



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**SECRETARÍA DE SALUD**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**“FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS DEL ACARREADOR  
DE FOLATOS Y LA ENZIMA MTHFR, MEDIANTE DHPLC,  
EN LA POBLACIÓN MEXICANA CON LEUCEMIA  
LINFOBLÁSTICA/LINFOMA LINFOBLÁSTICO”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:**

**HEMATOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**DR. GABRIEL GALVÁN SALAZAR**

**ASESOR DE TESIS:**

**DRA. MYRNA GLORIA CANDELARIA HERNÁNDEZ**



**MÉXICO, D. F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dra. Myrna Gloria Candelaria Hernández  
Asesora de Tesis  
Subdirección de Investigación Clínica  
Instituto Nacional de Cancerología

Dra. Sylvia Verónica Villavicencio Valencia  
Subdirectora de Educación Médica  
Instituto Nacional de Cancerología

## AGRADECIMIENTOS

- Nada sería posible sin la ayuda de mis padres, ambos ejemplos de compromiso y honestidad, gracias por darme su apoyo siempre de forma incondicional a lo largo de estos años; de igual forma gracias Dios por darles salud y permitirme compartir con ellos lo que se llama “vida”, siempre estarán conmigo.
- Lilo y Mau, no tendría sentido saber que nos espera, pero puedo asegurar que todo estará bien, gracias por toda la confianza y cariño; si tuviera que definir la lucha y fortaleza, créanme que sería con ustedes dos.
- Lucía, agradezco sinceramente tus muestras de amor, confianza y apoyo, siempre serás motivo para seguir adelante, y sé que cuento contigo para acompañarme en este viaje que apenas comienza, gracias por todo.
- Dr. Labardini, Calderón, Cesarman, Cervera, Candelaria, Izaguirre, Sánchez, Lozano y Rivas, gracias por compartir su experiencia y sobretodo demostrar su compromiso hacia la enseñanza.
- Dra. Vidal, Liliana y Luci, gracias por su tiempo y paciencia en el laboratorio.
- Olga, sinceramente agradezco tus explicaciones, motiva conocer gente como tú, agradecida con la vida, soy tu fan.
- No hay forma de agradecer al Instituto Nacional de Cancerología y cada uno de sus pacientes, todos ustedes son un ejemplo de lucha.

## ÍNDICE

Introducción	1
Antecedentes	
Epidemiología	3
Etiología	3
Manifestaciones clínicas y diagnóstico	5
Clasificación	7
Esquema de Hiper-CVAD	9
Farmacogenética	12
Metabolismo del Metotrexate	14
Objetivos	17
Justificación	18
Hipótesis	19
Material y Métodos	
Universo de estudio y tamaño de la muestra	20
Criterios de inclusión y exclusión	20
Metodología	21
Proceso de las muestras en el laboratorio	
Obtención de ADN	21
Amplificación por PCR	22
Análisis por DHPLC	23
Interpretación de resultados del DHPLC	24
Proceso para la obtención del consentimiento informado	25
Resultados	
Características de los pacientes	27
Resultados de los polimorfismos	28
Discusión	30
Conclusiones	38
Referencias	40

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo del tratamiento curativo en pacientes con leucemia aguda linfoblástica continúa siendo un paradigma. Desde hace más de 50 años se sabe que los antifolatos pueden inducir remisión clínica en pacientes con leucemia aguda linfoblástica (LAL),<sup>1</sup> por lo que se han hecho diferentes esquemas basados en el uso de los mismos, estimándose respuestas completas de hasta 80%. El uso moderno de quimioterapia en pacientes con LAL se basa en la administración de diferentes dosis dependiendo del riesgo de recaída, como son edad, leucocitosis inicial, inmunofenotipo, infiltración a sistema nervioso central, remisión al primer mes de tratamiento y riesgo citogenético.<sup>2</sup> En nuestro Instituto actualmente se utiliza el esquema Hiper-CVAD como primera línea de tratamiento en pacientes con LAL,<sup>3</sup> con el cual se han logrado respuestas completas de 91%. Este esquema está compuesto por Ciclofosfamida, Vincristina, Adriamicina y Dexametasona alternado con Citarabina y Metotrexate. En total se administran 4 ciclos de la fase A y 4 ciclos de la fase B de forma alterna, utilizando en esta última las dosis altas de Metotrexate (1 g/m<sup>2</sup>).

A pesar del tratamiento basado en riesgo inicial, un gran número de pacientes con LAL sufre de recaída y eventualmente muere de la enfermedad, independientemente del riesgo establecido. Se han identificado marcadores moleculares que pudieran predecir la respuesta al tratamiento y correlacionar la sensibilidad al tratamiento, como por ejemplo perfiles de expresión de microarreglos de oligonucleótidos,<sup>4</sup> logrando identificar genes o “firmas” en determinados pacientes

que causan resistencia a medicamentos.<sup>5</sup> Identificar las vías de un medicamento en particular, así como transportadores o receptores, pudiera ayudar a predecir resistencia o riesgo de recaída posterior a su administración. Recientemente se reportó el valor pronóstico del acarreador de folato,<sup>6</sup> el mayor transportador de Metotrexate, en pacientes pediátricos con LAL, demostrando diferencia significativa en relación a los niveles de transcripción media y riesgo de recaída ( $p= 0.278$ ), sugiriendo la importancia pronóstica de la expresión del acarreador en la supervivencia. A pesar de que se han sugerido previamente genes predictores de respuesta a tratamiento o pronóstico, no está aún bien establecido su papel.

## ANTECEDENTES

### EPIDEMIOLOGÍA

La leucemia aguda linfoblástica representa el 1% del total de casos de cáncer y 20% del total de leucemias en el adulto, siendo más frecuente en la edad pediátrica, ya que representa el 15% del total de casos de cáncer en esta edad. Se ha descrito alta incidencia en pacientes hispanos, comparada con la raza blanca, con una incidencia en hispanos de 2.5/100 000 hombres y 2.1/100 000 mujeres contra 2.0/100 000 hombres blancos y 1.5/100 000 mujeres blancas (**Figura 1**). En general se ha reportado una incidencia de 1.9/100 000 hombres y 1.4/100 000 mujeres.<sup>7</sup> Para el año 2009 se estimaron 5760 nuevos casos de leucemia aguda linfoblástica en Estados Unidos (3 350 hombres y 2 410 mujeres), así como 1400 muertes estimadas para el mismo año (740 hombres y 660 mujeres).<sup>8</sup> En el Instituto Nacional de Cancerología de México se reportaron en el 2006 y 2007 un total de 79 nuevas leucemias agudas, siendo el 67% leucemias agudas linfoblásticas, de las cuales el 92% correspondieron a LAL-L2 por FAB. Se desconoce de forma exacta la epidemiología de las leucemias agudas en nuestro país.

### ETIOLOGÍA

El evento patogénico preciso que causa leucemia aguda se desconoce en la mayoría de los pacientes, aunque algunos han identificado asociaciones en el 10% de sus pacientes.<sup>9</sup> De igual forma solo el 5% de los casos son por síndromes genéticos predisponentes, siendo el más significativo el síndrome de Down, que incrementa el riesgo de LAL hasta 30 veces más. Enfermedades genéticas



autosómicas recesivas asociadas a aumento de fragilidad cromosómica y predisposición a LAL incluye ataxia telangiectasia y síndrome de Bloom.<sup>10</sup> Existen cambios genéticos adquiridos en la mayoría de los pacientes con LAL, los cuales tiene importancia pronóstico y terapéutica. Estos cambios incluyen anomalías en el número (ploidías) y estructura de cromosomas, como por ejemplo translocaciones, inversiones, deleciones, mutaciones puntuales y amplificaciones. Las aberraciones genéticas más comunes son hiperdiploidias, hipodiploidias, t(1;19)(q23;p13.3), t(9;22)(q34;q11.2), t(4;11)(q21;q23), fusión TEL-AML1, sobreexpresión HOX11L2, fusión MLL-EN, deleción y monosomía del cromosoma 7. Las aberraciones genéticas primarias por si solas no son suficientes para causar leucemia. Son necesarias mutaciones cooperativas para la transformación leucémica, incluyendo cambios epigenéticos en vías reguladoras de crecimiento, como p53 y genes supresores de tumor (RB).<sup>11</sup> También existe la asociación de riesgo con factores ambientales, incluyendo radiación ionizante,<sup>12</sup> contacto con benceno y exposición a pesticidas, así como antecedente de exposición a agentes alquilantes y epipodofilotoxinas;<sup>13</sup> sin embargo cada una de estas asociaciones es controvertida.

Las causas asociadas a agentes infecciosos incluyen infección por Epstein-Barr y al virus humano de leucemia de células T (Asia y Caribe), así mismo están descritas en la literatura diferentes teorías como las de Kinlen (exposición a agente infeccioso postnatal), Smith (exposición a agente infeccioso prenatal o durante nacimiento) y Greaves (retraso en exposición inicial a agente infeccioso después del primer año de vida), todas en relación al riesgo de desarrollar leucemia aguda.<sup>14</sup>

También se han descrito polimorfismos genéticos de enzimas metabolizadoras de xenobióticos que pudieran interactuar con factores ambientales, dietéticos, maternos y otros externos, contribuyendo al riesgo de desarrollo de LAL.<sup>15</sup> Por ejemplo, varios polimorfismos inactivadores de enzimas detoxificantes (glutación S transferasa y quinona oxido reductasa) están asociadas al desarrollo de LAL.<sup>16,17</sup> Polimorfismos de baja penetrancia de enzimas metabolizadoras de folatos también están asociadas al desarrollo de LAL. Las variantes polimórficas de metiltetrahidrofolato reductasa, que cataliza la reducción de 5,10-metiltetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato (la forma circulante predominante de folato), está ligada a un riesgo menor de desarrollar LAL en adultos y niños.<sup>18,19</sup> Este efecto protector podría resultar por la mayor disponibilidad de 5,10-metiltetrahidrofolato y reservas de timidina, así como a un incremento de síntesis de DNA. Otros dos polimorfismos de genes relacionados a folatos (hidroximetiltransferasa de serina y timidilato sintasa) están asociados a menor riesgo de LAL.<sup>20</sup> El rol de vías de folato en relación a la susceptibilidad de LAL es sugerido por la asociación entre el suplemento de folatos y la disminución de riesgo para desarrollar LAL.<sup>21</sup> Sin embargo todas estas asociaciones aún necesitan confirmarse, con especial atención a la diversidad geográfica y étnica por la frecuencia de polimorfismos.

## **MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y DIAGNÓSTICO**

Las manifestaciones varían entre cada paciente, ya que estas pueden aparecer de forma insidiosa o aguda. Estas manifestaciones reflejan generalmente el grado de falla medular o extensión extramedular. Aproximadamente un 50%

presenta fiebre, la cual está inducida por citocinas (IL-1, IL6 y FNT) secretadas por células tumorales, así como infecciones secundarias a la neutropenia. La fatiga y letargia son manifestaciones comunes de anemia, sin embargo las personas mayores pueden debutar con disnea asociada a anemia, angina y mareo. Más de un cuarto de pacientes sufren de dolor óseo o artralgias, debido a la infiltración leucémica del periostio o por expansión de la médula ósea por células leucémicas. En algunos casos los pacientes se presentan con hemorragias graves (hemorragia del sistema nervioso central) secundarias a la trombocitopenia, sin embargo la gran mayoría presenta púrpura, petequias y equimosis. En la **tabla 1** se observa los diferentes porcentajes de presentación de LAL.

El diagnóstico de LAL generalmente se realiza al analizar la morfología en el aspirado de médula ósea con la tinción de Romanowsky (Wright-Giemsa o May-Grünwald-Giemsa), así como análisis citogenético y de inmunofenotipo. Actualmente se considera como mínimo un 20% de blastos en médula ósea para establecer el diagnóstico de leucemia aguda. Generalmente los blastos son de pequeño a mediano tamaño con escaso citoplasma, con cromatina moderadamente condensada a dispersa y nucleolo prominente. La leucemia linfoblástica y linfoma linfoblástico son considerados como la misma enfermedad; por consenso se ha considerado que la presentación de 25% de blastos en médula ósea sea considerada como leucemia linfoblástica, y para los que tiene enfermedad confinada a una masa o menor de 25% de blastos en médula ósea, se utilizará el término de linfoma linfoblástico.<sup>22</sup>

## CLASIFICACIÓN

La clasificación morfológica inicia para LAL fue propuesta por el grupo cooperativo de la FAB (Franco-Estadounidense-Británica), clasificándola en 3 grupos, L1, L2 y L3 (**imagen 1-3**). Son diferentes las variaciones morfológicas, ya que se puede encontrar desde escaso citoplasma, cromatina nuclear condensada y nucleolo indistinto, hasta células grandes con citoplasma en moderada cantidad, desde azul claro a azul grisáceo, y ocasionalmente vacuolado con cromatina nuclear dispersa y múltiples nucleolos prominentes. El nucleolo es redondo, irregular u ovalado. Algunas veces se puede encontrar granulaciones en el citoplasma hasta en un 10% de los blastos, sin embargo es más frecuente ese hallazgo en la leucemia mieloide (**tabla 2**). Otra característica, aunque poco frecuente, es la morfología similar a un espejo de mano (pseudópodo citoplasmático).

