caracterizado como metabolizador ultrarrápido (MU), metabolizador normal (ME), metabolizador intermedio (MI) y metabolizador lento (MP) (60, 66).

Para establecer los estados metabolizadores de CYP2D6, se hace mediante la asignación de puntuación, de acuerdo a la actividad enzimática, por ejemplo en presencia de un alelo funcional se le asigna 1, por su parte, un alelo con función disminuida se le asignara 0,5 y alelos con función nula 0. De manera que al totalizar aquellos individuos con score 0, 1, 2 y >3 serán clasificados como MP, MI, ME y MU respectivamente (67).

Existen registros de evaluación variantes alélicas de CYP2D6, en 121 individuos sanos, procedentes de Pereira en quienes se identificaron los alelos CYP2D6*1, *2,*3,*4,*5 y *17 (68). De igual forma dos estudios que evaluaron comunidades Embera y Ngawbe, identificaron las variantes CYP2D6*4, *6 y *10 (69). Finalmente en dos tesis se evaluaron individuos sanos constituidos por 123 participantes del personal académico y estudiantil de la Pontificia Universidad Javeriana sede Bogotá y 148 participantes de la Escuela de Suboficiales de la Fuerza Aérea Colombiana (ESUFA) donde se identificaron las variantes CYP2D6 *1, *2, *3, *4, *5, *6, *10, *35 y *41 (70, 71).

Finalmente para CYP3A5, se ha identificado que el alelo wt es CYP3A5*1 y los alelos vt son CYP3A5*3 (rs776746 T/C) y CYP3A5*7 (rs76293380 -/A). Para población colombiana se tiene registro de frecuencias para CYP3A5 de las variantes *1,* 2 y *3 según lo reportado en la base de datos del proyecto internacional para haplotipos humanos (Hapmap) que incluye los datos de 70 individuos procedentes de Medellín, conformados por tríos familiares.

Se resume, en la Tabla 1-1, la actividad metabolizadora generada por las variantes alélicas de los genes CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 y CYP3A5.

Tabla 1-1. Resumen de actividad metabolizadora generada por las principales variantes alélicas de los genes CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 y CYP3A5.

GEN	CAPACIDAD METABOLIZADORA-VARIANTES ALELICAS				REF
	NULA	INTERMEDIO	NORMAL	ULTRARRAPIDO	
CYP2B6	*28	*6A, *8, *11, *12, *14, *15, *16	*1A	*4 y *22	(59, 72)
CYP2C9	*3, *5 y *13	*2	*1		(59, 72)
CYP2C19	*2, *3, *4,*5, *6, *7, *8	*27	*1	*17	(59)
CYP2D6	*3, *4, *5, *6, *7, *8, *11, *16, *19-*21, *38, *40, *42	*9, *10, *17, *29, *36, *41	*1, *2, *2A,*33, *35	*1/*2XN	(73)
CYP3A4	*20 y *26	*8,*11,*13,*16 y*18	*1		(59)
CYP3A5	*3 y*6	*8	*1		(59)

En la primera columna se indica gen, seguido de las columnas que muestra las variantes alélicas que confieren actividad nula, intermedio, normal y ultrarrápido de la proteína.

Por otra parte, cabe mencionar que en el caso del profármaco tamoxifeno, se espera que individuos con estado metabolizador pobre, presenten cifras de metabolitos activos bajos, con un riesgo casi 2 veces mayor de desarrollar recurrencia del cáncer de mama en comparación con los pacientes con 2 alelos CYP2D6 funcionales (ME). La relación entre el número de alelos funcionales y el resultado clínico es más evidente a partir de los fenotipos UM de CYP2D6, que pueden tener el mejor resultado de tamoxifeno (74).

Adicionalmente la asignación de fenotipo para el gen CYP2D6, tiene diversas interpretaciones dependiendo de la referencia que cada investigador decida seguir, para mencionar algunos ejemplos, tenemos que Zineh (75), Zanger (76), Gaedigk (67) y Borges (77), difieren en la asignación de los genotipos incluidos en el estadio metabolizador intermedio y metabolizador pobre, principalmente, donde por ejemplo, en la clasificación de Zanger en presencia de dos alelos con actividad reducida corresponderá a individuos metabolizadores pobres, en contraste para Gaedigk a esta categoría también pertenecerán individuos con genotipos que incluyan un alelo de función reducida y uno de función nula, situación que hace que los resultados obtenidos en una u otra investigación no muestren similitud al no poder ser comparables.

En este contexto la evaluación farmacogenómica, se ha convertido en una herramienta que permite estadificar a los individuos en diversos estados metabolizadores que permiten identificar que xenobiótico serán metabolizados y cuales por el contrario no y de esta forma seleccionar que medicamentos podrían ser suministrados, con la posibilidad de mostrar efecto terapéutico y disminuir efectos adversos. Para esto, existen diversas plataformas que permiten realizar la identificación del estado metabolizador, una de las más completas consiste en realizar secuenciación de nueva generación (NGS) para identificar todas las variantes genéticas asociadas a la respuesta a fármacos, aunque para la realidad nacional implica dos grandes limitantes, primero capacidad de análisis y segundo costos elevados que no son asumidos por el sistema de salud.

Por otra parte, es posible emplear microarrays (Oncochips), microchips o micromatrices de ADN complementario (ADNc) o de oligonucleótidos que constituyen una herramienta estándar para una estimación del riesgo de fallo o resistencia a las diversas terapias farmacológicas existentes. En consecuencia, los laboratorios Roche, lanzó en el año 2003 en Estados Unidos la primera micromatriz farmacogenómica mundial para aplicaciones clínicas, un microchip de uso en humanos y con fines diagnósticos, el AmpliChip CYP450 que fue aprobado por la agencia estadounidense FDA. Se basa en la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que detecta 33 polimorfismos en dos genes del complejo CYP450: el CYP2D6 y el CYP2D19, los cuales desempeñan un papel fundamental en el metabolismo de varios medicamentos. Actualmente este chip se solicita previa

prescripción de opiáceos y amitriptilina (78), con la limitante, que este no es comercializado en Colombia, teniendo en cuenta que Roche no lo distribuye.

Por otra parte, también existen otras alternativas, como xTaq CYP2D6 de Luminex, que permite la evaluación de 16 variantes en CYP2D6, prueba basada en la misma tecnología de amplichip450, también existe, Infinity CYP450 para la evaluación de las principales variantes genéticas en 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 y 3A5, así como para UGT1A1, adicionalmente el panel DMET de affymetrix, el genochip TAMOX de pharmgenomics, Pharmachip, así como Vera Code ADME y HumanExome BeadChip de Illumina son alternativas que podrían ser implementadas en el país, pero que pocos laboratorios disponen del equipo para realizar la lectura y sus costos son elevados.

Finalmente, viendo estas limitaciones otros países han generado sus propios paneles donde se incluyen las variantes genéticas más frecuentes en la población y con mayor relevancia clínica como genochip Tamox de Pharmcogenomics, que permite realizar el genotipado de las principales variantes genéticas de CYP2D6 con significado clínico, la prueba puede llevarse a cabo de manera fácil y rápida en cualquier laboratorio de genética molecular y también se puede solicitar como un servicio.

Teniendo este marco se planteó la **hipótesis**: Variantes genéticas de los genes más representativos en el metabolismo de tamoxifeno reportadas en otras poblaciones, son relevantes para la respuesta a tamoxifeno en cáncer de seno ductal infiltrante, en población que asiste al HUSI.

Objetivos

Objetivo General:

Establecer las frecuencias alélicas de las variantes en genes asociados al metabolismo de tamoxifeno (CYP2D6) en una muestra de población colombiana, contrastar su asociación con la respuesta a tratamiento con TAM, desenlace clínico y sobrevida de pacientes con cáncer de seno para la generación de una prueba de apoyo terapéutico.

Objetivos específicos:

1. Determinar/Identificar las variantes genéticas que afectan el efecto de la hormonoterapia con tamoxifeno en pacientes con cáncer de seno, mediante revisión de la literatura.

2. Determinar si los SNPs reportados en la literatura, están asociadas a respuesta a tratamiento con tamoxifeno en pacientes colombianas con cáncer de seno.

3. Analizar si variantes genéticas se correlacionan con parámetros histopatológicos del tumor y respuesta a tratamiento de hormonoterapia con tamoxifeno para ser usados como parámetros pronósticos.

4. Determinar si existe correlación entre las variantes genéticas evaluadas y sobrevida de pacientes colombianas con cáncer de seno.

5. Seleccionar al menos 3 de las variantes genéticas más frecuentes en la muestra de población colombiana para la generación de una prueba de apoyo para la toma de decisiones en tratamiento con tamoxifeno.

Para efectos del desarrollo de este escrito iremos desarrollando cada uno de los objetivos específicos describiendo: metodología, resultados y discusión.

Capítulo 2. Objetivo 1: Determinar/Identificar las variantes genéticas que afectan el efecto de la hormonoterapia con tamoxifeno en pacientes con cáncer de seno, mediante revisión de la literatura.

Este primer objetivo tuvo como fin, revisar el estado del arte de la farmacogenómica de tamoxifeno en pacientes con cáncer de seno y de esta forma identificar variantes genéticas asociadas al metabolismo de tamoxifeno reportadas en otras poblaciones.

Metodología:

Reconocimiento de variantes genéticas.

Se realizó la revisión bibliográfica mediante el uso de las bases de datos: NCBI, EMBASE, Espacenet, FullfreePDF, Medline, Nature.com, Pubmed, Sciencedirect, incluyendo en las ecuaciones de búsqueda los siguientes términos (MESH):

- Pharmacologic *AND* tamoxifen
- Breast cancer *AND* tamoxifen
- Pharmacogenomic *AND* tamoxifen

Para cada ecuación de búsqueda se obtuvo los resultados mostrados en la Tabla 2-1., donde la primera columna indica las palabras clave usadas, adicionalmente se incluyeron 3 columnas, cada una corresponde a las bases de datos consultada. Para cada una de las bases de datos se indica el número total de publicaciones, seguido de una columna donde se indica el número de revisiones y finalmente el número de artículos originales. La consulta fue realizada durante el mes de agosto del año 2016.

Tabla 2-1. Ecuaciones de búsqueda y número de artículos en las diferentes bases de datos.

TERMINOS USADOS	NCBI			Science direct			EMBASE		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Pharmacogenomic <i>AND</i> tamoxifen	222	67	155	581	113	468	4	0	4
Pharmacologic <i>AND</i> tamoxifen	9942	180	9762	7567	967	6600	20	0	20
Breast cancer <i>AND</i> tamoxifen	15264	1117	14147	28272	1728	26544	156	10	146

En la primera columna se indican los términos empleados en las ecuaciones de búsqueda y los resultados obtenidos en tres de las bases de datos consultadas. Indicando A: el número total de publicaciones, B: número de revisiones y C: artículos originales.

Luego de identificar las publicaciones que generaba cada ecuación se procedió a retirar la información redundante y realizar la revisión de cada uno de los “abstracts” para identificar los artículos que se incluirían en este estudio, teniendo como principal criterio de selección que fueran publicaciones que evaluaran la farmacogenómica de tamoxifeno en el tratamiento del cáncer de mama.

Se estableció que los términos de la ecuación de búsqueda “Pharmacogenomic and tamoxifen” fueron los que generaron los resultados más aproximados al objeto de esta investigación, por incluir la literatura donde se evaluaba respuesta a tamoxifeno mediada por variantes genéticas asociadas a su biotransformación, encontrando que para esta ecuación en la base de datos EMBASE se obtuvo el menor número de publicaciones, seguido de NCBI, mientras, que Science direct mostró el mayor número de artículos con: 581 registros. Se tomó como referencia los artículos encontrados mediante NCBI, al evidenciar que en estos estaban contenidos los que se capturaban por las otras dos bases de datos relacionados al tratamiento con tamoxifeno, por otra parte se encontró que los artículos de interés correspondían a revisiones sistemáticas, evaluación sobre pacientes o uso de modelos *in vitro* (microsomos hepáticos o líneas celulares).

Una vez seleccionados los artículos relevantes, se identificaron los que no estaban disponibles y se solicitaron a la biblioteca de la Universidad Nacional de Colombia.

Se procedió a revisar los artículos completos y se identificó que 122 de los artículos originales no evaluaban la variabilidad genética asociada a la respuesta a tamoxifeno, de igual forma 47 de las revisiones no hacían mención directa de respuesta a tratamiento con tamoxifeno, ni genotipificación para evaluación farmacogenética en cáncer de seno, motivo por el cual esta literatura se excluyó.

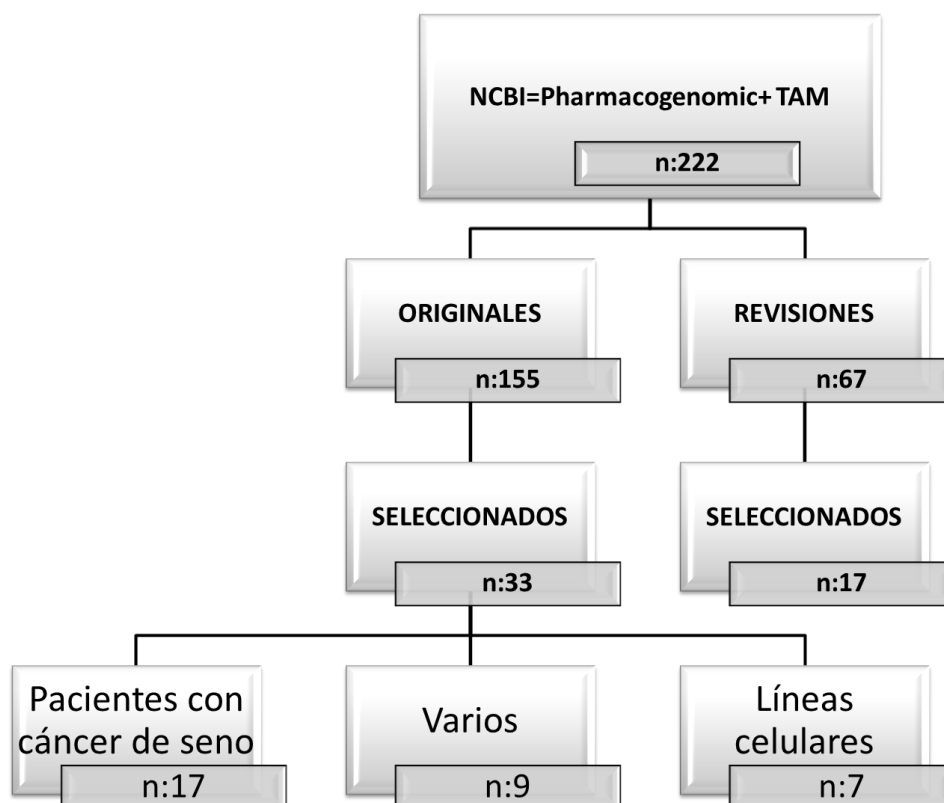
Resultados

Se seleccionaron 53 artículos, de los cuales, 17 fueron artículos de revisión en farmacogenómica de tamoxifeno (73, 79-95) y 33 artículos originales que evaluaban la respuesta a tamoxifeno en presencia de diversas variantes genéticas.

De los 33 artículos originales: 17 fueron estudios sobre pacientes con cáncer de seno tratadas con tamoxifeno (96-111), 9 catalogados como varios, donde 2 fueron análisis de data sets disponible en línea (112, 113), 1 metaanálisis (114), 3 estudios de miRNAs (115-117), 2 estudios de expresión de ARNm (118, 119) y 1 artículo evaluando el efecto sobre el

“integromic¹” posterior al suministro de tamoxifeno (120), finalmente 7 fueron estudios sobre líneas celulares (121-127) Figura 2-1.

Figura 2-1 Descripción de las temáticas de los artículos seleccionados.



Resultados obtenidos al aplicar la ecuación de búsqueda “pharmacogenomic AND Tamoxifen” en la base de datos, NCBI.. TAM: tamoxifeno Número de artículos originales y revisiones y se indican los que finalmente fueron tenidos en cuenta para esta investigación.

De la información recolectada se tomaron los artículos originales en los que se había evaluado pacientes con cáncer de seno n: 17 ANEXO 1, se realizó cuadro resumen donde se lista: gen evaluado, población examinada, técnica empleada para la detección molecular, resultado obtenido, año y DOI, posteriormente se procedió a confirmar su importancia clínica mediante búsqueda en la base de datos de farmacogenómica (www.pharmgkb.org). Identificando 10 genes de interés, para cada uno de los cuales se seleccionaron variantes genéticas tipo polimorfismo de un sólo nucleótido -SNP (single nucleotide polymorphisms;) y variación en el número de copias- CVN (Copy Number Variation), asociados al metabolismo de tamoxifeno a continuación se describen brevemente:

¹ enfoque de red, donde se evalúa la respuesta real a la administración de tamoxifeno, primero integrando los datos del transcriptoma con los datos de la interacción de proteína, usando un algoritmo eficiente de detección.

Los genes ABCB1 y ABCB2 que hacen parte de la superfamilia de transportadores de casete de unión a ATP (ABC). Las proteínas ABC transportan varias moléculas a través de las membranas extra e intracelulares. Adicionalmente están involucrados en la resistencia a múltiples fármacos. La proteína codificada por este gen es una bomba de eflujo de fármaco dependiente de ATP para compuestos xenobióticos con amplia especificidad de sustrato. Es responsable de la disminución de la acumulación de fármacos en las células resistentes a múltiples fármacos y, a menudo, media el desarrollo de resistencia a los fármacos contra el cáncer, en **ABCB1** se ha visto asociación de las variantes: rs104564, rs112850, rs3213619 y rs203258. Del mismo modo para **ABCB2** se identificaron rs717620, rs3740066 y rs227369.

Por otra parte de la familia CYP450 se identificaron 6 genes: En el caso del gen **CYP2B6** se identificó la presencia de tres variantes asociadas a tratamiento con TAM: rs3745274, rs12721655 y rs28399499. De igual forma para **CYP2C19** se identificaron 11 variantes: rs12248560 (*17), rs3758580 (*2A), rs4244285 (*2C), rs72552267 (*6), rs4986893 (*3), rs56337013 (*5), rs72558186 (*7), rs6413438 (*10), rs41291556 (*8), rs17885098 (*1B) y rs28399504 (*4). Por su parte para **CYP2C9** se identificaron 8 variantes: rs7900194 (*8), rs1799853 (*2), rs1057910 (*3), rs28371686 (*5), rs56165452 (*4), rs28371685 (*11), rs72558187 (*13) y rs7900199 (*27). En el caso de **CYP2D6** se identificaron 22 variantes: rs28371706 (*17), rs1065852 (*4 y *10), rs1135840 (*2A), rs16947 (*2), rs3892097 (*4), rs769258(*35), rs5030862 (*12), rs201377835 (*11), rs5030867 (*7), rs72549349 (*44), hCV32407229 (*9), rs72549351 (*38), rs35742686 (*3), rs72549353 (*19), rs5030655 (*6), rs1080985 (*2), rs59421388 (*29), rs28371725 (*41), rs72549346 (*42), rs147960066 (*56), rs72549354 (*20), rs5030865 (*8 y *14), adicionalmente en este gen las CNV de los alelos funcionales confieren un metabolismo ultrarrápido y es fundamental su identificación para poder establecer capacidad metabólica en los pacientes. Finalmente de la subfamilia CYP3 se identificó que en **CYP3A4** se han asociado cuatro variantes: rs2740574 (*1B), rs2242480 (*1H), rs4646437 y rs35599367 (*22), así como para **CYP3A5** se sabe de tres variantes: rs776746 (*3), rs10264272 (*6), rs41303343 (*7).

Por último de la familia de la glucoroniltransferasas se identificó en **UGT1A1** tres variantes: rs4148323, rs4124874 y rs887829, del mismo modo en **UGT2B15**, rs1902023.

Discusión

TAM al ser un profármaco, involucra en su metabolismo diversas enzimas, luego de la revisión de la literatura, se identificaron los genes ABCB1, ABCB2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, UGT1A1 y UGT2B15, particularmente las variantes genéticas para cada gen, indicadas previamente, donde en estudios previos se ha

establecido su asociación con respuesta a tratamiento con TAM en mujeres con cáncer de seno de poblaciones diferentes a la colombiana.

Al contrastar la información reportada en la literatura se ven algunos datos contradictorios: encontrando casos que muestran clara asociación, en donde se establece que CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5 y UGT1A1 tienen gran importancia para la biotransformación, particularmente al estar asociados con la activación de TAM y conducir la generación del metabolito activo, endoxifeno (87, 128), otros casos donde no es concluyente o no ha sido posible establecer asociación de las variantes genéticas con respuesta a tamoxifeno (129, 130), dejando entre ver la importancia de la calidad de la genotipificación, la cobertura de la técnica molecular para la identificación de variantes genéticas, los criterios para la recolección de muestras, la fuente de ADN, así como, la necesidad de realizar estudios que evalúen poblaciones en particular (81, 128, 131) de forma que conocer las variantes genéticas presentes en pacientes colombianas tratadas con tamoxifeno permitirá hacer una presunción del posible comportamiento de la población a la que representan (122).

Adicionalmente, es sabido que a nivel nacional se ofrece a la venta pruebas genéticas que incluyen secuenciación de genoma completo, donde la mayor limitante para su aplicación en tamizaje de la población local, está asociada a costos y capacidad de análisis, pues si bien los costos de secuenciación han disminuido, aún representan cifras que el sistema de salud no puede costear para toda la población. Igualmente la capacidad de análisis aún es restringida, pues se requiere validación de la presencia de las variantes genéticas en la población nacional y capacidad de cómputo que permita emitir análisis certeros. Así mismo, se ofrecen paneles farmacogenómicos que incluyen algunas de las variantes más frecuentes de las poblaciones sobre las cuales fueron generados, de forma que cabe la posibilidad que dichos paneles no estén incluyendo variantes genéticas que se puedan estar presentando en la población local y que al estar en frecuencias bajas o ausentes en otras poblaciones no son contemplados para el diseño de dichos paneles, con el agravante que los costos continúan siendo elevados para ser cubiertos por el sistema de salud. Finalmente cabe mencionar que la prueba molecular que se hace de rutina a nivel mundial, Amplichip450, no se encuentra disponible a nivel local, pues Roche casa comercial que lo distribuye, no lo ofrece al país.

Por otra parte, al tener en cuenta que estas enzimas, son comunes al metabolismo de diversos xenobióticos ampliamente descritos en la literatura (132, 133), se puede pensar en generar metodologías de tipificación que incluyan las variantes más representativas para población local que permitan procesar muestras de manera rápida y a bajo costo, generando oportunidad de acceso amplio, donde se pueda evaluar estado metabolizador de la

población y su posible beneficio terapéutico al ser tratada con un determinado compuesto metabolizado por estas enzimas.

Capítulo 3. Objetivo2: Determinar si los SNPs reportados en la literatura, están asociados a respuesta a tratamiento con tamoxifeno en pacientes colombianas con cáncer de seno.

Este objetivo tuvo como fin evaluar las variantes genéticas asociadas al metabolismo de tamoxifeno, identificadas por literatura en el objetivo 1 y validar su presencia en individuos con cáncer de seno ductal infiltrante de una muestra de población que asiste al HUSI, correlación con estado metabolizador, respuesta y efectos secundarios.

Metodología:

TIPO DE ESTUDIO: Estudio de correlación de corte transversal (134).

Muestra

El marco muestral consistió en un censo de las pacientes con carcinoma ductal infiltrante que asistieron a consulta Hospital Universitario San Ignacio (HUSI) durante enero del 2014 hasta julio del 2015 y que manifestaron interés en participar.

Población de Estudio

Para el desarrollo de este estudio se contó con el apoyo de la unidad de oncología y cirugía de seno, tejidos blandos y melanoma del HUSI. Para el acceso a las pacientes se contó con la aprobación del Comité de ética de la facultad de ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (10 JUNIO 2014) y el Comité de ética del HUSI (FM-CIE-7038-13).

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Para efectos de la selección de la población se tuvo en cuenta:

Mujeres mayores de 18 años diagnosticadas con **carcinoma ductal infiltrante** teniendo en cuenta que a este grupo pertenecen el mayor número de pacientes diagnosticadas y atendidas en el HUSI (135) adicionalmente en este grado histológico se presentan los mayores efectos adversos asociados al consumo de tamoxifeno (136, 137), para ello, las pacientes debían contar

con reporte de receptores estrógenos y receptores progestágenos positivos y HER2 negativos, considerando que las pacientes con RE positivos son las candidatas a consumir tamoxifeno.

El tratamiento hormonal adyuvante con tamoxifeno debía estar indicado y lo debían haber consumido por al menos 4 meses previos a la toma de la muestra sanguínea.

No haber recibido quimioterapia neo adyuvante.

Haber respondido la entrevista clínica y consejería genética para recolectar la información personal e historia familiar, que fue registrada en un cuestionario (Anexo 2), la información fue almacenada y codificada en una base de datos en Access diseñada para este estudio.

Finalmente debían manifestar su interés en participar en el estudio y firmar el consentimiento informado.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Fueron excluidas aquellas pacientes con RE negativos, mujeres con contraindicación para recibir tamoxifeno (antecedentes de enfermedad tromboembólica, hiperplasia endometrial o síntomas ginecológicos anormales como metrorragia) así como hipersensibilidad conocida a tamoxifeno, por otra parte, también fueron excluidas las pacientes con diagnóstico diferente a carcinoma ductal infiltrante, por representar minoría en el número de pacientes que son atendidas en el HUSI y porque a ellas no se les prescribe tamoxifeno como tratamiento de primera elección.

No fueron incluidas pacientes con algún grado de consanguinidad con pacientes que ya hicieran parte del estudio.

Selección de pacientes

Se incluyeron 30 pacientes que acudieron al servicio de Oncología del HUSI, que cumplieron con los criterios de inclusión y que manifestaron mediante firma del consentimiento informado (Anexo 2) su interés en participar en el estudio, el reclutamiento se realizó durante 18 meses (enero de 2014 a julio de 2015). Se realizó punción en vena periférica para la obtención de una muestra de 4 mL de sangre total, se asignó una codificación a cada una de las pacientes para respetar la confidencialidad de la muestra, los datos obtenidos, así como en la base de datos y durante todo el estudio.

Adicionalmente, se recolectaron muestras de 21 mujeres sin diagnóstico de cáncer de seno, teniendo en cuenta que presentaran características similares en: edad de menarquia con las pacientes, de igual modo se buscó que guardaran similitud en el índice de masa corporal (IMC) y sin antecedentes de cáncer de seno en la familia. Las mujeres incluidas en este grupo

correspondieron a personal administrativo de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. El número de mujeres sanas se vio limitado por la disponibilidad de recursos para procesar las muestras.

Almacenamiento y conservación de las muestras

Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos con EDTA y centrifugadas a 4500rpm por 3 min para realizar la separación, para obtener plasma y la capa leucocitaria, para el plasma de cada paciente se utilizó una punta y micropipeta de 1000µL, el cual fue rotulado con el respectivo código asignado y conservado a -80°C hasta su uso final, en crioviales de 2ml. Por otra parte, la capa leucocitaria se separó en eppendorf y se procesó para hacer la extracción de ADN, mediante kit “UltraClean® Blood DNA Isolation Kit (Non-Spin)” de MoBio, protocolo al que se le realizaron modificaciones, (Anexo 3). Una vez se obtuvo el ADN se realizó la cuantificación de ácidos nucleicos mediante medición en NanoDrop2000c y se ajustó a una concentración de 100ng/µl, la relación A260/A280 fue de 1.8 garantizando su calidad. Se realizaron geles de agarosa con fago lamda y se comprobó integridad. Posteriormente las muestras de ADN también se conservaron a -80°C hasta su uso.

Se identificó que el *Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS) Genomic Medicine Group / Pharmacogenetics Research de la University of Santiago de Compostela*, realiza la evaluación de las variantes genéticas de interés para nuestro estudio, identificadas en el objetivo 1, contenidas en el “panel de farmacogenética general mediante QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System”, que consiste en la tecnología OpenArray™ basada en PCR en tiempo real para análisis de expresión génica de alto rendimiento y genotipado, que evalúa 34 genes asociados a ADME (Administración, Distribución, Metabolismo y Excreción) de medicamentos, incluidos los de la familia CYP 450, que incluye 122 variantes genéticas (ANEXO 4).

Se realizó el envío de las muestras para el procesamiento, para lo cual se prepararon a un volumen 50µl con una concentración de 100ng/µl, en placas de PCR de 96 pozos. Las muestras fueron liofilizadas mediante el equipo FreeZone 2,5 (Labconco) del laboratorio de microbiología del IBUN, siguiendo el protocolo del fabricante. Al procesar las muestras los datos fueron trazados en un gráfico de discriminación alélica con señal de fluorescencia FAM en el eje Y y señal de fluorescencia VIC en el eje X. Las herramientas de software permiten convertir los datos en genotipo (por ejemplo, homocigotos y heterocigotos) donde algunas variantes alélicas comparten sonda para su identificación y debe ser confirmada mediante una segunda sonda que discrimine cada alelo de forma independiente. Por ejemplo el alelo CYP2D6*4, es identificado por la sonda C__11484460_40 que es común también a la variante CYP2D6*10 y para la correcta discriminación, se emplea la sonda C__27102431_D0 que identifica exclusivamente a

CYP2D6*4, en el ANEXO 5 se muestran en detalle los resultados de las sondas para la asignación del genotipo para CYP2D6, de este estudio.

Por otra parte, se contó con el apoyo del doctor Dennis D. Heath del Cancer Center, University of California, San Diego, Health Sciences Cancer Prevention and Control Program, Moores UCSD para el procesamiento de las muestras de plasma y se realizó la identificación de metabolitos intermediarios de tamoxifeno de las pacientes mediante HPLC, descrito previamente en la publicación de Heath y colaboradores en 2014 (138).

