



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

SECRETARÍA DE SALUD

**FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS DEL GEN *TIOPURIN*
S-METILTRANSFERASA EN PACIENTES SOBREVIVIENTES DE
LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA PRECURSOR DE CÉLULAS B Y
SU RELACIÓN CON EL ANTECEDENTE DE NEUTROPENIA COMO
EFECTO ADVERSO DURANTE SU TRATAMIENTO CON
6- MERCAPTOPURINA**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE HEMATÓLOGA PEDIATRA

PRESENTA

DRA. CLAUDIA SOFÍA GÓMEZ GONZÁLEZ

TUTOR DE TESIS

DR. ROGELIO PAREDES AGUILERA

CO TUTORA

DRA. ARIADNA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL

MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS DEL GEN *TIOPURIN*
S-METILTRANSFERASA EN PACIENTES SOBREVIVIENTES DE LEUCEMIA
AGUDA LINFOBLÁSTICA PRECURSOR DE CÉLULAS B Y SU RELACIÓN
CON EL ANTECEDENTE DE NEUTROPENIA COMO EFECTO ADVERSO
DURANTE SU TRATAMIENTO CON
6- MERCAPTOPURINA**

Dr. José N. Reynes Manzur
Director de Enseñanza

Dra. Mirella Vázquez Rivera
Jefe del Departamento de Pre y Postgrado

Dr. Rogelio A. Paredes Aguilera
Profesor Titular del Curso de Hematología
Tutor

Dra. Ariadna González del Ángel
Subdirectora de Investigación Médica
Co Tutora

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ariadna González, mi asesora de tesis. Por haberme brindado nuevamente su confianza para iniciar este proyecto de investigación. Muchas gracias por su disponibilidad y amabilidad. Es usted un ejemplo de disciplina y humildad. Desde hace tiempo nos conocemos y espero que forjemos con los años una gran amistad.

Al Dr. Miguel Ángel Alcántara, por su invaluable colaboración al frente del Laboratorio de Biología Molecular.

A Omar, mi eterno compañero durante este arduo camino. Gracias por tanta paciencia y amor.

A mis maestros: Dr. Rogelio Paredes, Dra. Catalina Taboada, Dra. Norma López, Dra. Angélica Monsiváis, Dra. Lourdes González, Dra. Ángeles Del Campo.

A mis amigas Evelyn, Keny e lo, por su compañía y apoyo durante la subespecialidad.

A Cesárea y a Benilde, colaboradoras incondicionales en este proyecto de tesis. Gracias al conocimiento de su especialidad y a su disposición, se logró el análisis integral de los pacientes.

A la Maestra Luisa Díaz por su invaluable ayuda para la culminación de este proyecto.

A todos los pacientes incluidos en este protocolo, por su confianza.

Gracias a la vida y a Dios por todas sus bendiciones.

"Los famas para conservar sus recuerdos proceden a embalsamarlos en la siguiente forma: luego de fijado el recuerdo con pelos y señales, lo envuelven de pies a cabeza en una sábana negra y lo colocan parado contra la pared de la sala, con un cartelito que dice: "Excursión a Quilmes", o: "Frank Sinatra". Los cronopios, en cambio, esos seres desordenados y tibios, dejan los recuerdos sueltos por la casa, entre alegres gritos, y ellos andan por el medio y cuando pasa corriendo uno, lo acarician con suavidad y le dicen: "No vayas a lastimarte", y también: "Cuidado con los escalones". Es por eso que las casas de los famas son ordenadas y silenciosas, mientras que en las de los cronopios hay gran bulla y puertas que golpean. Los vecinos se quejan siempre de los cronopios, y los famas mueven la cabeza comprensivamente y van a ver si las etiquetas están todas en su sitio."

Julio Cortázar.

FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS DEL GEN *TIOPURIN S-METILTRANSFERASA* EN PACIENTES SOBREVIVIENTES DE LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA PRECURSOR DE CÉLULAS B Y SU RELACIÓN CON EL ANTECEDENTE DE NEUTROPENIA COMO EFECTO ADVERSO DURANTE SU TRATAMIENTO CON 6- MERCAPTOPURINA

Tesista	Dra. Sofía Gómez González
Grado a obtener	Sub Especialista en Hematología Pediátrica
Tutor	Dr. Rogelio Paredes Aguilera ¹
Co-Tutora	Dra. Ariadna González del Ángel ²
Investigadores asociados	Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza ³ Dra. Norma López Santiago ¹ M. en C. Luisa Díaz García ⁴ M. en C. Cesárea Bermúdez López ³ Dra. Benilde García de Teresa ³ Dra. Adriana Cepeda Cárdenas ⁵

¹ Médico Adscrito al Servicio de Hematología, INP. ² Subdirectora de Investigación Médica, INP.

³ Investigador en Ciencias Médicas Adscrito al Laboratorio de Biología Molecular, INP. ⁴ Asesor Metodológico Adscrita al Departamento de Metodología INP, ⁵ Pasante Servicio Social Laboratorio de Biología Molecular, INP

I. RESUMEN ESTRUCTURADO

Los avances científicos presentados en el ámbito del tratamiento de las neoplasias infantiles no escapan a lo observado en la Leucemia Aguda Linfoblástica Precursor de Células B. Hoy en día el tratamiento es adaptado y diseñado de acuerdo a las características clínicas y biológicas de la enfermedad en el momento del diagnóstico y en la probabilidad de riesgo de recidiva. La identificación y el análisis de los polimorfismos del gen *Tiopurin S-Metiltransferasa (TPMT)* en los pacientes sometidos a protocolos de tratamiento específicos ha permitido prevenir los efectos adversos del tratamiento con 6-mercaptopurina, dentro de los cuales la neutropenia grado III/IV representa el efecto adverso más frecuente que lleva a la suspensión temporal del tratamiento. Eventos repetidos de suspensión pueden significar un factor determinante en la recaída de un paciente. Los casos con alelos no funcionales del gen *TPMT* representan una población susceptible a estos eventos ya que son incapaces de inactivar adecuadamente los metabolitos tóxicos del fármaco. Este grupo de pacientes podría beneficiarse con la reducción de la dosis del medicamento.

La genotipificación de las variantes alélicas *TPMT *2*, *TPMT *3A*, *TPMT *3B* y *TPMT *3C* permite identificar a más del 90% de individuos con actividad enzimática de *TPMT* intermedia ó baja. Este nivel de concordancia ha sido establecido en diferentes poblaciones y en diferentes instituciones, demostrando la confiabilidad de las técnicas de genotipificación. En México se han reportado dos estudios de genotipificación, sin embargo, la población leucémica infantil no ha

sido estudiada, por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar si la presencia de las variantes alélicas *TPMT* *2, *TPMT* *3A, *TPMT* *3B y *TPMT* *3C en los pacientes sobrevivientes de LAL Precursor de Células B se relacionó con el antecedente de neutropenia grado III-IV durante la etapa de mantenimiento, en una población leucémica infantil que acude a un Instituto de tercer nivel para su manejo. Se realizó un estudio transversal, observacional, comparativo que incluyó 93 pacientes con LAL precursor de células B en fase de vigilancia. Se obtuvo de cada paciente DNA genómico a partir del cual se caracterizaron las variantes *TPMT**2, *TPMT**3A *TPMT**3B y *TPMT**3C con las técnicas de PCR alelo específica y PCR con restricción, las muestras que no mostraron ninguna de las variantes hipomorfas se consideró que presentaban la variante normal *TPMT**1.

Se estudiaron a 48 pacientes clasificados con riesgo habitual y a 45 con riesgo alto, en ellos se estableció que la variante normal *TPMT* *1 fue la más frecuente (91.9%). La variante hipomorfa más común fue *TPMT* *3A (6.45%), en segundo lugar fue *TPMT* *2 (1.07%) y en tercer lugar fue *TPMT* *3C (0.53%). La variante *TPMT* *3B no se presentó en nuestro estudio. En total se identificaron 15 pacientes con un genotipo heterocigoto por la presencia de un alelo hipomorfo (10 del grupo de riesgo habitual y 5 del riesgo alto). Las frecuencias de polimorfismos en la población mexicana estudiada fueron acordes con lo reportado en población caucásica general.