Los linfoblastos en la biopsia de médula ósea son relativamente uniformes en apariencia, con nucleolo redondo u ovalado, y puede ser prominente. La cromatina está finamente dispersa. El número de figuras mitóticas varía. El linfoma linfoblástico generalmente se caracteriza por un patrón difuso o menos frecuente paracortical en el ganglio u otro tejido. Las figuras mitóticas son generalmente numerosas y en algunos casos existe el patrón de cielo estrellado. Las características morfológicas de proliferación B y T son indistinguibles.

La evaluación citoquímica por si sola contribuye al diagnóstico. Generalmente los linfoblastos muestran negatividad para mieloperoxidasa y sudan negro. La

reacción ácida de Schiff y esterasa no específica pueden ser positivas, así como TdT en la mayoría de LAL.

Fenotipos específicos de LAL, como líneas T o B, no se pueden distinguir durante la evaluación morfológica. El análisis de inmunofenotipo por citometría de flujo es un método rápido y efectivo para caracterizar diferentes subtipos de LAL, como por ejemplo, precursor B, B común, precursor B temprano o B maduro, así como subtipos de línea T.<sup>23</sup> Los linfoblastos de la leucemia/linfoma linfoblástico son casi siempre positivos para marcadores B, como CD19, CD79a y CD22 citoplásmico; sin embargo ninguno de ellos por sí sólo es específico. Los antígenos mieloides CD13 y CD33 pueden estar expresados, y esta expresión no excluye el diagnóstico de LAL. El grado de diferenciación del linaje B tiene correlación clínica y genética. En la etapa más temprana, llamada precursor temprano o pro-B, los blastos expresan CD19, CD79a citoplásmica, CD22 citoplásmica y TdT nuclear. En la etapa intermedia, llamada común, los blastos expresan CD10. En la etapa de diferenciación de precursor más maduro, llamada pre-B, los blastos expresan cadenas citoplásmicas  $\mu$  (c- $\mu$ ). La inmunoglobulina de superficie está generalmente ausente, sin embargo su presencia no descarta la posibilidad de LAL/LL. Finalmente la expresión de Ig de superficie es característica de la leucemia linfoblástica llamada madura.

Las alteraciones genéticas en LAL se pueden detectar por citogenética, FISH y RT-PCR. Estas técnicas permiten la determinación específica de los genotipos de LAL, proporcionando información pronóstica importante; por ejemplo la

determinación del cromosoma Philadelphia, que se encuentra en un 30% de los pacientes adultos con LAL y 5% en la población pediátrica, le da un pronóstico pobre.

Basados en estas características, según la Organización Mundial de la Salud del 2008, se puede dividir las neoplasias linfoides en neoplasias linfoides precursoras, y estas en 3 grupos: Leucemia/Linfoma linfoblástico B no clasificado, leucemia/linfoma linfoblástico B con anormalidades genéticas recurrentes, y leucemia/linfoma linfoblástico T.<sup>22</sup> La única que se subdivide en 7 es la leucemia/linfoma linfoblástico B con anormalidades genéticas recurrentes: 1.- leucemia/linfoma linfoblástico B con  $t(9;22)(q34;q11.2)$ ; *BCR-ABL1*; 2.- leucemia/linfoma linfoblástico B con  $t(v;11q23)$ ; *rearreglos del MLL*; 3.- leucemia/linfoma linfoblástico B con  $t(12;21)(p13;q22)$ ; *TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)*; 4.- leucemia/linfoma linfoblástico B con hiperdiploidias; 5.- leucemia/linfoma linfoblástico B con hipodiploidias; 6.- leucemia/linfoma linfoblástico B con  $t(5;14)(q31;q32)$ ; *IL3-IGH*; 7.- leucemia/linfoma linfoblástico B con  $t(1;19)(q23;p13.3)$  *E2A-PBX1(TCF3-PBX1)*.

## **ESQUEMA DE HIPER-CVAD**

El tratamiento de la leucemia aguda linfoblástica del adulto ofrece posibilidades de supervivencia libre de enfermedad a largo plazo del 20- 35 %.<sup>24, 25</sup> El pronóstico de esta entidad se asocia con características del huésped (edad, desempeño físico, función orgánica) y de la neoplasia, incluyendo fenotipo de las células leucémicas, alteraciones citogenéticas, afección extramedular y sensibilidad al tratamiento administrado.

El esquema Hiper-CVAD, descrito por Kantarjian y cols,<sup>3</sup> se divide en 2 fases; una fase de dosis intensas de quimioterapia y la segunda de mantenimiento. La primera fase incluye la administración de cuatro ciclos alternantes de Metotrexate y Citarabina, con Ciclofosfamida, Vincristina, Doxorubicina y Dexametasona, además de quimioterapia profiláctica intratecal, profilaxis con antibióticos, apoyo de factor estimulante de colonias de granulocitos; la fase de mantenimiento consta de 6MP, Metotrexate, Vincristina y Prednisona.

Se incluyeron en total 204 pacientes, obteniendo respuesta completa en 185 pacientes (91%), 12 pacientes murieron durante la inducción (6%), con supervivencia global a 5 años del 39 % y respuesta completa a 5 años del 38%. Posteriormente compararon sus resultados con su régimen previo (VAD), donde demostraron una diferencia estadísticamente significativa de respuesta completa (91% vs 75%,  $p=0.01$ ) (**Figura 2**).

A continuación se ejemplifica la administración del esquema completo:

**Hiper-CVAD:** Ciclofosfamida  $300 \text{ mg/m}^2$  intravenoso durante 3 horas cada 12 hrs por 6 dosis, los días 1 a 3, con Mesna a la misma dosis de Ciclofosfamida, pero este último en infusión continua, la cual inicia con la Ciclofosfamida y termina 6 horas después de la última dosis de Ciclofosfamida; Vincristina 2 mg intravenoso los días 4 y 11; Doxorubicina  $50 \text{ mg/m}^2$  intravenoso el día 4, y Dexametasona 40 mg diarios los días 1 a 4 y 11 a 14.

Dosis altas de Citarabina y Metotrexate: Metotrexate 200 mg/m<sup>2</sup> intravenoso durante 2 horas, seguido por 800 mg/m<sup>2</sup> intravenoso durante 24 hrs el día 1; el rescate de Leucovorin (ácido folínico) se comienza 24 horas después de haber terminado la infusión de Metotrexate, con una dosis de 15 mg cada 6 horas; se incrementa a 50 mg cada 6 horas si los niveles de Metotrexate son mayores a 20 mmol/L al final de la infusión, más de 1 mmol/L 24 hrs después del término de la infusión o más de 0.1 mmol/L a las 48 horas después del término de la infusión del Metotrexate, y hasta que los niveles estén menores a 0.1 mM; Citarabina 3 g/m<sup>2</sup> durante 2 horas cada 12 horas los días 2 y 3; y Metilprednisolona 50 mg intravenosos 2 veces al día los días 1 a 3.

Profilaxis a SNC: Los pacientes se categorizaron de acuerdo al riesgo esperado de infiltración a SNC. Se consideraron de alto riesgo si la deshidrogenasa láctica sérica era mayor a 600 U/L (referencia normal de 25 a 225 U/L) o un índice proliferativo (%S+G<sup>2</sup>M) mayor al 14% o más; bajo riesgo si ninguno estaba aumentado, y riesgo desconocido en caso de que no estuviera disponible la información. La profilaxis se administró con Metotrexate 12 mg intratecales el día 2 y Citarabina 100 mg intratecales en el día 8 de cada ciclo por 16 tratamientos en el grupo de alto riesgo, 4 tratamientos en el grupo de riesgo bajo, y 8 tratamientos intratecales en el grupo de riesgo desconocido.

Profilaxis antibiótica: La profilaxis empírica con antibióticos se administró durante la fase de dosis intensiva (inducción y consolidación) con Ciprofloxacino 500 mg vía oral 2 veces al día o Levofloxacino 500 mg vía oral una vez al día; Fluconazol



200 mg vía oral una vez al día, y Aciclovir 200 mg vía oral 2 veces al día o Valaciclovir 500 mg vía oral una vez al día.

Apoyo con factor estimulante de colonia de granulocitos: FEC-G 10 mg/kg cada 24 horas dividido en 2 dosis cada día, iniciando 24 horas posteriores al término de la quimioterapia (día 5 de Hiper-CVAD y día 4 de altas dosis de Metotrexate o Citarabina).

Mantenimiento: Se administró tratamiento con Mercaptopurina (6-MP), Metotrexate, Vincristina y Prednisona (POMP) por 2 años. La dosis fue: 6-MP 50 mg vía oral 3 veces al día; Metotrexate 20 mg/m<sup>2</sup> vía oral una vez por semana; Vincristina 2 mg intravenosos mensualmente y Prednisona 200 mg vía oral una vez al día por 5 días de cada mes con Vincristina. La profilaxis antibiótica durante el mantenimiento consistió en Trimetoprim/Sulfametoxazol 2 veces al día durante los fines de semana, y Aciclovir 200 mg vía oral o Valaciclovir 500 mg vía oral al día o 3 veces por semana, por los primeros 3 meses para disminuir la infección por neumocistis, herpes zoster o varicela.

En la actualidad, el esquema Hiper-CVAD se usa como tratamiento de primera línea en pacientes con Leucemia/Linfoma linfoblástico en el Instituto Nacional de Cancerología de México.

## **FARMACOGENÉTICA**

Las variaciones genéticas se relacionan con el metabolismo de los medicamentos antineoplásicos e influyen en su toxicidad y respuesta a la quimioterapia en pacientes con cáncer. Los polimorfismos se definen como

variaciones genéticas presentes en más del 1 % de la población; generalmente tienen una alteración específica y pueden asociarse a cambios en la actividad del DNA que se encuentra alterado. La respuesta a los agentes de quimioterapia se determina primariamente por el genoma del tumor, pero la toxicidad depende primariamente del genoma en los tejidos sanos.<sup>26,27</sup> Existen diferentes técnicas para la determinación de polimorfismos de nucleótidos aislados (SNP's). El DHPLC (DHPLC, por sus siglas en inglés: *denaturing high-performance liquid chromatography*) es un método utilizado en múltiples laboratorios para el análisis de polimorfismos de nucleótidos aislados, así como de mutaciones conocidas y no conocidas en una variedad de enfermedades. El DHPLC consta de dos fases que separan ácidos nucleicos a través de intercambio aniónico. Se ajusta con temperatura para trabajar DNA en tres condiciones diferentes: no desnaturalizado, parcialmente desnaturalizado y completamente desnaturalizado. Se emplea para el análisis de genes que se sabe son altamente polimórficos, para los cuales se han descrito numerosas variantes alternativas o para genes susceptibles de una tasa alta de mutaciones esporádicas. Su alta sensibilidad del DHPLC combinada con la precisión del análisis de heteroduplex ha permitido el desarrollo de aplicaciones que rebasan los métodos tradicionales de secuenciación o genotipificación, ya que estas técnicas implican un alto costo y consumo de tiempo.<sup>27</sup>

## METABOLISMO DEL METOTREXATE

El Metotrexate es utilizado no solo en el tratamiento del cáncer, sino también para el tratamiento de artritis reumatoide, psoriasis y prevención de enfermedad de injerto contra el huésped de pacientes sometidos a trasplante alogénico de médula ósea. Tiene buena biodisponibilidad a bajas dosis, pero su absorción es errática a dosis mayores de  $25 \text{ mg/m}^2$ . A dosis convencionales se alcanza únicamente niveles en líquido cefalorraquídeo de 5 – 10% en comparación a niveles plasmáticos. Sin embargo a dosis mayores logra obtener niveles terapéuticos. El medicamento necesita poliglutamación a su forma activa por la enzima FPGS en el hígado. Se elimina por riñón. Se utiliza en diferentes neoplasias, incluyendo tumores sólidos como cáncer de mama, cabeza y cuello, coriocarcinoma, osteosarcomas, cáncer colorectal y de vejiga, así como neoplasias hematológicas como LAL y linfoma no Hodgkin.<sup>28</sup> La dosis para enfermedades malignas varía dependiendo de cada padecimiento, y estas pueden ser consideradas como dosis bajas ( $100 \text{ mg/m}^2$ ), intermedias ( $100 - 1\,000 \text{ mg/m}^2$ ) y altas (más de  $1\,000 \text{ mg/m}^2$ ).<sup>29</sup> Dosis moderadas y altas necesitan rescate con leucovorin, el cual deberá ser iniciado 24 hrs posteriores a la administración y continuarlas hasta que los niveles séricos sean menores a 50 nM. Se deberá medir niveles plasmáticos en todos los pacientes con disfunción renal.

El Metotrexate es un antagonista de ácido fólico con acción específica en la fase S del ciclo celular. Requiere ser transportado al interior de la célula a través del acarreador de folato reducido.<sup>30</sup> Una vez que se encuentra en el interior de la célula se poliglutamina, con la adición de 2 a 7 residuos de ácido glutámico a través de la

enzima folilpoliglutamato sintetasa. Los poliglutamatos de Metotrexate inhiben la enzima dihidrofolato reductasa, necesaria para la conversión de ácido fólico a ácido tetrahidrofólico, depletando folatos, ocasionando así la inhibición síntesis de DNA, RNA, timidilato y purinas, como se señala en la **Figura 3**.