En los cuestionarios, se recolectó la información de reporte histopatológica del tumor, de las pacientes y de antecedentes clínicos y datos generales, de todas las mujeres participantes (Anexo 2).

Análisis estadístico

Se determinaron los perfiles alélicos de las muestras y se procedió a identificar las frecuencias para cada una de las variantes de cada gen. Se establecieron estados metabolizadores para cada gen, siendo un metabolizador pobre (MP) codificado con el número 0, metabolizador intermedio (MI) con el número 1, metabolizador extensivo (ME) con el número 2 y finalmente metabolizador Ultra-rápido (MU) con el número 3. Posterior a la asignación de genotipo y fenotipos, se identificaron las frecuencias alélicas para cada variante y se calculó su equilibrio de Hardy Weinberg.

Simultáneamente, se estratificaron: en pacientes con respuesta a tamoxifeno codificadas con 1, para aquellas que presentaron concentraciones de endoxifeno superiores a 1 ng/mL, en caso de presentar concentraciones menores, se catalogaron, como pacientes sin respuesta y codificadas con el valor de cero (41); por otra parte, de acuerdo a la información suministrada por las pacientes se dividieron en dos grupos: las que presentaron efectos secundarios (bochornos, engrosamiento de endometrio, eventos tromboembólicos o cataratas) codificadas con uno y las que no refirieron ningún signo, ni síntoma particular, asignándoles cero para los análisis posteriores.

Se evaluó efecto de multicolinealidad entre los genes, para demostrar que no existe correlación entre los fenotipos de los genes incluidos, con el índice de factor de inflación de varianza, el cual no mostró que los fenotipos de los genes presentaban correlación entre ellos, con esto se llevaron las variables a un modelo único para análisis de regresión logística condicional para las variables codificadas con 0-1 y regresión logística acumulativa para las variables con tres estratos (grado histológico). Para identificar la asociación con efectos secundarios y respuesta a tratamiento, se consideraron significativos valores $p < 0,05$, para estos análisis se empleó el programa SAS; 9.4

Resultados:

Dentro de los datos evaluados se evidencio que la edad media de menarquia de los casos fue de 13 años (10-18años) por su parte, en las mujeres sin cáncer de seno fue de 12,7 años (11-14años), de igual forma la media del IMC de los casos fue de 26,33 (16,22-38,13) comparado con 24,84 (18,36-40) en las mujeres sin cáncer. Adicionalmente, 17 de las pacientes y 20 mujeres sin cáncer, fueron procedentes y residentes de Bogotá, con edad media de 60,9 y 50,9 años respectivamente, la diferencia de edad está acorde a lo que se esperaba, teniendo en cuenta que las mujeres del grupo control hacen parte del personal administrativo de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá y se encuentran en edad laboral productiva activa. Adicionalmente al indagar en los medicamentos consumidos por las pacientes no se identificó que consumieran inhibidores del CYP2D6, aunque se identificó que 14 de las pacientes consumieron otros medicamentos simultáneamente con tamoxifeno, donde cabe mencionar que los medicamentos que se consumieron con mayor frecuencia fueron: levotiroxina en 6 de las pacientes así como omeprazol, metoprolol y losartan en 4 de las pacientes. Por otra parte, se identificó que la mayoría de las mujeres evaluadas presentaron estado posmenopáusico y la afiliación al sistema de salud de todas las pacientes fue al régimen contributivo, encontrando que particularmente 4 de las pacientes contaban con servicio de salud en modalidad prepagada, finalmente, los casos mostraron, para los grados histológicos I y II trece pacientes para cada categoría y para el grado III, cuatro pacientes, las principales características de la población evaluada se describen en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1. Descripción de la población. Se indican las principales características de casos y controles, evaluadas.

Características	Pacientes	Mujeres sin cáncer
n	30	21
Edad Menarquía (rango)	13 (10-18)	12,7 (11-14)
IMC (kg/m ²)	26,33 (16,22-38,13)	24,84 (18,36-40)
Edad media	60,9 (42-81)	50,9 (38-64)
Estado menopáusico		
Premenopáusicas	2	8
Menopáusicas	28	13
Procedencia:		
Bogotá	17	20
Fuera de Bogotá	13	1
Consumo de medicamentos concomitantemente a tamoxifeno		
0=16		
1=14		
Tamaño de tumor		
<2cm	22	
> 2 cm > 5cm	8	
Número de ganglios		
0	26	
1	4	
Grado Histológico		

I	13
II	13
III	4

n: número de mujeres. IMC índice de masa corporal. Número de ganglios: 0: cero ganglios, 1: entre 1-4 ganglios . consumo de medicamentos concomitantemente con tamoxifeno donde cero representa que la paciente no consumía ningún otro medicamento y uno que si consumía otros medicamentos.

Posterior a la asignación de genotipo y fenotipos, se identificaron las frecuencias alélicas para cada variante y se calculó el equilibrio de Hardy Weinberg, encontrando que las variantes de los genes están en equilibrio.

Se realizó la asignación alelos a cada estado metabolizador para los genes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A5 (61, 67, 139-142), teniendo en cuenta que estos 4 genes fueron los que mostraron mayor correlación.

En consecuencia, para este estudio se estableció como estado metabolizador que: en presencia de más de 2 alelos funcionales se denominaría metabolizador ultrarrápido (MU), codificándolo con el número 3, para el caso de 2 alelos con función normal (ejemplo *1/*1), se clasificó como metabolizador extensivo o normal (ME), y se le asignó el número 2. En el caso de presentar la combinación de 1 alelo con función normal en presencia de uno con actividad disminuida o uno no funcional se denominó metabolizador intermedio (MI) y se le asignó el número 1. Finalmente en el caso de presentar un alelo con actividad disminuida y un alelo no funcional o 2 alelos no funcionales fue definido como metabolizador pobre (MP) y codificado con cero ANEXO 5.

Para cada gen, la asignación de genotipo se realizó como se indica en la Tabla 3-2., la primera columna indica el estado metabolizador: siendo metabolizador pobre (MP) codificado con el número 0, metabolizador intermedio (MI) con el número 1, metabolizador extensivo (ME) con el número 2 y finalmente metabolizador Ultra-rápido (MU) con el número 3. Adicionalmente las columnas corresponden a los alelos de los genes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A5 y muestran para cada uno de los estados metabolizadores las variantes genéticas que se encontraron en este estudio.

Tabla 3-2. Asignación de fenotipo metabolizador de acuerdo a las variantes alélicas encontradas en este estudio para cada gen.

Fenotipo	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A5
MP (0)	NI	*2	*3 y *4	*3 y *7
MI (1)	*2 y *3	NI	*9, *17, *29 y *41	NI
ME (2)	*1	*1B	*1, *2A y *35A	*1
MU (3)	NI	*17	*2A *2AXN	NI

Se describen las variantes alélicas identificadas para los genes CYP2D9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A5, indicando el fenotipo que confieren siendo MP (0 Metabolismo pobre), MI (1 Metabolismo intermedio), ME (2 Metabolismo extensivo o normal) y MU (3 Metabolizador ultrarrápido). N: hace referencia a duplicaciones alélicas lo que implica que están presentes más de dos alelos. NI: No identificados.

Por otra parte, el resumen que incluye la descripción de los genotipos encontrados para los genes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A5A en la población de pacientes y mujeres sin cáncer evaluadas se enuncia en la Tabla 3-3., donde la primera columna contiene los genes evaluados, en la segunda columna se muestra el genotipo (indicando las variantes alélicas identificadas) y el número de pacientes que presento cada genotipo y finalmente, en la columna tres se muestra los genotipos identificados y el número de mujeres sin cáncer que lo presentaron. Para las variantes no identificadas se las asigno NI y para las muestras que no amplificaron se les asigno NA.

Se evidenció que los genotipos más frecuentes para CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A5 son *1/*1, *1B/*1B, *1/*2A y *3/*3 respectivamente, es importante resaltar que el gen CYP2D6 fue el que mostro mayor variabilidad en los genotipos identificados, con un total de 15 combinaciones de genotipos diferentes.

Tabla 3-3. Genotipos para los genes evaluados en casos y controles.

Gen	Genotipo/ n Pacientes	Genotipo/ n mujeres sin cáncer
CYP2C9	*1/*1=20 *1/*2=8 *1/*3 =1 NA=1	*1/*1=16 *1/*2=1 *1/*3=3 *2/*3=1
CYP2C19	*1B/*1B =17 *1B/*2A=4 *1B/*17=4 *1/*1B = 2 *1/*1=1 *2A/*17=1 NA=1	*1B/*1B =11 *1B/*2A=3 *1B/17=3 *1/*1B =4
CYP2D6	*1/*4=4 *2A/*2A=4 *1/*1 =4 *2A/*17=1 *1/*35A =1 *2A/*4 = 1 *1/*2A=5 *4/*9=1 *1/*9=2 *1/*3 =2 *2A/*35A=1 *2A/*2AXN=1 *4/*41=1 NI=1 NA=1	*1/*4=3 *2A/*2A=1 *1/*1=2 *2A/*17=1 *1/*35A=2 *2A/*4=3 *1/*2A=8 *1/*29=1
CYP3A5	*3/*3=19	*3/*3=14

*1/*3=7	*1/*3=6
*1/*1 =3	*3/*7=1
NA=1	

Se indica el genotipo seguido del número de mujeres que lo presentaron. NA: No Amplificó, NI: No Identificado. N: hace referencia a duplicaciones alélicas lo que implica que están presentes más de dos alelos.

De igual forma para la población evaluada los fenotipos hallados son los que se indican en la Tabla 3-4., donde se subdividió cada uno de los estadios metabolizadores (EM): para cada uno de los genes: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A5 como se indica a continuación: codificados con los números del 0 al 3 ,donde cada número representa como sigue: 0 representa a metabolizador pobre (MP), 1:metabolizador intermedio (MI), 2: metabolizador extensivo (ME) y 3 metabolizador ultra rápido(MU), finalmente los datos que no se identificaron se rotularon respectivamente como No Amplifico: (NA) y No Identificado (NI), seguido del número de individuos que presento cada estado metabolizador, para pacientes y mujeres sin cáncer evaluadas.

Se estableció que para los genes CYP2C9 y CYP2C19 los estadios metabolizadores identificados fueron MP y MI, en el caso del gen CYP2D6 en las pacientes se identificaron los estados metabolizadores MP, MI, ME y MU mientras que para las mujeres sin cáncer evaluadas, solo se identificó MI y ME, finalmente para el CYP3A5 en las pacientes se identificó el fenotipo MP, MI y ME en contraste, en las mujeres sin cáncer evaluadas, solo se identificaron MP y MI.

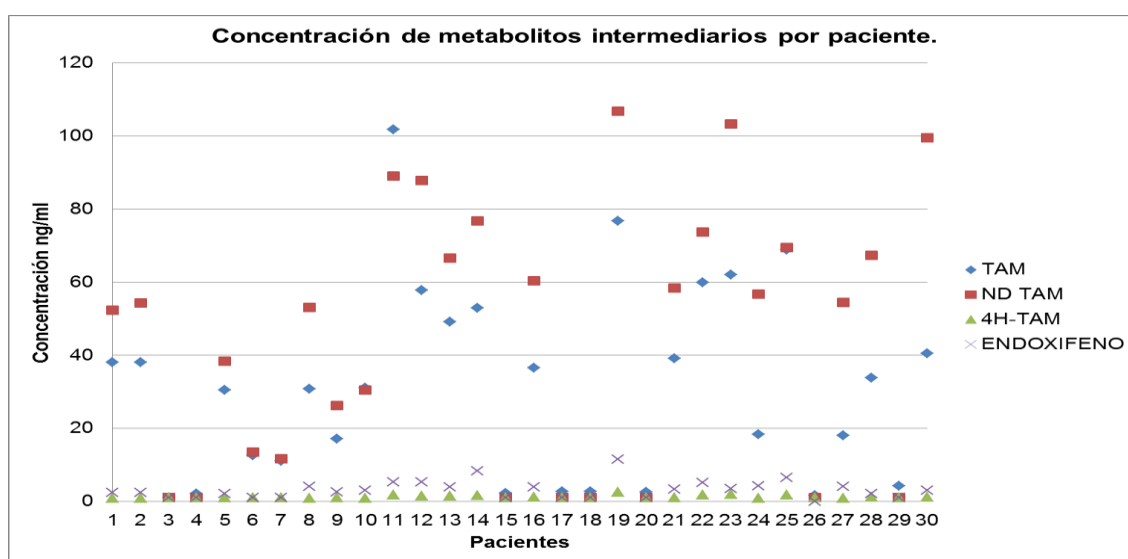
Tabla 3-4. Estado metabolizador identificados para cada gen en las pacientes y mujeres sin cáncer evaluadas.

Gen/Fenotipos	EM (n Pacientes)	EM (n controles)
CYP2C9	1 (9) 2 (20) NA (1)	1 (5) 2 (16)
CYP2C19	1 (4) 2 (25) NA (1)	1 (3) 2 (18)
CYP2D6	0 (2) 1 (10) 2 (15) 3 (1) NI (1) NA (1)	1 (8) 2 (13)
CYP3A5	0 (19) 1 (7) 2 (3) NA (1)	0 (15) 1 (6)

Se indican los EM (Estados metabolizadores) donde 0 representa pobre metabolizador, 1 metabolizador intermedio, 2 metabolizador normal, 3 metabolizador ultrarrápido, NI: No identificado, NA: No amplifico, seguidos cada uno del número de pacientes y mujeres control que lo presentaron.

En la cuantificación de metabolitos intermediarios en plasma, se evaluaron puntualmente: Tamoxifeno (TAM), N-desmetiltamoxifeno (ND TAM), Z-4-hidroxi-tamoxifeno (4H-TAM) y Endoxifeno (138). Para este procesamiento se contó con el apoyo del Doctor Dennis D. Heath del Cancer Center, University of California, San Diego, Health Sciences Cancer Prevention and Control Program, Moores UCSD mediante la utilización de la técnica de Cromatografía líquida de alta resolución (High-performance liquid chromatography-HPLC), encontrando las concentraciones de los metabolitos intermediarios reportados en ng/ml (eje Y) que se indican para cada paciente (eje X) en la Figura 3-1.

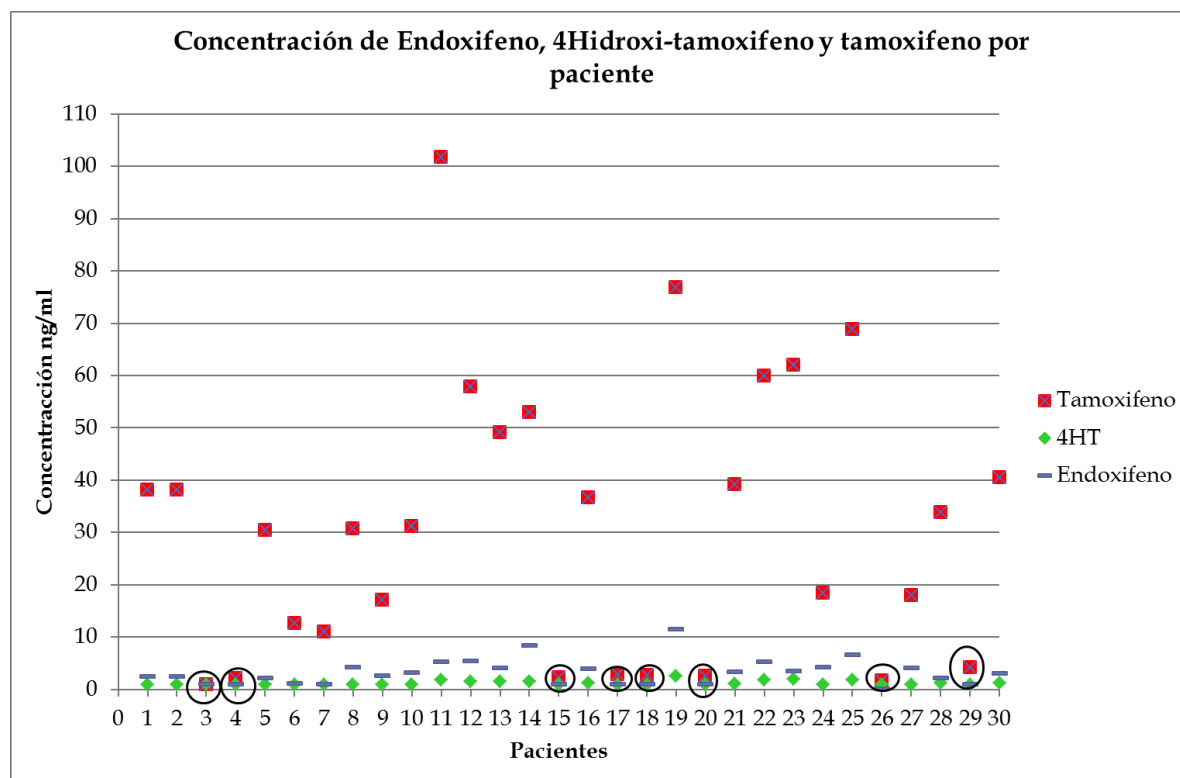
Figura 3-1. Concentración en ng/ml de los 4 metabolitos intermedios evaluados



En el eje Y se muestra la concentración en ng/ml de los metabolitos: TAM (Tamoxifeno), ND TAM (N desmetil tamoxifeno), 4H-TAM (4 hidroxi tamoxifeno) y endoxifeno versus pacientes en el eje X.

Teniendo en cuenta que los dos metabolitos intermediarios más activos son 4H-TAM y endoxifeno, se tomaron estos dos datos para realizar la Figura 3-2. Contrastándolos con las concentraciones de TAM, para identificar que pacientes realmente se habían tomado el medicamento, teniendo en cuenta que por literatura, se espera que en paciente con adherencia al tratamiento las concentraciones mínimas de tamoxifeno deben ser de 10 ng/ml, en las pacientes evaluadas se identificaron 8 que presentaran cifras inferiores, las cuales se resaltan en círculos negros (paciente 3, 4, 15, 17, 18, 20, 26 y 29). Estas pacientes se excluyeron de los análisis de asociación de fenotipo y concentración de endoxifeno.

Figura 3-2. Concentración de endoxifeno ,4 hidroxi-tamoxifeno (4HT-TAM) y TAM en las 30 pacientes.



En el eje Y concentración en ng/ml de Tamoxifeno, 4HT (4 Hidroxitamoxifeno) y endoxifeno, en el eje X los pacientes, encerrados en círculos negros las pacientes con concentración de tamoxifeno inferior a 10ng/ml.

Al identificar que las mayores concentraciones de metabolito activo están representadas por endoxifeno se procedió a identificar que niveles presentaban las pacientes de acuerdo a su estado metabolizador para los genes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A5, los datos de los fenotipos identificados en las pacientes y las concentraciones de metabolitos intermediarios se muestran en la Tabla 3-5, donde como se mencionó previamente, se excluyeron las 8 pacientes que presentaron concentraciones de tamoxifeno inferiores a 10ng/ml.

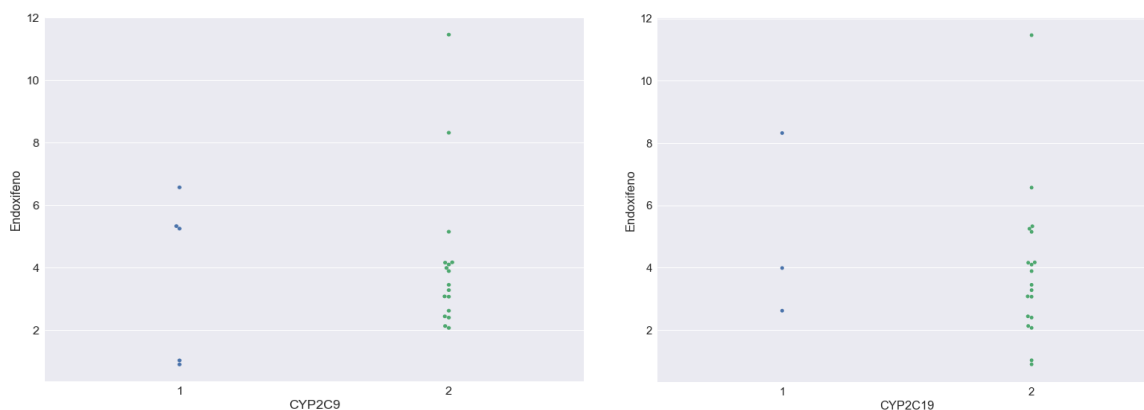
Tabla 3-5. Tabla resumen de los fenotipos para los genes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A5, concentraciones de metabolitos intermediarios tamoxifeno, ND tamoxifeno (N-des metil tamoxifeno), 4HT (4 hidroxitamoxifeno) y endoxifeno.

Paciente	EFECTOS SECUNDARIOS	RESPUESTA	ESTADO METABOLIZADOR CYP2C19	ESTADO METABOLIZADOR CYP2C9	ESTADO METABOLIZADOR CYP2D6	ESTADO METABOLIZADOR CYP3A5	Tamoxifeno	ND tamoxifeno	4HT	Endoxifeno
P01	0	1	2	2	2	0	38.09	52.4	0.88	2.4
P02	1	1	2	2	2	0	38.12	54.35	0.91	2.44
P03	1	0	2	2	1	2	0.9	0.9	0.9	0.9
P04	1	0	2	2	3	0	2.07	0.9	0.9	0.9
P05	0	1	2	2	1	1	30.45	38.41	0.9	2.13
P06	0	1	2	1	1	0	12.64	13.44	0.9	1.03
P07	0	1	2	1	1	0	11.05	11.65	0.9	0.9
P08	1	1	2	2	2	0	30.78	53.04	0.92	4.16
P09	0	1	1	2	2	1	17.15	26.21	0.9	2.62
P10	0	1	2	2	2	0	31.15	30.55	0.88	3.08
P11	0	1	2	1	2	0	101.75	89.09	1.83	5.25
P12	0	1	2	1	2	0	57.88	87.91	1.5	5.33
P13	0	1	1	2	NI	0	49.16	66.64	1.53	3.99
P14	0	1	1	2	2	0	52.92	76.72	1.59	8.32
P15	1	1	2	2	2	2	2.2	0.9	0.9	0.9
P16	1	1	2	2	2	1	36.63	60.45	1.16	3.89
P17	1	0	2	1	1	0	2.78	0.9	0.9	0.9
P18	1	0	2	1	1	0	2.69	0.9	0.9	0.9
P19	1	1	2	2	2	0	76.78	106.86	2.53	11.46
P20	1	0	1	1	2	1	2.54	0.9	0.9	0.9
P21	0	1	2	2	2	2	39.11	58.36	1.12	3.28
P22	0	1	2	2	2	0	59.87	73.73	1.74	5.15
P23	0	1	2	2	1	0	62.03	103.29	1.96	3.45
P24	0	1	2	2	1	0	18.4	56.71	0.89	4.17
P25	1	1	2	1	2	0	68.86	69.46	1.74	6.57
P26	1	0	2	1	1	1	1.6	0.9	0.9	0
P27	0	1	2	2	1	1	18.04	54.45	0.93	4.1
P28	0	1	2	2	0	0	33.76	67.37	1.15	2.07
P29	1	0	NI	NI	NI	NI	4.17	0.9	0.9	0.9
P30	0	1	2	2	0	1	40.48	99.53	1.25	3.07

Paciente: número consecutivo precedido de P: seguido de la columna de efectos secundarios donde 0 representa ausencia y 1 presencia de efectos secundarios, la columna de respuesta, muestra que pacientes continúan tomando el medicamento y presentan concentraciones por encima de 1ug/ml de endoxifeno codificadas con 1 y las pacientes sin respuesta se codificaron con 0. Para los estados metabolizadores de CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 y CYP3A5 se codifico con 3 (metabolizador ultrarrápido), 2 (metabolizador extensivo), 1 (metabolizador intermedio), 0 (metabolizador pobre), NI: No identificado. Concentraciones de tamoxifeno, ND tamoxifeno (n-desmetil tamoxifeno), 4HT (4 Hidroxitamoxifeno) y endoxifeno en ng/ml, finalmente se resaltó en azul las pacientes excluidas de los análisis por concentraciones de endoxifeno inferiores a 10ng/ml.

En la Figura 3-3, se presentan los diagramas donde se indican las concentraciones de endoxifeno para cada grupo metabolizador, se estadifica las pacientes en los estadios: metabolizadora extensiva (ME=2), metabolizadoras intermedias (MI=1) y metabolizadoras pobres (MP=0), realizado en r project.

Figura 3-3. Concentración de endoxifeno para los fenotipos de CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A5.



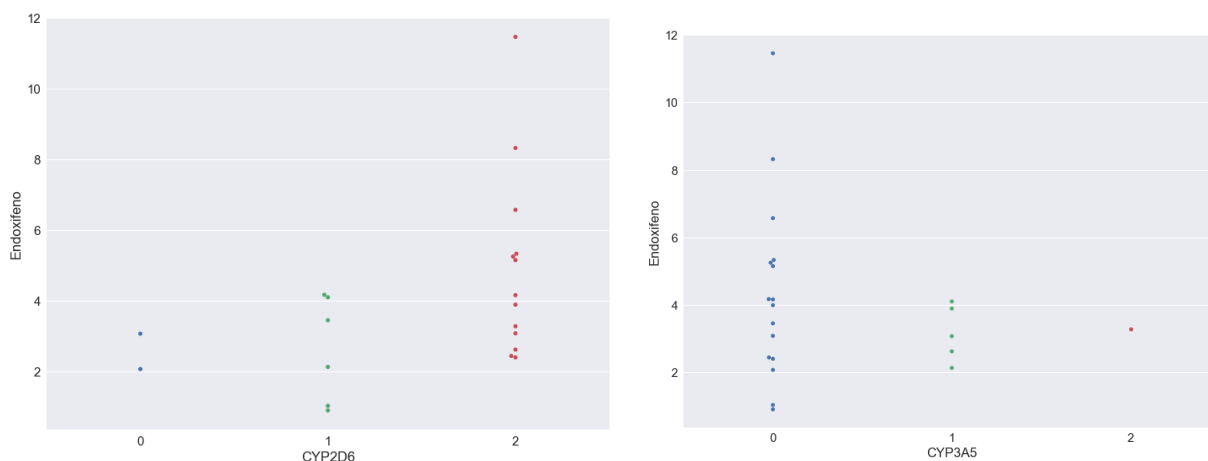


Figura 3.3 (cont) Diagramas que muestran la concentración de endoxifeno (ug/ml) en el eje Y, para cada grupo metabolizador en los fenotipos en el eje X de CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A5. Siendo 2=Metabolizador extensivo, 1=Metabolizador intermedio y 0= Metabolizador pobre.

Se evidencio que la clasificación por estado metabolizador para CYP2C9 y CYP2C19 no muestra una tendencia que permita establecer asociación entre los genotipos identificados y las concentraciones de endoxifeno, en contraste, el gen CYP2D6 mostró estratificación que permite evidenciar categorías bien definidas, donde para pacientes metabolizadoras pobres (0) muestran concentraciones inferiores de endoxifeno (2 pacientes), para metabolizadoras intermedias (1) seis pacientes, metabolizadoras extensivas (2) con las concentraciones más altas de endoxifeno donde se identificaron 13 pacientes, (una paciente no fue asignada a ningún estado metabolizador al no ser posible su genotipificación) por otra parte los fenotipos del gen CYP3A5 muestran una correlación inversa pues las pacientes pobres metabolizadoras para este gen muestran concentraciones de endoxifeno mayores, para el desarrollo de este trabajo se tomaran los datos de fenotipo del gen CYP2D6.

Los resultados de las variantes alélicas en CYP2D6 presentes en las mujeres evaluadas, se describen para cada SNP y se muestran en Anexo 6. Al contrastar otros estudios donde se han evaluado pacientes tratadas con tamoxifeno y concentraciones de endoxifeno se evidencia similitud en la concentración de dicho metabolito y el genotipo de las pacientes con estado metabolizador pobre y extensivo, en la Tabla 3-6., se muestran datos de estudios en diversas poblaciones y se comparan con los de este estudio, donde es importante identificar bajo que genotipos fue realizada la clasificación de fenotipos para establecer las similitudes de las poblaciones contrastadas. Encontrando por ejemplo que en población de Brasil se consideró el genotipo *4/*41 como metabolizadoras intermedias (143) y para este estudio fueron consideradas pobres metabolizadoras, en consecuencia las concentraciones de endoxifeno también evidenciaron diferencias, que podrían indicar que el genotipo puede estar incidiendo sobre la concentración de endoxifeno.

Tabla 3.6. Comparación de concentración de endoxifeno en diversos estudios.