Encontramos que los pacientes con genotipo heterocigoto con una variante hipomorfa, presentaron 0.06 y 0.66 veces más eventos de neutropenia grado III/IV en los grupos de riesgo habitual y alto riesgo respectivamente durante la terapia de mantenimiento en comparación con los pacientes con genotipo normal. Con relación al porcentaje de tratamiento completado encontramos que dentro del grupo de alto riesgo que completaron su tratamiento por arriba del 60% de acuerdo al protocolo establecido (n=34), un 94% (n=32) de estos tenían las variantes normales, mientras que los pacientes con variantes hipomorfas en este mismo rubro correspondieron a un 6% (n=2). Por otro lado, de los pacientes clasificados como riesgo habitual y que completaron su tratamiento por arriba del 60% (n=35), presentaban el genotipo heterocigoto el 26% (n=9) de ellos mientras que con el genotipo normal fueron el 74% (n=26).

Los datos que presentamos son un reporte preliminar en el que encontramos que existe relación entre los eventos de neutropenia y el genotipo de los pacientes, sin embargo, el tamaño de muestra para considerar estos resultados estadísticamente significativos debe ser mayor.

II. MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN

Las neoplasias infantiles han adquirido a lo largo de las últimas décadas una importancia progresiva en el ámbito de la pediatría. La disminución de la mortalidad por otras patologías en los países en desarrollo ha ido otorgando a los tumores un papel cualitativamente más importante en la patología infantil atendida en el ámbito intrahospitalario. De acuerdo a la literatura internacional, la edad de mayor incidencia de cáncer se encuentra entre los cuatro y nueve años de edad. En México, la tasa señalada por organismos nacionales marca que el cáncer entre los 4 y 15 años tiene una incidencia de 122 casos nuevos/millón/año (Rivera Luna 2007). En México se ha calculado, con base al Censo de Población Nacional de 2005 - que reveló una población de 103 millones de habitantes, de los cuales 42% eran niños menores de 15 años de edad - una incidencia de cáncer de 13 casos por 100,000 ó 130 casos nuevos por millón de niños por año, lo que de acuerdo a los datos del censo representaría 4160 casos de cáncer por año en niños menores de esta edad y de leucemia aguda entre 1200 a 1400 casos nuevos por año, aproximadamente.

Actualmente, las enfermedades neoplásicas se encuentran entre las primeras causas de muerte en la población pediátrica en el mundo. Entre la población estadounidense de 1 a 19 años de edad, las enfermedades neoplásicas representan la segunda causa de muerte, sólo superada por los accidentes (Mejía y cols. 2005). En México, el cáncer infantil pasó del decimotercer lugar como causa de muerte en 1971, al segundo lugar entre la población de 1 a 14 años a partir del año 2000. Además, la tasa de mortalidad por cáncer en los países en desarro es mayor que en los países desarrollados. La mortalidad por cáncer en países en vías de desarrollo para toda la población es de 57 casos/100,000/año en comparación con países industrializados, en los cuales la mortalidad es de 4 casos/100,000/año (Rivera Luna 2007). En informes recientes se describe que para las instituciones de salud el costo de la atención de cada niño con cáncer representa alrededor de 620 mil dólares anuales.

Esta importancia cualitativa se ha visto afortunadamente acompañada en las dos últimas décadas por una mejoría en los resultados obtenidos en el tratamiento del cáncer infantil. Actualmente, en la mayoría de los cánceres infantiles es posible conseguir la supervivencia y la curación. Se calcula que la supervivencia del paciente pediátrico, con cáncer en México es aproximadamente del 75%, siempre y cuando haya un diagnóstico oportuno y correcto, y el tratamiento se efectúe en un centro hospitalario de alta especialidad (Rivera Luna 2006). En el caso específico de la leucemia, ésta era considerada hasta hace 40 años, como una enfermedad invariablemente fatal. En la actualidad, la supervivencia a largo plazo

supera el 80%, lo que implica que la mayoría de estos pacientes se cura definitivamente de su enfermedad (Rivera GK y cols. 1993). La curación biológica del cáncer ha sido definida por Donald Pinkel como el momento en que se finaliza el tratamiento completo, sin signos clínicos ni analíticos de la enfermedad, junto con un riesgo mínimo de recidiva (Brenner MK. 1999). El objetivo es restablecer la salud física y mental, así como la actividad normal.