Como se ha descrito previamente el Metotrexate es parte fundamental del tratamiento de LAL, por lo que alteraciones en la expresión del acarreador de folato (secundarios a polimorfismos) y/o de la MTHFR, pueden influir en la sensibilidad a este fármaco.

El polimorfismo del acarreador de folato que tiene una sustitución de arginina por histidina en el codón 27 de la proteína FC (RFCG80A), puede influir en su funcionalidad.<sup>31</sup> En un estudio de 204 niños con leucemia que se trataron con Metotrexate y eran homócigos para la variante RFCG80A, tuvieron mayores niveles plasmáticos de Metotrexate, en comparación con otros genotipos <sup>32</sup>. Estos hallazgos concuerdan con los descritos por Dervieux <sup>33,34</sup>.

La enzima MTHFR se ha estudiado ampliamente con respecto al metabolismo de Metotrexate. Se han descrito por lo menos 15 polimorfismos de nucleótidos aislados (SNP's) de esta enzima,<sup>35</sup> de los cuales dos son no sinónimos (C677T y A1298C). El polimorfismo C677T permite el cambio de un aminoácido (alanina por valina) en el codón 222, lo que disminuye la actividad enzimática. Los heterócigos tienen actividad enzimática in vitro de aproximadamente el 60 % y los homócigos de 40 % en población caucásica.<sup>36</sup> El polimorfismo A1298C permite la sustitución de un aminoácido (ácido glutámico por alanina) en el codón 429 y también se asocia a menor actividad enzimática.<sup>31</sup>

Van Ede evaluó el polimorfismo C677T, y demostró en 236 pacientes con artritis reumatoide un incremento en la toxicidad secundaria a Metotrexate en la población portadora de por lo menos un alelo T, en comparación con el genotipo CC.<sup>37</sup> En esta población no se encontró diferencia en la respuesta a Metotrexate. Estos resultados concuerdan con los publicados por Urano,<sup>38</sup> quien demostró que la presencia del alelo 677T incrementó la toxicidad por Metotrexate (27 %, en comparación con 8 %); el polimorfismo A1298C no correlacionó con toxicidad. Berkun<sup>39</sup> y Hughes<sup>40</sup> han evaluaron también los polimorfismos C677 T y A1298C, y no encontraron asociación entre ellos y toxicidad. Estos resultados sugieren que el polimorfismo C677T puede ser un marcador de toxicidad, en particular hepatotoxicidad. Los resultados para el polimorfismo A1298C son inconsistentes.<sup>41</sup>

Los polimorfismos descritos para el RFC y la enzima MTHFR han sido evaluados por diferentes técnicas, incluyendo DHPLC.<sup>41-44</sup>

El desarrollo de resistencia a Metotrexate limita la actividad de estos medicamentos antifolatos, por lo que el entendimiento de estos mecanismos ayudará al desarrollo de nuevos fármacos. Con técnicas moleculares recientes se pueden identificar cambios fenotípicos asociados la resistencia en tumores específicos. Esta resistencia ocurre como resultado de cambios en el transportador de Metotrexate, su poliglutamación, interacción con dihidrofolato reductasa o rompimiento de poliglutamatos de Metotrexate.<sup>45</sup>

## **OBJETIVO PRIMARIO**

Evaluar la frecuencia de polimorfismos, mediante DHPLC, del acarreador de folatos RFCG804 y de la enzima MTHFR C677T en población mexicana con leucemia/linfoma linfoblástico.

## **OBJETIVO SECUNDARIO**

Evaluar las características demográficas y clínicas de pacientes con diagnóstico de leucemia/linfoma linfoblástico que acudieron al Instituto Nacional de Cancerología de México en el 2010.

Evaluar la influencia de los polimorfismos del acarreador de folatos y de la enzima MTHFR en la respuesta en pacientes con leucemia/linfoma linfoblástico en el Instituto Nacional de Cancerología de México.

## JUSTIFICACIÓN

La leucemia aguda es la entidad neoplásica más frecuente de la edad pediátrica, y en el Instituto Nacional de Cancerología de México se reportaron, en el 2006 y 2007, un total de 79 nuevas leucemias agudas, siendo el 67% leucemias linfoblásticas. El tratamiento de esta entidad incluye antimetabolitos, como el Metotrexate. En la actualidad, en el Instituto Nacional de Cancerología se utiliza el esquema Hiper-CVAD (Ciclofosfamida, Vincristina, Adriamicina y Dexametasona, alternado con Citarabina y Metotrexate) como primera línea de tratamiento en pacientes con esta entidad. Los factores genéticos asociados con el metabolismo de fármacos, incluyendo transportadores, vías enzimáticas de eliminación y activación, han definido mutaciones y polimorfismos en poblaciones que incrementan la susceptibilidad individual a los efectos adversos y pueden asociarse a la eficacia terapéutica y control de la enfermedad a largo plazo.

Actualmente, nuestro grupo en el INCan determina rutinariamente el genotipo de TPMT en pacientes que reciben tiopurinas, para disminuir el riesgo de toxicidad. Se ha reportado que polimorfismos en el acarreador de folato (principal transportador de Metotrexate) y el SNP de la MTHFR 677 C>T son determinantes en la farmacogenética del Metotrexate e influyen en el riesgo de recaída en pacientes con leucemia linfoblástica. Actualmente el DHPLC es un método utilizado en múltiples laboratorios para el análisis de polimorfismos de nucleótidos aislados, así como de mutaciones conocidas y no conocidas en una variedad de enfermedades. La

administración individualizada del Metotrexate, en función de la determinación de polimorfismos encontrados en nuestra población que influyan en la respuesta, permitirá el uso racional de esta combinación en pacientes con leucemia aguda linfoblástica y mejorará la calidad de vida de estos pacientes.

## **HIPÓTESIS**

La frecuencia de los polimorfismos del acarreador de folatos y la enzima MTHFR en la población del Instituto Nacional de Cancerología de México de pacientes con diagnóstico de leucemia/linfoma linfoblástico son similares a las reportadas previamente en nuestra población y diferentes a la reportadas en la literatura internacional

La evaluación de polimorfismos previo al inicio del tratamiento permitirá seleccionar a los pacientes para recibir mejores opciones de tratamiento, disminuyendo el riesgo de efectos secundarios generados por los mismos.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **UNIVERSO DE ESTUDIO Y TAMAÑO DE MUESTRA**

Se incluyeron a 29 pacientes del Instituto Nacional de Cancerología con diagnóstico de leucemia/linfoma linfoblástico que requirieron tratamiento con Hiper-CVAD.

### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Aceptación del paciente para participar voluntariamente en este estudio (firma del consentimiento informado).
- Pacientes con diagnóstico de leucemia/linfoma linfoblástico que acudan al Instituto Nacional de Cancerología de México.
- Género: indistinto.
- Edad: Mayor de 15 años.
- Función renal y hepática normal.
- Candidatos a tratamiento con Hiper-CVAD.

### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Pacientes con antecedentes de hipersensibilidad al Metotrexate u otros fármacos incluidos en el esquema Hiper-CVAD.
- Imposibilidad de seguimiento del paciente.

## **METODOLOGÍA**

A partir de una muestra de 10 ml de sangre periférica, se extrajo DNA y RNA de células MN por métodos convencionales. El DNA se amplificó por PCR para el gen que codifica para el acarreador de folatos y el de la enzima MTHFR. Posteriormente se analizó por DHPLC. Los pacientes recibieron tratamiento de acuerdo con el esquema Hiper-CVAD. Se realizaron aspirados de médula ósea previo al inicio y posterior a cada ciclo de tratamiento para evaluar respuesta.

## **PROCESO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO**

### **a) OBTENCIÓN DE ADN:**

Se aisló DNA de células mononucleares por métodos estándares a partir de una muestra de 15 ml de sangre periférica.

En resumen: se centrifugó 15 ml de sangre total a 2500 rpm por 10 minutos y se recuperó la capa de leucocitos, la cual se incubó con 1 volumen de Buffer de lisis de eritrocitos (NH<sub>4</sub>Cl 0.15M, KHCO<sub>3</sub> 1 mM, EDTA 0.1 mM) por 20 minutos a 37 °C. Se centrifugó a 1200 rpm por 7 minutos y se eliminó el sobrenadante. El botón se resuspendió en Buffer de extracción (Tris 10 mM, EDTA 20 mM, SDS 0.5 %) con proteinasa K (50ug/ml) y se incubó a 60°C por 3 hr, posteriormente se procedió a extraer con fenolcloroformo. Se precipitó el DNA en 1 volumen de isopropanol y 25µl NaCl 0.4 M; se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos y se lavó el botón 2 veces con etanol al 70 %. Se dejó secar el botón y se resuspendió en 200 ul TE (Tris

10mM, EDTA 1mM, pH7.6).

### **b) AMPLIFICACIÓN POR PCR**

1.- Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para la amplificación del gen que codifica para el **acarreador de folatos RFCG804**:

Se: 5'-AGTGTCACTTCGTCCC-3'

AS: 5'-TCCCGCGTGAAGTTCTTG-3'

La amplificación por técnica de PCR se realizó en un volumen total de 25 µl, que contenía 100 ng de DNA genómico, 2 pmol/µl de cada oligonucleótido, 200 µM de dNTPs, 0.25 U de Taq polimerasa y buffer para PCR10x (15mM MgCl<sub>2</sub>, Perkin Elmer).

Esta amplificación se inició con denaturalización a 94° C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos con: 94°C por 30 segundos, 57 °C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos.

La extensión final fue a 72°C por 7 minutos. En la **imagen 4** se observa la amplificación por PCR del gen que codifica para el acarreador de folatos.

Posteriormente los productos se evaluaron en geles de agarosa y analizados por DHPLC.

2.- Los fragmentos de los genes que codifica para la enzima **MTHFR C677T**, se amplificaron usando los siguientes oligonucleótidos:

Se: 5'-GGAGCTTTGAGGCTGACCTGAA-3'

As: 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'

La amplificación por técnica de PCR se realizó en un volumen total de 25 µl,

que contenía 100 ng de DNA genómico, 2 pmol/μl de cada oligonucleótido, 200 μM de dNTPs, 0.25 U de Taq polimerasa y buffer para PCR10x (15mM MgCl<sub>2</sub>, Perkin Elmer).

Esta amplificación se inició con denaturalización a 94° C durante 5 minutos, seguido de 38 ciclos con: 94°C por 30 segundos, 57 °C por 35 segundos, 72°C por 30 segundos. La extensión final fue a 72°C por 7 minutos. En la **imagen 5** se observa la amplificación por PCR del gen que codifica para la enzima MTHFR.

Posteriormente los productos fueron evaluados en geles de agarosa y analizados por DHPLC.

### **c) ANÁLISIS POR DHPLC**

Los productos obtenidos por PCR se denaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos y se enfriaron lentamente hasta 50°C, con cambio de 1°C/minuto para permitir la formación de los homo o heteroduplexes.

Estos productos fueron analizados por DHPLC, de acuerdo con la técnica descrita inicialmente por Fang,<sup>42</sup> que en resume es:

**Acarreador de folato:** Se inyectaron a la columna de HPLC 7 μl de DNA los siguientes buffers; Buffer A (acetato de tri-etil amonio 0.1 mol/L ) y buffer B (acetato de tri-etil amonio 0.1 mol/L, conteniendo acetonitrilo 250 mL/L) en las proporciones y tiempos que a continuación se señalan: 52 %A- 48 % B basal, 47 % A-53 % B durante 0.1 minutos, 40 % A-60 % B durante 5.2 minutos, 0 % A- 100 % B durante 0.1 minutos, 52 % A- 48 % B durante 0.6 minutos. La fase móvil se realizó a 55 °C, que permitió la detección de heteroduplex. Esta temperatura se obtuvo después de

múltiples análisis con muestras analizadas 1-2°C por debajo y arriba de las temperaturas calculadas por el software del equipo DHPLC de transgenomics.

**MTHFR:** Se inyectó a la columna de HPLC 7 µl de DNA con los siguientes buffers; Buffer A (acetato de tri-etil amonio 0.1 mol/L ) y buffer B(acetato de tri-etil amonio 0.1 mol/L, conteniendo acetonitrilo 250 mL/L) en las siguientes proporciones y tiempos: 54 %A- 46 % B basal, 46 % A-54 % B durante 1 minuto, 39 % A-61 % B durante 4.8 minutos, 0 % A- 100 % B durante 0.1 minutos, 54 % A- 46 % B durante 1.1 minutos. La fase móvil se realizó a 62 °C, que permitió la detección de heteroduplex. Esta temperatura se obtuvo después de múltiples análisis con muestras analizadas 1-2°C por debajo y arriba de las temperaturas calculadas por el software del equipo DHPLC de transgenomics.

#### **d) INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DEL DHPLC**

La formación de heteroduplex fue evaluada con controles de DNA genómico secuenciado de tipo silvestre y con los polimorfismos. Se analizaron las curvas obtenidas por DHPLC; en el caso de heteroduplex se observaron y compararon con las curvas conocidas de DNA genómico secuenciado para esta alteración. En los casos de homoduplex (aparentes tipo silvestres), este fue mezclado con DNA silvestre para permitir la formación de heteroduplex en el caso de existir polimorfismos. Los resultados finales fueron informados como silvestre (wt) o con el polimorfismo detectado.