POBLACIÓN	n	Genotipo MP (n) (Endoxifeno)	Genotipo MI (n) (Endoxifeno)	Genotipo ME (n) (Endoxifeno)	Genotipo MU (n) (Endoxifeno)	REF.
Brasil	97	*4/*4 (2) *4/*4 xN(2) (2.25 ng/ml)	*4*17(1) *4/*41(1) *5/*41(2) (4.43 ng/ml)	*1/*4(12), *1/*5(6), *2/*4(7), *2/*4 xN(2) *1/*3(1), *4/*35(1), *5/*35(1), *2/*3(2), *3/*35(1), *1/*6(1), *9/*9(1), *17/*29(1), *2/*41(2), *1/*41(2), *1/*9(1), *1/*10(2), *9/*35(1), *2/*9(1) *1/*41(1), *1/*1(14), *2/*35(3) (6.53 ng/ml)	*1/*2, xN (3) (7.52 ng/ml)	(143)
Países Bajos CYP TAM study	12MP y 12MI	*3/*4 (2) *4/*4 (7) *4/*5 (2) *5/*6 (1) (2.5 ng/ml)	*1/*4 (2) *2/*4 (6) *2/*5 (2) *4/*41 (2) (5.59 ng/ml)			(102)
Polonia	279	MP/MP *4/*4 (15) *3/*4(2) *4/*5 (2) *4/*6 (1) (1.8 ng/ml) MI/MP *4/*41 (6) *4/*10 (3) *4/*17(1) *5/*41 (1) (2.3 ng/ml)	MI/MI *41/*41(1) *10/*10(1) *10/*41(1) ME/MI *1/*41(24) *2/*41(10) *1/*10(7) *2/*10(2)	ME/ME *1/*2(44) *1/*1(33) *2/*2(10) (7.3 ng/ml) ME/MP *1/*4(51) *2/*4(30) *1/*5(6) *1/*3(4) *2/*5(3) *1/*6(1) *2/*3(1) *2/*6(1) (4.9 ng/ml)	*1/*2 (xN) (10) *1/*1 (xN) (5) *2/*2 (xN) (3)	(144)
Colombia	28	*4/*9(1) *4/*41(1) (2.57 ng/ml)	*1/*9(2) *2A/*17(1) *1/*3(2) *1/*4(4) (1.94 ng/ml)	*1/*1(4) *1/*2A(6) *2A/*2A(4) *1/*35A(1) *2A/*35A(1) (4.16 ng/ml)	*2A/*2Ax N(1) (0.9 ng/ml)	Este estudio

Tabla 3-6. Comparación de concentración de endoxifeno en diversos estudios. En cada una de las columnas se muestra el estado metabolizador (MP, MI, ME y MU) se indica el genotipo, seguido del número de individuos que lo presentaron en paréntesis, adicionalmente al final se indica en negrita la media de la concentración de endoxifeno. xN: hace referencia a duplicaciones alélicas, lo que implica que están presentes más de dos alelos.

Queda en evidencia que los fenotipos MP y ME establecidos para este estudio presentan concentraciones de endoxifeno similares a las reportadas previamente en otros estudios (102, 106, 145, 146). En contraste los datos para las MI y MU muestran desviación de la media hacia valores más bajos de lo que podría esperarse, aquí debe tenerse presente la limitación de los datos, a causa de la variable, adherencia al medicamento que puede incidir en las concentraciones plasmáticas de endoxifeno, adicionalmente debe tenerse presente el posible consumo concomitante de otros medicamentos con metabolismo por CYP2D6, basado en la alta automedicación reportada en pacientes con cáncer de seno (147, 148), por otra parte, la muestra de sangre de las pacientes fue colectada a diferentes horas del día de acuerdo a la hora en que cada participante tenían su cita médica, sumado a esto, es necesario contemplar las particularidades de cada participante, circunstancias que podrían incidir en las concentraciones observadas en la población (103, 149).

Como se mencionó previamente, en la evaluación alélica para CYP2D6 no fue posible la amplificación para realizar la genotipificación de la paciente 29, así como para la paciente 13 no fue posible hacer una asignación de genotipo con las variantes identificadas, para las demás pacientes fue posible realizar la genotipificación, obteniendo las frecuencias para CYP2D6 mostradas en la Tabla 3-7., se indican el número de mujeres y genotipos presente en cada grupo.

Tabla 3-7. Resumen frecuencias alélicas CYP2D6 para pacientes y mujeres sin cáncer evaluadas.

Alelos en CYP2D6	Frecuencia Total	Frecuencia pacientes	Frecuencia Mujeres sin cáncer
*1	40	22	18
*2A	33	19	14
*3	2	2	0
*4	13	7	6
*9	3	3	0
*17	2	1	1
*29	1	0	1
*35A	4	2	2
*41	1	1	0
TOTAL	99	57	42

Se describen las frecuencias alélicas de CYP2D6 encontradas en la población estudiada, en la primera columna se indica la variante genética evaluada, seguida de la columna que indica el número total de alelos pertenecientes a cada variante y las dos últimas columnas representan el número de alelos para pacientes y mujeres sin cáncer evaluadas respectivamente.

Las frecuencias de genotipos para cada grupo metabolizador del gen CYP2D6 en el grupo de pacientes se indican en la Tabla 3-8.

Tabla 3-8. Genotipos presentes en cada grupo metabolizador para las pacientes de este estudio.

MP/MI	n	ME/MI-ME/MP	n	ME	n	MU	n
*4/*9	1	*1/*9	2	*1/*1	4	*2A/*2A x N	1
*4/*41	1	*2A/*17	1	*1/*2A	5		
		*1/*3	2	*2A/*2A	4		
		*1/*4	4	*1/*35A	1		
		*2A/*4	1	*2A/*35A	1		

Se indica para cada estado metabolizador que genotipos fueron incluidos. n el número de pacientes que presento cada genotipo. El primer estado estuvo conformado por alelos que con actividad MP/MI: metabolizadora pobre/metabolizadora intermedia, el segundo estado por ME/MI- ME/MP metabolizadora extensiva y metabolizadora intermedia o por la combinación de alelos un alelo con metabolismo extensivo y uno de metabolismo pobre, tercero ME metabolizador extensivo y cuarto MU, metabolizador ultrarrápido. xN: hace referencia a duplicaciones alélicas lo que implica que están presentes más de dos alelos para el caso particular (*2A/*2A/*2A).

Adicionalmente a la categorización de las pacientes por estado metabolizador, se estratificaron en pacientes: con respuesta a tamoxifeno codificadas con 1, para aquellas que presentaron concentraciones de endoxifeno superiores a 1 ng/mL (145, 146, 150, 151) encontrando para esta categoría 23 pacientes, y en caso de presentar concentraciones menores se catalogaron con cero, como pacientes sin respuesta; encontrando 7 pacientes. Por otra parte de acuerdo a la información suministrada por las pacientes se dividieron en dos grupos: las que presentaron efectos secundarios (bochornos, engrosamiento de endometrio, eventos tromboembólicos, cataratas, etc) para lo cual fueron codificadas con uno, ubicando para esta categoría 13 pacientes y las que no refirieron ningún signo, ni síntoma particular, identificando 17 pacientes y asignándoles cero para los posteriores análisis estadísticos.

Al evaluar en el modelo, las variantes genéticas identificadas en las pacientes (mediante la identificación del estado metabolizador) versus presencia de efectos secundarios, no se encontró correlacionado, los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3-9. Adicionalmente se realizaron estos mismos análisis excluyendo las 8 pacientes que presentaron cifras de tamoxifeno inferiores a 10 ng/mL y tampoco se encontró correlación.

Tabla 3-9. Valores de p para cada uno de los genotipos de los genes evaluados y presencia de efectos secundarios.

Parameter	ODDs	Pr > ChiSq
CYP2D6	4.235	0.0761
CYP2C9	0.222	0.1285
CYP2C19	4.467	0.3300
CYP3A5	2.663	0.1638

Descripción de los valores de ODDs (odds ratio) y valores de p, para los fenotipos de CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 y CYP3A5.

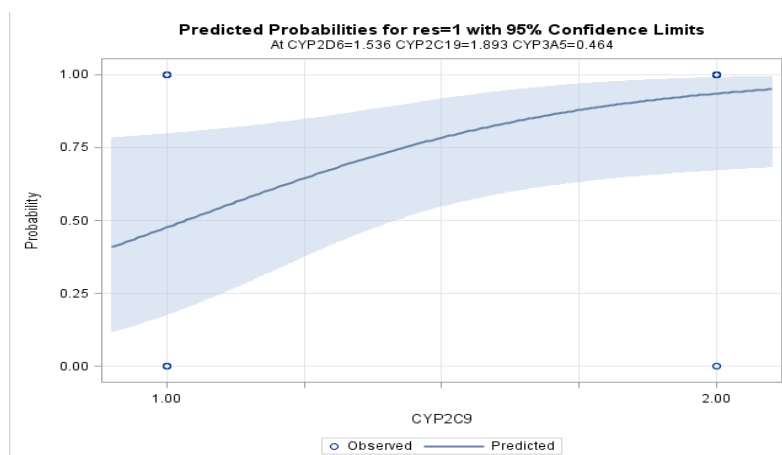
En la segunda clasificación, donde se estratificaron pacientes con respuesta y sin respuesta a tratamiento a TAM incluyendo a las 30 participantes, se encontró que solo el gen CYP2C9 mostro asociación con una p: 0,0417 los datos obtenidos se muestran en la Tabla 3-10. Adicionalmente el Odds de 15.92 evidencia que existe 15 veces mayor probabilidad de tener respuesta al tratamiento en presencia de CYP2C9 con metabolismo extensivo (fenotipo 2) Figura 3-4. Por su parte, al realizar el análisis excluyendo a las 8 pacientes, no mostro asociación estadísticamente significativa con respuesta.

Tabla 3-10. Datos regresión logística para evaluación de fenotipos versus respuesta a tamoxifeno.

Effect	Odds Ratio	Pr > ChiSq
CYP2C9	15.921	0.0417
CYP2D6	0.982	0.9843
CYP2C19	1.601	0.7959
CYP3A5	0.277	0.1422

Descripción de los valores de ODDs (odds ratio) y p, para CYP2C9, CYP2C6, CYP2C19 y CYP3A5

Figura 3-4. Análisis de asociación CYP2C9 versus probabilidad de respuesta a tratamiento con tamoxifeno.



Probabilidad de presentar res (respuesta) en presencia de genotipo: 1 (MI metabolizador intermedio), 2 (ME metabolizador extensivo) para CYP2C9.

Finalmente al comparar estudios previos realizados en población colombiana se identificaron frecuencias de las variantes en CYP2D6, las cuales se muestran en la Tabla 3-10., evidenciando que es la primera vez que se reportan en CYP2D6 las variantes *9 y *29, las cuales han sido asociadas a metabolismos reducido.

Tabla 3-11. Descripción de frecuencias alélicas para el gen CYP2D6 en población Colombiana

POBLACIÓN-UBICACIÓN	n	ALELOS FUNCIONALES			ALELOS NO FUNCIONALES				ALELOS FUNCIÓN REDUCIDA					Técnica identificación alélica	REFERENCIA
		*1	*2	*35	*3	*4	*5	*6	*9	*10	*17	*29	*41		
EMBERA (Panamá. Colombia)	153				NI	0.14	NI	0.011	NI	0.069				PCR+ enzimas de restricción	(69)
NGAWBE (Panamá. Colombia)	344				NI	0.17	NI	0.005	NI	0.175				PCR+ enzimas de restricción	
Individuos sanos (Pereira)	121	0.38	0.37		0.01	0.19	0.08				0.016			XL PCR	(68)
Individuos sanos (Bogotá)	271	0.49	0.226	0.036	0.003	0.149		0.012		0.005			0.055	PCR	(70)
Individuos sanos (Bogotá)	288		0.21	0.035	0.003	0.17	0.014	0.007		0.005			0.049	PCR	(71)
Mujeres cáncer de seno	28	0.22	0.19	0.04	0.02	0.07			0.03		0.02		0.01	QuantStudio™ 12K y taqman	<u>Este estudio</u>
Mujeres sanas (Bogotá)	21	0.18	0.14	0.02		0.06				0.01	0.01				
HAPMAP (Medellín CLM)	70			0.02	0.016	0,16		0.011			0,01		0,01	Plataforma Illumina	(152)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa, XL-PCR: PCR de largo alcance específica de alelo, NI: No identificada, se evaluó pero no se identificó. CLM: Población incluida en el proyecto HAPMAP pertenecientes a Medellín Colombia.

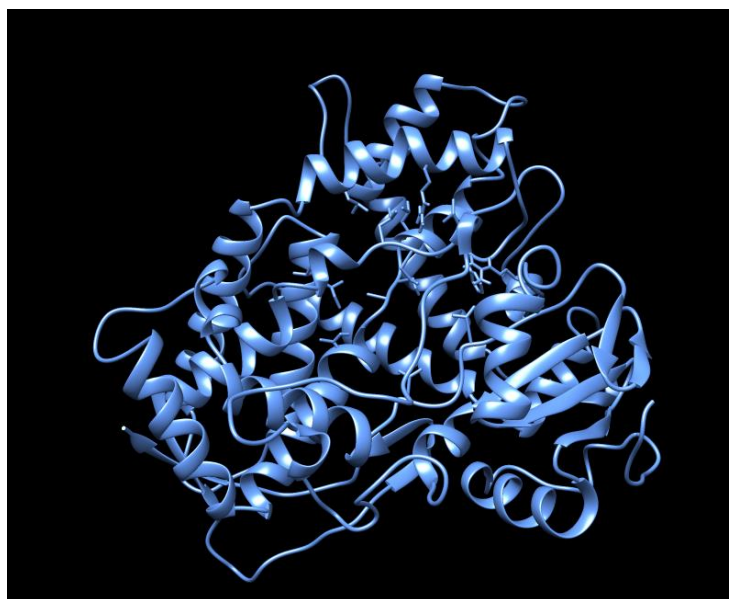
Por otra parte, una vez identificadas las pacientes MP, que para este estudio fueron dos pacientes identificadas como P28 y P30, se decidió realizar el respectivo modelamiento molecular de la proteína y tamoxifeno para identificar como las variantes presentes en estas pacientes, podrían estar incidiendo en los fenotipos y concentraciones de endoxifeno.

A continuación se indica la secuencia de la proteína CYP2D6 tomada de PDB (Protein Data Bank).

CYP2D6 NATIVA (PDB ID: 3QM4)

```
1 mglealvpla vivaiflllv dlmhrrqrwa aaryspgplpl pglgnllhvd fqntpycfdq
 61 Irrrfgdvfs lqlawtpvvv lnglaavrea lvthgedtad rppvptqil fgprsqgvf
121 larygpawre qrrfsvstlr nlglgkksle qwvteeaacI caafanhsgr pfrpnlldk
181 avsnviaslt cgrrfeyddp rflrldlaq egIkeesgfl revlnavpvl lhipalagkv
241 lrfqkafItq Idelltehrm twdpaqpprd lteafIaeme kakgnpessf ndenIrivva
301 dlfsagmvtI sttlawgllI mlhpdvqrr vqqeiddvig qvrrpemgdq ahmpyttavi
361 hevqrfgdiv plgvthmtsI dievqgfrip kgttlItIls svIkdeavwe kpfrfhpehf
421 ldaqghfvkp eafIpfSagr racIgeplar melIffftsl lqhfsfsvpt gqprpshhgV
481 faflvtpspy elcavpr
```

Figura 3-5: Estructura CYP2D6 nativa



Laminas β , y α hélices de CYP2D6 nativa. Fuente: (Facilitada por Ph. D. Juvenal Yosa, 28 enero 2017)

Posteriormente se procedió a simular la interacción de tamoxifeno con CYP2D6, la cual se visualiza en la Figura 3-6.

Figura 3-6. Estructura de CYP2D6 en interacción con una molécula de Tamoxifeno.



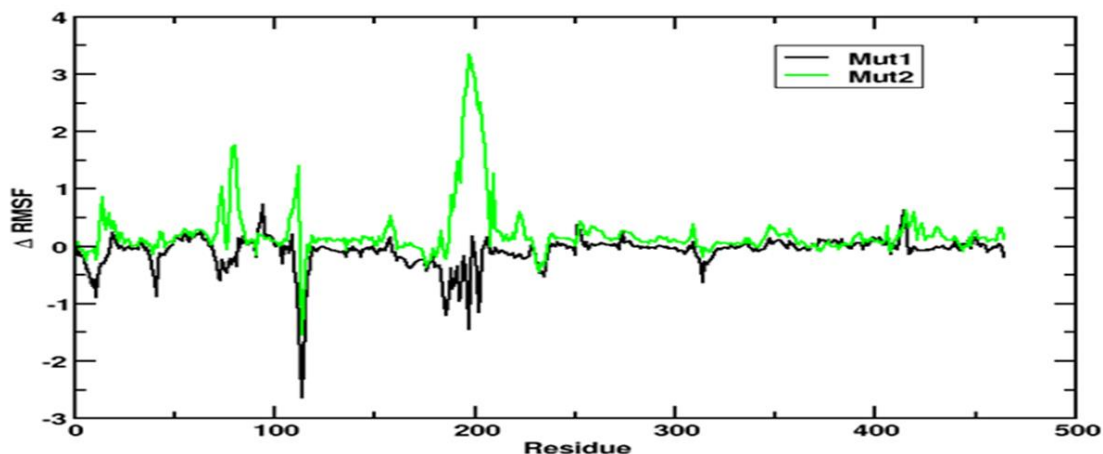
Interacción de CYP2D6 (Laminas y hélices en azul) con tamoxifeno (estructura en beige y rojo). Fuente: Facilitada por Ph. D., Juvenal Yosa 28 enero 2017.

Una vez identificada la interacción de tamoxifeno con la enzima CYP2D6 se visualizó la estabilidad de la unión, mediante el programa AMBER y se procedió a identificar si los SNPs hallados en las dos pacientes pobres metabolizadoras generaban cambio en el triplete sobre el que se encontraban (Anexo 7). Por otra parte, mediante simulación de 400 nanosegundos para cada forma alélica, se realizó un análisis de túnel para las estructuras de cada grupo para un total de 1000 coordenadas por sistema. Se utilizó el paquete CAVER 3.0 para los túneles de acceso y salida, para visualizar el comportamiento dinámico de dichos túneles cuando están presentes las diferentes formas alélicas (153), ya que los túneles de entrada son las "puertas moleculares" para el acceso de los ligandos que serán metabolizados por la enzima, en este caso particular tamoxifeno como sustrato, encontrando lo que se describe a continuación:

Durante 400 nanosegundos se evaluaron las fluctuaciones de cada uno de los residuos de CYP2D6 nativa, mediante la curva RMSF (raíz media cuadrada de las fluctuaciones) esta es una medida del promedio de la movilidad de los residuos en la proteína. Luego se comparó CYP2D6 nativa con CYP2D6 de la paciente P28 (DeltaRMSF) esto es la diferencia de valores de RMSF entre la nativa y P28 ($\text{DeltaRMSF} = \text{RMSFP1} - \text{RMSF nativa}$), identificados en el eje Y donde CYP2D6 nativa está en cero, valores menores de 0 indican rigidez comparado con la normal y valores mayores a 0 indican mayor flexibilidad que la normal y en el eje X se muestra cada residuo de la proteína CYP2D6.

Para la proteína de P28 y P30 se observa la curva en negro y verde respectivamente, en la Figura 3-7.

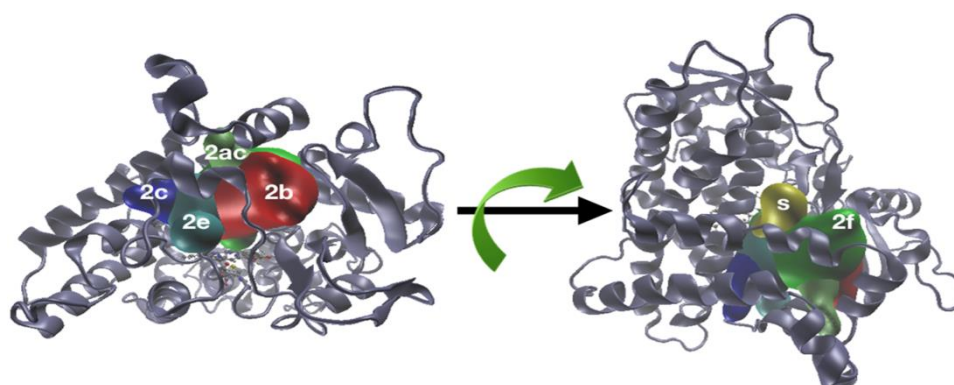
Figura 3-7. Raíz media cuadrada de las Fluctuaciones (RMSF) para todos los residuos de CYP2D6 nativa y de las dos pacientes metabolizadoras pobres.



Eje X, residuos de CYP2D6. Eje Y Raíz media cuadrada de las Fluctuaciones (RMSF) de CYP2D6 en la paciente P28 (negro) y P30 (verde). (Facilitada por Ph. D. Juvenal Yosa, 30 noviembre 2017)

Durante la dinámica se identificaron 6 túneles (2ac, 2b, 2c, 2e, 2f y 2s calculados con el programa Caver 3.0) que podrían permitir el ingreso de tamoxifeno Figura 3.8.

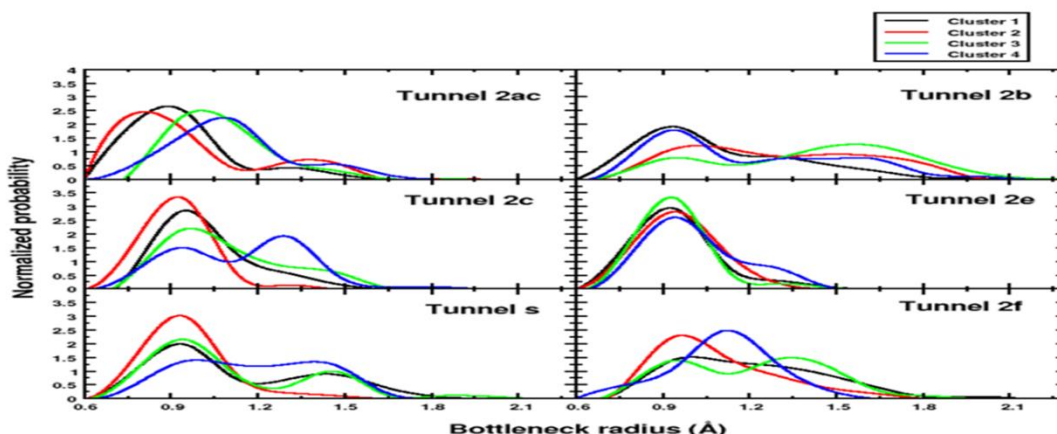
Figura 3-8. Túneles de CYP2D6 nativa.



Estructura de CYP2D6 nativa donde se indican los 6 túneles (2ac, 2b, 2c, 2e, 2f y 2s) que permiten el ingreso de los sustratos en el sitio activo (Facilitada por Ph. D. Juvenal Yosa, 30 noviembre 2017).

Adicionalmente al evaluar el comportamiento dinámico de cada túnel para la proteína CYP2D6 nativa se identificaron 4 Clusters, dos de ellos identifican un túnel abierto y cerrado y los otros muestran dos transiciones de apertura, esto es medio abiertos, Figura 3-9.

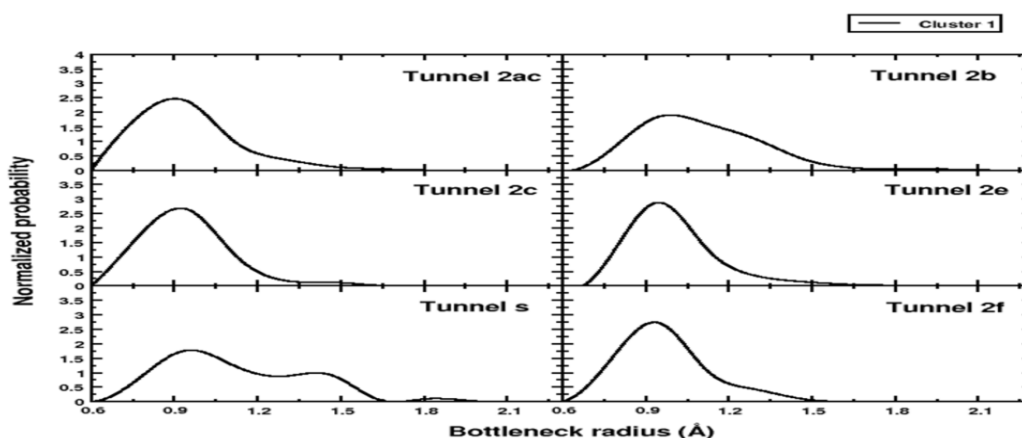
Figura 3-9. Modelamiento molecular computacional de los túneles de CYP2D6 nativa.



En eje X los cuellos de botella que para cada túnel, curvas hacia la izquierda representa túnel cerrado y curvas hacia la derecha túnel abierto. Llama la atención que el túnel 2e, se encuentra mayoritariamente cerrado. (Facilitada por Ph. D. Juvenal Yosa, 30 noviembre 2017)

Al hacer el mismo cálculo para la paciente P28, se puede observar que ya no están los 4 clúster, solo se evidencia 1, que se encuentra en la forma cerrada, la rigidez que se identificó anteriormente en la fluctuaciones podría ser la causa que hace que los canales permanezcan cerrados. Lo que sugiere que si los canales están cerrados no es posible que el TAM pueda llegar al sitio activo y esto podría explicar la causa por la cual aunque las pacientes consuman el medicamento no evidencien beneficio terapéutico teniendo en cuenta que posiblemente tamoxifeno no podrá acceder al sitio activo para ser transformado en endoxifeno, adicionalmente se podría pensar que cualquier otro xenobiótico que se metabolice por CYP2D6 en estas pacientes tampoco será efectivo. Figura 3-10.

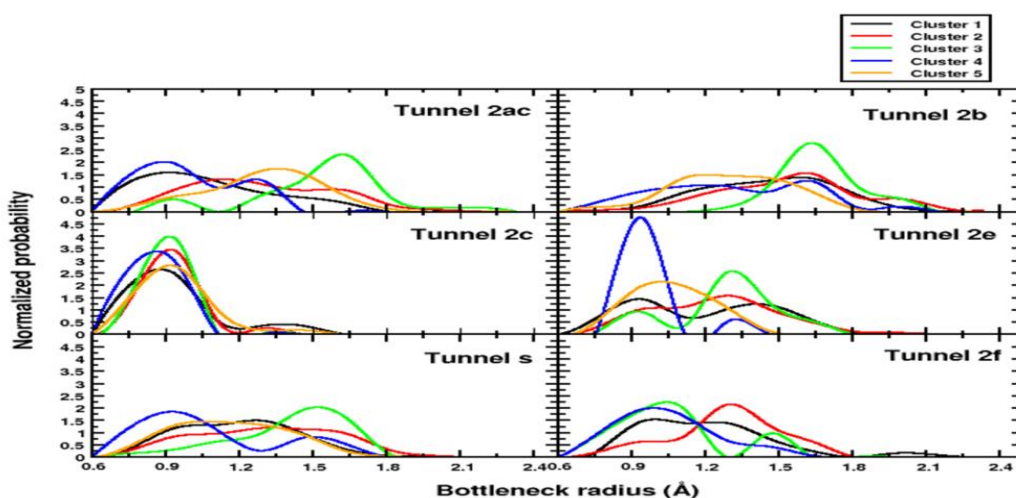
Figura 3-10. Comportamiento dinámico de los túneles de CYP2D6 en la paciente P28.



En eje X los cuellos de botella que para cada túnel, curvas hacia la izquierda representa túnel cerrado y curvas hacia la derecha túneles abiertos. Llama la atención todos los túneles, se encuentra mayoritariamente cerrados y solo un clúster. (Facilitada por Ph. D. Juvenal Yosa, 30 noviembre 2017)

Para la paciente P30(mut2) se calcularon los túneles y contrario a P28, se asemejan a la forma normal, solo que hay más transiciones de abierto a cerrado (5 clústers) Figura 3-11., al encontrar más transiciones, es indicativo de actividad intensa de las formas abiertas o cerradas, esto representa que la velocidad a la que esto sucede es mayor, de tal manera que entre un túnel abierto o cerrado solo transcurre poco tiempo, estos resultados son acordes con lo encontrado previamente en el análisis de fluctuaciones que mostró para P30 mayor elasticidad de CYP2D6. Esto sugiere que al momento en que TAM entra en contacto con CYP2D6 tiene menor tiempo para acceder a los túneles que llevan al sitio activo. Por otra parte, se identificó que la delección en la posición L241, está cerca a los túneles y esto puede estar afectando la capacidad de la proteína de reconocer TAM, así mismo podría estar interfiriendo en su metabolismo..

Figura 3-11. Comportamiento dinámico de los túneles de CYP2D6 en la paciente P30.



Se presenta aumento en el número de clústers, adicionalmente se evidencia que el túnel (2c) permanece cerrado durante la simulación lo que podría explicar un bloqueo en el ingreso a la proteína. (Facilitada por Ph. D. Juvenal Yosa, 30 noviembre 2017)

Discusión:

De las 69 variantes genéticas evaluadas sobre 10 genes asociados a la respuesta de tamoxifeno seleccionados por literatura, identificamos que solo los fenotipos de los genes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A5 se correlacionan con respuesta, en las pacientes con carcinoma ductal infiltrante del HUSI evaluadas. Se destaca que CYP2D6 fue el que

mostró mayor correlación al contrastar las concentraciones de endoxifeno versus fenotipo metabolizador.

Al evaluar la asociación de los genotipos identificados y concentraciones de metabolitos intermediarios, se evidenció que 8 pacientes mostraron valores bajos, pese a que todas las participantes aseguraron consumir diariamente TAM, al revisar las cifras de tamoxifeno en plasma se estableció que estaban por debajo de 10ng/ml, lo que sugiere que estas pacientes no habían consumido recientemente tamoxifeno, situación que deja en evidencia la necesidad de realizar estudios supervisados donde se suministre tamoxifeno a horas establecidas, donde se realice cuantificación de metabolitos intermediarios en más de un punto del seguimiento y se garantice que las pacientes consumen el medicamento a diario, preferiblemente siempre a la misma hora, pues se ha visto que el ritmo circadiano incide en la respuesta a TAM (103). Adicionalmente se debe garantizar adherencia y constatar que las pacientes no consuman otros medicamentos que puedan funcionar como inhibidores de citocromos, por otra parte, es conocido que muchas pacientes al experimentar efectos secundarios como: bochornos, tromboembolismos o engrosamiento de endometrio desisten de consumir el medicamento de una manera prematura, aunque la literatura indique que la presencia de bochornos es un indicativo de actividad adecuada de TAM (48, 154), circunstancia que podría hacer que pacientes candidatas a tener efecto terapéutico, suspendan el tratamiento a causa de efectos secundarios esperados, en cuyo caso se haría necesario realizar seguimiento y acompañamiento de estas pacientes. Adicionalmente, las pacientes pobres metabolizadoras podrían experimentar beneficio al tener ajustes en la posología, que les podría permitir evidenciar efecto terapéutico según ha sido reportado (155).