LEUCEMIA AGUDA

La leucemia aguda (LA) es una enfermedad genética adquirida, se trata de un trastorno monoclonal del sistema hematopoyético caracterizado por la proliferación no regulada de las células progenitoras no asignadas ó parcialmente asignadas y acumulación de precursores hematopoyéticos inmaduros malignos en la médula ósea (blastos) y su infiltración en tejidos extramedulares. (McKenzie 2000). Se ha llegado a concebir a la célula leucémica como una célula “mutante”, en la cual los genes reguladores de la diferenciación se encuentran reprimidos ó funcionan de una manera imperfecta, mientras que los genes reguladores de la proliferación se hallan activados y no responden a las señales para detener el crecimiento. En años recientes, el interés generado por la apoptosis, desde su caracterización como uno de los dos mecanismos básicos de muerte celular, ha hecho que hoy en día se piense que la leucemia puede desarrollarse también cuando los genes encargados de dirigir a las células hacia la apoptosis están mutados y no tienen una función adecuada (Paredes R y cols. 1999). Dependiendo de la estirpe celular afectada, se puede hacer la distinción de leucemias agudas linfoblásticas (LAL), mieloblásticas (LAM) o de estirpe indiferenciada.

En México, al igual que en el resto del mundo, las leucemias agudas en menores de 15 años, son los cánceres más frecuentes. **Cuadro 1.** La LAL representa el 35% de todas las neoplasias malignas de los 0 a 18 años de edad. (Ross JA 1994). Este tipo de leucemia corresponde al 75% de todas las formas de leucemia aguda. Su incidencia varía de 3 a 5 casos por 100,000/año, siendo más común en el género masculino. En los países con muy poco desarrollo y en pobreza se estima a la leucemia aguda en 3 casos/100,000/año; en los países industrializados y algunos en vías de desarrollo, como México, la incidencia es de 5 casos/100,000/año en menores de 15 años de edad. El máximo de edad de mayor frecuencia es entre los dos y cinco años. (Metzer y cols. 2003).

La LAL es la leucemia aguda más común en los niños entre 2 y 15 años y representa cerca de 85 % de los casos. La leucemia aguda mieloblástica (LAM) representa entre 20 y 25% de todas las leucemias agudas en la población pediátrica a nivel mundial. Por lo tanto, la relación entre LAL y LAM es de 1:4, con excepción en recién nacidos y lactantes menores, en quienes la frecuencia es mayor para leucemia aguda mieloblástica.

En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) que comprendió un período de 15 años (1980-1995) se identificaron 4076 casos nuevos de cáncer de un total de 179,480 pacientes pediátricos registrados en busca de atención médica. Se registraron 1427 casos de leucemia aguda (35%) de los cuales 1169 (81.9%) correspondían a LAL y 258 (18%) a LAM (Rivera Luna y cols. 1996). En el servicio de Hematología del INP, en el período comprendido entre 1987 y 1997, se evaluaron 863 casos de LA de diagnóstico reciente, de los cuales fueron clasificados como LAL, 704 (81.6%) y los restantes (18.4%) como LAM.

Entidad	Porcentaje (%)
Leucemia	34.5%
Linfomas	19.5%
Tumores del sistema nervioso central	16%
Retinoblastoma	8.5%
Osteosarcoma	6.5%
Tumor de Wilms	5.0%
Otros	10%

Cuadro 1. Incidencia del cáncer infantil en México (Rivera Luna 2007)

LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA

La LAL es la consecuencia de una proliferación clonal incontrolada de células progenitoras linfoides inmaduras bloqueadas en un punto de su diferenciación. Este proceso produce una diversidad de genotipos y fenotipos celulares que se correlacionan con las características clínicas y la evolución de la enfermedad.