Se utilizaron muestras de control tipo silvestre y heterocigoto para analizar el

polimorfismo del acarreador de folatos y MTHFR mediante DHPLC; en las **imágenes 6, 7, 8 y 9** se observan los cromatogramas de control respectivamente.

## **PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO**

La invitación a participar en el estudio, así como la obtención del consentimiento informado, fueron realizados en conjunto con la Dra. Myrna Gloria Candelaria Hernández, investigadora principal del estudio.

Con la intención de no interferir con las citas de la consulta externa, durante la hospitalización del paciente para el tratamiento de inducción a la remisión, o para la fase de consolidación, se le explicó de manera detallada la posible influencia de variantes genéticas en la determinación de la respuesta a diferentes fármacos, en particular las relacionadas con el Metotrexate. Se les invitó a participar de manera voluntaria en este estudio, sin remuneración económica o de otra índole, con la toma de una muestra de sangre para la determinación de polimorfismos, así mismo se le informó que se evaluarían los posibles efectos secundarios del tratamiento a través de la consulta externa y estudios de laboratorio que se realizarían de manera estándar para su padecimiento. Aquellos pacientes que decidieron participar de manera voluntaria se le entregó una copia del consentimiento informado para que lo comentaran con sus familiares y al día siguiente, si el paciente acepta participar, se aclararon dudas del paciente o sus testigos, procediendo así a la firma del consentimiento informado (**ver anexo**). Para este trabajo se obtuvieron los mismos pacientes.

De no aceptar participar en el estudio, se le informó al médico tratante y continuó con el tratamiento que el hematólogo tratante considere mejor para el paciente.

## RESULTADOS

### CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

El estudio fue aprobado por los Comités Científico y de Ética del Instituto Nacional de Cancerología de México. Se incluyeron 29 pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica y/o linfoma linfoblástico, el cual fue confirmado por morfología, patología e inmunofenotipo. Se utilizó la FAB para la clasificación morfológica de las leucemias linfoblásticas. El inmunofenotipo fue dividido de acuerdo al precursor B o T.<sup>23</sup> Los linfomas linfoblásticos fueron diagnosticados de acuerdo la clasificación de tumores hematopoyéticos y tejidos linfoides de la OMS 2008,<sup>22</sup> así mismo, se estableció la etapa clínica basada en el Ann Arbor, y el pronóstico basado en el índice pronóstico internacional.<sup>46</sup> Las características principales de los pacientes se detallan en la **Tabla 3**. La media de edad fue de 31 años (rango de 15-64 años); fueron 15 pacientes del sexo masculino y 14 pacientes del sexo femenino (52% y 48 % respectivamente). 24 pacientes tuvieron diagnóstico de leucemia linfoblástica y 5 pacientes con diagnóstico de linfoma linfoblástico (82.7% y 17.3% respectivamente). La morfología por la FAB de las leucemias linfoblásticas correspondió a 22 pacientes con LAL-L2 (91.6%) y 2 paciente con LAL-L3 (8.3%), ninguno con LAL-L1. Se desconoce el inmunofenotipo en 5 pacientes (20.8%) con LAL, sin embargo 14 pacientes correspondieron a inmunofenotipo B común (58.3%), 3 pacientes a inmunofenotipo Pro-B (12.5%), 1 paciente a inmunofenotipo B madura (4.1%), y 1 paciente a inmunofenotipo T (4.1%). En 9 pacientes se estableció riesgo estándar (37.5%) y el resto, 15 pacientes, con riesgo alto (62.5%). Fueron 6 pacientes con



leucemia linfoblástica que presentaron cromosoma Philadelphia positivo (25%). Las características de los 5 pacientes con diagnóstico de linfoma linfoblástico fueron las siguientes: todos ellos con etapa clínica IV, ya que la invasión a médula ósea se considera como sitio extranodal. El pronóstico se basó en el IPI, y ningún paciente correspondió a riesgo bajo, 2 se clasificaron como riesgo intermedio bajo (40%), 2 riesgo intermedio alto (40%), y 1 paciente a riesgo alto (20%).

En total 9 de los 29 pacientes analizados cumplieron criterios para establecer un alto riesgo de infiltración a SNC, y el resto quedó como bajo riesgo. Los 29 pacientes tenían contemplado recibir tratamiento con el esquema de Hiper-CVAD independientemente de su diagnóstico, riesgo y etapa clínica. La media de leucocitos al momento del diagnóstico fue de 37.7 miles/mm<sup>3</sup> (0.8-243 miles/mm<sup>3</sup>), media de hemoglobina de 8.2 g/dL (3.9-16.3 g/dL), media de plaquetas de 69 000 miles/mm<sup>3</sup> (2000-527 000 miles/mm<sup>3</sup>), media de DHL de 841 UI/L (111-6437 UI/L), media de ácido úrico de 6.9 mg/dL (1.8-12.5 mg/dL). Cabe mencionar que en 22 de los 29 pacientes se tomó la muestra para el estudio durante el abordaje inicial, y el resto de pacientes se obtuvo la muestra durante el tratamiento.

## **RESULTADO DE POLIMORFISMOS**

Para el análisis de este estudio se tomaron los resultados de ambos polimorfismos de 13 pacientes incluidos de forma inicial. Al comparar las gráficas obtenidas mediante DHPLC con los controles para evaluar los polimorfismos RFCG804 del acarreador de folatos y C677T de MTHR se obtuvieron los siguientes resultados:

- Se encontró que la población presentó un porcentaje similar (53.8 %) de pacientes heterocigos para ambas mutaciones, con 7 pacientes para el acarreador de folatos y 7 pacientes para el MTHFR. Ningún paciente resultó ser homocigo para el polimorfismo del acarreador, a diferencia de 5 pacientes que fueron homocigos para el polimorfismo el MTHFR, representando el 38.4 % de esa población. El último grupo analizado, tipo silvestre, mostró también diferencia en cuanto al porcentaje de presentación, ya que fueron 6 pacientes, el 46.1 %, para el acarreador de folatos y 1 paciente para el MTHFR, representando el 7.69 % de la población.

En resumen:

#### **Polimorfismo del acarreador de folatos RFCG804**

- Tipo silvestre: 6 pacientes (46.1 %)
- Heterocigos: 7 pacientes (53.8 %)
- Homocigos: Ninguno

#### **Polimorfismo de MTHFR C677T**

- Tipo silvestre: 1 paciente (7.69 %)
- Heterocigos: 7 pacientes (53.8 %)
- Homocigos: 5 pacientes (38.4%)

En la **tabla 4** se resumen los resultados obtenidos de los 2 polimorfismos analizados mediante DHPLC.

## DISCUSIÓN

Existe diferencia en la frecuencia de polimorfismos al momento de compararlo en otro tipo de población por varios autores (**Tabla 5**). El polimorfismo RFCG804 del acarreador de folatos en la población caucásica se encontró en un 15 % de forma homóciga,<sup>33</sup> contrastando con nuestra población mexicana analizada, ya que no encontramos ningún paciente con estas características, teniendo únicamente el 53.8 % el polimorfismo heterócigo y el resto tipo silvestre (46.1 %). No sólo el origen caucásico fue diferente en estas poblaciones, ya que existen otras diferencias al momento de comparar ambas poblaciones, siendo la más importante el diagnóstico inicial, debido a que se trata de una población portadora de artritis reumatoide y la nuestra de pacientes con diagnóstico oncológico. Desconocemos la frecuencia exacta del polimorfismo del acarreador RFCG804 en nuestra población mexicana, lo cual sería de utilidad para poder realizar una comparación con nuestros resultados obtenidos.

Existe más información documentada en la literatura internacional del polimorfismo de MTHFR C677T, siendo también más compleja y diversa al momento de compararla con nuestra población, ya que el resultado homócigo para esta mutación en la población caucásica varía de un 10 a 49 %, tipo silvestre de 10.1 a 32.8 %, y sólo similar en aquellos con mutación heteróciga de 40 a 47.3 %. Aquellos pacientes de descendencia africana tienen la frecuencia más baja del polimorfismo homócigo reportado hasta en un 1.4 % de su población analizada, siendo heterócigos en el 19 % y tipo silvestre en la mayoría de su población, el 78 %.<sup>40, 36</sup>

Nuestros hallazgos del polimorfismo de MTHFR C677T no son nada parecidos a la población africana, ya que encontramos en un 38.4 % y 53.8 % el polimorfismo de forma homóciga y heteróciga respectivamente, con el restante 7.69 % de tipo silvestre. En el 2006, Guéant-Rodríguez y Mutchinick realizaron un análisis de la prevalencia de la misma mutación del MTHFR en población mexicana de 300 individuos sanos, encontrando también una alta frecuencia en su población analizada al momento de compararla con la población africana.<sup>49</sup> Se realizó una comparación de esos datos obtenidos con los analizados por nosotros, encontramos una frecuencia similar, ya que la población homóciga portadora de la mutación fue del 35.7 %, heteróciga 58 %, tipo silvestre en 6.3 %, y la nuestra homóciga 38.4 %, heteróciga 53.8 % y tipo silvestre de 7.69 %. De igual forma la media de edad fue similar en ambos grupos, 32 y 31 años respectivamente. Es de destacar que esta comparación es de dos poblaciones con características clínicas diferentes, ya que la nuestra es de pacientes oncológicos y la analizada por Guéant-Rodríguez es de población sana.

En la **figura 4** se observan las curvas de supervivencia global de acuerdo al polimorfismo del gen RFC; clínicamente parece el doble de supervivencia en aquellos heterócigos portadores de la mutación en comparación a los tipo silvestre (wt), sin embargo no existe significancia estadística ( $p=.30$ ), seguramente por el escaso número de pacientes. De igual forma, como se observa en la **figura 5**, no existe significancia estadística en la supervivencia global en los pacientes homócigos, heterócigos y tipo silvestre de la mutación de MTHFR ( $p=.34$ ).

Las características clínicas y demográficas encontradas en los pacientes de nuestra población con diagnóstico de leucemia/linfoma linfoblástico incluidos en este estudio fueron similares a los reportados previamente, tanto en el Instituto Nacional de Cancerología de México, como en la literatura internacional.<sup>7</sup> Fueron en total 29 pacientes que se analizaron, de los cuales únicamente 5 cumplieron criterios de linfoma linfoblástico, siendo el resto leucemias linfoblásticas. Morfológicamente la leucemia linfoblástica L1 es generalmente más común en la población pediátrica, lo que explica el porque no tuvimos ningún paciente que cumpliera características de LAL L1, ya que los pacientes estudiados tuvieron edad en rango de 15 a 64 años. En la población adulta, que son los pacientes que tratamos en el Instituto Nacional de Cancerología de México, es más frecuente la leucemia linfoblástica L2 y L3, y en la población analizada fueron 91.6% con LAL L2 y el resto con L3, lo cual es similar a lo reportado en la literatura internacional en la población adulta; de igual forma, por inmunofenotipo es más común la leucemia linfoblástica B común, y nuestros pacientes cumplieron criterios para clasificarlas de esta forma en un 58.3%, siendo el resto Pro B, B madura y únicamente 1 caso con inmunofenotipo T; así mismo el inmunofenotipo no fue concluyente en 5 casos, desconocemos la razón.

La positividad del cromosoma Philadelphia en los pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica se ha reportado en rangos del 25 al 30%;<sup>47</sup> en la población analizada se encontró este cromosoma en el 25% de nuestros pacientes con leucemia. Cabe mencionar que este porcentaje reportado en la literatura es en la población adulta, ya que en la población pediátrica se documenta únicamente en el 5% de los pacientes. Como se describió previamente, el cromosoma Philadelphia

confiere automáticamente un mal pronóstico en los pacientes con leucemia linfoblástica, así como edad mayor de 30 años, inmunofenotipo B maduro, leucocitosis inicial (más de 30 miles/mm<sup>3</sup> en leucemias B y más de 100 miles/mm<sup>3</sup> en leucemias T), infiltración a sistema nervioso central o testículos, y falta de respuesta a la inducción. Desafortunadamente la mayoría de nuestros pacientes, el 62.5 %, quedaron clasificados como riesgo alto por presentar alguno de estos factores, y el resto, 37.5 %, como riesgo estándar. De hecho es más probable que la población adulta quede clasificada con riesgo alto comparada con la población pediátrica, y esto es una más de las características que diferencian a las dos poblaciones, cuyos comportamientos, y sobre todo el pronóstico, sean tan diferentes.