Adicionalmente, la duplicación de la variante genética *2A, en el gen CYP2D6 genera el genotipo *2A/2AXN (*2A/*2A/*2A) que confieren metabolismo ultrarrápido, en este estudio se identificó una paciente que presento este genotipo, particularmente esta pacientes mostró una tendencia mayor a presentar efectos secundarios, previamente otros estudios habían demostrado correlación con el estado metabolizador y respuesta a tratamiento (58, 102, 146) pero pocos habían identificado asociación con presencia de efectos secundarios (146, 154). Pese a que solo se encontró una paciente con estado metabolizador ultrarrápido, se realizó seguimiento y mediante entrevistas telefónicas se indago sobre aspectos relevantes en las hábitos asociados al consumo de tamoxifeno, donde la paciente admitió haber suspendido el tratamiento sin mencionarlo al médico tratante, a causa de los efectos secundarios que estaba experimentando, que según refirió la paciente era “repetir con mayor intensidad lo ya experimentado en la menopausia”. Esta situación nos sugiere que debe explorarse si pacientes metabolizadoras ultrarrápidas, podrían tener beneficio al

realizar un acompañamiento y ser informadas de los efectos secundarios asociados al esquema hormonoterapéutico, para evitar que interrumpan el tratamiento, esto debe estudiarse en un número mayor de pacientes ultra-metabolizadoras.

De otro lado, el genotipo *1/*1 en el gen CYP2C9, que confiere fenotipo metabolizador normal, dejó ver una tendencia a presentar mejor respuesta a tratamiento con tamoxifeno representado por cifras de endoxifeno superiores a 1ng/ml, en la población estudiada. Para confirmación de estos hallazgos requiere ser evaluado en una población más grande y en caso de corroborarse la presencia de este genotipo podría ser tenido en cuenta, a la hora de prescribir tratamiento con tamoxifeno a pacientes con cáncer seno ductal infiltrante, con receptores de estrógenos y progestágenos positivos.

Para la evaluación de estos hallazgos se debe tener en cuenta que la población incluida, auto reporto sus síntomas y aseguró tener adherencia al tratamiento, de manera que cabe la posibilidad que algunas pacientes no hayan seguido rigurosamente el tratamiento y por esto se evidencien cifras de metabolitos intermediarios más bajos de lo que se esperaría (58). De igual forma no existe manera de asegurar que las pacientes no consumieron simultáneamente medicamentos que puedan ser metabolizados por los citocromos estudiados, teniendo en cuenta, que es conocida la alta tasa de automedicación en pacientes con cáncer de seno (40, 156, 157).

De otro lado, la identificación en la muestra estudiada, de dos variantes sin reporte previo para población colombiana; CYP2D6*9 y CYP2D6*29, cuyas variantes están asociadas a proteína con función disminuida como previamente se ha reportado (67, 82, 84, 88), deja ver que estudios sobre población colombiana son necesarios para lograr una caracterización de frecuencias genotípicas, que permitan generar una caracterización de la población y de esta manera pensar en generar paneles farmacogenómicos que evalúen la diversidad de la población local a costos asequibles.

Por otra parte, si tenemos en cuenta que la variante CYP2D6*9 se ha reportado previamente en población mexicana (158), de Brasil (159) y Nicaragua (160), de igual forma, la variante CYP2D6*29 se ha reportado en población mexicana (158), brasilera (159) y ecuatoriana (161), evidenciando que existe similitud con la población cercana de sur América, lo cual es de esperarse por los fenómenos de desplazamiento, migración y remezcla que se han presentado en el continente y que inciden en lo que se esperaría encontrar en población colombiana, de igual forma se requiere incrementar el número de individuos estudiados para que se pueda dar una descriptiva inicial de lo que se esperaría encontrar en la población colombiana global.

Finalmente el modelamiento molecular para las dos pacientes que presentaron metabolismo pobre, mostro que las variantes en CYP2D6 no están en el sitio de unión con tamoxifeno pero si están afectando la plasticidad de la proteína, generando mayor rigidez en la proteína de la pacientes P28 y bloqueo en uno de los túneles de ingreso en la proteína de la paciente P30, situación que estaría incidiendo en la interacción de tamoxifeno y CYP2D6, estos hallazgos sugieren el mecanismo mediante el cual estas pacientes no experimentan efecto terapéutico, permitiendo proponer una hipótesis que explique parcialmente la baja concentración de endoxifeno. Para corroborar estos datos obtenidos *in silico* sería deseable realizar pruebas en húmedo y así poder afirmar que esta es la causa por la cual no se evidencian concentraciones terapéuticas de endoxifeno sobre dichas pacientes. Este tipo de resultados *in silico* permite hacer aproximaciones para estudiar a nivel molecular la proteína, evaluando sitios catalíticos, capacidad de captación, ingreso, favorecimiento de aproximación o separación molecular, que son relevantes para la actividad enzimática.

Capítulo 4. Objetivo 3: Analizar si variantes genéticas se correlacionan con parámetros histopatológicos del tumor y respuesta a tratamiento de hormonoterapia con tamoxifeno para ser usados como parámetros pronósticos.

Este objetivo tuvo como fin, evaluar las variantes genéticas identificadas en la población incluida en este estudio y determinar si presentaban asociación con parámetros histopatológicos de tumor y respuesta a TAM para sugerirlos como parámetros pronóstico.

Metodología:

La selección de las variables a incluir en el modelo se hizo mediante análisis de literatura, identificando publicaciones que incluyeran estudios de asociación donde se evaluaran pacientes con cáncer de seno que consumieran tamoxifeno y factores histopatológicos que mostraran correlación con respuesta al tratamiento. Se describen a continuación las variables seleccionadas, la población sobre la cual fue evaluada en cada uno de los artículos, indicando si fue o no incluida en este estudio, enunciando la causa y finalmente la referencia de la cual fue extraída la información. Tabla 4-1.

Tabla 4-1. Lista de estudios revisados a partir de los cuales se identificaron las variables histopatológicas y demográficas.

Variable	Población	Causas inclusión o exclusión	Ref.
Tamaño del tumor, Cáncer ductal infiltrante	72 pacientes con cáncer de seno	Se incluye al contar con dichas variable para todas la pacientes	(162)
Ganglios	362 pacientes analizadas mediante Gene Expression Omnibus (GEO), <i>in silico</i>	Se incluye al contar con dichas variable para todas la pacientes	(163)
Edad	151 pacientes postmenopáusicas con cáncer de seno primario	Se incluye al contar con dichas variable para todas la pacientes	(164)
	29,245 pacientes diagnosticadas con cáncer de seno metastásico y no metastásico		(165)
Ki 67 y estado menopaúsico	26 pacientes con cáncer de seno	Ki67 no se incluyó al no contar con datos completos para las pacientes	(166)
IMC y Estado menopaúsico	35 568 pacientes con cáncer de seno invasivo participantes de 34 estudios (Breast Cancer Association Consortium).	Se incluyen al contar con dichas variable para todas la pacientes	(167)
Tamaño del tumor estado de ganglios	1328 pacientes con cáncer de seno de todos los estadios, el 50% I-II	Se incluye al contar con dichas variable para todas la pacientes	(168)

Ki-67 marcador de proliferación celular, IMC: índice de Masa Corporal

Posteriormente, las asociaciones fueron realizadas entre los fenotipos encontrados de los genes (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A5) y características clínicas e histopatológicas del tumor, (grado histológico, tamaño tumoral, estado ganglionar) usando como co-variables IMC y edad, para el tamaño del tumor se evaluó la asociación mediante regresión lineal múltiple, por otra parte, para grado histológico y estado ganglionar, su evaluación fue mediante regresión logística, los valores estimados fueron considerados significativos cuando el valor de $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se hicieron utilizando SAS versión 9.4.

Los variables tenidas en cuenta de los datos histopatológicos fueron: tamaño del tumor, grado histológico y compromiso ganglionar. Para lo cual se codificaron: en milímetros para el tamaño, para los grados histológicos (I, II y III) y finalmente el estado ganglionar se codifico, cero las pacientes sin compromiso ganglionar y 1 para pacientes con compromiso es decir que tenían 1 o más ganglios comprometidos.

Para los análisis estadísticos se codificaron las variables colectadas, como se muestran en la Tabla 4-2

Tabla 4-2. Codificación de datos histopatológicos y fenotipos evaluados.

Paciente	ESTADO METABOLIZADOR CYP2C19	ESTADO METABOLIZADOR CYP2C9	ESTADO METABOLIZADOR CYP2D6	ESTADO METABOLIZADOR CYP3A5	Tamaño de tumor	Ganglios	Grado Histologico	IMC
P01	2	2	2	0	18	0	1	30,22
P02	2	2	2	0	30	0	2	26,22
P03	2	2	1	2	25	0	2	31,11
P04	2	2	3	0	35	1	2	38,14
P05	2	2	1	1	15	0	2	26,22
P06	2	1	1	0	15	0	2	24,65
P07	2	1	1	0	30	0	2	22,77
P08	2	2	2	0	15	0	3	22,32
P09	1	2	2	1	2	0	2	26,22
P10	2	2	2	0	14	0	1	24,44
P11	2	1	2	0	8	0	2	35,56
P12	2	1	2	0	15	0	2	24,44
P13	1	2	NI	0	15	0	1	25,81
P14	1	2	2	0	15	0	1	24,44
P15	2	2	2	2	10	0	3	26,64
P16	2	2	2	1	14	0	2	24,22
P17	2	1	1	0	15	1	3	23,34
P18	2	1	1	0	15	0	2	24,02
P19	2	2	2	0	28	0	1	26,29
P20	1	1	2	1	15	0	2	24,22
P21	2	2	2	2	24	1	2	24,84
P22	2	2	2	0	26	0	1	31,25
P23	2	2	1	0	13	0	1	21,21
P24	2	2	1	0	10	0	1	16,23
P25	2	1	2	0	13	0	1	22,10
P26	2	1	1	1	50	0	3	30,75
P27	2	2	1	1	1	0	1	29,34
P28	2	2	0	0	10	0	1	33,16
P29	NI	NI	NI	NI	7	0	1	25,71
P30	2	2	0	1	15	1	1	24,09

Estado metabolizador: se codificaron con 3 (metabolizador ultrarrápido), 2 (metabolizador extensivo), 1 (metabolizador intermedio), 0 (metabolizador pobre), NI: No identificado. Tamaño: tamaño del tumor reportado en mm. Ganglios: número de ganglios comprometidos donde: cero indica sin compromiso ganglionar y 1: representa entre 1-4 ganglios comprometidos. Grado histológico, donde 1 representa grado histológico I, 2 grado histológico II y 3 grado histológico III. IMC (Índice de Masa Corporal)

Resultados:

Se realizó evaluación de colinealidad entre las dos covariables seleccionadas IMC y edad, encontrando que estas dos variables están correlacionadas entre sí, de modo que teniendo en cuenta que IMC fue la variable que se evaluó sobre el mayor número de mujeres con cáncer de seno y mostró asociación según literatura, se seleccionó como única covariable para ser evaluada en este estudio.

Para cada variable (tamaño del tumor, estado ganglionar y grado histológico) se realizó ajuste por la covariable IMC, Tabla 4-3. Al evaluar tamaño de tumor, no se logro encontrar asociación para ninguno de los genotipos de los genes incluidos (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A5). Posteriormente se evaluó estadio ganglionar, para el cual tampoco se encontró asociación para ninguno de los genes.

Tabla 4-3. Datos regresión logística fenotipo de genes evaluados versus estadio ganglionar, con IMC como covariable.

Tamaño del tumor (TT)			Estado ganglionar (EG)			Grado histológico (GH)		
Gen	Valor de t	Pr>t	Gen	Odd Ratio	Pr>Chi sq	Gen	Odd Ratio	Pr>Chi sq
CYP2C9	-0.90	0.3776	CYP2C9	1.013	0.9926	CYP2C9	0.050	0.0059
CYP2D6	0.86	0.4041	CYP2D6	1.044	0.9573	CYP2D6	2.936	0.1474
CYP2C19	1.31	0.2042	CYP2C19	>999.999	0.9643	CYP2C19	3.987	0.3431
CYP3A5	0.31	0.7568	CYP3A5	1.897	0.3947	CYP3A5	7.029	0.0085
IMC	1.15	0.2626	IMC	1.052	0.6825	IMC	1.005	0.9610

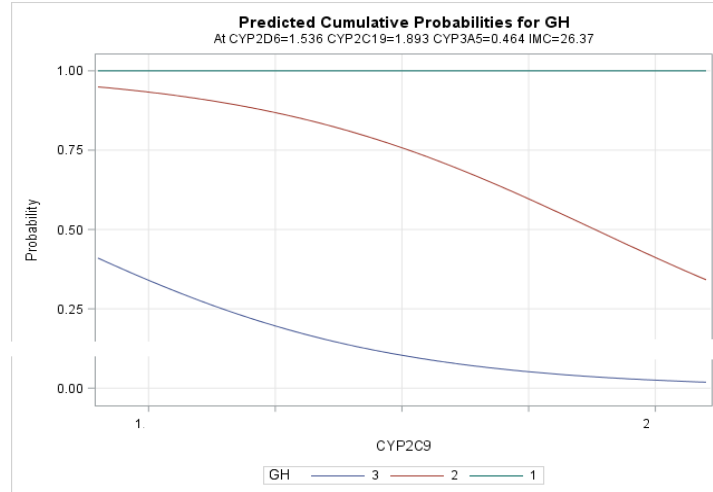
Solo se evidencia asociación de los genotipos de CYP2C9 p: 0,0059 y los genotipos de CYP3A5 p: 0,0085 con grado histológico.

Estos resultados nos indican que el estadio ganglionar no se ve asociado directamente a ninguno de los estados metabolizadores de los genes evaluados en la muestra de población del HUSI examinada.

Posteriormente, se evaluó efecto de grado histológico con los genes evaluados y se identificó asociación con CYP2C9 y CYP3A5 con p 0,0059 y p 0,0085 respectivamente. Lo que sugiere que en presencia de fenotipo metabolizador intermedio y/o extensivo de CYP2C9, así como el fenotipo pobre metabolizador y extensivo del gen CYP3A5 muestran asociación con el grado histológico.

Con la intención de discernir qué grado histológico estaba asociado con los fenotipos, se realizó análisis de regresión logística multinominal de CYP2C9 con grado histológico I, II y III Figura 4-1., y se estableció asociación de los fenotipos CYP2C9 con grado histológico II y III.

Figura 4-1. Asociación de los fenotipos de CYP2C9 con grado histológico II y III.

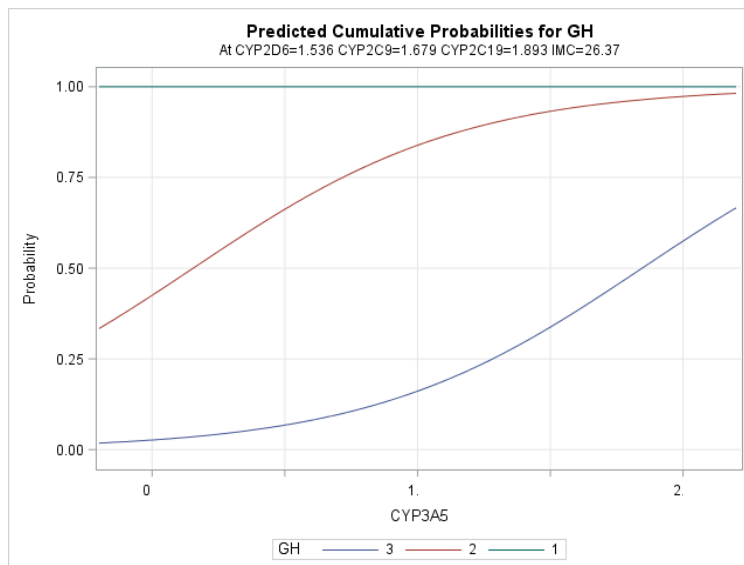


Regresión logística multinomial para CYP2C9 Versus GH (grado histológico). 3(III), 2 (II) y 1(I). En el eje X 1 metabolizador intermedio y 2 metabolizador extensivo.

Como resultado de la regresión logística multinomial para CYP2C9 en presencia de fenotipo metabolizador intermedio (1) y fenotipo metabolizador extensivo (2) se evidencia asociación con grado histológico (GH) 2 (II), por su parte, las pacientes con metabolismo intermedio y extensivo, de grado histológico (GH) 3 (III) tendrán menor probabilidad de responder al tratamiento.

Finalmente se realizó análisis de regresión logística multinomial de CYP3A5 con los grados histológicos (I, II y III), Figura 4-2, donde se estableció asociación de los fenotipos CYP3A5 con grado histológico II y III.

Figura 4-2. Asociación de los fenotipos de CYP3A5 con grado histológico II y III.



Regresión logística multinomial para CYP3A5 versus GH (grado histológico) 3(III), 2 (II) y 1(I). En el eje X: 0 metabolizador pobre, 1 metabolizador intermedio y 2 metabolizador extensivo.

Encontrando que los fenotipos de CYP3A5, están asociado a grado histológico (GH) 2, evidenciando que las pacientes con grado histológico 2, tendrán mejor respuesta a tratamiento con tamoxifeno, al ser contrastadas con las pacientes con los mismos fenotipos, pero con grado histológico 3. Por su parte las pacientes con grado histológico 1 no mostraron ningún tipo de efecto.

Discusión:

La asociación entre los genotipos de CYP2C9 y grado histológico II y III, sumado a que en el objetivo 2 se identificó asociación con respuesta a tratamiento con TAM, se puede sugerir que para la población evaluada la presencia de fenotipo de metabolizadoras extensivas para CYP2C9 en presencia de grado histológico I y II favoreció la respuesta a consumo de tamoxifeno. Esto probablemente se debe, a que al ser los grados histológicos con mejor pronóstico y sumando a que pacientes con actividad metabolizadoras extensivas, tienen una mayor capacidad de metabolizar correctamente el medicamento y esto favorece su respuesta.

Por otra parte se evidenció asociación entre CYP3A5 en las pacientes metabolizadoras extensivas con grado histológico II, en este caso, se podría pensar que la capacidad metabolizadora conferida por este fenotipo, favorece la conversión de tamoxifeno a endoxifeno mediada por este citocromo lo que permite que las pacientes con este fenotipo presenten cifras de endoxifeno superiores a 1ug/ml.

Para los demás genes evaluados no fue posible realizar correlación entre los fenotipos definidos y características clínicas.

Es importante mencionar que se hace necesario validar estos datos mediante la evaluación de una población seleccionada, con un n mayor, sobre la cual se realicen administración supervisada de tamoxifeno, seguimiento y mediciones periódicas de metabolitos intermediarios para poder garantizar que la respuesta al tratamiento se está cuantificando correctamente y de esta forma evitar sesgos, también sería necesario incluir la evaluación de cada genotipo no solo de los fenotipos y establecer su posible asociación con datos histopatológicos.

Capítulo 5. Objetivo 4: Determinar si existe correlación entre las variantes genéticas evaluadas y sobrevida de pacientes colombianas con cáncer de seno.

Metodología:

Se realizó seguimiento durante 12 meses, de cada una de las pacientes mediante llamadas telefónicas trimestrales donde cada paciente auto-reporto: efectos secundarios, recaídas y demás eventos asociados al consumo de tamoxifeno, así garantizar conocer el estado de cada paciente.

Resultados:

Ninguna de las pacientes a la última fecha de seguimiento (28/04/2017) presentó desenlace fatal, motivo por el cual no fue posible realizar análisis de supervivencia, con punto final: "muerte". Otros desenlaces que podrían ser comparables serían recaída o metástasis pero tampoco se evidenciaron en la población evaluada.

Como eventos identificados en la población solo se contó con la información correspondiente a la suspensión de consumo de tamoxifeno. A partir de esta información se usó el estimador de Kaplan-Meier, para evaluar fenotipo versus suspensión, calculada a partir de fecha de inicio de consumo de tamoxifeno y fecha de suspensión, posteriormente se usó el test de long rang para comparar las diferentes curvas de Kaplan-Meier de los fenotipos de los genes identificados en el objetivo 2, asociados con respuesta, siendo: CYP2D6 y CYP2C9, los resultados se muestran en el Anexo 8.

Al evaluar asociación entre concentración de endoxifeno y tiempo de consumo de tamoxifeno, mediante análisis de supervivencia, no se encontró evidencia estadísticamente significativa. Adicionalmente se evaluaron las diferentes combinaciones de fenotipos de CYP2D6 y CYP2C9 con la prueba de Log-Rank, contrastando el tiempo de suspensión de tratamiento, encontrando que en el caso de pacientes con metabolismo extensivo para CYP2C9 (CYP2C9=2) y metabolizadoras ultrarrápidas para CYP2D6 (CYP2D6=3), categoría con una paciente, se evidenció suspensión más rápida contrastada con las demás pacientes.

Al evaluar las particularidades de esta paciente se identificó que los efectos secundarios que presentó fueron bochornos y engrosamiento de endometrio, razón que la hizo, interrumpir el consumo de tamoxifeno, esto nos hace pensar que, por el fenotipo de esta paciente, se podría sugerir al médico tratante realizar un ajuste de dosis para evidenciar beneficio terapéutico en la paciente y así reducir o incluso evitar los efectos secundarios.

Discusión:

En el diseño del estudio se debió contemplar un tiempo de seguimiento mayor, teniendo en cuenta que las pacientes incluidas en su mayoría, pertenecen a los grupos de mejor pronóstico, al tener dentro de las características histopatológicas carcinomas ductales infiltrantes grado histológico I y II mayoritariamente, adicionalmente, 26 de las pacientes no tenían compromiso ganglionar. Probablemente debido a estas particularidades de la población estudia, no fue posible encontrar desenlaces fatales en un periodo de 12 meses.

Por otra parte, los fenotipos de CYP2C9 y CYP2D6 evaluados en este estudio, en general, no mostraron asociación con el tiempo de consumo del medicamento, solo se evidencio, suspensión temprana por parte de la paciente con fenotipo MU para CYP2D6 y ME para CYP2C9. Debe tenerse en cuenta, que como criterio de inclusión las pacientes debían haber iniciado el consumo de tamoxifeno mínimo 4 meses antes de realizar la toma de muestra para participar en el estudio, situación que puede incidir en los resultados obtenidos, teniendo en cuenta que durante los primeros meses las pacientes suelen interrumpir el tratamiento por efectos secundarios, de manera que en futuros estudios se podría proponer que la población a incluir tenga al menos 12 meses de consumir el medicamento y de esta manera controlar la variable de suspensión.

Capítulo 6. Objetivo 5: Seleccionar al menos 3 de las variantes genéticas más frecuentes en la muestra de población colombiana para la generación de una prueba de apoyo para la toma de decisiones en tratamiento con tamoxifeno.

Este objetivo tuvo como propósito seleccionar al menos tres de las variantes genéticas en CYP2D6 asociadas a metabolismo pobre e intermedio de TAM para diseñar sondas taqman para su detección, teniendo en cuenta que fueron los genotipos de este gen los que mostraron asociación con las concentraciones de endoxifeno.

Metodología:

Luego de revisar las variantes genéticas en CYP2D6, identificadas en la población evaluada en este estudio, se priorizó incluir en el panel, las que confieren un fenotipo metabolizador pobre e intermedio, CYP2D6 *3, *4, *9,*17,*29 y *41, debido a que identificar estas variantes en pacientes candidatas a consumir tamoxifeno permiten re-direccionar su tratamiento o realizar ajuste de dosis. Adicionalmente se incluyó la identificación de la variante CYP2D6*2A como control de genotipificación.

Por otra parte, teniendo en cuenta que actualmente los técnicas de biología molecular están ampliamente difundidas en los laboratorio convencionales y que adicionalmente se cuenta con el equipo LightCycle480, en el laboratorio de caracterización molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, se optó por el diseño de sondas y primers para la identificación de cada una de las variantes seleccionadas.

Para esto se identificaron las particularidades del gen CYP2D6, realizando una caracterización de las coordenadas genéticas, ubicación de cada uno de los SNPs y así proceder al diseño de sondas y primers. Adicionalmente debido a la presencia de pseudogenes como CYP2D7 y CYP2D8 se confirmaron las secuencias de cada SNP para garantizar la especificidad de los diseños obtenidos.

Se buscó la secuencia del gen y del ARNm de CYP2D6 en NCBI, y posteriormente se realizó el alineamiento por Spidey program, obteniendo la secuencia del gen identificando sus exones e intrones.

Una vez identificadas las zonas de interés se procedió a realizar el diseño de primers y sondas mediante el programa en línea Primer3. Al tener los juegos de primer sugeridos por el programa primer 3, se procedió a realizar blast para garantizar su especificidad y se

solicitó el servicio de síntesis con Roche. La descripción de los primers y sondas diseñados se describen en la Tabla 6-1.

Tabla 6-1. Descripción de los primers y sondas diseñados.

SNP-Alelo	Primer F	Primer R	Sonda	Alelo identificado
CYP2D6*2A	CAGTggCTCAggCCTgTA	gTgCTgggATTATAggCATg	-TTgTAgAgACCCggTTCTTCCA-FL - LC610gTTgTCCAggCTggTCTTgAATTCC-PH	C
CYP2D6*3(A/-),4 (A/G) y 5(DEL)	Kit comercial Ligth mix CYP2D6*3,4 y5.	Kit comercial Ligth mix CYP2D6*3,4 y5	Kit comercial Ligth mix CYP2D6*3,4 y5	*3: A/- *4:G/A *5:DEL:
CYP2D6*9 (TCT/-)	CAAGGTCCTACGCTTCCAAA	GGCAGAGATGGAGcGTGAGAGTGGCTG	TGGGGGGCAAGGGTGGTGGGTTG	*TCT
CYP2D6*17(G/C)	GCCCCTGGCCgTGATAGTGGCCATC	GTGGACCTGATGCACCGCGCCA	TCGGTGTGCTGAGAGTGCCTGCCTG	G
CYP2D6*29(C/T)	gAggCAAgAAggAgTgTCA	gTggTgTAgggCATgTgA	-ggAgATCgACgACATgATAgggC-FL -ggTgCggCgACCAgAgATg-PH	C
CYP2D6*41(C/T)	AAgAAgTCgCTggAgCAgTg	CACggCTTgTCCAAGAgA	6FAM-CggTgggTgATgggCAgAAgggC—BBQ	C

SNP: polimorfismo de un nucleótido. Primer F: primer forward. Primer R: Primer reverse. DEL: Delección total del gen CYP2D6.

La descripción de las características de cada juego de primers y sondas se describe en el Anexo 9. Se realizó compensación de color, mediante el kit: 5997704001 Color-Compensation 530/640/670/690 TIB. Posterior a la compensación de color se realizó la estandarización de condiciones de reacción para cada juego primers y sondas.

Los canales compensados fueron 515: Fluor, 610: LC red, 640: LC red y 690:LC red. Se realizó el corrido de cada juego de primers y sondas, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las características del protocolo de corrida, concentración y volumen de reacción son mostradas en la Tabla 6-2.

La selección de muestras controles para los procesos de estandarización, se realizó mediante la revisión de los resultados obtenidos de la genotipificación mediante el panel de Farmacogenética General de QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System, de estos resultados se seleccionaron para cada SNP, al menos 3 muestras que permitieran evaluar un individuo heterocigoto, uno con los dos alelos wild type y 1 con los dos alelos mutado y finalmente un control negativo.

Tabla 6-2. Concentraciones y volúmenes del mix de reacción para los ensayos y protocolo de amplificación.

20 µL reaction mixture			Parameter	Value			Parameter	Value		
Primer F	0.5	µM	Cycles	40-50			Cycles	1		
Primer R	0.5	µM	Analysis Mode	<i>Quantification</i>			Analysis Mode	<i>Melting Curve</i>		
HybProbe 3LC	0.15	µM		<i>Segment</i>				<i>Segment</i>		
HybProbe 3LC	0.15	µM		1	2	3		1	2	3
TM/SP	0.5-1.0	µM	Target Temp [°C]	95	57	72	Target Temp [°C]	95	40	85
MgCl2	3-4	mM	Incubation Time [sec]	5	10	10	Incubation Time [sec]	20	20	0
Roche Diagnostics FastStart contains 1.0 mM of MgCl2			Transition Rate [°C/s] 96 well	4.4	2.2	4.4	Transition Rate [°C/s]	4.4	1.5	-
			Acquisition Mode	none	single	none	Acquisition Mode	none	none	cont
							Acquisitions/ °C			X

Initial heating for 5-10 min at 95°C recommended. Finally the Rotor should be cooled down to 40°C for 30 s

Fuente: Protocolo sugerido Roche.

Los volúmenes de reacción para 1 y 4 muestras, respectivamente se muestran en la

Tabla 6-3.