Se ha mencionado que el riesgo de infiltración a SNC es frecuente en los pacientes con leucemia linfoblástica, por lo que se han hecho modelos predictores de riesgo de infiltración. En el Instituto Nacional de Cancerología de México establecemos el riesgo de infiltración a SNC en pacientes con leucemia linfoblástica de acuerdo a como fue realizado en el esquema original del Hiper-CVAD,<sup>3</sup> y esto es dependiendo del nivel de DHL al momento del diagnóstico o con el índice proliferativo del LCR (%S+G<sup>2</sup>M), sin embargo únicamente contamos con el nivel de deshidrogenasa láctica en el Instituto. 9 de los 29 pacientes analizados cumplieron criterios para establecer un alto riesgo de infiltración a SNC, y el resto quedó como bajo riesgo. En total fueron 9 pacientes con alto riesgo de infiltración a SNC por el nivel de DHL inicial, únicamente 1 (11.1 %) presentó infiltración durante su evolución confirmada por resonancia nuclear magnética de cráneo y citológico de LCR, 3 (33.3 %) presentaron líquidos con pleocitosis, de los cuales 1 se descartó por resonancia y

los otros 2 no se solicitó ningún examen complementario; en los otros 5 pacientes (55.5 %) sólo se obtuvo líquidos sin infiltración por el método de citología. Los restantes 20 pacientes quedaron con riesgo bajo de infiltración a SNC, sin embargo durante su evolución se documentó infiltración en 3 pacientes (15 %), y en 6 pacientes (30 %) fueron reportados líquidos con pleocitosis, de los cuales únicamente en 1 se obtuvo datos compatibles con infiltración mediante resonancia nuclear magnética y los otros 5 no se realizó otro examen complementario. En los 11 pacientes restantes (55 %) con riesgo bajo de infiltración a SNC nunca se documentó ninguna anomalía que hiciera sospechar infiltración. Es de llamar la atención que ambos grupos presentaron infiltración a SNC independientemente del riesgo establecido inicialmente (11.1% y 15 %), sin embargo son sólo 29 pacientes analizados. Cabe mencionar que el riesgo de infiltración a SNC es independiente al riesgo de recaída, ambos establecidos al momento del diagnóstico.

De los 6 paciente con cromosoma Philadelphia positivo, únicamente 1 (16.6 %) había recibido tratamiento con Imatinib al momento del análisis de los resultados, los otros 5 restantes (83.3 %) no se les estaba dando el medicamento por cuestiones administrativas, ya que el medicamento se obtiene mediante donación, lo que implica cumplir con ciertos requisitos. Afortunadamente se logró obtener respuesta citogenética completa en el único paciente con cromosoma Philadelphia positivo que recibió Imatinib, sin embargo presentó posteriormente recaída con evolución clonal y logró en una segunda ocasión otra respuesta citogenética completa.

A los linfomas linfoblásticos se les establece un riesgo basado en el Índice Pronóstico Internacional descrito en el año 1993,<sup>46</sup> el cual está basado en la etapa

clínica (Ann Arbor), desempeño físico, DHL, invasión a sitios extranodales y edad. Todos los linfomas linfoblásticos quedaron clasificados con una etapa clínica IV de Ann Arbor, por lo que se estableció riesgo intermedio bajo, intermedio alto y riesgo alto en un 40%, 40% y 20% respectivamente. La infiltración a la médula ósea se considera como invasión a sitio extranodal, así mismo, esta enfermedad es considerada como un linfoma agresivo, por lo que es inusual encontrar pacientes que se encuentren en etapas tempranas al momento del diagnóstico, lo que pudiera explicar el motivo de que ninguno de nuestros pacientes cumplió criterio para riesgo bajo.

8 pacientes ya habían fallecido al momento de realizar el análisis; la principal causa de muerte, como es esperada, fue la sepsis en 5 casos (62.5 %), seguida por neumonía, insuficiencia renal aguda y coagulación intravascular diseminada con 1 caso cada uno respectivamente. La mediana de supervivencia fue de 56 días (rango de 3 a 155 días) en 7 de los 8 pacientes fallecidos, el otro restante tuvo una supervivencia de 742 días, sin embargo fue incluido en el estudio en su segunda recaída a médula ósea y falleció en la inducción con su tercera línea de tratamiento. El resto de los pacientes vivos al momento del análisis (21 pacientes) se encuentran en diferentes fases del tratamiento. Es importante mencionar que 2 pacientes (6.8 %) tuvieron recaída de su enfermedad y 2 pacientes (6.8 %) persistencia de la misma a pesar del tratamiento, así mismo en 3 pacientes (10.3 %) se documentó progresión, 2 a sistema nervioso central y 1 a pleura. En la **figura 6** se observa la supervivencia global de únicamente los 13 pacientes a los que se analizaron los polimorfismos.



A pesar de que el esquema Hiper-CVAD es considerado como uno de los esquemas de primera línea en pacientes con diagnóstico de leucemia/linfoma linfoblástico, existen ciertos factores que pueden causar modificación en cuanto a los medicamentos que lo componen, como son la positividad al cromosoma Philadelphia y la expresión del CD20 en la superficie de las células, ameritando la adición de Imatinib y Rituximab respectivamente.<sup>47</sup> En este caso sólo 26 pacientes (89.6 %) recibieron tratamiento basado en Hiper-CVAD, de estos, únicamente 1 recibió Hiper-CVAD-Imatinib por ser cromosoma Philadelphia positivo y otro más recibió Hiper-CVAD-Rituximab por presentar positividad al CD20 mediante citometría de flujo. 1 paciente (3.4 %) cumplió criterios para recibir Hiper-CVAD convencional, sin embargo no se administró porque falleció antes del inicio del mismo; los otros 2 pacientes (6.8%) no recibieron Hiper-CVAD desde el inicio, 1 recibió esquema 7 más 3 por tener datos morfológicos sugestivos de leucemia mieloblástica, y el otro recibió dosis altas de Metotrexate por tener infiltración a sistema nervioso central desde el momento del diagnóstico.

Se compararon las características clínicas y demográficas más significativas de los 29 pacientes analizados de forma inicial con los 13 en los que se reportaron los polimorfismos. El diagnóstico fue de leucemia linfoblástica en 84.6 % y linfoma linfoblástico en 15.3 % de aquellos pacientes analizados finalmente, siendo los diagnóstico similares a los iniciales con 82.7 % y 17.2 % respectivamente; de igual forma el sexo y la positividad al cromosoma Philadelphia, ya que el 46.1 % fueron del sexo femenino en los 13 pacientes finalmente analizados y 48.2 % al inicio, así como 30 % con positividad al cromosoma Philadelphia en los últimos 13 pacientes y 25 %

en el inicio. La edad media al momento del diagnóstico también fue similar en ambas poblaciones, con una media de 35 años en los pacientes analizados al final y 31 años en los primeros 29 pacientes incluidos de forma inicial. Por lo que podemos afirmar que las características demográficas y clínicas se mantuvieron similares al momento de realizar el análisis final de los polimorfismos comparado con los pacientes incluidos al inicio del trabajo.

Una de las mayores limitantes de este estudio es la presencia de pocos pacientes analizados, sin embargo el análisis de estos u otros polimorfismos podrían ayudar en un futuro a mejorar la calidad de vida, respuestas logradas y disminuir toxicidades en futuras generaciones, incluso utilizarlos como marcadores pronósticos, ya que recientemente se ha reportado que la expresión de genes, como el acarreador de folatos humano reducido, está en relación al riesgo de recaída.<sup>48</sup>

Se planea complementar el análisis de los 29 pacientes incluidos de forma inicial, así como incluir nuevos pacientes al protocolo, con la finalidad de ampliar el tamaño de muestra y sobre todo vigilar la evolución de los pacientes.

## CONCLUSIONES

La prevalencia de los polimorfismos de nuestra población del Instituto Nacional de Cancerología de México, tanto RFCG804 y MTHFR C677T, son altos en comparación a los encontrados en otras poblaciones y similares a las reportadas previamente en población mexicana.

La diversidad en la frecuencia de estos polimorfismos podría estar en relación a las diferencias étnicas y geográficas, así como a la evolución generada por factores ambientales.

La frecuencia de variaciones de polimorfismos en diferentes poblaciones a nivel mundial ayuda determinar el índice de resultados obtenidos.

Las características clínicas de la población analizada son similares a las reportadas en la literatura internacional y a las reportadas previamente en nuestro Instituto.

No contamos con un método confiable para determinar el riesgo real de infiltración a SNC al momento del diagnóstico en pacientes con leucemia/linfoma linfoblástico, por lo que se deberá de buscar métodos alternos para establecerlo de una manera eficaz.

Las infecciones son la principal causa de muerte en pacientes con leucemia/linfoma linfoblástico de nuestro Instituto a pesar de las recomendaciones y profilaxis antimicrobiana utilizada; probablemente influya en nuestra población otros factores como nivel cultural, económico e higiene de cada uno de los pacientes y familiares.

El costo de los medicamentos limita su utilización oportuna, en este caso el Imatinib, ya se sabe del beneficio en la supervivencia y respuesta obtenida cuando se administra de forma concomitante con la quimioterapia, por lo que habrá que buscar la forma de contar con mayor disponibilidad y accesibilidad del mismo. Así mismo, el uso óptimo y personalizado de las diferentes opciones de tratamiento, a través de una evaluación farmacogenética, permitirá optimizar los recursos en este tipo de pacientes.

## BIBLIOGRAFIA

1. Farber et al. Temporary remission in acute leukemia in children produced by the folic acid antagonist, 4-aminopteroyl glutamic acid. *N Eng J Med* 1948;238:187-193.
2. Gokbuget et al. *Hematology ASH* 2006:133-141.
3. Kantarjian et al. Results of treatment with Hyper-CVAD, a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2000;18:547-56.
4. Moos et al. Identification of gene expression profiles that segregate patients with childhood leukemia. *Clin Cancer Res* 2002;8:3118-3130.
5. Cario et al. Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005;105:821-826.
6. Yubin et al. Prognostic role of the reduced folate carrier, the major membrane transporter for methotrexate, in childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the children's oncology group. *Clin Cancer Res* 2007;13:41-457.
7. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/aly1.html>.
8. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2009*. Atlanta: American Cancer Society.
9. Buffler et al. Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. *Cancer Invest* 2005;23:60-75.
10. Vanasse et al. Regulated genomic instability and neoplasia in the lymphoid lineage. *Blood* 1999;94:3997.
11. Sherr et al. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002;2:103.
12. Moloney et al. Radiogenic leukemia revisited. *Blood* 1987;70:905-908.
13. Leone et al. The incidence of secondary leukemia. *Haematologica* 1999;84:937-945.
14. Kinlen et al. Evidence for an infective cause of childhood leukemia. *Lancet* 1988;332:1323-1327.
15. Pui et al. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004;350:49-62.

16. Davies et al. Glutathione S-transferase genotypes, genetic susceptibility, and outcome of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100:67.
17. Smith et al. Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity is associated with increased risk of leukemia with MLL translocations in infants and children. *Blood* 2002;100:4590.
18. Skibola et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12810.
19. Wiemels et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:4004.
20. Skibola et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:3786.
21. Thompson et al. Maternal folate supplementation in pregnancy and protection against acute lymphoblastic leukaemia in childhood: A case-control study. *Lancet* 2001;358:1935.
22. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Swerdlow;4th Ed, Lyon 2008.
23. Craig et al. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms *Blood* 2008;11;3941-3967
24. Hoelzer et al. Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* 1988;71:123-131.
25. Radford et al. Adult acute lymphoblastic leukemia. Results of the Iowa HOP-L protocol. *J Clin Oncol* 1989;7:58-66.
26. Candelaria et al. Genetic determinants of Cancer Drug efficacy and toxicity. Practical considerations and perspectives. *Anticancer Drugs* 2005;16:923-933.
27. Taja-Chayeb et al. Importance of the polymorphisms of the Thiopurine S-methyltransferase Gene (TMPT) determination in Mexican Mestizo Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Medical Oncology* 2008;25:56-62.

28. Bertino et al. Cancer research: from folate antagonism to molecular targets. *Best Pract Res Clin Haematol* 2009;22:577-82.
29. Perry. *The chemotherapy source book* 4th ed; Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
30. Genestier et al. Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology* 2000;47:247-257.
31. Hider et al. The pharmacogenetics of methotrexate. *Rheumatology* 2007;46:1520-1524.
32. Laverdiere et al. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100:3832-3834.
33. Dervieux et al. Contribution of common polymorphisms in reduced folate carrier and gamma-glutamylhydrolase to methotrexate polyglutamate levels in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics* 2004;14:733-739.
34. Dervieux et al. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidilate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:2766-2774.
35. Rozen et al. Molecular genetics of methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *J. Inherit Metab Dis* 1996;19:589-594.
36. Ranganathan et al. Methotrexate pharmacogenetics: the first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:1366-1377.
37. Van Ede et al. Effect of folic or folinic acid supplementation on the toxicity and efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis: a forty –eight week, multicenter, randomized, double-blinded, placebo controlled study. *Arthritis Rheum* 2001;44: 1515-1524.
38. Urano et al. Polymorphisms in the methylenetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics* 2002;12:183-90.
39. Berkun et al. Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1227-1231.