Tabla 6-3. Volúmenes de reacción en µl para 1 y 4 muestras,

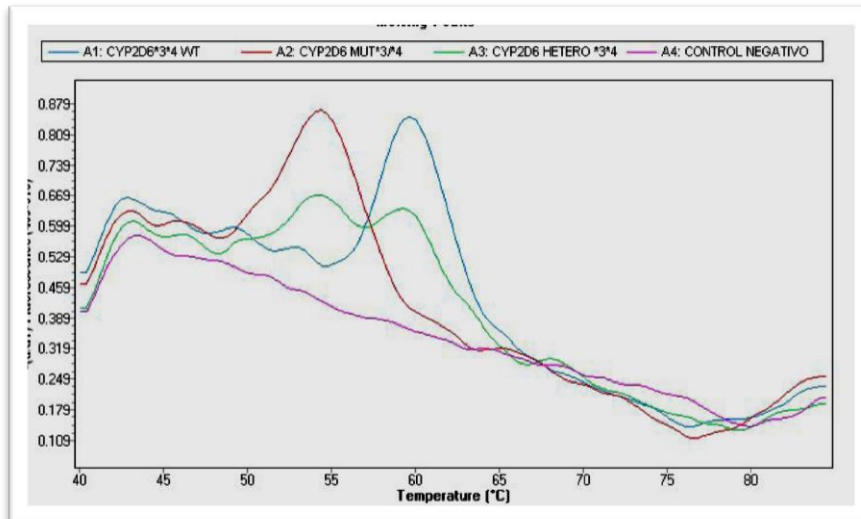
REACTIVO	1Xµl	4Xµl
Agua	10,93	43,72
Mg	1,87	7,48
Sonda1	0,6	2,4
Sonda 2	0,6	2,4
Primer F	1	4
Primer R	1	4
Enzima	2	8
mx	2	2 C/U

Descripción de los volúmenes empleados para el proceso de estandarización de condiciones para 1X (1 muestra) y 4X (4 muestras), µl microlitos.C/U cada una de las 4 muestras.

Las variantes CYP2D6*3, *4 y *5 fueron evaluadas mediante el kit comercial Lighmix CYP2D6, teniendo en cuenta que este kit permite evaluar simultáneamente 3 de las variantes genéticas asociadas a metabolismo pobre en una sola reacción, adicionalmente incluye controles negativos, positivos homocigotos y positivos heterocigotos para cada una de las 3 variantes evaluadas, siendo la alternativa más costo efectiva disponible en el mercado local.

Resultados:

Para las variantes CYP2D6*3, *4 y *5, fueron obtenidos los picos de curvas melting expuestos en la Figura 6-1.

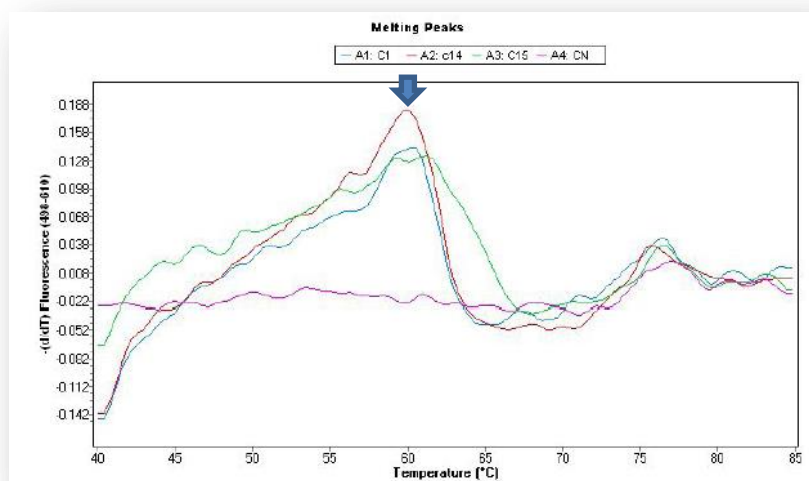
Figura 6-1. Curva de amplificación de CYP2D6*4 a 530nm.

Curvas discriminación alélica de CYP2D6*4: donde A1 (homocigoto Wild type, línea azul), A2 (homocigoto mutado, línea roja), A3 (heterocigoto, línea verde) y A4 (corresponde al control negativo, de color lila)

Donde se evidenció la amplificación correcta de los alelos CYP2D6*4, mostrando el control negativo en fucsia, el pico de color rojo muestra el alelo wild type, la curva representada en azul muestra el alelo mutado y la curva en verde que muestra los dos picos hace referencia a los alelos heterocigotos.

Adicionalmente para los alelos CYP2D6*3 y CYP2D6*5 a longitudes de onda de 640nm y 705nm, respectivamente, se obtuvieron los resultados indicados por el fabricante.

Por otra parte se realizó genotipificación para CYP2D6*9, los resultados de los controles se muestran en la Figura 6-2

Figura 6-2. Electroferograma de corrido donde se identifican el pico para TCT.

Fuente: Resultados obtenidos.

En la segunda parte del desarrollo, se propuso generar pruebas multiplex y para esto se corrió cada juego de primer con la misma temperatura de alineamiento empezando con 57°C, escalando paulatinamente y se realizó la lectura con cada uno de los filtros.

Luego de realizar las diferentes corridas no fue posible realizar la identificación simultánea de las variantes de interés a causa de la diversidad de diseños, adicionalmente los fluorocromos se solapan, hecho que impidió realizar la correcta discriminación.

En la evaluación de la concordancia de los datos obtenidos mediante las sondas taqman diseñadas para cada variante genética, en este estudio, se encontró homología en los resultados de las 51 muestra evaluadas, con los resultados obtenidos previamente mediante el panel de farmacogenética general QuantStudio™ 12K Flex Real- Time PCR System, al realizar la evaluación de forma independiente, para cada variante el resumen de los datos obtenidos se muestran en la Tabla 6-4.

Tabla 6-4 Comparación de genotipos obtenidos con las técnicas empleadas

CYP2D6 SNPs	QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System	Alelo que identifica la sonda Taqman . Este estudio	Concordancia
CYP2D6 *3	rs35742686	kit comercial CYP2D6*3	51/51
CYP2D6*4,	rs3892097	kit comercial CYP2D6*4	51/51
CYP2D6*9,	hCV32407229	TCT	51/51
CYP2D6 17	rs28371706	G	50/51*
CYP2D6*29	rs59421388	C	50/51**
CYP2D6*41	rs28371725	C	48/51***

*Para todas las muestras se identificó al menos la presencia de un alelo TCT, en las homocigotas se identificaron las dos.

** Solo una muestra fue heterocigoto, para la cual no se identificó el alelo A.

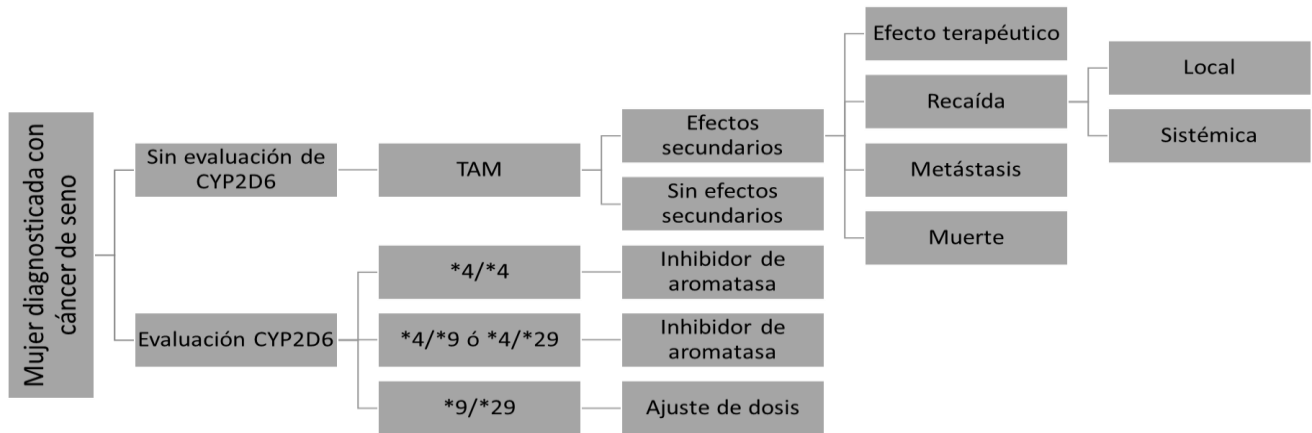
*** 1 de las muestras fue heterocigoto y no se identificó el alelo T, y dos muestras no amplificaron.

Teniendo en cuenta esta situación, mediante el uso de las sondas y los primers diseñados en este trabajo, se realizó la discriminación alélica del alelo para el que fue diseñada la sonda de forma individual para cada una de las pruebas, de tal forma que con estos datos se procedió a establecer los costos que tendría procesar una muestra con la respectiva identificación de las variantes (ANEXO 10), llegando al cálculo estimado de \$100.000 para la genotipificación de al menos 3 de las variantes que confieren metabolismos Intermedio y pobre de TAM.

Si adicionalmente tenemos en cuenta que el algoritmo de manejo de pacientes con carcinoma ductal infiltrante de primera línea tiene recomendado consumir TAM Figura 6-3, y si tenemos en cuenta los posibles desenlaces y costos asociados podremos evidenciar el

beneficio que podrían experimentar las pacientes si se realiza una genotipificación de CYP2D6*4,*9 y *29.

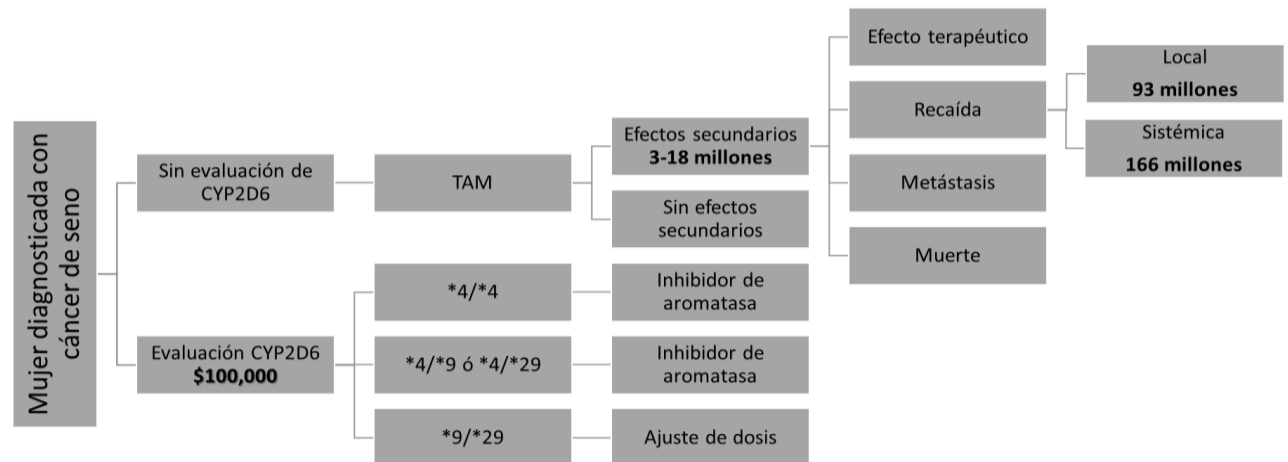
Figura 6-3. Árbol de decisión de hormonoterapia propuesto con la implementación de la prueba de apoyo.



Descripción de posibles desenlaces esquema convencional de hormonoterapia versus genotipificación previa de CYP2D6*4,*9 y *29

Por otra parte se realizó el cálculo de los costos farmacoeconómicos a partir de las cifras reportadas en las Guías de práctica clínica de cáncer de mama del Instituto Nacional de Cancerología del 2013 (Anexo 10), donde basados en la perspectiva de evaluación económica del tercero pagador, incluyen costos directos expresados en pesos colombianos, se realizó la actualización de los costos hasta agosto de 2017 teniendo en cuenta el IPC (Índice de Precios al Consumidor) del DANE. Por otra parte al establecer el costo de tratamiento de una paciente con cáncer de seno durante un año con tamoxifeno se identificó que el costo de Tratamiento de una paciente es en promedio de 5.304.539,23 (4), donde es importante mencionar que según estudios reportados, el tratamiento con TAM puede presentar efectos secundarios como eventos ginecológicos en el 20% de los casos, trombosis venosa en un 2%, anormalidades endometriales en un 4%, eventos adversos musculo esqueléticos en 44%, hipertensión en el 5% e hiperlipidemias en el 3% (169), representando aumento en los costos de tratamiento y disminución en la calidad de vida de las pacientes (170). Adicionalmente, una recaída local tiene un coste de \$ 92.933.036,53 y una recaída sistémica puede representar \$166.234.164,83 por paciente Figura 6-4, por otro lado, se ha identificado que al menos el 25% de las pacientes tratadas con TAM, no mostraran respuesta clínica completa (171).

Finalmente, si tenemos en cuenta los posibles desenlaces y costos asociados podremos evidenciar el beneficio que podrían experimentar las pacientes si se realiza una genotipificación de CYP2D6*4,*9 y *29.

Figura 6-4. Costos asociados a efectos adversos a la hormonoterapia con y sin genotipificación

Árbol de decisión en tratamiento con hormonoterapia con Inclusion de gastos asociados efectos secundarios en ausencia de genotipificación y costo de evaluar CYP2D6*4, *9 y *29.

En consecuencia, se propone un modelo en el que se incluya una prueba donde se evalúen al menos 3 variantes genéticas evaluadas en este estudio, con la posibilidad de incidir de manera positiva mediante direccionamiento terapéutico y ajuste de dosis representando un beneficio costo económico cuantificado en \$5.204.539,23 por año de tratamiento en pacientes pobres metabolizadoras, quienes podrían llegar a presentar recaídas locales o sistémicas, elevando estos costos, y si tenemos en cuenta que el tratamiento con tamoxifeno, según las nuevas guías de manejo propone prolongar el tratamiento a 10 años, se podrá evidenciar un gran beneficio costo-efectivo para las pacientes.

Discusión

Los primers y sondas diseñados han mostrado especificidad para la variante que fueron diseñados. Se debe tener en cuenta que al permitir solo la discriminación de la variante para la cual fue diseñada, deja por fuera del alcance la determinación de la variante que no fue incluida en el diseño para las variantes CYP2D6*9, *17, *29 y *41. Por el contrario para el caso de las variantes CYP2D6 *3, *4 y *5 se puede obtener una discriminación total de las pacientes homocigotas wild type, heterocigotas y homocigotas de la variante infrecuente, al estar incluidas en el kit comercial.

La evaluación de los SNP en reacción individual mostró homología con los resultados que previamente se habían obtenido del panel de Farmacogenética General de QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System.

En el proceso de desarrollar pruebas multiplex nos encontramos con la limitante que el diseño inicial incluyó mezcla de sondas de hibridación y taqman, situación que impide que la lectura se pueda hacer en la misma corrida adicionalmente los fluorocromos empleados en varias de las sondas fueron redundantes, hecho que impide su diferenciación en la lectura de pruebas donde se incluya más de uno de los SNPs marcados con el mismo fluorocromo.

Es evidente que el diseño desarrollado en este trabajo representa una prueba preliminar que permitió discriminar las variantes alélicas para las que fueron diseñadas, para su implementación en clínica deberá incluirse la evaluación de los alelos faltantes, incluyendo sondas que discriminen CYP2D6*9 (-), CYP2D6*17 (C), CYP2D6*29(T) y CYP2D6*41(T). Adicionalmente se debe realizar un diseño que permita realizar lectura simultánea, esto mediante sondas marcadas con fluorocromos compatibles en la misma reacción.

El resultado aquí obtenido se proyecta como una herramienta útil en el contexto clínico teniendo en cuenta que permitiría realizar discriminación alélica de las variantes más frecuentes y con significado clínico de CYP2D6, disminuyendo tiempo de procesamiento y permitiendo realizar procesamiento en los laboratorios locales, mediante su implementación y validación podrá ser empleada para dar apoyo al médico para la toma de decisiones terapéuticas, dosis, frecuencia y co-tratamientos evaluando interacciones en pacientes poli-medicados, así como disminución en los costos al permitir evaluar solo las variantes con significado clínico que se han identificado como presentes en población local.

Debe tenerse en cuenta que los primers y sondas aquí diseñados permiten realizar la identificación del genotipo para el cual fueron diseñados y en caso de querer continuar con este trabajo se deberá realizar la respectiva validación de pruebas moleculares donde se evalúen entre otros parámetros: factibilidad, repetibilidad, reproducibilidad, eficiencia, determinación de parámetros críticos, así como especificidad y sensibilidad analítica (172-174), adicionalmente, para poder proponer el diseño como un servicio con aplicación en clínica deben cumplirse con las normas reglamentadas por la WHO (World Health Organization) Organización Mundial de la Salud y la FDA.

Discusión general

La presente investigación tuvo como objeto el estudio de las variantes genéticas asociadas a la respuesta a tamoxifeno reportadas en la literatura y validar su presencia en mujeres diagnosticadas con cáncer de seno ductal infiltrante atendidas en el HUSI. En este sentido, los resultados obtenidos permitieron evidenciar la presencia de variantes conocidas por su relación con la variabilidad interindividual en eficacia y seguridad de las cuales no existía reporte previo para el contexto local. Como fue el caso de CYP2D6*9 y CYP2D6*29, variantes asociadas con actividad metabolizadora disminuida, dejando ver que estudios sobre población colombiana, son necesarios para lograr una caracterización de frecuencias genotípicas, que permitan generar pruebas de diagnóstico molecular que incluyan las variantes más representativas de la población y así poder hacer ajustes de dosis o redireccionamiento terapéutico.

En consecuencia la evaluación de un perfil que incluya CYP2D6 podría permitir identificar pacientes con estados metabolizadores pobres e intermedios con mayor probabilidad de no evidenciar efecto terapéutico, así como aumento en la posibilidad de presentar recaídas, metástasis y además presentar efectos adversos al consumir tamoxifeno, de igual modo, la asociación del fenotipo del gen CYP2C9 con respuesta debe ser estudiada en detalle para establecer si puede ser tomada en cuenta a la hora de prescribir tratamiento con tamoxifeno a pacientes con cáncer de seno con receptores positivos. Por otra parte, los genotipos de los genes CYP3A5 y CYP2C9 fueron asociados con el grado histológico I y II, en la población evaluada, encontrando que la presencia de fenotipo ME para CYP2C9 y grado histológico I y II favoreció la respuesta a consumo de tamoxifeno en las pacientes examinadas. Esto probablemente debido a que al ser un grado histológico, con mejor pronóstico y sumando a que las pacientes con actividad ME, tienen una mayor capacidad de metabolizar correctamente el medicamento.

De otro lado, las variantes genéticas evaluadas en la población no mostraron asociación con el tiempo de consumo del medicamento, solo se evidenció la suspensión temprana de la paciente MU, probablemente porque esta paciente presentó efectos secundarios severos que la hicieron desistir de consumir el medicamento de una manera prematura, se podría sugerir que la paciente MU, al tener consejería farmacogenética previa al consumo de tamoxifeno estaría informada de la intensidad de los efectos secundarios que experimentaría al consumir el medicamento y evitar suspensión prematura y quizás se podría evidenciar efecto terapéutico.

Es necesario mencionar que una de las limitantes, se debe a que la población incluida auto reporto sus síntomas y aseguro tener adherencia al tratamiento. Sin embargo, es

posible que algunas pacientes no hayan seguido rigurosamente el tratamiento como se evidencio con las concentraciones de tamoxifeno en plasma y por ello se evidencien cifras de metabolitos intermediarios en sangre más bajos de lo que se esperaba. De igual forma, no es posible asegurar que las pacientes no consumieron simultáneamente medicamentos que también puedan ser metabolizados por CYP2D6 o que puedan inducir o inhibir la actividad, aspectos que bajo las condiciones del estudio no pueden ser valorados.

Finalmente, se debe tener en cuenta que el desarrollo del prototipo de prueba molecular mediante PCR, al permitir solo la discriminación de la variante para la cual fue diseñada, deja por fuera del alcance la determinación de la variante que no fue incluida en el diseño para las variantes CYP2D6*9, CYP2D6*17, CYP2D6*29 y CYP2D6*41. Por el contrario para el caso de las variantes CYP2D6*3, CYP2D6*4 y CYP2D6*5 se puede obtener una discriminación alélica total de las pacientes teniendo en cuenta que las sondas adquiridas permiten realizar la diferenciación de alelos wild type y mutado para cada una de dichas variante genéticas. Por otra parte, en el proceso de desarrollar pruebas multiplex nos encontramos con la limitante que el diseño inicial incluyo mezcla de sondas de hibridación y taqman situación que impide que la lectura se pueda hacer en la misma corrida, adicionalmente los fluorocromos empleados en varias de las sondas fueron redundantes hecho que impide su diferenciación en la lectura de pruebas donde se incluya más de uno de los SNPs marcados con el mismo fluorocromo. Sin embargo, la discriminación alélica de cada variante en formato individual mostro similitud con resultados previos obtenidos con el panel de farmacogenética, situación que nos permite sugerir que la genotipificación mediante el uso de sondas taqman desarrollada en este trabajo puede ser un prototipo para aplicar en población local para realizar la identificación de estado metabolizador, mediante el uso de esta metodología se podría pensar en mejorar tiempo y costo que permitirían al personal médico tomar decisiones terapéuticas en pacientes candidatas a consumir tamoxifeno. Adicionalmente, la genotipificación de estas variantes para población que consuma diversos xenobiótico metabolizados por CYP2D6, podría permitir identificar pacientes candidatos sobre los que se deberá realizar consejería farmacogenómica, escenario que actualmente está restringido, por la limitada oferta de pruebas de tipificación farmacogenómica dados los costos de las mismas.

Conclusiones

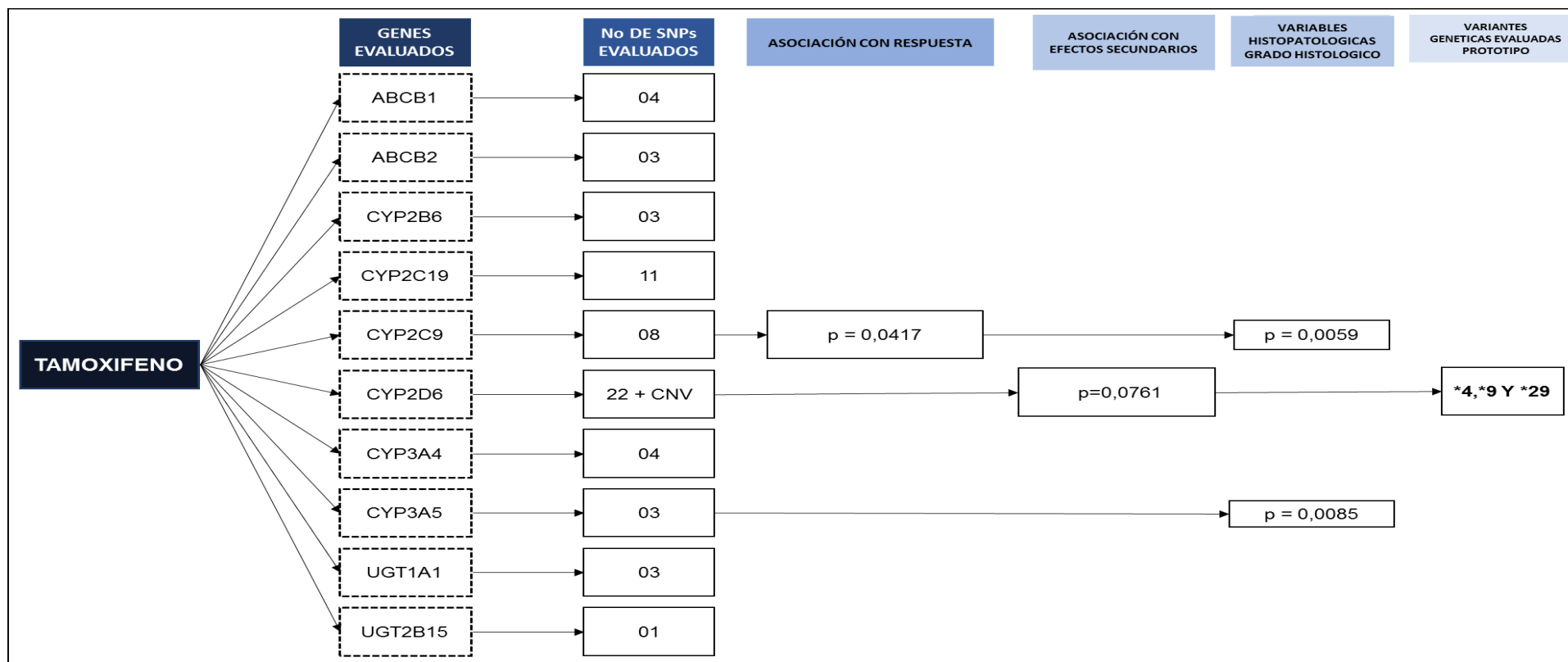
La variabilidad genética interindividual permite caracterizar el estado metabolizador de pacientes que consumen tamoxifeno, para este estudio se identificó que el gen CYP2D6, mostro asociación con los niveles de endoxifeno, en este contexto sobre la población estudiada se evidencia la presencia de variantes que previamente no habían sido reportadas para población colombiana: CYP2D6*9 y CYP2D6*29, que dejan ver la necesidad de explorar nuestra población e identificar las frecuencias genotípicas relevantes, para generar paneles diseñados a medida, que permitan garantizar cobertura de la población, aplicación de alternativas de tamizaje para identificar estado metabolizador, en la práctica clínica de manera ordenada.

Evidentemente la cuantificación de metabolitos intermediarios, también podrá ser una herramienta eficiente para evaluar la capacidad metabolizadora de cada paciente, así mismo permite monitorear adherencia, no obstante, en este estudio al solo tener una muestra de las pacientes incluidas, no es posible realizar un seguimiento más riguroso que permita demostrar que las pacientes que presentaron cifras bajas de endoxifeno realmente no los tenían por co-medicación o baja adherencia.

El tamaño de muestra se determinó, teniendo en cuenta el marco muestral de pacientes atendidas en el HUSI, y se seleccionó el grado histológico más frecuente, esto con la intención de poder acceder al mayor número de pacientes posible y disminuir la estratificación de la población por una variable determinante como es el grado histológico lo que limita los resultados aquí obtenidos, obligando a que sean vistos solo a la luz de la población evaluada.

Finalmente las diferentes técnicas de detección de SNPs que existen actualmente y su implementación en los laboratorios locales, podría permitir generar paneles de evaluación farmacogenómica de pacientes candidatas a consumir tamoxifeno a costos bajos, que permitan una mayor cobertura y el respectivo direccionamiento terapéutico, generando el campo propicio que permita atender a cada paciente en el marco de una salud personalizada incidiendo en su calidad de vida, disminuyendo efectos secundarios, eventos adversos y toxicidad.

Para sintetizar los resultados obtenidos en este estudio se genera el siguiente modelo explicativo:



TAMOXIFENO y los 10 genes evaluados, para cada gen se indica el número de variantes examinadas mediante el panel QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System. CNV (Copy number variation). Se estableció asociación de respuesta a tamoxifeno con los fenotipos de CYP2C9. De otro lado se observó asociación con presencia de efectos secundarios y los fenotipos de CYP2D6, igualmente se identificó asociación con grado histológico para los genes CYP2C19 y CYP3A5. Finalmente las variantes genéticas del CYP2D6 se emplearon para hacer prototipo de prueba molecular mediante empleo de sondas taqman.

Recomendaciones

Para llegar a conclusiones más contundentes sería deseable contar con más de una muestra sanguínea por paciente, que permita realizar correlación de niveles séricos de los metabolitos intermediarios de tamoxifeno, adicionalmente en el seguimiento de pacientes se debería contar con acceso a la información de toda la medicación que la paciente consume simultáneamente a tamoxifeno, no solo la reportada en la historia clínica sino también la que la paciente consume de manera libre y sin prescripción. Por otra parte se requieren estudios controlados que garanticen que las pacientes consumen las dosis prescritas a la misma hora, para disminuir factores de confusión que pueden afectar los resultados, así como un tiempo de seguimiento durante más de 12 meses para poder evaluar desenlace y sobrevida.

En futuros diseños de paneles para evaluar las principales variantes alélicas de CYP2D6, se debe diseñar sondas que identifiquen cada una de las variantes para realizar una correcta discriminación alélica y así tener una evaluación más certera, de igual forma cada una de las variantes al menos en cada SNP deberá estar marcada con diferente fluorocromo para evitar errores de lectura e interpretación. Adicionalmente, con los primers y sondas diseñados solo es posible realizar la discriminación alélica para la que fueron construida y nos podrá hacer diferenciación genotípica en pacientes heterocigotos para las que no se haya incluido la variante menos frecuente.

Los resultados obtenidos en este trabajo son extrapolables solo a población con las mismas características de la población incluida en el estudio, por lo tanto no tendrá validez en pacientes con diagnóstico histopatológico diferente al objeto de este estudio.

Pese a que la población que acude al servicio de oncología del HUSI es representativa al tener un alto número de pacientes y ser un hospital universitario de referencia, que cuenta con convenios con diversas aseguradoras de salud en todo el país, no es posible pretender que con el muestreo aquí realizado se extrapole la información obtenida a toda la población colombiana, para poder realizar una aseveración de este tipo, se requieren estudios multicéntricos que incluyan a instituciones que atiendan a pacientes de todo el país.

Por otra parte, las enzimas asociadas al metabolismo de tamoxifeno son comunes a diversos xenobióticos, se podría pensar que la generación del prototipo de prueba rápida aquí diseñada permitirá extrapolar el tamizaje de estado metabolizador a una población blanco más amplia, es decir a aquellos individuos que sean candidatos a consumir xenobiótico metabolizados por CYP2D6, permitiendo realizar un abordaje más apropiado y de esta manera disminuir efectos secundarios o toxicidad.

Limitaciones

El tamaño de la muestra, pese a ser un censo de las pacientes que acudieron al servicio de oncología del HUSI, debe incrementarse para futuros estudios, mediante la ampliación del tiempo de reclutamiento y la inclusión de otros centros que atiendan a pacientes con cáncer de seno.

La población incluida solo representa el subtipo histológico ductal infiltrante, en caso de querer extrapolar la información obtenida en este estudio, se deberá realizar un diseño que aborde todos los estadios, donde se deberán incluir todas las pacientes posibles, indistintamente del subtipo histológico que refiera el reporte de patología.

El diseño de las sondas solo permite realizar la discriminación del alelo para la cual fue diseñada.

El tiempo de seguimiento fue de 12 meses, se podría pensar en continuar el seguimiento para tener datos más robustos y que permitan evaluar eventos tardíos.