40. Hughes et al. Racial or ethnic differences in allele frequencies of single-nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and their influence on response to methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1213-1218.
41. Fisher MC, Cronstein BN. Meta-analysis of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms affecting methotrexate toxicity. *J Rheumatol*. 2009; 36: 539-545.
42. Fang et al. Detection of C677T mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene by denaturing high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 2004;18:625-629.
43. Stanislawska-Sachadyn et al. The reduced folate carrier (SLC19A1) c.80G>A polymorphism is associated with red cell folate concentrations among women. *Ann Hum Genet* 2009;73:484-491.
44. Li et al. Detecting the polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene by denaturing high performance liquid chromatography. *Zonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2006;23:184-185.
45. Orlick et al. Intrinsic and acquired resistance to Methotrexate in acute leukemia. *N Engl J Med* 1996;335:1041-1048.
46. Shipp et al. A predictive model for aggressive non Hodgkin's lymphoma. *N Eng J Med* 1993;329:987-994.
47. Thomas et al. Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia with hyper-CVAD and imatinib mesylate. *Blood* 2004;103:4396-4407.
48. Ge et al. Prognostic role of the reduced folate carrier, the major membrane transporter for Methotrexate, in childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the Children's Oncology Group. *Clin Cancer Res* 2007;13: 451-457
49. Guéant-Rodríguez, Mutchinick et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006;83:701-707



# ANEXOS

## FIGURAS

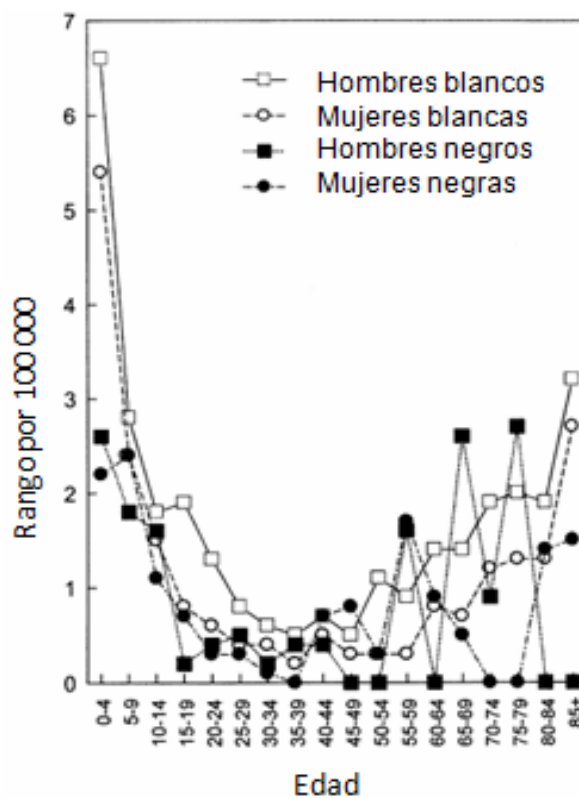


Figura 1. Incidencia de leucemia aguda linfoblástica por raza y edad.

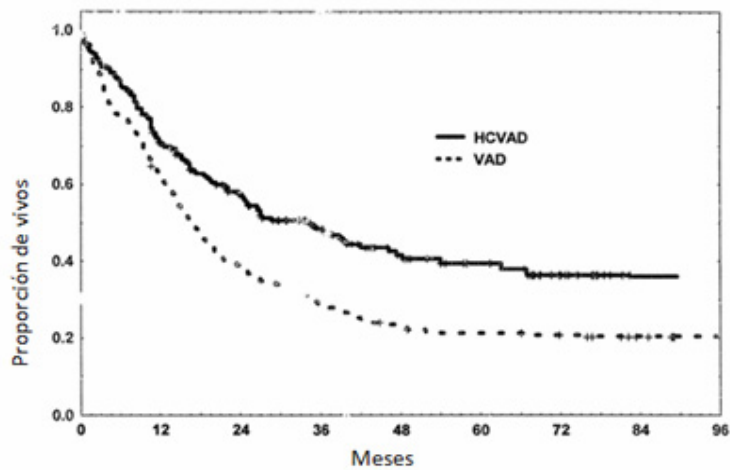
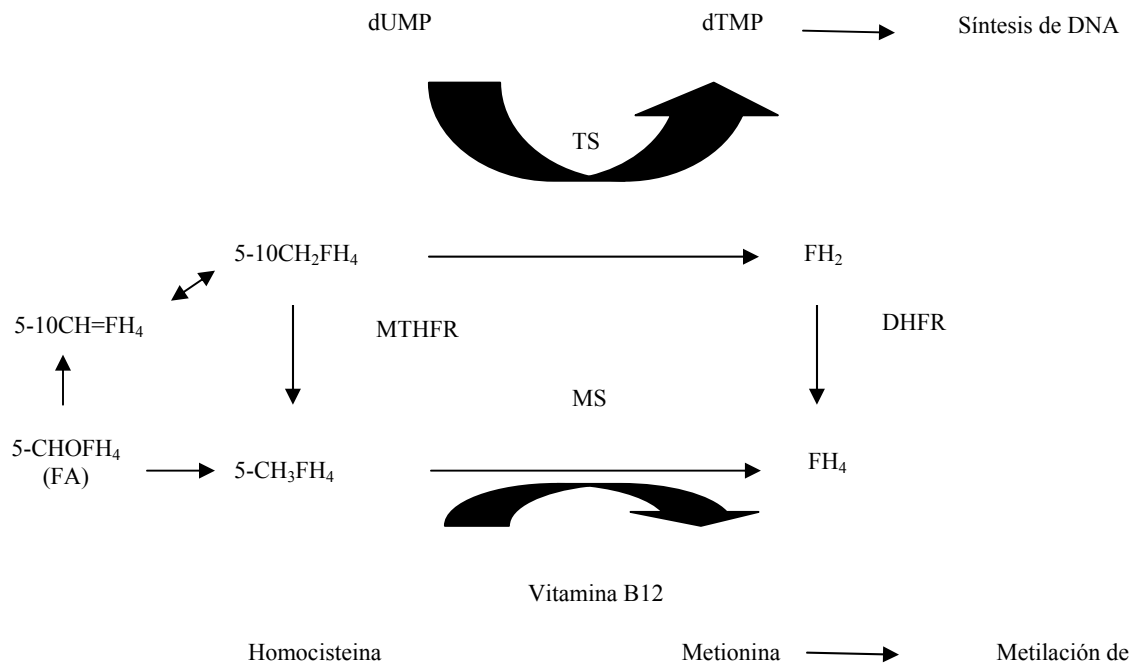
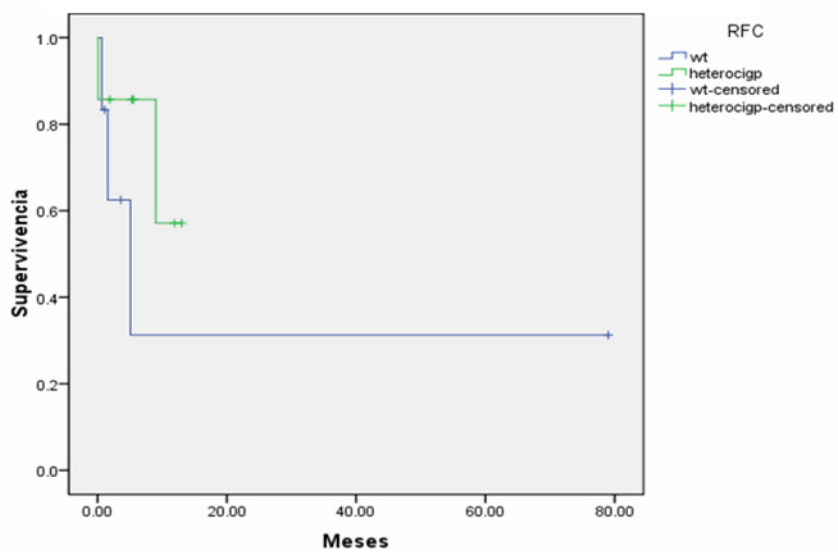


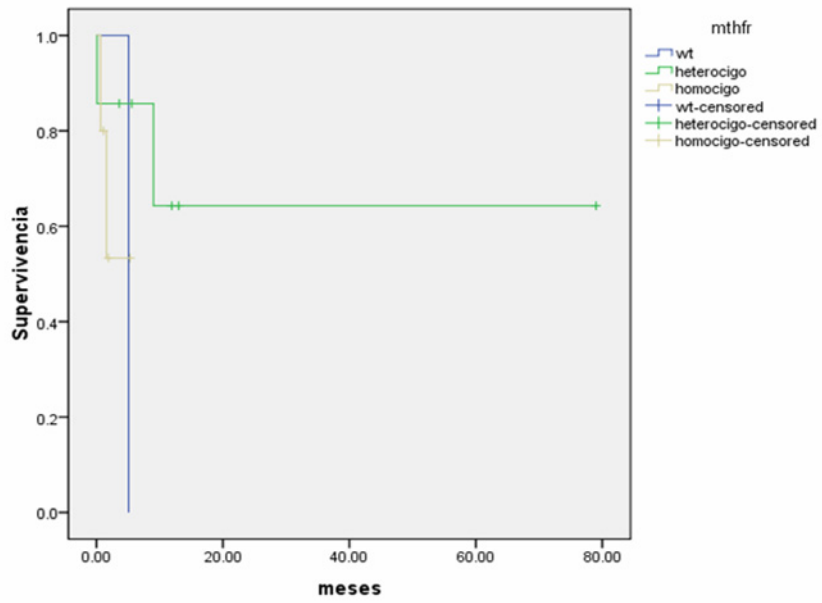
Figura 2. Comparación de esquema VAD vs Hiper-CVAD.



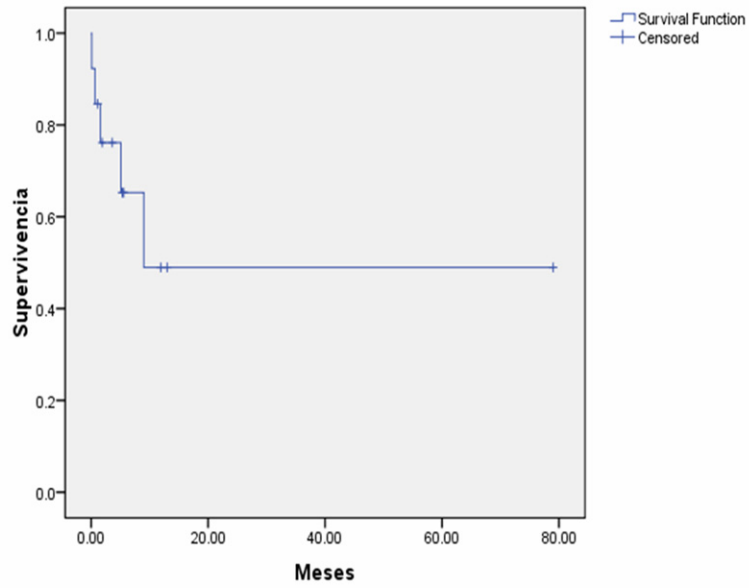
**Figura 3.** Metabolismo del Metotrexate.



**Figura 4.** Supervivencia global de acuerdo al polimorfismo del gen RFCG804.

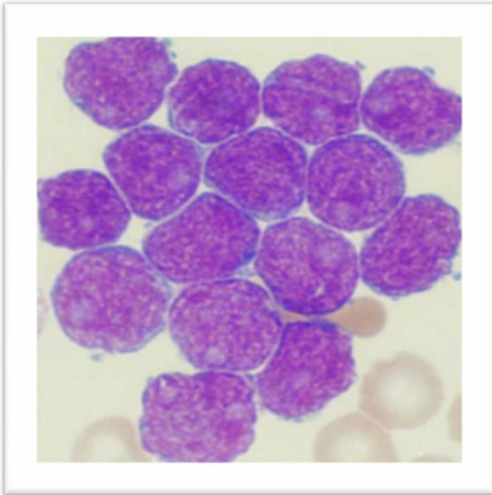


**Figura 5.** Supervivencia global de acuerdo al polimorfismo del gen MTHFR C677T.

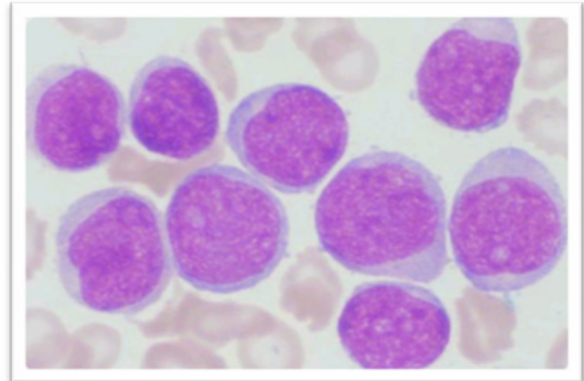


**Figura 6.** Supervivencia global.

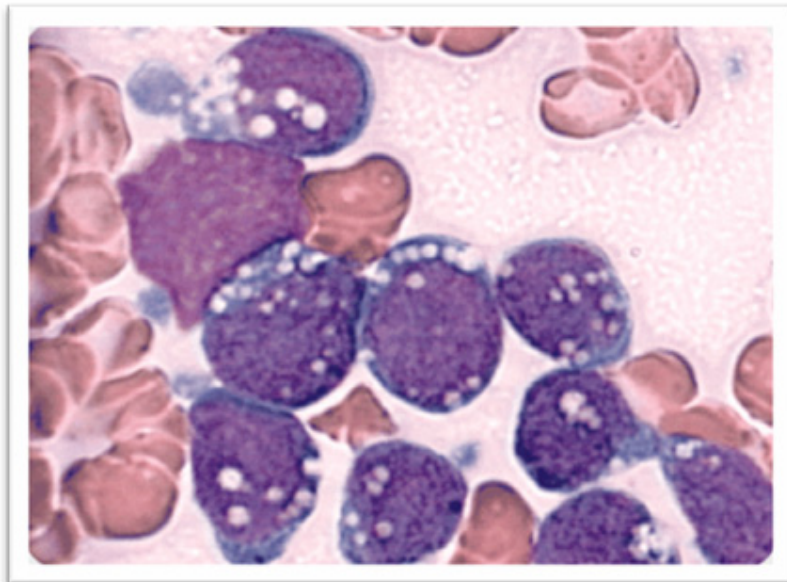
## IMÁGENES



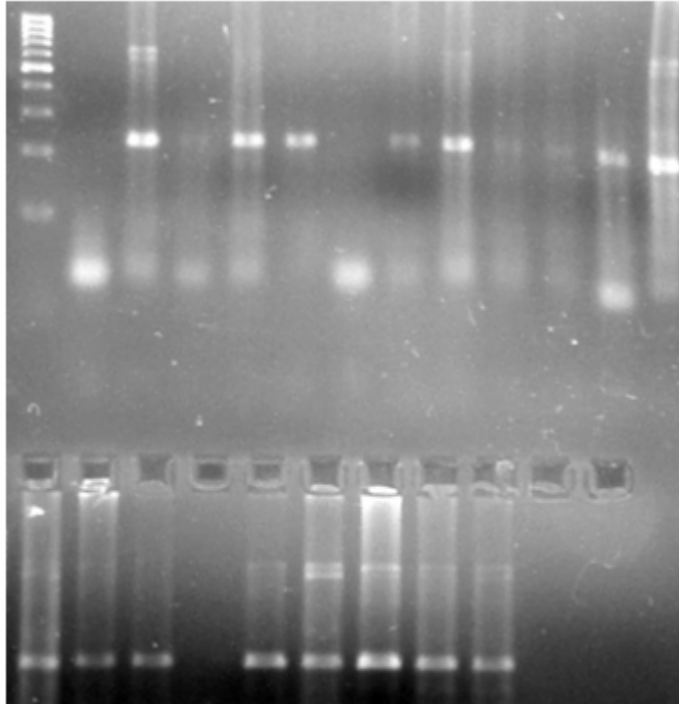
**Imagen 1.** LAL L1 por FAB. Se observan células pequeñas con cromatina homogénea y escaso citoplasma.



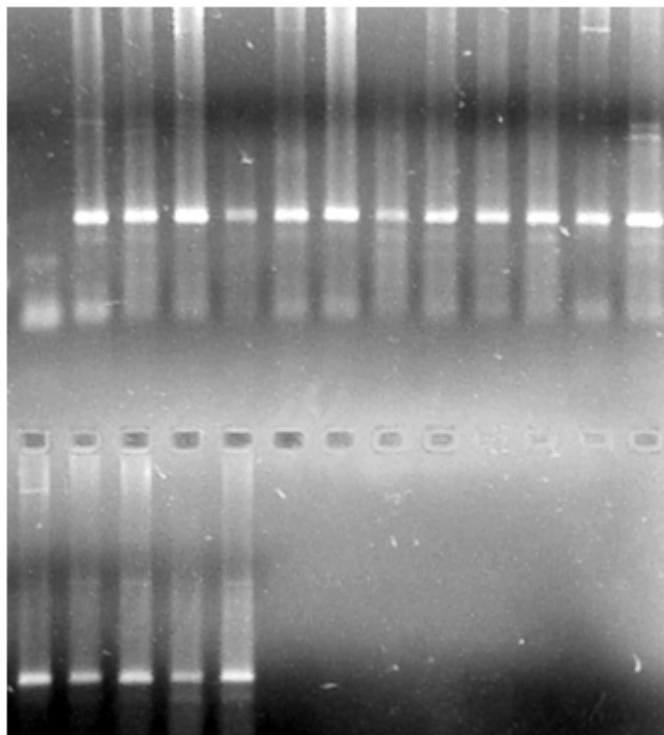
**Imagen 2.** LAL L2 por FAB. Se observan células grandes y heterogéneas con núcleo irregular y cantidad de citoplasma variable.



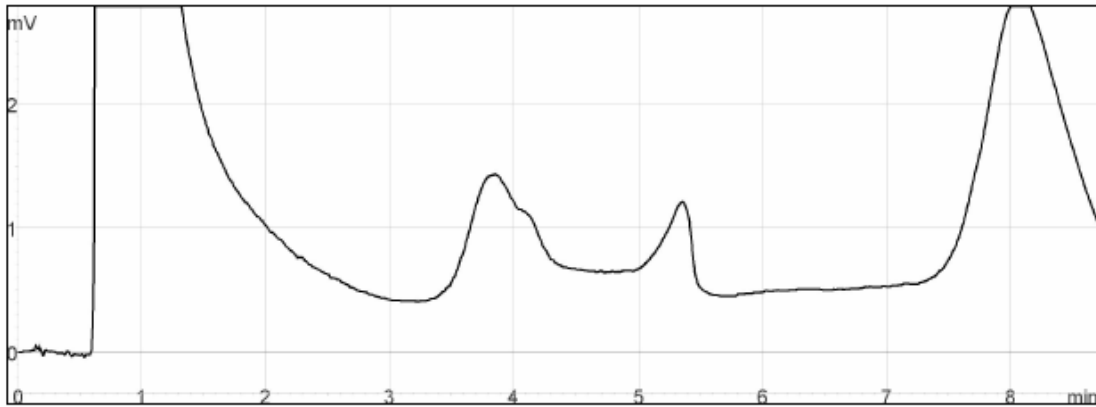
**Imagen 3.** LAL L3 por FAB. Se observan células grandes y homogéneas, con células vacuoladas en más del 25%.



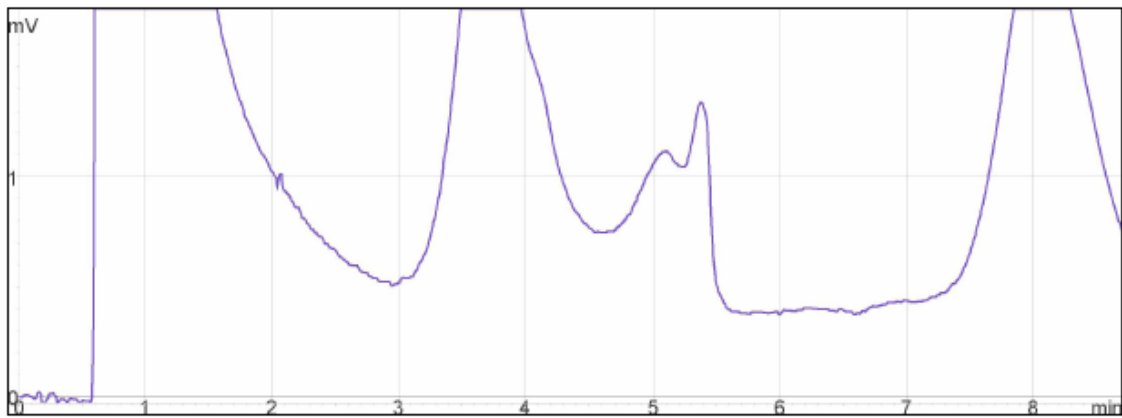
**Imagen 4.** Amplificación por PCR del gen que codifica para el acarreador de folatos.



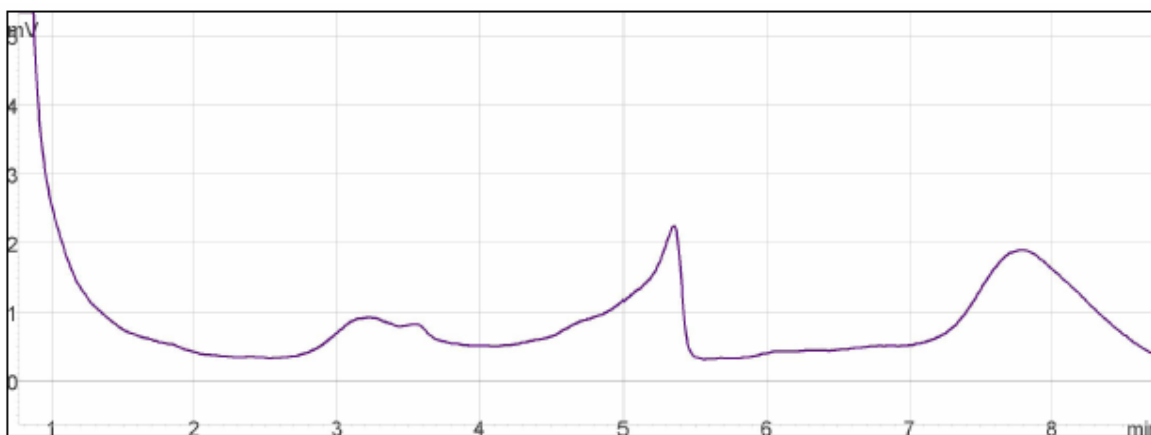
**Imagen 5.** Amplificación por PCR del gen que codifica para la enzima MTHFR.



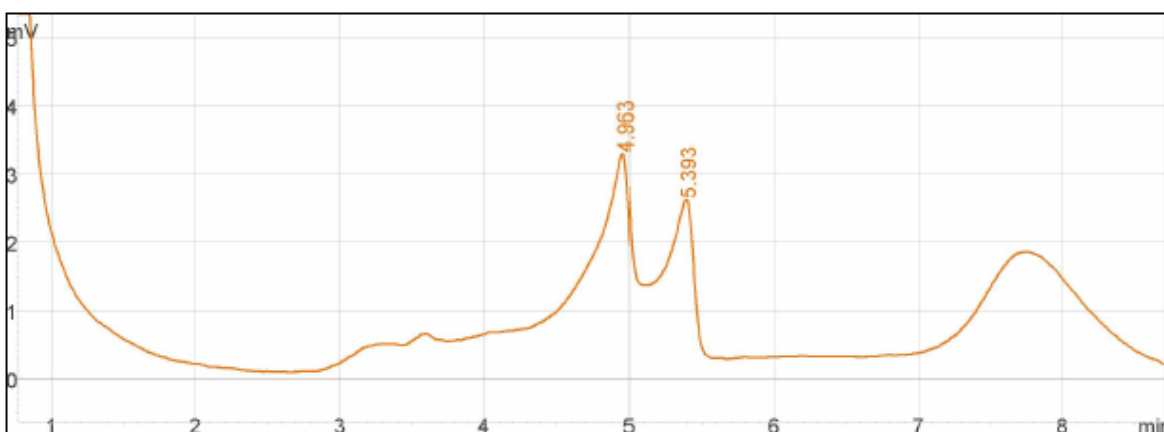
**Imagen 6.** Cromatograma de control tipo silvestre para la mutación de acarreador de folatos RFCG804.



**Imagen 7.** Cromatograma de control heterocigo para la mutación de acarreador de folatos RFCG804.



**Imagen 8.** Cromatograma de control tipo silvestre para la mutación del MTHFR C677T.



**Imagen 9.** Cromatograma de control heterocigoto para la mutación del MTHFR C677T.

## TABLAS

<b>TABLA 1. Signos y síntomas al momento del diagnóstico de leucemia linfoblástica</b>	
	<b>% reportado</b>
<b>Hemorragia</b>	35 - 38
<b>Infección</b>	12 - 38
<b>Síntomas B</b>	27 -33
<b>Linfadenopatía</b>	
<b>Células B</b>	21 - 46 (adulto), 17 - 60 (niños)
<b>Células T</b>	67 - 71 (adulto), 79 (niños)
<b>Hepatomegalia</b>	
<b>Células B</b>	13 - 50 (adulto), 3 - 5 (niños)
<b>Células T</b>	34 (adulto), 41 - 72 (niños)
<b>Esplenomegalia</b>	
<b>Células B</b>	30 - 49 (adulto), 5 - 80 (niños)
<b>Células T</b>	52 (adulto), 54 - 84 (niños)
<b>Infiltración a SNC</b>	
<b>Células B</b>	5 - 9 (adulto), 2 - 5 (niños)
<b>Células T</b>	9 - 11 (adulto), 8 - 17 (niños)
<b>Masa mediastinal</b>	
<b>Células B</b>	2 - 6 (adultos), 0.2 - 11 (niños)
<b>Células T</b>	40 - 91 (adultos), 39 - 54 (niños)
<b>Afección a pleura</b>	9 - 40 (adultos), 5 - 7 (niños)
<b>Afección a testículos</b>	2 - 4 (adultos), 2 (niños)

SNC: Sistema nervioso central

<b>Tabla 2. Diferencias morfológicas entre leucemia aguda mieloide y linfoide</b>		
<b>Característica</b>	<b>Mieloblasto</b>	<b>Linfoblasto</b>
<b>Tamaño</b>	Grande	Pequeño
<b>Cantidad de citoplasma</b>	Moderado	Escaso
<b>Cromatina</b>	Fina-Granular	Condensada
<b>Nucleolo</b>	Prominente	No prominente
<b>Bastones de Auer</b>	Presentes	Ausentes
<b>Espejo de mano</b>	Ausentes	Presentes