Luego de explorar las diferentes alternativas en el mercado, se encontró que pese a que la plataforma de Illumina sería la mejor opción al permitir evaluar cientos de variantes, se identificó como limitante que no cuentan con un panel comercial que incluya la evaluación de las variantes en CYP2D6, de manera que exploramos la posibilidad de diseñar un panel que las incluyera, encontrando que se requiere un pedido mínimo de 1158 muestras, situación que por costos se salió de nuestro presupuesto y que para futuras investigaciones podría ser contemplado.

Finalmente, se podría pensar en diseñar un panel que incluya las variantes más relevantes para farmacogenómica de tamoxifeno y otros medicamentos de importancia en el tratamiento de cáncer de seno para reducir costos y optimizar resultados y de esta forma incidir en salud pública, esto con miras a generar paneles a medida que nos permitan acercar a nuestro sistema de salud a una salud personalizada, incidiendo en la calidad de vida de las pacientes, sus familias, así como reducción en los costos asociados a la atención por efectos tóxicos, que podrían evitarse realizando ajustes de dosis o re-direccionamiento terapéutico

ANEXO 1: Descripción de los 17 artículos originales (en pacientes con cáncer de seno tratadas con tamoxifeno) seleccionados.

Variante genética identificada	Técnica identificación	Población evaluada	Resultado	Año	DOI
CYP2D6 y CYP2C19	AmpliChip™ CYP450	57 mujeres con cáncer de seno en tratamiento con TAM y seguimiento de 5 años	Los polimorfismos en CYP2D6 y CYP2C19 evaluados en pacientes posmenopáusicas puede ser usado para predecir respuesta a tratamiento con TAM	2013	10.2147/PGPM.S42330
CYP2D6 y CYP3A5	PHARMAchip	241 mujeres con cáncer de seno tratadas con TAM	Los polimorfismos en CYP2D6 y CYP3A5 evaluados en pacientes con cáncer de seno están asociados con respuesta a TAM	2013	10.2217/pgs.13.83.
CYP3A4/5, ABCB1 y ABCB2	PCR	30 mujeres con cáncer de seno bajo tratamiento con TAM	Mayor riesgo de recurrencia dentro de los 3 años después de recibir terapia adyuvante con tamoxifeno.	2013	10.2147/PGPM.S44006
CYP2D6, CYP3A4 y CYP3A5	AmpliChip® CYP450 + PCR-RFLP	135 pacientes con cáncer de seno	CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, SULT1A1, SULT1A2 y SULT1E1 también desempeñan un papel en el mantenimiento de los niveles óptimos de 4-hidroxi-tamoxifeno y endoxifeno.	2013	10.1371/journal.pone.0070183
CYP2C9 y CYP2D6	Secuenciación	260 mujeres con cáncer de seno tratadas con TAM	Se identificaron peculiaridades étnicas relacionadas con la farmacogenómica y las características demográficas de los hispanos y no hispanos tratados con TAM.	2014	10.1007/s10549-014-3191-4
CYP2D6 y CYP3A	Secuenciación	40 mujeres con cáncer de seno tratadas con TAM	Se demuestra que no solo CYP2D6, sino también la actividad de la enzima CYP3A influye en la conversión de tamoxifeno a endoxifeno en pacientes con cáncer de mama.	2014	10.1111/bcp.12388.

CYP2D6	Sondas Taqman	53 hombres con cáncer de seno tratados con TAM	El polimorfismo CYP2D6 * 4 aumenta la probabilidad de recurrencia, con un efecto constante en grupos de riesgo definidos por factores pronósticos clásicos (edad, características clínicas y tratamiento primario).	2014	10.1016/j.breast.2015.04.010
CYP2D6	Amplichip 450	24 mujeres con cáncer de mama temprano que usaban tamoxifeno (12 CYP2D6 pobres y 12 metabolizadores intermedios) durante 2 meses escalonando dosis.	La escalada de la dosis de tamoxifeno guiada por genotipo de CYP2D6 y endoxifeno, aumentó las concentraciones de endoxifeno sin aumentar los efectos secundarios a corto plazo	2015	10.1007/s10549-015-3562-5
CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19 y CYP2D6	Amplichip 450	587 mujeres con cáncer de seno tratadas con tamoxifeno.	La formación de endoxifeno en mujeres premenopáusicas depende de CYP2D6 independientemente de su origen étnico. La baja concentración / formación de endoxifeno y la disminución de la actividad de CYP2D6 predicen una supervivencia libre de recaída a distancia (DRFS) más corta	2015	10.1038/tmj.2014.34.
CYP2D6 , CYP2C19 y CYP3A4	Sondas Taqman	18 mujeres con cáncer de seno tratadas con TAM	El ritmo circadiano puede ser uno de los muchos factores determinantes de la variabilidad farmacocinética intrapaciente e interpaciente del tamoxifeno	2015	10.1007/s10549-015-3452-x.
CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19, and ABCB1	Taqman open array	116 mujeres con cáncer de seno tratadas con TAM	Se confirma que CYP2D6 juega un papel importante en la producción de endoxifeno junto a ABCB1	2016	10.1002/jcph.771.
CYP2D6	INFINITI CYP450 2D6T	367 pacientes con cáncer de seno tratadas con TAM	Se evidencio una asociación entre los genotipos de CYP2D6 y las concentraciones de endoxifeno y 4 hidroxitamoxifeno	2016	10.1007/s10549-016-3932-7

CYP2D6	Amplichip 450	353 pacientes con cáncer de seno tratadas con TAM	El aumento de la dosis de tamoxifeno guiado por genotipo CYP2D6, confirma que aumentar a 40 mg / día en pacientes con CYP2D6 baja actividad (metabolizadores deficientes o intermedios) aumenta las concentraciones de endoxifeno sin aumentos obvios en la toxicidad relacionada con el tratamiento.	2016	10.1634/theoncologist.2015-0480.
CYP3A5, CYP2D6 y ABCB1	PCR	73 pacientes con cáncer de seno tratadas con TAM	El estudio indica que los polimorfismos de ABCC2 y ABCB1 se asocian de forma independiente con la metástasis ósea en pacientes tratadas con tamoxifeno.	2016	10.2147/OTT.S100905
UGT1A1 y UGT2B15	Secuenciación	202 pacientes con cáncer de seno tratadas con TAM	La variabilidad genética en el gen UGT1A1 está asociado con la respuesta a TAM	2016	10.1007/s40262-016-0402-7
CYP2D6, CYP3A5 y ABCC2	HumanExome BeadChip.	1590 muestras	Las variantes genéticas en CYP2C19 y CYP3A5 están asociados con respuesta a tratamiento con TAM	2016	10.1186/s12967-016-0778-z
CYP2C19	Secuenciación	240 mujeres sanas y 201 mujeres con cáncer de seno tratadas con TAM	CYP2C19 * 2 se asoció independientemente con concentraciones plasmáticas significativamente más bajas de endoxifeno y 4 hidroxitamoxifeno	2016	: 10.1111/bcp.12886

Amplichip 450: prueba de farmacogenética que usa micromatrices de ADN para evaluar CYP2D6 y CYP2C19. PHARMAchip: prueba farmacogenética que emplea micromatrices de ADN para evaluar 91 polimorfismos en 33 genes. HumanExome BeadChip: prueba genética para evaluación de exoma que emplea >250.000 marcadores para identificación. INFINITI CYP450 2D6T: prueba farmacogenética que permita la evaluación de 11 variantes alélicas en CYP2D6.

ANEXO 2: Cuestionario- consentimiento

Cuestionario mujeres sin cáncer evaluadas.

Estudio: Una aproximación a salud personalizada: Identificación y validación de variantes genéticas asociadas con respuesta a tamoxifeno en pacientes con cáncer de seno y sobrevida en mujeres colombianas”.

Fecha:
Nombre:
Numero de cedula:
Fecha de nacimiento: / / Edad:
Antecedentes familiares:
Peso:
Estatura:
Edad menarquia:
Número de embarazos/Hijos: Meses que amamanto:
Edad menopausia: Causa:
Terapia hormonal:
Medicamentos:
Cirugías anteriores:
Alergias:
Café
Cigarrillo:
Teléfonos de contacto:
Muestras colectadas:
Observaciones:

Cuestionario Pacientes:

Estudio: Una aproximación a salud personalizada: Identificación y validación de variantes genéticas asociadas con respuesta a tamoxifeno en pacientes con cáncer de seno y sobrevida en mujeres colombianas”.

Fecha:
Cirujano:
Nombre de la paciente.
Numero de cedula:
Fecha de nacimiento: / / Edad:
Antecedentes familiares:
Peso:
Estatura:
Edad menarquia:
Número de embarazos/Hijos: Meses que amamanto:
Edad menopausia: Causa:
Terapia hormonal:
Tipo de carcinoma:
Estadio:
Grado:
Tamaño tumor:
Nº ganglios comprometidos:
RE: RP: HER2:
Tipo de cirugía:
Radioterapia:
Quimioterapia:
Hormonoterapia:
Medicamentos:
Cirugías anteriores:
Alergias:
Café
Cigarrillo:
Teléfonos de contacto:
Muestras colectadas:
Datos seguimiento:
Observaciones:

CONSENTIMIENTO INFORMADO ESTUDIO

“Una aproximación a salud personalizada: Identificación y validación de variantes genéticas asociadas con respuesta a tamoxifeno en pacientes con cáncer de seno y sobrevida en mujeres colombianas”.

Usted está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, a cargo de:

Dr. Fabio Ancizar Aristizabal, PhD Director del Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia (Bogotá).

Dra. Yeimy Viviana Ariza Márquez Bacterióloga. cPhD Biotecnología Universidad Nacional de Colombia,

Dr. Ignacio Briceño Balcazar, PhD. Instituto de Genética Humana, PUJ (Bogotá).

Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio: **(a)** Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. **(b)** El participar en este estudio puede no beneficiarlo a usted directamente, pero esta investigación nos permite entender conceptos sobre la enfermedad, de manera que los beneficios posteriores podrían ser para usted, su familia u otros individuos afectados. **(c)** Usted puede retirarse del estudio cuando lo desee. La revocación de este consentimiento no tendrá perjuicio alguno sobre la relación médico-paciente. **(d)** Ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación. **(e)** Este estudio no tiene ningún interés económico por nuestra parte o de las instituciones colaboradoras, así como tampoco el desarrollo de patentes con base en el material genético. **(f) CONFIDENCIALIDAD:** Los registros con la información de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Biotecnología. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos suministre son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de investigación tendrá acceso a estos datos. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos. **(g)** La naturaleza de este estudio, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información importante está resumida a continuación y será explicada por el grupo investigador. **(h)** Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas.

Cualquier información adicional usted puede obtenerla de los investigadores, o directamente con: Dra. Yeimy Viviana Ariza Márquez Cel:3112560345

EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO: Cáncer de seno es el cáncer más común entre las mujeres a nivel mundial. Se ha observado que la incidencia de cáncer de seno es mayor en Europa y Norte América aun cuando las tasas en países en vías de desarrollo incluido Sur América se han venido incrementando. En Colombia, la incidencia edad-estandarizada para cáncer de seno (Registro de Cali) fue estimada en 38.8 pacientes por 100.000 casos, por año.

El objetivo principal de esta investigación es validar variantes genéticas establecidas en literatura científica mundial y la asociación de respuesta a tratamiento con hormonoterapia de tamoxifeno en pacientes con cáncer de seno y el desenlace clínico, en población colombiana.

PROCEDIMIENTO: Se realizará una entrevista clínica con usted y se realizara toma de una muestra de sangre aproximadamente 4 ml, mediante punción en vena periférica.

Estas muestras serán manejadas y analizadas únicamente por personas involucradas directamente en este proyecto y almacenadas en nuestro laboratorio en el Instituto de Biotecnología de Universidad Nacional de Colombia.

RIESGOS E INCOMODIDADES: La participación en este estudio representa riesgo mínimo para su salud e integridad y las molestias y efectos adversos estarán representados exclusivamente por la toma de muestra

referida en el procedimiento, es posible que se pueda presentar inflamación o hematoma.

BENEFICIOS ADICIONALES: El conocimiento generado de esta investigación será de gran utilidad en la identificación de las mejores alternativas para manejo farmacogenético de pacientes con cáncer de seno, con el fin de dirigir los esfuerzos a estrategias de tratamiento personalizado que permitan identificar que pacientes realmente asimilaban o no tamoxifeno, con la intención de disminuir los efectos adversos en aquellas pacientes que no pueden metabolizar tamoxifeno.

RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES: Al tomar parte de este estudio es importante que usted contemple las siguientes responsabilidades y precauciones: Comprende que el riesgo existente en una toma de muestra de sangre en vena periférica es muy bajo y por lo tanto no reviste riesgo en la salud del paciente.

AUTORIZACIÓN:

Para la utilización de la muestra en estudios posteriores que nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores.

Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio de investigación.

Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla en las situaciones señaladas a continuación:

En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones Nacionales y/o Internacionales, enviando la muestra al exterior a el(los) laboratorio(s) de el(los) instituto(s) antes mencionado(s).	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
En estudios complementarios de diagnóstico para mi o algún miembro de mi familia.	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación:	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación:	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones Nacionales y/o Internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación.	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No

AUTORIZACIÓN PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSIÓN VOLUNTARIA EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“Una aproximación a salud personalizada: Identificación y validación de variantes genéticas asociadas con respuesta a tamoxifeno en pacientes con cáncer de seno y sobrevivida en mujeres colombianas “.

Fecha: _____

Yo, _____ con documento de identificación No. _____ de _____, acepto voluntariamente que se me tome una muestra de sangre con el fin de realizar el análisis objeto de este estudio.

Así mismo, declaro que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará a la muestra.

HUELLA DIGITAL

Firma del Paciente

CC

Firma Testigo 1

CC:

Firma Testigo 2

CC

ANEXO 3: Modificaciones protocolo Mo bio

Protocolo sugerido Mo Bio

Extracción DNA Muestras de sangre total.

1. Añadir 300u l de sangre entera a 900u l de solución de G1.
2. Se incuba 5 minutos a temperatura ambiente e Invertir el eppendorf dos veces.
3. Centrifugar durante 30 segundos a 13.000 x g. Eliminar sobrenadante con punta de pipeta estrecha y deseche, sin perturbar pellet blanco. (Alrededor de 20ul de sobrenadante se mantendrán.)
4. Vórtex para resuspender pellets por completo.
(Se deja sobre servilleta hasta que escurra toda la sangre)
5. Compruebe G2 solución. Si evidencia precipitado, caliente a 55°- 65°C durante 5 minutos para disolver. Añadir 300ul de solución G2.
6. Pipetear hacia arriba y abajo para lisar las células (Si grupos de células siguen siendo visibles incuba en 37°C hasta que no haya grumos visibles). Repetir el proceso por al menos durante dos horas, paso crítico. Dejar bajar la espuma.
7. Añadir 100u l de solución de G3.
8. **Vortex inmediatamente** durante 15 segundos.
9. Centrifugar 3 minutos a 13.000 x g.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo colector limpio 2,0 ml.
11. Añadir 300 l de 100% de isopropanol.
12. Invertir 15 veces y se incuba a temperatura ambiente durante 3 minutos.
13. Centrifugar 5 minutos a 13.000 x g.
14. Vierta con cuidado el sobrenadante sin perturbar pellet y escurrir sobre una toalla de papel o material absorbente. Dejar secar completamente el isopropanol.
15. Añadir 300 ul de etanol al 70%.
16. Invertir el tubo 5 veces para lavar el pellet.
17. Centrifugar 30 segundos a 13.000 x g.
18. Vierta con cuidado el sobrenadante sin perturbar pellet y deje escurrir sobre una toalla de papel o material absorbente.
19. Centrifugar durante 30 segundos, y retire sobrenadante residual con punta de pipeta estrecha sin molestar el sedimento.
20. Añadir 100 ul de solución G4.
21. Se calienta en un baño de agua o en bloque a 65°C moviendo el tubo de vez en cuando, hasta que el pellet se halla resuspendido (no debe tomar más de 30-40 minutos).
22. El ADN genómico en el tubo ya está listo para su uso para cualquier aplicación.

Protocolo modificado Mo Bio Extracción DNA Muestras de sangre total.

Se indican resaltados en negrita los pasos sobre los cuales se realizó la modificación obteniendo mejores resultados.

1. Añadir 300u l de sangre entera a 900u l de solución de G1.
2. Se incuba 5 minutos a temperatura ambiente e Invertir el eppendorf dos veces.
3. Centrifugar durante 30 segundos a 13.000 x g. Eliminar sobrenadante con punta de pipeta estrecha y deseche, sin perturbar pellet blanco. (Alrededor de 20ul de sobrenadante se mantendrán.)
4. **Realizar los lavados que sean necesarios para obtener un pellet blanco con solución de lisis de rojos.**
5. Vórtex para resuspender el pellet por completo. (Se deja sobre servilleta hasta que escurra toda la sangre)
6. Compruebe solución G2. Si esta precipitado, caliente a 55°- 65°C durante 5 minutos para disolver. Añadir 300ul de solución G2.
7. **Vortex a máxima velocidad por al menos 5min.**
9. **Añadir 100u l de solución de G3.**
10. **Vortex inmediatamente durante 45 segundos. Conservar a -20°C hasta el siguiente día.**
11. Centrifugar 3 minutos a 13.000 x g.
12. Transferir el sobrenadante a un tubo colector limpio de 2,0 ml.
13. Añadir 300 ul de 100% de isopropanol **bien frio.**
14. Invertir 15 veces y se incuba a temperatura ambiente durante 3 minutos.
15. Centrifugar 5 minutos a 13.000 x g.
16. Vierta con cuidado el sobrenadante sin perturbar pellet y escurrir sobre una toalla de papel o material absorbente. Dejar secar completamente el isopropanol.
17. Añadir 300 ul de 70% de etanol.
18. Invertir el tubo 5 veces para lavar el pellet.
19. Centrifugar 30 segundos a 13.000 x g.
20. Vierta con cuidado el sobrenadante sin perturbar pellet y escurrir sobre una toalla de papel o material absorbente.
21. Centrifugar durante 30 segundos, y retire sobrenadante residual con punta de pipeta estrecha sin molestar el sedimento.
22. Añadir 100 ul de solución G4.
23. Se calienta en un baño de agua o en bloque a 65°C moviendo el tubo de vez en cuando, hasta que el pellet se halla resuspendido (no debe tomar más de 30-40 minutos).
24. El ADN genómico en el tubo ya está listo para su uso para cualquier aplicación.

ANEXO 4: Variantes evaluadas en el panel QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System

PANEL DE FARMACOGENÉTICA GENERAL	
ABCB1	rs104564, rs112850, rs203258, rs203258, rs3213619
ABCC2	rs227369, rs717620, rs3740066
ABCG2	rs2231142
ADRB2	rs1042713
ANKK1/DRD2	rs1800497, rs1799978
APOE	rs7412
COMT	rs4680
CRHR1	rs1876828
DPYD	rs1801265, rs1801160, rs55886062, rs2297595, rs67376798, rs3918290
Factor V Leiden	rs6025
GRIK4	rs1954787
GSTP1	rs1695
IFNL3	rs12979860, rs8099917
MTHFR	rs1801131, rs1801133
NAT2	rs1208, rs1799931, rs1801279, rs1799930, rs1799929, rs1801280, rs1041983
OPRM1	rs1799971
SLC22A1	rs12208357, rs628031, rs72552763
SLCO1B1	rs2306283, rs4149056, rs4149015
SOD2	rs4880
TPMT	*2, *3A, *3B, *4
UGT1A1	rs4124874, rs4148323, rs887829
UGT2B15	rs1902023
VKORC1	rs9923231, rs9934438, rs2359612, rs8050894
CYP1A2	rs762551, rs2069514, rs12720461
CYP2A6	rs1801272, rs28399433
CYP2B6	rs28399499, rs3745274, rs12721655
CYP2C19	*1, *2, *3, *4, *5, *6, *7, *8, *10, *17
CYP2C8	*1, *2, *3, *4
CYP2C9	*1, *2, *3, *4, *5, *8, *11, *13, *27
CYP2D6	*1, *2, *3, *4, *5 (delección), *6, *7, *8, *9, *10, *11, *14, *17, *19, *20, *29, *35, *36, *38, *40, *41, *42, *44, *1xN, *2xN, *4xN, *10xN, *17xN, *35xN, *41xN
CYP2E1	rs2070673
CYP3A4	rs2740574, rs2242480, rs4646437, rs35599367
CYP3A5	*3, *6, *7
CYP4F2	rs2108622

ANEXO 5. Haplotipos identificados en las pacientes.

PACIENTE	CYP2C19 Haplotipo	ESTADO METABOLIZADOR CYP2C19	CYP2C9	ESTADO METABOLIZADOR CYP2C9	CYP2D6 Haplotipo	Estado metabolizador CYP2D6	CYP3A5 Haplotipo	ESTADO METABOLIZADOR CYP3A5
P1	*1B/*1B	2	*1/*1	2	*2A/*2A	2	*3/*3	0
P2	*1B/*1B	2	*1/*1	2	*2A/*2A	2	*3/*3	0
P3	*1B/*1B	2	*1/*1	2	*2A/*4	1	*1/*1	2
P4	*1B/*1B	2	*1/*1	2	*2A/*2A x N	3	*3/*3	0
P5	*1B/*1B	2	*1/*1	2	*1/*4	1	*1/*3	1
P6	*1B/*1B	2	*1/*2	1	*1/*9	1	*3/*3	0
P7	*1B/*1B	2	*1/*2	1	*1/*9	1	*3/*3	0
P8	*1B/*1B	2	*1/*1	2	*1/*2A	2	*3/*3	0
P9	*1B/*2A	1	*1/*1	2	*2A/*2A	2	*1/*3	1
P10	*1/*1B	2	*1/*1	2	*2A/*2A	2	*3/*3	0
P11	*1/*1B	2	*1/*3	1	*2A/*35A	2	*3/*3	0
P12	*1B/*1B	2	*1/*2	1	*1/*35A	2	*3/*3	0
P13	*1B/*2A	1	*1/*1	2	NI	NI	*3/*3	0
P14	*1B/*2A	1	*1/*1	2	*1/*1	2	*3/*3	0
P15	*1B/*1B	2	*1/*1	2	*1/*1	2	*1/*1	2
P16	*2A/*17	2	*1/*1	2	*1/*2A	2	*1/*3	1
P17	*1B/*1B	2	*1/*2	1	*1/*3	1	*3/*3	0
P18	*1B/*1B	2	*1/*2	1	*1/*3	1	*3/*3	0
P19	*1B/*17	2	*1/*1	2	*1/*2A	2	*3/*3	0
P20	*1B/*2A	1	*1/*2	1	*1/*2A	2	*1/*3	1
P21	*1B/*1B	2	*1/*1	2	*1/*1	2	*1/*1	2
P22	*1B/*1B	2	*1/*1	2	*1/*2A	2	*3/*3	0
P23	*1B/*17	2	*1/*1	2	*2A/*17	1	*3/*3	0
P24	*1B/*1B	2	*1/*1	2	*1/*4	1	*3/*3	0
P25	*1/*1	2	*1/*2	1	*1/*1	2	*3/*3	0
P26	*1B/*17	2	*1/*2	1	*1/*4	1	*1/*3	1
P27	*1B/*17	2	*1/*1	2	*1/*4	1	*1/*3	1
P28	*1B/*1B	2	*1/*1	2	*4/*41	0	*3/*3	0
P29	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
P30	*1B/*1B	2	*1/*1	2	*4/*9	0	*1/*3	1

Se indica los haplotipos identificados para CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 y CYP3A5 seguidos de los estados metabolizadores asignados donde se codificaron con 3 (metabolizador ultrarrápido), 2 (metabolizador extensivo), 1 (metabolizador intermedio), 0 (metabolizador pobre), NI: No identificado.

ANEXO 6. Datos crudos variantes alélicas CYP2D6.

Referecia	CYP2D6*17	CYP2D6*4 y *10	CYP2D6*-	CYP2D6*-	CYP2D6*4	CYP2D6*35	CYP2D6*12	CYP2D6*11	CYP2D6*7	CYP2D6*44	CYP2D6*9	CYP2D6*38	CYP2D6*3	CYP2D6*19	CYP2D6*6	CYP2D6*-	CYP2D6*29	CYP2D6*41	CYP2D6*42	CYP2D6*56	CYP2D6*20	CYP2D6*8	CYP2D6*14	
Paciente	rs28371706	rs1065852	rs1135840	rs16947	rs3892097	rs769258	rs5030862	rs201377835	rs5030867	rs72549349	hCV32407229	rs72549351	rs35742686	rs72549353	rs5030655	rs1080985	rs59421388	rs28371725	rs72549346	rs147960066	rs72549354	rs5030865	rs5030865	Haplotipo
P1	G/G	G/G	G/G	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	C/C	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*2A/*2A
P2	G/G	G/G	G/G	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	C/C	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*2A/*2A
P3	G/G	A/G	G/G	A/G	C/T	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/C	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*2A/*4
P4	G/G	G/G	G/G	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	C/C	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*2A/*2A x N
P5	G/G	A/G	C/G	G/G	C/T	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/G	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*1/*4
P6	G/G	G/G	C/C	G/G	C/C	NOAMP	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/-	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/G	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*1/*9
P7	G/G	G/G	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/-	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/G	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*1/*9
P8	G/G	G/G	C/G	A/G	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/C	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*1/*2A
P9	G/G	G/G	G/G	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	C/C	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*2A/*2A
P10	G/G	G/G	G/G	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	C/C	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*2A/*2A
P11	G/G	G/G	G/G	A/A	C/C	C/T	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	C/C	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*2A/*35A
P12	G/G	G/G	C/G	A/G	C/C	C/T	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/C	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*1/*35A
P13	G/G	G/G	C/G	G/G	C/T	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/G	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	NI
P14	G/G	G/G	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/G	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*1/*1
P15	G/G	G/G	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/G	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*1/*1
P16	G/G	G/G	C/G	A/G	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/C	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*1/*2A
P17	G/G	G/G	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/-	AGTT/AGTT	A/A	G/G	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*1/*3
P18	G/G	G/G	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/-	AGTT/AGTT	A/A	G/G	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*1/*3
P19	G/G	G/G	C/G	A/G	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/C	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*1/*2A
P20	G/G	G/G	C/G	A/G	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/C	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*1/*2A
P21	G/G	G/G	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/G	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*1/*1
P22	G/G	G/G	C/G	A/G	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/C	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*1/*2A
P23	G/A	G/G	G/G	A/A	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/C	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*2A/*17
P24	G/G	A/G	C/G	G/G	C/T	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/G	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*1/*4
P25	G/G	G/G	NOAMP	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/G	C/C	NOAMP	-/-	G/G	-/-	NOAMP	NOAMP	*1/*1
P26	G/G	A/G	C/G	G/G	C/T	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/G	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*1/*4
P27	G/G	A/G	C/G	G/G	C/T	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/G	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*1/*4
P28	G/G	A/G	G/G	A/G	C/T	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/TCT	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/G	C/C	C/T	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*4/*41
P29	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP
P30	G/G	A/G	C/G	G/G	C/T	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	TCT/-	AGTC/AGTC	T/T	AGTT/AGTT	A/A	G/G	C/C	C/C	-/-	G/G	-/-	C/C	C/C	*4/*9

Se describen los resultados de las 23 sondas para CYP2D6, en la última columna se indican los haplotipos correspondientes. NOAMP: no amplificó. -delección. NI: genotipo no identificado. Paciente 13, no fue posible realizar asignación de genotipo..

ANEXO 7. Detalles modelamiento molecular

Para las dos pacientes metabolizadoras pobres se estableció si los SNPs identificados generaban cambios en la proteína.

Variantes generadas por los SNPs en la paciente P28

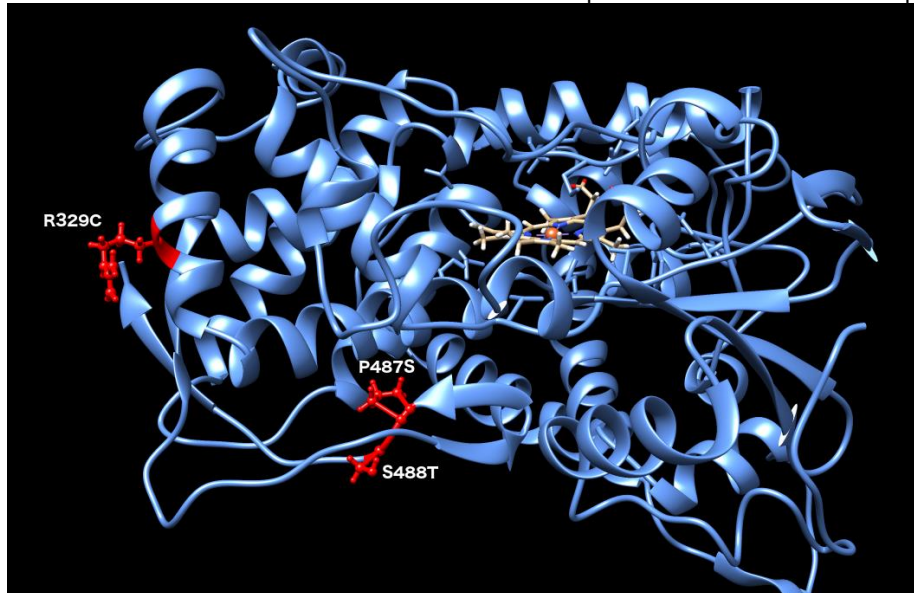
En la posición 488 cambia S (serina) a T (treonina)

En la posición 329 cambia R (arginina) a C (cisteína)

En la posición 487 cambia P (prolina) a S (serina)

Al ubicar los cambios de aminoácido (marcados en rojo) sobre la proteína (estructura en azul) se identificó que los cambios están lejos del sitio de interacción de la proteína y TAM (Molécula en beige) Figura 3-7.