<b>Tabla 3. Características de los pacientes</b>		
<b>Variable</b>	<b>Número (N:29)</b>	<b>%</b>
<b>Mediana de edad</b>	31(15-64)	
<b>Sexo, hombre/mujer</b>	15/14	51.7/48.2
<b>Diagnóstico</b>		
<b>Leucemia linfoblástica</b>	24	82.7
<b>Tipo por FAB, L1/L2/L3</b>	0/22/2	0/91.6/8.3
<b>Inmunofenotipo</b>		
<b>Desconocido</b>	5	20.8
<b>B común</b>	14	58.3
<b>Pro-B</b>	3	12.5
<b>B Madura</b>	1	4.1
<b>T</b>	1	4.1
<b>Riesgo</b>		
<b>Estándar/alto</b>	9/15	37.5/62.5
<b>Cromosoma Ph+</b>	6	25
<b>Linfoma linfoblástico</b>	5	17.3
<b>Ann Arbor IV</b>	5	100
<b>IPI, B/IB/IA/A</b>	0/2/2/1	0/40/40/20
<b>Tratamiento</b>	Hiper-CVAD	100
<b>Media de leucocitos (miles/mm<sup>3</sup>)</b>	37.7 (0.8-243)	
<b>Media de hemoglobina (gr/dL)</b>	8.2 (3.9-16.3)	
<b>Media de plaquetas (miles/mm<sup>3</sup>)</b>	69 000 (2000-527 000)	
<b>Media de DHL (UI/L)</b>	841 (111-6437)	
<b>Media de ácido úrico (mg/dL)</b>	6.9 (1.8-12.5)	

LAL: Leucemia linfoblástica; FAB: Clasificación Franco-Estadounidense-Británica; Ph+: Philadelphia positivo; IPI: Índice pronóstico internacional; B: Bajo; IB: Intermedio bajo; IA: Intermedio alto; A: Alto; DHL: Deshidrogenasa láctica; β-2MCG: Beta 2 microglobulina

Número paciente	RFCG804	MTHFR C677T
1	WT	HM
2	WT	HT
3	HT	HT
4	WT	HM
5	HT	HT
6	HT	HM
7	WT	WT
8	HT	HT
9	HT	HT
10	HT	HT
11	WT	HT
12	HT	HM
13	WT	HM

RFCG804: Acarreador de folatos; MTHFR C677T: Gen de Metiltetrahidrofolato reductasa; WT: Silvestre; HT: Heterócigo; HM: Homócigo.

**Tabla 4.** Resultados de los polimorfismos analizados.

Autor	Polimorfismo	Población evaluada	Frecuencia (%)	Otros
Dervieux, 2004	RFCG804	Caucásicos	Homócigo: 15 %	Pacientes con AR
<b>Trabajo actual, 2010</b>	<b>RFCG804</b>	<b>Mexicanos</b>	<b>Homócigos: 0 %</b> <b>Heterócigos: 53.8 %</b> <b>Silvestre: 46.1 %</b>	<b>Pacientes con LAL/LL</b>
Ranganathan, 2006	MTHFR C677T	Caucásicos	Homócigo: 10 % Heterócigo: 40 % Silvestre: 30 %	Pacientes con AR
Hughes, 2006	MTHFR C677T	Caucásicos  Africanos	Homócigos: 49 % Heterócigos: 39 % Silvestre: 10.1 % Homócigos: 1.4 % Heterócigos: 19 % Silvestre: 78 %	Pacientes con AR
Guéant-Rodríguez, 2006	MTHFR C677T	Caucásicos  Mexicanos	Homócigos: 19.9 % Heterócigos: 47.3 % Silvestre: 32.8 % Homócigos: 35.7 % Heterócigos: 58 % Silvestre: 6.3 %	Población sana  Población sana
<b>Trabajo actual, 2010</b>	<b>MTHFR C677T</b>	<b>Mexicanos</b>	<b>Homócigos: 38.4 %</b> <b>Heterócigos: 53.8 %</b> <b>Silvestre: 7.69 %</b>	<b>Pacientes con LAL/LL</b>

AR: Artritis reumatoide; LAL/LL: Leucemia/Linfoma Linfoblástico

**Tabla 5.** Comparación de la frecuencia de diferentes polimorfismos que intervienen en el metabolismo del Metotrexate analizados en diferentes poblaciones.

## **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

- **TITULO DEL ESTUDIO**

**Evaluación de SNPs en los genes involucrados en el transporte y metabolismo de folatos y la expresión del transportador y activador de citosin-arabinósido, como factor pronóstico de respuesta y supervivencia en pacientes con leucemia linfoblástica.**

- **I. LA JUSTIFICACION Y EL OBJETIVO DEL ESTUDIO.**

Lo/la invitamos a que participe en un estudio de investigación. Los médicos del Instituto Nacional de Cancerología están interesados en estudiar la influencia de algunos genes en la respuesta y posibilidad de toxicidad secundaria a un grupo de medicamentos (quimioterapia: Metotrexate, Citarabina), que son requeridos para el tratamiento de pacientes con diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica. El objetivo de este estudio es determinar la frecuencia de estas alteraciones genéticas (polimorfismos) que pudieran influir en la respuesta a su tratamiento.

En este estudio no se administrarán medicamentos en experimentación. Usted recibirá el tratamiento indicado por su médico. Usted y su familia deben hacer todas las preguntas que deseen antes de que usted decida participar en este estudio. Asegúrese de obtener toda la información que necesita antes de tomar la decisión.

- **II. LOS PROCEDIMIENTOS MÉDICOS QUE SE REALIZARÁN AL SUJETO DURANTE EL ESTUDIO, ESPECIALMENTE LOS INVASORES.**

En este estudio se le realizará una punción venosa, para obtener una muestra de aproximadamente 15 ml (3 cucharaditas), a partir de la cual se obtendrá DNA (material genético) para evaluar las posibles variaciones que pudieran influir en la respuesta a la quimioterapia que su médico le indique. Posteriormente, el grupo de investigadores tendremos acceso a su expediente clínico, para registrar la respuesta al tratamiento y los efectos secundarios y grado de los mismos que presente.

El material genético será utilizado exclusivamente para fines de esta investigación. En caso de que futuras investigaciones requieran del uso de esta muestra, se le informará y solamente podrá utilizarse si usted acepta participar y firmar un nuevo consentimiento informado.

### ¿POR QUÉ SE ME SELECCIONÓ?

Se le invita a participar porque usted recibirá un tratamiento que incluye dos medicamentos que se llaman Metotrexate y Citarabina, ambos necesarios para el tratamiento de su enfermedad.

### ¿EN QUÉ CONSISTIRÁ MI PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO?

Si usted acepta participar se le realizará una punción venosa para obtener una muestra de 15 ml a partir de la cual se obtendrá DNA (material genético) para evaluar las posibles variaciones que influyen en la respuesta y desarrollo de toxicidad por tiopurinas.

- **LAS RESPONSABILIDADES DEL SUJETO.**

Al aceptar participar en este estudio, se le solicita atentamente asistir a sus consultas en las fechas que le indique su médico, para poder evaluar la respuesta al tratamiento. También le pedimos informar a su hematólogo tratante de cualquier malestar que presente durante su tratamiento. Si usted se muda o no regresa a la clínica, podrán tratar de llamarlo(la) para dar con usted y averiguar cómo se encuentra.

- **III. LOS BENEFICIOS ESPERABLES, Y UNA MENCIÓN CATEGÓRICA DE QUE NO SE ESPERAN BENEFICIOS CLÍNICOS PARA EL SUJETO, CUANDO SEA EL CASO.**

Este estudio pretende evaluar variaciones (polimorfismos) en su material genético, que permitirán en un futuro probablemente seleccionar a los pacientes con mayor respuesta al tratamiento que va a recibir.

- **IV. GASTOS ADICIONALES, COMPENSACIONES Y PAGO POR LESIONES RELACIONADAS CON EL ESTUDIO.**

A usted no se le cobrará ningún costo por la toma de muestra y procesamiento de la misma. No recibirá ninguna remuneración por su participación, ni pago por indemnizaciones.

El tratamiento que el médico indique para su enfermedad, estará a su cargo. Esta investigación no pagará por su tratamiento o otros estudios de laboratorio que requiera para su atención.

- **V. QUE EL CONSENTIMIENTO IMPLICA PERMITIR EL ACCESO A SU EXPEDIENTE MÉDICO A TERCEROS, CON UNA INDICACIÓN DE LOS MISMOS (QUE DEBERÁ INCLUIR AL COMITÉ). QUE TAL ACCESO SE REALIZARÁ CON RESPETO A SU PRIVACIDAD, Y QUE NO SE PUBLICARÁ SU IDENTIDAD, EN TANTO EN CUANTO LO PERMITA LA LEY.**

La información reunida para el estudio será confidencial. El grupo de investigadores tendrá acceso a su expediente clínico y los resultados serán capturados en una base de datos, donde usted no podrá ser identificado.

Podremos publicar los resultados del estudio o presentarlos en reuniones profesionales, pero su nombre no se divulgará, ni se mencionará en ningún informe o publicación. No es posible que terceras personas, amigos, o allegados suyos sepan de su enfermedad y conozcan otras cosas únicas acerca de su edad, sexo o enfermedad que pudieran identificarlo a usted en una publicación.

- **VI. QUE RECIBIRÁ OPORTUNAMENTE CUALQUIER INFORMACIÓN NUEVA QUE PUDIERA AFECTAR A SU DESEO DE PERMANECER EN EL ESTUDIO.**

Una vez obtenido el resultado de esta prueba en sangre, tanto usted, como su médico tratante serán informados del resultado.

- **VII. LAS PERSONAS A CONTACTAR EN CASO DE TENER PREGUNTAS SOBRE EL ESTUDIO, CON SU NOMBRE COMPLETO Y TELÉFONO DE CONTACTO.**

Cualquier pregunta que usted pueda tener acerca de cualquier aspecto del estudio, ahora o en cualquier momento en el futuro. Le alentamos a que obtenga respuestas a todas sus preguntas comunicándose con la Dra. Myrna Gloria Candelaria Hernandez, al 56-28-04-79, investigadora principal.

Es posible que quiera que un amigo o familiar lea el formulario y hable con el médico del estudio junto con usted. Usted puede también hablar con su médico personal acerca de lo que debe hacer. Hablar de las cosas puede ayudarle a tomar la decisión correcta.

- **VIII. LAS PERSONAS (Y SUS TELÉFONOS) A CONTACTAR EN CASO DE TENER PREGUNTAS ACERCA DE SUS DERECHOS COMO PARTICIPANTE EN EL ESTUDIO, O EN CASO DE CREER QUE HA SUFRIDO UNA LESIÓN COMO RESULTADO DE SU PARTICIPACIÓN. ESTAS PERSONAS SERÁN MIEMBROS DEL COMITÉ Y SU IDENTIDAD SE COMUNICARÁ A LA COMUNIDAD DE INVESTIGADORES PARA QUE PUEDAN TENERLO EN CUENTA A LA HORA DE REDACTAR LOS CONSENTIMIENTOS.**

Para información acerca de los derechos de los sujetos de investigación, usted puede comunicarse con el Secretario Técnico del Comité de Etica, Dra. Mary Cruz Pérez Amador, al teléfono 56.28-04-00, extensión 338.

- **IX. LA DURACIÓN ESPERADA DE LA PARTICIPACIÓN DE CADA SUJETO.**

Si usted decide participar, se revisará su expediente durante 12 meses para conocer el estado de su enfermedad.

- **X. EL NÚMERO DE SUJETOS A INCLUIR EN TODO EL ESTUDIO Y EN EL CENTRO DEL INVESTIGADOR.**

Se incluirán aproximadamente 30-35 pacientes en esta Institución.

- **XI. UNA MENCIÓN EXPLÍCITA Y BIEN DIFERENCIADA QUE INDIQUE QUE LA PARTICIPACIÓN ES TOTALMENTE VOLUNTARIA Y QUE EL SUJETO PUEDE:**

Su participación es completamente voluntaria. Usted puede optar por no participar, y puede retirar su consentimiento en cualquier momento. Es decir, si una vez tomada la muestra de sangre usted decide que no se analice, ésta no se procesará. Su decisión acerca de la participación no afectará a la atención que recibe en el hospital, ahora o en el futuro. Sin embargo, aún si usted se retira del estudio, los médicos del estudio agradecerían poder examinar sus registros médicos en el futuro para ver cómo le ha ido a usted, pero usted puede también negarse a que se haga esto. Si usted cambia de parecer, se le atenderá igual que a cualquier paciente.

Le agradecemos su consideración. Si está dispuesto(a) a participar en esta investigación, por favor, firme a continuación.

**Autorización:**

Yo, \_\_\_\_\_, he leído todo lo antes mencionado, se me han contestado mis preguntas y, por voluntad propia, doy mi consentimiento a participar en este estudio de investigación, en el entendido de que el mismo incluye un examen por el personal de investigación de mis registros médicos para anotar mi diagnóstico definitivo y resultado del tratamiento. Este consentimiento seguirá en vigor hasta la recopilación completa de los datos del estudio, a menos que yo retire mi consentimiento. Mi firma a continuación indica que he recibido una copia de este formulario de consentimiento.

_____	_____
Nombre y (Firma del Participante)	(Fecha)
_____	_____
Dirección	Teléfono

**INVESTIGADOR:**

_____	_____
Nombre y firma de la persona que obtiene el consentimiento	(Fecha)

**TESTIGOS**

_____	_____
Nombre y (Firma del testigo 1)	(Fecha)

_____	_____
Dirección	Teléfono

_____	_____
Nombre y (Firma del testigo 2)	(Fecha)

_____	_____
Dirección	Teléfono