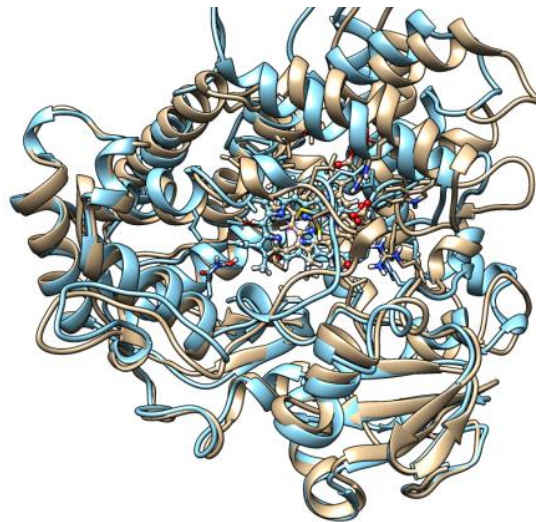
Figura 3-7. Ubicación de los SNP sobre la enzima CYP2D6 de la paciente P28 metabolizadora pobre.



Fuente: Facilitada por Ph. D Juvenal Yosa 28 enero 2017.

Al realizar una sobre posición de la estructura de CYP2D6 generada con los SNPs identificados en la paciente P28 (Lazo azul) y la proteína CYP2D6 nativa (Lazo beige), se evidencia un cambio en la estructura de la proteína, mostrado por la aparición de lazos no solapados en la Figura 3-8.

Figura 3-8. Estructura de la proteína CYP2D6 nativa sobrepuesta a la estructura de la proteína de la paciente P28 con los cambios generados por los SNPs identificados.



Fuente: Facilitada por Ph D., Juvenal Yosa 28 enero 2017.

Al realizar la dinámica molecular se encontró que los SNPs identificados en la paciente P28, hacen que la dinámica de la proteína sea más rígida, hecho que podría incidir en la entrada de tamoxifeno en el sitio activo de CYP2D6. De igual forma, para la evaluación de las variantes generadas por los SNPs en la paciente P30 se encontró que:

En la posición 488 cambia S (serina) a T (treonina)

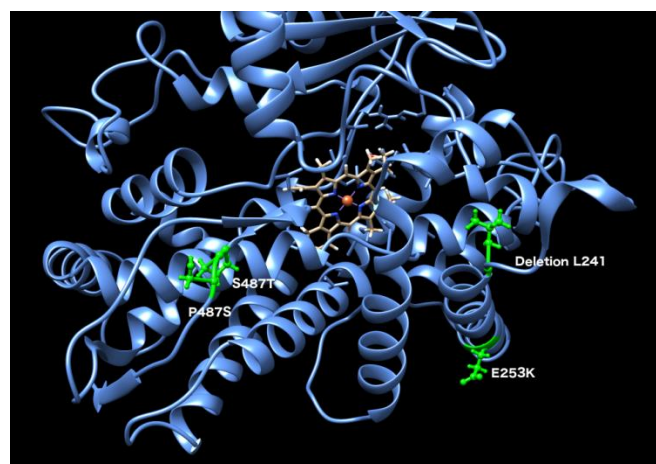
En la posición 253 cambia E (glutámico) a K (lisina)

En la posición 487 cambia P (prolina) a S (serina)

En la posición 241 Delección de L (leucina)

Al ubicar los cambios de aminoácido sobre la proteína (marcados en verde) se identificó que los cambios están lejos del sitio de interacción de la proteína y TAM en la Figura 3-9.

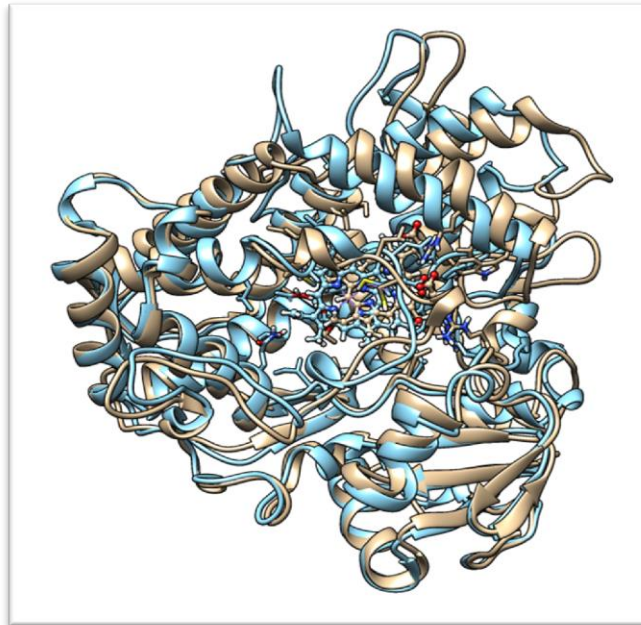
Figura 3-9. Ubicación de los SNP sobre la enzima CYP2D6 de la paciente pobre metabolizadora P30



Fuente: Facilitada por Ph. D Juvenal Yosa 28 enero 2017.

Al realizar una sobre posición de la estructura generada con los SNPs identificados en CYP2D6 en la paciente P28 (Lazo azul) y la proteína CYP2D6 nativa (Lazo beige), se evidencia un cambio en la estructura de la proteína, mostrado por la aparición de los lazos no solapados Figura 3-10.

Figura 3-10. Estructura de la proteína CYP2D6 nativa sobrepuesta a la estructura de la proteína de la paciente P30 con los cambios generados por los SNPs identificados.



Fuente: Facilitada por Ph. D Juvenal Yosa 28 enero 2017.

Al realizar el modelamiento molecular se encontró que los SNPs identificados en la paciente P30, probablemente afectan la funcionalidad de la proteína CYP2D6 a causa de la deleción en la posición 241 (L-del), al producir un cambio significativo en la dinámica de la proteína manteniendo uno de los túneles, cerrado. Además, un posible efecto para esta deleción, podría ser modificar el reconocimiento de ligando.

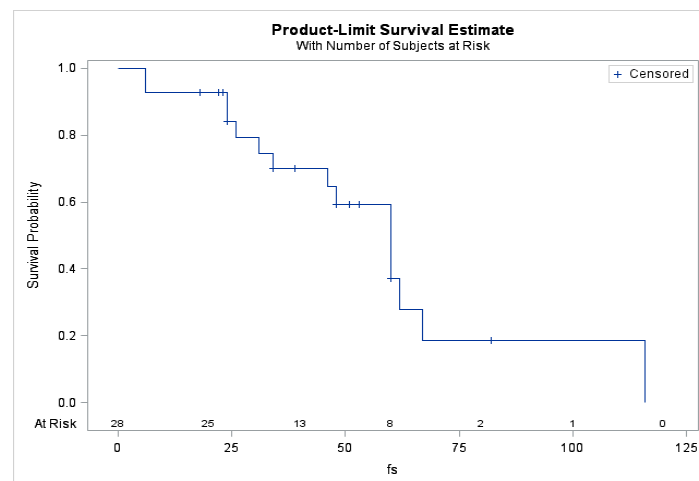
Se encontró que los SNPs identificados en la paciente P28, hacen que la dinámica de la proteína sea más rígida, hecho que podría incidir en la entrada de tamoxifeno en el sitio activo de CYP2D6. De igual forma, para la evaluación de las variantes generadas por los SNPs en la paciente P30 se encontró que los SNPs identificados en la paciente, probablemente afectan la funcionalidad de la proteína CYP2D6 a causa de la deleción en la posición 241 (L-del), al producir un cambio significativo en la dinámica de la proteína manteniendo uno de los túneles, cerrado. Además, un posible efecto de esta deleción, podría ser modificar el reconocimiento de ligando.

ANEXO 8. Análisis de sobrevida evaluando como desenlace tiempo de suspensión de tratamiento

Al evaluar asociación entre concentración de endoxifeno y tiempo de consumo de tamoxifeno, mediante análisis de supervivencia, no se encontró evidencia estadísticamente significativa, Figura 5-1. Adicionalmente se evaluaron las diferentes combinaciones de fenotipos de CYP2D6 y CYP2C19 con la prueba de Log-Rank, contrastando el tiempo de suspensión de tratamiento, datos mostrados en la Figura 5-2, encontrando que en el caso de pacientes con metabolismo extensivo para CYP2C9 (CYP2C9=2) y metabolizadoras ultrarrápidas para CYP2D6 (CYP2D6=3), categoría donde se encontró una paciente, se evidencio suspensión más rápida contrastada con las demás pacientes Figura 5-2.

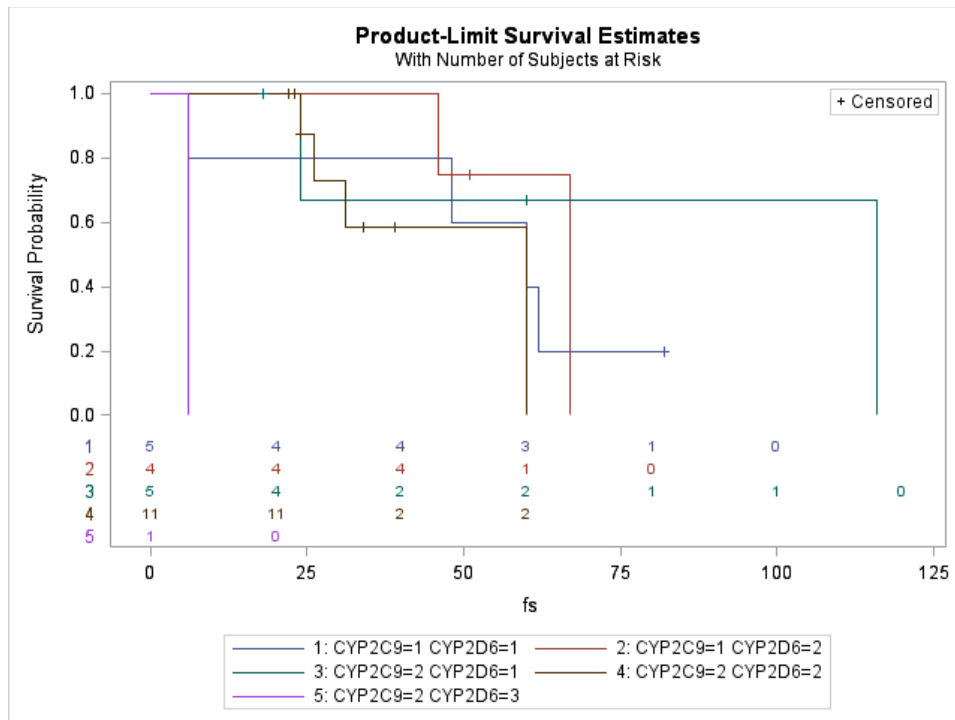
Al evaluar las particularidades de esta paciente se identifico que los efectos secundarios que presento fueron engrosamiento de endometrio y sangrados profusos, razón por la cual, debio interrumpir el consumo de tamoxifeno, esto nos hace pensar que, por el fenotipo de esta paciente, se podría sugerir al médico tratante realizar un ajuste de dosis para evidenciar beneficio terapéutico en la paciente y así reducir o incluso evitar los efectos secundarios.

Figura 5-1. Análisis de sobrevida entre concentración de endoxifeno y tiempo de consumo de tamoxifeno



Análisis supervivencia, no se evidencia relación entre el tiempo de consumo de TAM y la concentración de endoxifeno.

Figura 5-2. Análisis de supervivencia, fenotipos de CYP2D6, CYP2C9 versus fecha de suspensión consumo de tamoxifeno



Estimador de supervivencia, donde se contrastan los estados metabolizadores vs tiempo transcurrido para la suspensión del consumo de tamoxifeno. 1: CYP2C9=1 CYP2D6=1 (Metabolizador intermedio para los dos genes), 2: CYP2C9=1 CYP2D6=2 (metabolizador intermedio- metabolizador normal), 3: CYP2C9=2 CYP2D6=1 (metabolizador extensivo-metabolizador intermedio), 4: CYP2C9=2 CYP2D6=2 (metabolizador extensivo para los dos genes), 5: CYP2C9=2 CYP2D6=3 (metabolizador extensivo-metabolizador ultrarrápido), fs (tiempo de suspensión). Apoyado Doctor Edgar Benítez.

Adicionalmente, comparando la concentración de endoxifeno y tiempo de suspensión (fs), no se evidencia asociación Figura 5-1, por otra parte, tampoco se identificó diferencia en tiempo de permanencia en tratamiento con tamoxifeno, $p: 0.435$.

ANEXO 9. Descripción sondas y primer diseñados.

A continuación se indican las secuencias de cada juego de primers y sondas.

- **Las variantes CYP2D6*3, CYP2D6*4 y CYP2D6*5:** fueron identificadas mediante el kit Light Mix CYP2D6*3*4 de Roche.

Para las demás variantes se optó por adquirir el servicio de síntesis con Roche, para cada SNP de manera individual, mediante los siguientes juegos de primers y sondas.

CYP2D6 *9:

Primer F: 5` CAAGGTCCTACGCTTCCAAA
 Primer R: 5` GGCAGAGATGGAGcGTGAGAGTGGCTG
 Sonda: 5` TGGGGGGCAAGGGTGGTGGGTTG

CYP2D6 *17:

Primer F: 5`GCCCCTGGCCgTGATAGTGGCCATC
 Primer R: 5`GTGGACCTGATGCACCGGCGCCA
 Sonda: 5`TCGGTGTGCTGAGAGTGCCTGCCTG

CYP2D6*29:

Primer F: 5` gAggCAAgAAggAgTgTCA
 Primer R: 5` gTggTgTAgggCATgTgA
 Sonda: 5` LC610-ggTgCggCgACCAgAgATg—PH
 Sonda: 5` ggAgATCgACgACATgATAgggC--FL

CYP2D6 *41:

Primer F: 5` AAgAAgTCgCTggAgCAgTg
 Primer R: 5` CACggCTTTgTCCAAGAgA
 Sonda: 5` 6FAM-CggTgggTgATgggCAgAAgggC--BBQ

Adicionalmente se diseñó las sondas y primers para la variante CYP2D6 *2A como variante wild type.

Primer F: 5`CAgTggCTCAggCCTgTA
 Primer R: 5`gTgCTgggATTATAggCATg
 Sonda: 5` TTgTAgAgACCCggTTCTTCCA—FL "C"
 Sonda: 5` LC610-gTTgTCCAggCTggTCTTgAATTCC—PH

Se realizó compensación de color para el equipo Ligh Cycle 480 II mediante el kit: 5997704001 ColorCompensation 530/640/670/690 TIB, con el programa de corrida indicado por el fabricante .

Los canales compensados fueron 515: Fluor, 610: LC red, 640: LC red y 690:LC red. Se realizó el corrido de cada juego de primers y sondas, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para la temperatura de anillamiento se empleó la temperatura de los primers dividido en dos y sumándole dos unidades, se realizó el alineamiento en la amplificación para garantizar especificidad y correcto alineamiento, simultáneamente se estandarizaron las mejores condiciones de corrida.

Las características del protocolo de corrida, concentración y volumen de reacción son mostradas a continuación:

20 µL reaction mixture			Parameter	Value			Parameter	Value		
Primer F	0.5	µM	Cycles	40-50			Cycles	1		
Primer R	0.5	µM	Analysis Mode	<i>Quantification</i>			Analysis Mode	<i>Melting Curve</i>		
HybProbe 3LC	0.15	µM		<i>Segment</i>				<i>Segment</i>		
HybProbe 3LC	0.15	µM		1	2	3		1	2	3
TM/SP	0.5-1.0	µM	Target Temp [°C]	95	57	72	Target Temp [°C]	95	40	85
MgCl ₂	3-4	mM	Incubation Time [sec]	5	10	10	Incubation Time [sec]	20	20	0
Roche Diagnostics FastStart contains 1.0 mM of MgCl ₂			Transition Rate [°C/s] 96 well	4.4	2.2	4.4	Transition Rate [°C/s]	4.4	1.5	-
			Acquisition Mode	none	single	none	Acquisition Mode	none	none	cont
							Acquisitions/ °C			X

Initial heating for 5-10 min at 95°C recommended. Finally the Rotor should be cooled down to 40°C for 30 s

Fuente: Protocolo sugerido Roche.

La concentración de primers fue de 0,5uM

La concentración de sondas fue de 0,15uM

La enzima que se empleo fue LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe.

ANEXO 10. Costos de prueba molecular que incluye 3 SNPs y de eventos asociados al tratamiento de cáncer de seno.

Los costos de procesar 3 SNPs fueron realizados teniendo en cuenta los costos de las sondas, primers y demás reactivos para el procesamiento.

DESCRIPCION	UNIDADES	valor	Valor por Muestra	VALOR 3 SNPs
LightMix CYP2D6*3*4 x 96 reacciones	1	2500000	26041,7	100000
MASTER X96 Reacciones	1	750000	7812,5	
PRIMERS	5PARES	80000	400,0	
SONDAS	5	463000	4630,0	
FastStart Essential DNA Probes Master x 500 reacciones	1	1115000	2230,0	

Teniendo en cuenta que cada prueba se debe procesar en reacción independiente, con sus controles y por triplicado.

Por otra parte para la estimación de costos asociados a los efectos secundarios, se tomaron los costos farmacoeconómicos reportadas en las Guías de práctica clínica de cáncer de mama del Instituto Nacional de Cancerología del 2013, donde basados en la perspectiva de evaluación económica del tercero pagador, incluyen costos directos expresados en pesos colombianos para el 2012, se reportan los costos de los eventos adversos y demás desenlaces asociados a tratamiento con tamoxifeno, para la actualización de costos, se realizó el respectivo ajuste teniendo en cuenta el IPC (Índice de Precios al Consumidor) del DANE, actualizando las cifras hasta agosto de 2017.

GUIA INC 2012	2012 INC	2013/1,94	2014/3,7	2015/6,8	2016/ 5,75	2017Pagosto/3,	Agosto de 2017
IPC		1,94	3,7	6,8	5,75	3,4	
Diagnóstico inicial y de extensión	1.101.137,52	21362,06789	40742,08824	74877,35136	63315,4074	37438,67568	1.338.873,11
Tratamiento de hormonoterapia preme	4.362.644,32	84635,29981	161417,8398	296659,8138	250852,0484	148329,9069	5.304.539,23
Tratamiento de hormonoterapia posme	7.160.604,49	138915,7271	264942,3661	486921,1053	411734,7582	243460,5527	8.706.579,00
Rehabilitación	296.575,60	5753,56664	10973,2972	20167,1408	17053,097	10083,5704	360.606,27
Seguimiento 5 años	808.534,89	15685,57687	29915,79093	54980,37252	46490,75618	27490,18626	983.097,57
Costos recaída sistémica							
Diagnóstico inicial y de extensión	657.458,27	12754,69044	24325,95599	44707,16236	37803,85053	22353,58118	799.403,51
Tratamiento de quimioterapia	113.765.166,20	2207044,224	4209311,149	7736031,302	6541497,057	3868015,651	138.327.065,58
Tratamiento de radioterapia	3.493.774,00	67779,2156	129269,638	237576,632	200892,005	118788,316	4.248.079,81
Tratamiento de hormonoterapia preme	3.011.417,13	58421,49232	111422,4338	204776,3648	173156,485	102388,1824	3.661.582,09
Tratamiento de hormonoterapia posme	8.067.416,69	156507,8838	298494,4175	548584,3349	463876,4597	274292,1675	9.809.171,95
Cuidado paliativo	4.677.272,38	90739,08417	173059,0781	318054,5218	268943,1619	159027,2609	5.687.095,49
Rehabilitación	1.522.233,09	29531,32195	56322,62433	103511,8501	87528,40268	51755,92506	1.850.883,21
Seguimiento	1.522.233,09	29531,32195	56322,62433	103511,8501	87528,40268	51755,92506	1.850.883,21
TOTAL \$	136.716.970,83	2652309,234	5058527,921	9296754,016	7861225,823	4648377,008	166.234.164,83
Costos recaída local							
Diagnóstico inicial y de extensión	657.458,27	12754,69044	24325,95599	44707,16236	37803,85053	22353,58118	799.403,51
Tratamiento quirúrgico	1.938.642,56	37609,66566	71729,77472	131827,6941	111471,9472	65913,84704	2.357.195,49
Tratamiento de quimioterapia	56.882.583,10	1103522,112	2104655,575	3868015,651	3270748,528	1934007,825	69.163.532,79
Tratamiento de radioterapia	4.885.907,84	94786,6121	180778,5901	332241,7331	280939,7008	166120,8666	5.940.775,34
Tratamiento de hormonoterapia preme	3.011.417,13	58421,49232	111422,4338	204776,3648	173156,485	102388,1824	3.661.582,09
Tratamiento de hormonoterapia posme	8.067.416,69	156507,8838	298494,4175	548584,3349	463876,4597	274292,1675	9.809.171,95
Rehabilitación	988.054,41	19168,25555	36558,01317	67187,69988	56813,12858	33593,84994	1.201.375,36
TOTAL \$							92.933.036,53
Costo trombo embolismo venoso	2.958.332,00	57391,6408	109458,284	201166,576	170104,09	100583,288	3.597.035,88
Costo cáncer de endometrio	97.624.387,97	1893913,127	3612102,355	6638458,382	5613402,308	3319229,191	118.701.493,33
Costo evento cardiovascular	2.961.385,97	57450,88782	109571,2809	201374,246	170279,6933	100687,123	3.600.749,20
Costo fractura	2.226.469,82	43193,51451	82379,38334	151399,9478	128022,0147	75699,97388	2.707.164,65
Costo trombo embolismo pulmonar	3.806.955,97	73854,94582	140857,3709	258873,006	218899,9683	129436,503	4.628.877,76

Costos asociados a eventos en pacientes tratadas con tamoxifeno, tomados de la guía de manejo del Instituto Nacional de Cancerología del 2013, que reporta los costos para el 2012, se realiza la actualización de precios basados en el IPC (Índice de precios al consumidor) del DANE para cada año hasta agosto del 2017 y se suman los valores para establecer el total a la fecha, cifra mostrada en la última columna sombreada con azul.

Asistencia a eventos

- Simposio de Investigación en Posgrados en Biotecnología UN. Presentación oral. Bogotá. 17 de octubre de 2017.
- Día de la Investigación 2016, Fundación Cardioinfantil, Fundación Neumológica Colombiana. Poster. Bogotá 10-11 Noviembre de 2016
- V Jornadas de investigación en cáncer. Poster. Cali. 13-15 de octubre de 2016.
- VII Congreso de la sociedad española de farmacogenética y farmacogenómica. Poster. Madrid. 20 y 21 de abril de 2015.

Bibliografía

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*. 2015;136(5).
2. Washburn AL, Shia WW, Lenkeit KA, Lee SH, Bailey RC. Multiplexed cancer biomarker detection using chip-integrated silicon photonic sensor arrays. *The Analyst*. 2016;141(18):5358-65.
3. Nigenda G, Gonzalez-Robledo MC, Gonzalez-Robledo LM, Bejarano-Arias RM. Breast cancer policy in Latin America: account of achievements and challenges in five countries. *Globalization and health*. 2016;12(1):39.
4. (COLCIENCIAS) MdSyPS-DAdCTeS. Guía de practica clínica (GPC) para la detección temprana, tratamiento integral, seguimiento y rehabilitación del cáncer de mama. ISBN: 978-958-57937-7-4 ed2013. p. Versión completa,.
5. Gupta M, Kiruthiga KG. Malignant mixed Mullerian tumour of uterus secondary to tamoxifen therapy for hormone responsive breast cancer. *BMJ case reports*. 2015;2015.
6. Akduman AT, Ozerkan K, Zik B, Peker S, Avci B, Ata B. Effect of tamoxifen on ovarian reserve: A randomized controlled assessor-blind trial in a mouse model. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*. 2014;15(4):228-32.
7. Liu J, Jiang W, Mao K, An Y, Su F, Kim BY, et al. Elevated risks of subsequent endometrial cancer development among breast cancer survivors with different hormone receptor status: a SEER analysis. *Breast cancer research and treatment*. 2015;150(2):439-45.
8. Eckermann SD, Martin AJ, Stockler MR, Simes RJ. The benefits and costs of tamoxifen for breast cancer prevention. *Australian and New Zealand journal of public health*. 2003;27(1):34-40.
9. Phillips KA, Lindeman GJ. Breast cancer prevention for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: is there a role for tamoxifen? *Future oncology (London, England)*. 2014;10(4):499-502.
10. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Cecchini RS, Cronin WM, Robidoux A, et al. Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(22):1652-62.
11. Visvanathan K, Chlebowski RT, Hurley P, Col NF, Ropka M, Collyar D, et al. American society of clinical oncology clinical practice guideline update on the use of pharmacologic interventions including tamoxifen, raloxifene, and aromatase inhibition for breast cancer risk reduction. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(19):3235-58.
12. Liu Y, Malin JL, Diamant AL, Thind A, Maly RC. Adherence to adjuvant hormone therapy in low-income women with breast cancer: the role of provider-patient communication. *Breast cancer research and treatment*. 2013;137(3):829-36.
13. Cesuroglu T, Syurina E, Feron F, Krumeich A. Other side of the coin for personalised medicine and healthcare: content analysis of 'personalised' practices in the literature. *BMJ open*. 2016;6(7):e010243.
14. Ortega JP. *Hispatología de la Glándula Mamaria*. ANDALUCÍA F, 37 CADIM, editors2011. 15-8, p.
15. Welsch U, Sobotta J. *Histología*: Ed. Médica Panamericana; 2008.
16. Mandujano Rangel A, Trejo Camacho B. *Anatomía y Fisiología del aparato reproductor masculino y femenino* 1983.
17. Streuli CH, Bailey N, Bissell MJ. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *The Journal of cell biology*. 1991;115(5):1383-95.
18. Viale G. The current state of breast cancer classification. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2012;23 Suppl 10:x207-10.
19. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast cancer research : BCR*. 2010;12(4):207.
20. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(6):1471-4.

21. Edge S, Byrd D, Compton C, Fritz A, Greene F, Trotti A. American Joint Committee on Cancer AJCC Cancer Staging Manual. 8th. Springer New York, NY.; 2010.
22. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of clinical oncology*. 2006;25(1):118-45.
23. Liu H. Application of immunohistochemistry in breast pathology: a review and update. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2014;138(12):1629-42.
24. Zaha DC. Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World journal of clinical oncology*. 2014;5(3):382-92.
25. Elkin EB, Hudis C, Begg CB, Schrag D. The effect of changes in tumor size on breast carcinoma survival in the U.S.: 1975-1999. *Cancer*. 2005;104(6):1149-57.
26. Allgood P, Duffy S, Warren R, Hunnam G. Audit of negative assessments in a breast-screening programme in women who later develop breast cancer—implications for survival. *The Breast*. 2006;15(4):503-9.
27. González Ortega JM, Morales Wong MM, López Cuevas Z, Díaz Valdéz M. Factores pronósticos del cáncer de mama. *Revista Cubana de Cirugía*. 2011;50(1):130-8.
28. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Annals of surgery*. 1994;220(3):391.
29. Haybittle JL, Blamey RW, Elston CW, Johnson J, Doyle PJ, Campbell FC, et al. A prognostic index in primary breast cancer. *British journal of cancer*. 1982;45(3):361-6.
30. Rakha EA, Soria D, Green AR, Lemetre C, Powe DG, Nolan CC, et al. Nottingham Prognostic Index Plus (NPI+): a modern clinical decision making tool in breast cancer. *British journal of cancer*. 2014;110(7):1688-97.
31. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 1992;22(3):207-19.
32. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galvan P, Fernandez A, Gaba L, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)*. 2015;24 Suppl 2:S26-35.
33. Ozsoy A, Barca N, Dolek BA, Aktas H, Elverici E, Araz L, et al. The Relationship Between Breast Cancer and Risk Factors: A Single-Center Study. *European journal of breast health*. 2017;13(3):145-9.
34. Duarte E, de Sousa B, Cadarso-Suarez C, Klein N, Kneib T, Rodrigues V. Studying the relationship between a woman's reproductive lifespan and age at menarche using a Bayesian multivariate structured additive distributional regression model. *Biometrical journal Biometrische Zeitschrift*. 2017.
35. Cuzick J, Sestak I, Baum M, Buzdar A, Howell A, Dowsett M, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *The lancet oncology*. 2010;11(12):1135-41.
36. Recht A, Gray R, Davidson NE, Fowble BL, Solin LJ, Cummings FJ, et al. Locoregional failure 10 years after mastectomy and adjuvant chemotherapy with or without tamoxifen without irradiation: experience of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*. 1999;17(6):1689-.
37. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet (London, England)*. 2013;381(9869):805-16.
38. Group EBCTC. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet*. 2005;365(9472):1687-717.
39. Gamboa Ó, Díaz S, Chicaíza L, García M. Análisis de costo-efectividad en Colombia de anastrozol Vs. tamoxifeno como terapia inicial en mujeres con cáncer temprano de mama y receptor hormonal positivo. *Biomédica*. 2010;30(1):46-55.
40. Aiello Bowles EJ, Boudreau DM, Chubak J, Yu O, Fujii M, Chestnut J, et al. Patient-reported discontinuation of endocrine therapy and related adverse effects among women with early-stage breast cancer. *Journal of oncology practice*. 2012;8(6):e149-57.

41. Klopp-Schulze L, Joerger M, Wicha SG, Ter Heine R, Csajka C, Parra-Guillen ZP, et al. Exploiting Pharmacokinetic Models of Tamoxifen and Endoxifen to Identify Factors Causing Subtherapeutic Concentrations in Breast Cancer Patients. *Clinical pharmacokinetics*. 2017.
42. Li W, Shi X, Xu Y, Wan J, Wei S, Zhu R. Tamoxifen promotes apoptosis and inhibits invasion in estrogenpositive breast cancer MCF7 cells. *Molecular medicine reports*. 2017.
43. Gordon A, Aguilar R, Garrido-Gracia JC, Guil-Luna S, Sanchez-Céspedes R, Millan Y, et al. Activation of estrogen receptor-alpha induces gonadotroph progesterone receptor expression and action differently in young and middle-aged ovariectomized rats. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2009;24(10):2618-28.
44. Muhammad A, Ibrahim MA, Erukainure OL, Malami I, Sani H, Mohammed HA. Metabolism and toxicological implications of commonly used chemopreventive drugs against breast cancer/carcinogenesis. *Current drug metabolism*. 2016.
45. Iusuf D, Teunissen SF, Wagenaar E, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH. P-glycoprotein (ABCB1) transports the primary active tamoxifen metabolites endoxifen and 4-hydroxytamoxifen and restricts their brain penetration. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2011;337(3):710-7.
46. Yeniceli D, Deng X, Adams E, Dogrukol-Ak D, Van Schepdael A. Development of a CD-MEKC method for investigating the metabolism of tamoxifen by flavin-containing monooxygenases and the inhibitory effects of methimazole, nicotine and DMXAA. *Electrophoresis*. 2013;34(3):463-70.
47. Higgins MJ, Rae JM, Flockhart DA, Hayes DF, Stearns V. Pharmacogenetics of tamoxifen: who should undergo CYP2D6 genetic testing? *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2009;7(2):203-13.
48. Goetz MP, Rae JM, Suman VJ, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, et al. Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(36):9312-8.
49. Ariza Márquez YV, Briceño Balcázar I, Ancízar Aristizábal F. Treatment of breast cancer and pharmacogenetics. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2016;18(1):121-34.
50. Cariaso M, Lennon G. SNPedia: a wiki supporting personal genome annotation, interpretation and analysis. *Nucleic acids research*. 2011;40(D1):D1308-D12.
51. de Montellano PRO, De Voss JJ. Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P450. *Natural product reports*. 2002;19(4):477-93.
52. Fernández AG, de Sande García MA, Fernández AMM, Ramos SB, Galán MJG. Aspectos fundamentales del Citocromo P450: FUNDACIÓN TEJERINA; 2011.
53. Sirim D, Widmann M, Wagner F, Pleiss J. Prediction and analysis of the modular structure of cytochrome P450 monooxygenases. *BMC structural biology*. 2010;10(1):34.
54. Lewis D, Eddershaw P, Goldfarb P, Tarbit M. Molecular modelling of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) based on an alignment with CYP102: structural studies on specific CYP2D6substrate metabolism. *Xenobiotica*. 1997;27(4):319-40.
55. Fukuyoshi S KM, Watanabe Y, et al. Molecular Dynamics Simulations to Investigate the Influences of Amino Acid Mutations on Protein Three-Dimensional Structures of Cytochrome P450 2D6.1, 2, 10, 14A, 51, and 62. *PLoS ONE*. 2016;11(4).
56. Kirchheiner J, Tshuridu M, Jabrane W, Roots I, Brockmöller J. The CYP2C9 polymorphism: from enzyme kinetics to clinical dose recommendations. *Personalized Medicine*. 2004;1(1):63-84.
57. Scott SA, Sangkuhl K, Stein C, Hulot JS, Mega J, Roden D, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clinical pharmacology & therapeutics*. 2013;94(3):317-23.
58. Zembutsu H, Nakamura S, Akashi ST, Kuwayama T, Watanabe C, Takamaru T, et al. Significant Effect of Polymorphisms in CYP2D6 on Response to Tamoxifen Therapy for Breast Cancer; a Prospective Multicenter Study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016.
59. Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2017;102(4):688-700.

60. Zhou S-F. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance. *Clinical pharmacokinetics*. 2009;48(12):761-804.
61. Ingelman-Sundberg M, Daly A, Nebert D. The human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature database. 2012.
62. Cifuentes RA, Murillo-Rojas J, Avella-Vargas E. Prediction of sensitivity to warfarin based on VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms in patients from different places in Colombia. *Biomedica*. 2016;36(1):91-100.
63. Desta Z, Zhao X, Shin J-G, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clinical pharmacokinetics*. 2002;41(12):913-58.
64. Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, et al. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2006;79(1):103-13.
65. Isaza C, Henao J, Martínez JH, Sepulveda Arias JC, Beltrán L. Phenotype-genotype analysis of CYP2C19 in Colombian mestizo individuals. *BMC clinical pharmacology*. 2007;7:6.
66. Rodríguez-Vicente AE, Lumbreras E, Hernández JM, Martín M, Calles A, Otín CL, et al. Pharmacogenetics and pharmacogenomics as tools in cancer therapy. Drug metabolism and personalized therapy. 2016;31(1):25-34.
67. Gaedigk A, Simon S, Pearce R, Bradford L, Kennedy M, Leeder J. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2008;83(2):234-42.
68. Isaza CA, Henao J, Lopez AM, Cacabelos R. Isolation, sequence and genotyping of the drug metabolizer CYP2D6 gene in the Colombian population. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*. 2000;22(9):695-705.
69. Jorge LF, Eichelbaum M, Griese EU, Inaba T, Arias TD. Comparative evolutionary pharmacogenetics of CYP2D6 in Ngawbe and Embera Amerindians of Panama and Colombia: role of selection versus drift in world populations. *Pharmacogenetics*. 1999;9(2):217-28.
70. Borbón Orjuela AR. Estudio del polimorfismo del citocromo 2d6 en una población colombiana. 2009.
71. Sánchez APS. Farmacogenética del CYP2D6 en la población colombiana en relación con las iberoamericanas: Universidad de Extremadura; 2015.
72. Sim SC, Ingelman-Sundberg M. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Human genomics*. 2010;4(4):278.
73. Dean L. Tamoxifen Therapy and CYP2D6 Genotype. In: Pratt V, McLeod H, Dean L, Malheiro A, Rubinstein W, editors. *Medical Genetics Summaries*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
74. Zanger UM, Fischer J, Raimundo S, Stuvén T, Evert BO, Schwab M, et al. Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6. *Pharmacogenetics*. 2001;11(7):573-85.
75. Zineh I, Beitelshes AL, Gaedigk A, Walker JR, Pauly DF, Eberst K, et al. Pharmacokinetics and CYP2D6 genotypes do not predict metoprolol adverse events or efficacy in hypertension. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2004;76(6):536-44.
76. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2004;369(1):23-37.
77. Borges S, Desta Z, Jin Y, Faouzi A, Robarge JD, Philips S, et al. Composite functional genetic and comedication CYP2D6 activity score in predicting tamoxifen drug exposure among breast cancer patients. *Journal of clinical pharmacology*. 2010;50(4):450-8.
78. López SE, Velasco DC, Amaro JAB. Revisión sistemática sobre la eficacia e impacto económico de las pruebas genéticas en el tratamiento del cáncer de mama y la depresión [Recurso electrónico]= A systematic review on efficacy and economic impact of genetic tests in breast cancer and depression treatments. 2010.

79. Kiyotani K, Mushiroda T, Zembutsu H, Nakamura Y. Important and critical scientific aspects in pharmacogenomics analysis: lessons from controversial results of tamoxifen and CYP2D6 studies. *Journal of human genetics*. 2013;58(6):327-33.
80. Terasawa T, Dahabreh I, Castaldi PJ, Trikalinos TA. AHRQ Technology Assessments. Systematic Reviews on Selected Pharmacogenetic Tests for Cancer Treatment: CYP2D6 for Tamoxifen in Breast Cancer, KRAS for anti-EGFR antibodies in Colorectal Cancer, and BCR-ABL1 for Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2010.
81. Heller F. Genetics/genomics and drug effects. *Acta clinica Belgica*. 2013;68(2):77-80.
82. Klein DJ, Thorn CF, Desta Z, Flockhart DA, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: tamoxifen pathway, pharmacokinetics. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(11):643-7.
83. Ingle JN. Pharmacogenomics of endocrine therapy in breast cancer. *Journal of human genetics*. 2013;58(6):306-12.
84. Samer CF, Lorenzini KI, Rollason V, Daali Y, Desmeules JA. Applications of CYP450 testing in the clinical setting. *Molecular diagnosis & therapy*. 2013;17(3):165-84.
85. Chantry A-S, Quaranta S, Ciccolini J, Lacarelle B, editors. Applications cliniques, limites et perspectives des analyses pharmacogénétiques et pharmacocinétiques des traitements anticancéreux. *Annales de Biologie Clinique*; 2014.
86. Walko CM, McLeod HL. Personalizing medicine in geriatric oncology. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(24):2581-6.
87. Province MA, Altman RB, Klein TE. Interpreting the CYP2D6 results from the International Tamoxifen Pharmacogenetics Consortium. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2014;96(2):144-6.
88. Brauch H, Schwab M. Prediction of tamoxifen outcome by genetic variation of CYP2D6 in post-menopausal women with early breast cancer. *British journal of clinical pharmacology*. 2014;77(4):695-703.
89. de Vries Schultink AH, Zwart W, Linn SC, Beijnen JH, Huitema AD. Effects of Pharmacogenetics on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Tamoxifen. *Clinical pharmacokinetics*. 2015;54(8):797-810.
90. Binkhorst L, Mathijssen RH, Jager A, van Gelder T. Individualization of tamoxifen therapy: much more than just CYP2D6 genotyping. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(3):289-99.
91. Patel JN, Papachristos A. Personalizing chemotherapy dosing using pharmacological methods. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2015;76(5):879-96.
92. Sacco K, Grech G. Actionable pharmacogenetic markers for prediction and prognosis in breast cancer. *The EPMA journal*. 2015;6(1):15.
93. Del Re M, Citi V, Crucitta S, Rofi E, Belcari F, van Schaik RH, et al. Pharmacogenetics of CYP2D6 and tamoxifen therapy: Light at the end of the tunnel? *Pharmacological research*. 2016;107:398-406.
94. Cocca M, Bedognetti D, Bianca M, Gasparini P, Girotto G. Pharmacogenetics driving personalized medicine: analysis of genetic polymorphisms related to breast cancer medications in Italian isolated populations. *Journal of translational medicine*. 2016;14(1):22.
95. Kaplan M, Mahon SM. Tamoxifen benefits and CYP2D6 testing in women with hormone receptor-positive breast cancer. *Clinical journal of oncology nursing*. 2013;17(2):174-9.
96. Sensorn I, Sirachainan E, Chamnanphon M, Pasomsub E, Trachu N, Supavilai P, et al. Association of CYP3A4/5, ABCB1 and ABCC2 polymorphisms and clinical outcomes of Thai breast cancer patients treated with tamoxifen. *Pharmgenomics Pers Med*. 2013;6:93-8.
97. Chamnanphon M, Pechatanan K, Sirachainan E, Trachu N, Chantratita W, Pasomsub E, et al. Association of CYP2D6 and CYP2C19 polymorphisms and disease-free survival of Thai post-menopausal breast cancer patients who received adjuvant tamoxifen. *Pharmgenomics Pers Med*. 2013;6:37-48.
98. Fernandez-Santander A, Gaibar M, Novillo A, Romero-Lorca A, Rubio M, Chicharro LM, et al. Relationship between genotypes Sult1a2 and Cyp2d6 and tamoxifen metabolism in breast cancer patients. *PloS one*. 2013;8(7):e70183.

99. Rangel LB, Taraba JL, Frei CR, Smith L, Rodriguez G, Kuhn JG. Pharmacogenomic diversity of tamoxifen metabolites and estrogen receptor genes in Hispanics and non-Hispanic whites with breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2014;148(3):571-80.
100. ter Heine R, Binkhorst L, de Graan AJ, de Bruijn P, Beijnen JH, Mathijssen RH, et al. Population pharmacokinetic modelling to assess the impact of CYP2D6 and CYP3A metabolic phenotypes on the pharmacokinetics of tamoxifen and endoxifen. *British journal of clinical pharmacology*. 2014;78(3):572-86.
101. Abreu MH, Gomes M, Menezes F, Afonso N, Abreu PH, Medeiros R, et al. CYP2D6*4 polymorphism: A new marker of response to hormone therapy in male breast cancer? *Breast (Edinburgh, Scotland)*. 2015;24(4):481-6.
102. Dezentje VO, Opdam FL, Gelderblom H, Hartigh den J, Van der Straaten T, Vree R, et al. CYP2D6 genotype- and endoxifen-guided tamoxifen dose escalation increases endoxifen serum concentrations without increasing side effects. *Breast cancer research and treatment*. 2015;153(3):583-90.
103. Binkhorst L, Kloth JSL, de Wit AS, de Bruijn P, Lam MH, Chaves I, et al. Circadian variation in tamoxifen pharmacokinetics in mice and breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment*. 2015;152(1):119-28.
104. Powers JL, Buys SS, Fletcher D, Melis R, Johnson-Davis KL, Lyon E, et al. Multigene and Drug Interaction Approach for Tamoxifen Metabolite Patterns Reveals Possible Involvement of CYP2C9, CYP2C19, and ABCB1. *Journal of clinical pharmacology*. 2016;56(12):1570-81.
105. Johansson H, Gandini S, Serrano D, Gjerde J, Lattanzi M, Macis D, et al. A pooled analysis of CYP2D6 genotype in breast cancer prevention trials of low-dose tamoxifen. *Breast cancer research and treatment*. 2016;159(1):97-108.
106. Hertz DL, Deal A, Ibrahim JG, Walko CM, Weck KE, Anderson S, et al. Tamoxifen Dose Escalation in Patients With Diminished CYP2D6 Activity Normalizes Endoxifen Concentrations Without Increasing Toxicity. *The oncologist*. 2016;21(7):795-803.
107. Sutiman N, Lim JS, Muerdter TE, Singh O, Cheung YB, Ng RC, et al. Pharmacogenetics of UGT1A4, UGT2B7 and UGT2B15 and Their Influence on Tamoxifen Disposition in Asian Breast Cancer Patients. *Clinical pharmacokinetics*. 2016;55(10):1239-50.
108. Cocca M, Bedognetti D, La Bianca M, Gasparini P, Girotto G. Pharmacogenetics driving personalized medicine: analysis of genetic polymorphisms related to breast cancer medications in Italian isolated populations. *J Transl Med*. 2016;14:22.
109. Lim JS, Sutiman N, Muerdter TE, Singh O, Cheung YB, Ng RC, et al. Association of CYP2C19*2 and associated haplotypes with lower norendoxifen concentrations in tamoxifen-treated Asian breast cancer patients. *British journal of clinical pharmacology*. 2016;81(6):1142-52.
110. Saladores P, Muerdter T, Eccles D, Chowbay B, Zgheib NK, Winter S, et al. Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. *The pharmacogenomics journal*. 2015;15(1):84-94.
111. Alcazar-Gonzalez GA, Calderon-Garciduenas AL, Garza-Rodriguez ML, Rubio-Hernandez G, Escorza-Trevino S, Olano-Martin E, et al. Comparative study of polymorphism frequencies of the CYP2D6, CYP3A5, CYP2C8 and IL-10 genes in Mexican and Spanish women with breast cancer. *Pharmacogenomics*. 2013;14(13):1583-92.
112. Weng L, Ziliak D, Im HK, Gamazon ER, Philips S, Nguyen AT, et al. Genome-wide discovery of genetic variants affecting tamoxifen sensitivity and their clinical and functional validation. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2013;24(7):1867-73.
113. Wu HY, Karnik S, Subhadarshini A, Wang Z, Philips S, Han X, et al. An integrated pharmacokinetics ontology and corpus for text mining. *BMC bioinformatics*. 2013;14:35.
114. Province MA, Goetz MP, Brauch H, Flockhart DA, Hebert JM, Whaley R, et al. CYP2D6 genotype and adjuvant tamoxifen: meta-analysis of heterogeneous study populations. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2014;95(2):216-27.
115. Zhang W, Xu J, Shi Y, Sun Q, Zhang Q, Guan X. The novel role of miRNAs for tamoxifen resistance in human breast cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2015;72(13):2575-84.

116. Wei Y, Lai X, Yu S, Chen S, Ma Y, Zhang Y, et al. Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*. 2014;147(2):423-31.
117. Li J, Lei K, Wu Z, Li W, Liu G, Liu J, et al. Network-based identification of microRNAs as potential pharmacogenomic biomarkers for anticancer drugs. *Oncotarget*. 2016;7(29):45584-96.
118. Zhu L, Liu J. Integration of a prognostic gene module with a drug sensitivity module to identify drugs that could be repurposed for breast cancer therapy. *Computers in biology and medicine*. 2015;61:163-71.
119. Lebedeva G, Yamaguchi A, Langdon SP, Macleod K, Harrison DJ. A model of estrogen-related gene expression reveals non-linear effects in transcriptional response to tamoxifen. *BMC systems biology*. 2012;6:138.
120. Dimitrakopoulou K, Dimitrakopoulos GN, Sgarbas KN, Bezerianos A. Tamoxifen integromics and personalized medicine: dynamic modular transformations underpinning response to tamoxifen in breast cancer treatment. *Omics : a journal of integrative biology*. 2014;18(1):15-33.
121. Raffo D, Pontiggia O, Bal de Kier Joffe E, Simian M. Non-genomic actions of estradiol and 4-OH-tamoxifen on murine breast cancer cells. *Oncology reports*. 2015;33(1):439-47.
122. Fang H, Liu X, Ramirez J, Choudhury N, Kubo M, Im HK, et al. Establishment of CYP2D6 reference samples by multiple validated genotyping platforms. *The pharmacogenomics journal*. 2014;14(6):564-72.
123. Greer AK, Dates CR, Starlard-Davenport A, Edavana VK, Bratton SM, Dhakal IB, et al. A potential role for human UDP-glucuronosyltransferase 1A4 promoter single nucleotide polymorphisms in the pharmacogenomics of tamoxifen and its derivatives. 2014;42(9):1392-400.
124. Ward A, Shukla K, Balwierz A, Soons Z, Konig R, Sahin O, et al. MicroRNA-519a is a novel oncomir conferring tamoxifen resistance by targeting a network of tumour-suppressor genes in ER+ breast cancer. *The Journal of pathology*. 2014;233(4):368-79.
125. Tseng E, Walsky RL, Luzietti RA, Jr., Harris JJ, Kosa RE, Goosen TC, et al. Relative contributions of cytochrome CYP3A4 versus CYP3A5 for CYP3A-cleared drugs assessed in vitro using a CYP3A4-selective inactivator (CYP3cide). *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2014;42(7):1163-73.
126. Yaacob NS, Kamal NN, Norazmi MN. Synergistic anticancer effects of a bioactive subfraction of *Strobilanthes crispus* and tamoxifen on MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cell lines. *BMC complementary and alternative medicine*. 2014;14:252.
127. Lattrich C, Schuler S, Haring J, Skrzypczak M, Ortmann O, Treeck O. Effects of a combined treatment with tamoxifen and estrogen receptor beta agonists on human breast cancer cell lines. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2014;289(1):163-71.
128. Sensorn I, Sirachainan E, Chamnanphon M, Pasomsub E, Trachu N, Supavilai P, et al. Association of CYP3A4/5, ABCB1 and ABCC2 polymorphisms and clinical outcomes of Thai breast cancer patients treated with tamoxifen. *Pharmacogenomics and personalized medicine*. 2013;6:93.
129. Terasawa T, Dahabreh I, Castaldi PJ, Trikalinos TA. Systematic reviews on selected pharmacogenetic tests for cancer treatment: CYP2D6 for tamoxifen in breast cancer, KRAS for anti-EGFR antibodies in colorectal cancer, and BCR-ABL1 for tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. 2010.
130. Klein DJ, Thorn CF, Desta Z, Flockhart DA, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: tamoxifen pathway, pharmacokinetics. *Pharmacogenetics and genomics*. 2013;23(11):643.
131. Rangel LB, Taraba JL, Frei CR, Smith L, Rodriguez G, Kuhn JG. Pharmacogenomic diversity of tamoxifen metabolites and estrogen receptor genes in Hispanics and non-Hispanic whites with breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2014;148(3):571-80.
132. Colabufo NA. Modulation, absorption and delivery of xenobiotics: the synergic role of CYP450 and P-gp activities. *Current drug metabolism*. 2011;12(8):701.
133. Tralau T, Luch A. The evolution of our understanding of endo-xenobiotic crosstalk and cytochrome P450 regulation and the therapeutic implications. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2013;9(12):1541-54.
134. Morales AR, Zárate LEM. *Epidemiología clínica: investigación clínica aplicada*: Ed. Médica Panamericana; 2004.

135. Angarita FA, Acuña SA, Torregrosa L, Tawil M, Ruiz ÁJ. Presentación inicial de las pacientes con diagnóstico de cáncer de seno en el Centro Javeriano de Oncología, Hospital Universitario San Ignacio. *Revista Colombiana de Cirugía*. 2010;25(1):19-26.
136. Estévez LG, Álvarez I, Seguí MÁ, Muñoz M, Margelí M, Miró C, et al. Current perspectives of treatment of ductal carcinoma in situ. *Cancer treatment reviews*. 2010;36(7):507-17.
137. Huang B, Warner M, Gustafsson J-Å. Estrogen receptors in breast carcinogenesis and endocrine therapy. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015;418:240-4.
138. Heath DD, Flat SW, Wu AH, Pruitt MA, Rock CL. Evaluation of tamoxifen and metabolites by LC-MS/MS and HPLC methods. *British journal of biomedical science*. 2014;71(1):33-9.
139. Hatta FH, Lundblad M, Ramsjö M, Kang J-H, Roh H-K, Bertilsson L, et al. Differences in CYP2C9 genotype and enzyme activity between Swedes and Koreans of relevance for personalized medicine: Role of ethnicity, genotype, smoking, age, and sex. *Omics: a journal of integrative biology*. 2015;19(6):346-53.
140. Swen J, Nijenhuis M, Boer Ad, Grandia L, Maitland-van der Zee A-H, Mulder H, et al. Pharmacogenetics: from bench to byte—an update of guidelines. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2011;89(5):662-73.
141. Sim SC, Ingelman-Sundberg M. Update on allele nomenclature for human cytochromes P450 and the Human Cytochrome P450 Allele (CYP-allele) Nomenclature Database. *Cytochrome P450 Protocols*. 2013:251-9.
142. Fernández Santander A, Gómez Gallego F, Gómez A, Santiago Dorrego C, Bandrés Moya F, Bernal A. Aspectos Farmacogenéticos en el tratamiento del cáncer de mama con tamoxifeno. 2008.
143. Antunes MV, Linden R, Santos TV, Wallemacq P, Haufroid V, Classen JF, et al. Endoxifen levels and its association with CYP2D6 genotype and phenotype: evaluation of a southern Brazilian population under tamoxifen pharmacotherapy. *Therapeutic drug monitoring*. 2012;34(4):422-31.
144. Hennig EE, Piatkowska M, Karczmarski J, Goryca K, Brewczynska E, Jazwiec R, et al. Limited predictive value of achieving beneficial plasma (Z)-endoxifen threshold level by CYP2D6 genotyping in tamoxifen-treated Polish women with breast cancer. *BMC cancer*. 2015;15:570.
145. Murdter TE, Schroth W, Bacchus-Gerybadze L, Winter S, Heinkele G, Simon W, et al. Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2011;89(5):708-17.
146. Madlensky L, Natarajan L, Tchu S, Pu M, Mortimer J, Flatt SW, et al. Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2011;89(5):718-25.
147. Lv X, Wang B, Chen J, Ye J. [Clinical observation of depression after breast cancer operation treated with auricular point sticking therapy]. *Zhongguo zhen jiu = Chinese acupuncture & moxibustion*. 2015;35(5):447-50.
148. Hurtado-de-Mendoza A, Jensen RE, Jennings Y, Sheppard VB. Understanding Breast Cancer Survivors' Beliefs and Concerns About Adjuvant Hormonal Therapy: Promoting Adherence. *Journal of cancer education : the official journal of the American Association for Cancer Education*. 2017.
149. Donzelli M, Derungs A, Serratore MG, Noppen C, Nezcic L, Krahenbuhl S, et al. The basal cocktail for simultaneous phenotyping of human cytochrome P450 isoforms in plasma, saliva and dried blood spots. *Clinical pharmacokinetics*. 2014;53(3):271-82.
150. Maximov PY, McDaniel RE, Fernandes DJ, Korostyshevskiy VR, Bhatta P, Murdter TE, et al. Simulation with cells in vitro of tamoxifen treatment in premenopausal breast cancer patients with different CYP2D6 genotypes. *British journal of pharmacology*. 2014;171(24):5624-35.
151. Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P, et al. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(23):1758-64.
152. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.
153. Chovancova E, Pavelka A, Benes P, Strnad O, Brezovsky J, Kozlikova B, et al. CAVER 3.0: a tool for the analysis of transport pathways in dynamic protein structures. *PLoS computational biology*. 2012;8(10):e1002708.

154. Dezentje VO, Gelderblom H, Van Schaik RH, Vletter-Bogaartz JM, Van der Straaten T, Wessels JA, et al. CYP2D6 genotype in relation to hot flashes as tamoxifen side effect in a Dutch cohort of the tamoxifen exemestane adjuvant multinational (TEAM) trial. *Breast cancer research and treatment*. 2014;143(1):171-9.
155. Martínez de Duenas E, Ochoa Aranda E, Blancas Lopez-Barajas I, Ferrer Magdalena T, Bandres Moya F, Chicharro Garcia LM, et al. Adjusting the dose of tamoxifen in patients with early breast cancer and CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *Breast (Edinburgh, Scotland)*. 2014;23(4):400-6.
156. Bright EE, Petrie KJ, Partridge AH, Stanton AL. Barriers to and facilitative processes of endocrine therapy adherence among women with breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2016;158(2):243-51.
157. Van Liew JR, Christensen AJ, de Moor JS. Psychosocial factors in adjuvant hormone therapy for breast cancer: an emerging context for adherence research. *Journal of cancer survivorship : research and practice*. 2014;8(3):521-31.
158. Luo HR, Gaedigk A, Aloumanis V, Wan YJ. Identification of CYP2D6 impaired functional alleles in Mexican Americans. *European journal of clinical pharmacology*. 2005;61(11):797-802.
159. Kohlrausch FB, Gama CS, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, Gesteira A, Barros F, et al. Molecular diversity at the CYP2D6 locus in healthy and schizophrenic southern Brazilians. *Pharmacogenomics*. 2009;10(9):1457-66.
160. Agundez JA, Ramirez R, Hernandez M, Llerena A, Benitez J. Molecular heterogeneity at the CYP2D gene locus in Nicaraguans: impact of gene-flow from Europe. *Pharmacogenetics*. 1997;7(4):337-40.
161. Dorado P, Heras N, Machin E, Hernandez F, Teran E, Llerena A. CYP2D6 genotype and dextromethorphan hydroxylation phenotype in an Ecuadorian population. *European journal of clinical pharmacology*. 2012;68(5):637-44.
162. Lei L, Wang X, Wu X-D, Wang Z, Chen Z-H, Zheng Y-B, et al. Association of CYP2D6* 10 (c.100C>T) polymorphisms with clinical outcome of breast cancer after tamoxifen adjuvant endocrine therapy in Chinese population. *American Journal of Translational Research*. 2016;8(8):3585.
163. Cockburn JG, Hallett RM, Gillgrass AE, Dias KN, Whelan T, Levine M, et al. The effects of lymph node status on predicting outcome in ER+/HER2-tamoxifen treated breast cancer patients using gene signatures. *BMC cancer*. 2016;16(1):555.
164. Abu RZ, Zoranovic T, Milovanovic J, Todorovic-Rakovic N, Nikolic-Vukosavljevic D. Breast cancer in postmenopausal patients: Impact of age. *Journal of BU ON: official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2014;20(3):723-9.
165. Jacob L, Hadji P, Kostev K. Age-related differences in persistence in women with breast cancer treated with tamoxifen or aromatase inhibitors in Germany. *Journal of geriatric oncology*. 2016;7(3):169-75.
166. Severson TM, Nevedomskaya E, Peeters J, Kuilman T, Krijgsman O, van Rossum A, et al. Neoadjuvant tamoxifen synchronizes ER α binding and gene expression profiles related to outcome and proliferation. *Oncotarget*. 2016;7(23):33901.
167. Yang XR, Chang-Claude J, Goode EL, Couch FJ, Nevanlinna H, Milne RL, et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(3):250-63.
168. Robledo Abad JF, Caicedo Mallarino JJ, DeAntonioSuárez R. Study of survival of a cohort of 1,328 patients with breast cancer. *Revista Colombiana de Cirugía*. 2005;20(1):4-20.
169. Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, Paridaens R, Jassem J, Delozier T, et al. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(11):1081-92.
170. Van de Velde CJ, Rea D, Seynaeve C, Putter H, Hasenburg A, Vannetzel J-M, et al. Adjuvant tamoxifen and exemestane in early breast cancer (TEAM): a randomised phase 3 trial. *The Lancet*. 2011;377(9762):321-31.
171. Vargas AN, López KCF, Amador DD. Letrozol vs tamoxifeno como terapia neoadyuvante para pacientes posmenopáusicas con cáncer de mama hormono-dependiente localmente avanzado. *Ginecol Obstet Mex*. 2011;79(9):553-7.

172. Fondevila N, Compaired D, Maradei E, Duffy S. Validación de una técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección del virus de fiebre aftosa y evaluación de su desempeño en la infección aguda. *Revista argentina de microbiología*. 2014;46(3):188-95.
173. Lara SJP, Morantes SJ, Gutierrez FAA. Desarrollo y validación de PCR múltiple con sondas TaqMan para la cuantificación de la dosis génica en cáncer. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 2012;41(1):81-98.
174. Prado García JM. Desarrollo de una metodología de PCR en Tiempo Real para detección y cuantificación de fitoplasma 16SrIII-L y reovirus CFSV asociados con la enfermedad del Cuero de Sapo en yuca: Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.