La LAL se encuentra asociada con síntomas de fiebre, debilidad, anorexia, hemorragias y complicaciones infecciosas. Sin embargo, la presentación clínica puede ser insidiosa con síntomas poco específicos, como irritabilidad, dolores óseos y cambios en el comportamiento. Al examen físico los pacientes pueden demostrar palidez, petequias, hematomas, hepatoesplenomegalia y adenopatías.

La LAL se puede clasificar por varios métodos complementarios incluyendo morfología y tinciones químicas, marcadores monoclonales que distinguen antígenos celulares (inmunofenotipo), citogenética y por la presencia de marcadores moleculares (McKenzie 2000).

La mayor parte de los niños con leucemia en los Estados Unidos, Europa y otros países, actualmente reciben tratamiento de acuerdo a las clasificaciones de riesgo establecidas según protocolos ó estudios de investigación clínica que dictan la evaluación inicial y subsiguiente de los pacientes (Paredes 2007).

GRUPOS DE RIESGO EN LAL (PRONÓSTICO) Y SU INFLUENCIA EN EL TRATAMIENTO

Miembros de un grupo *ad hoc* al Instituto Nacional de Cancerología (NCI, criterios de Roma) de los Estados Unidos recomendaron un sistema uniforme para la asignación de grupos de riesgo basado principalmente en la edad y el número de leucocitos al diagnóstico en casos de LAL de estirpe celular B (Smith y cols. 1996). Los casos cuya edad fuera menor de 1 año y mayor de 10 años ó aquéllos con cifra de leucocitos mayor de 50,000/ μ l se consideraban de alto riesgo (AR). La clasificación de riesgo propuesta por este grupo no incluía factores citogenéticos y moleculares, ya que su valor estaba sujeto a estudios prospectivos. Sin embargo, la recomendación era que en todos los pacientes se obtuvieran muestras para el estudio de estos factores.

La ventaja actual más evidente de este sistema es que estas variables pueden medirse con fiabilidad en casi todas las circunstancias y de este modo estos criterios pueden ser aplicados de manera universal. Existe una relación lineal entre el recuento inicial de leucocitos y el pronóstico: los niños con un recuento de leucocitos más elevados tienden a tener un pronóstico pobre (Simone 1975, Pui 1998), en particular los pacientes con un recuento de leucocitos inicial mayor de 50,000 células/ μ l (aproximadamente el 20% de los niños con leucemia aguda linfoblástica). Los buenos resultados observados característicamente en el grupo de niños de más de 1 año y menores de 10 años de edad son debidos parcialmente a las características genéticas favorables de las células blásticas (Paredes 2007).

La identificación de dichos factores junto con los que se presentan en el **Cuadro 2** ha sido esencial en el diseño y el análisis de ensayos terapéuticos modernos. Las características que determinan actualmente el pronóstico de la LAL infantil son: edad y recuento de leucocitos al diagnóstico, sexo, inmunofenotipo, raza, clasificación morfológica FAB, número de cromosomas o ploidía, alteraciones estructurales cromosómicas y génicas, enfermedad del sistema nervioso central al diagnóstico, infiltración extramedular, respuesta temprana al tratamiento con esteroides, estado nutricional y enfermedad mínima residual (Ruiz Argüelles 1997).

CLASIFICACIÓN DE RIESGO		
	Riesgo habitual (RH)	Alto riesgo (AR)
Edad	1-9 años	Menor de 1 año y mayor de 10 años
Género	Femenino	Masculino
Magnitud y distribución de la carga tumoral <ul style="list-style-type: none"> Leucocitos Visceromegalias "masivas" Infiltración testicular Infiltración renal Infiltración SNC 	<ul style="list-style-type: none"> Menos 10,000/μl Ausente Ausente Ausente Ausente 	<ul style="list-style-type: none"> Mayor 50,000/μl Presente Presente Presente Presente
Clasificación citomorfológica	FAB L1	FAB L2, L3
Clasificación inmunológica	LAL precursor de célula B	LAL tipo "T", "B"
Clasificación citogenética	Alteraciones numéricas: hiperdiploidía mayor 50. Alteraciones estructurales t(12;21)	Alteraciones numéricas: hipodiploidía menor 46. Alteraciones estructurales t(9;22), t(4;11), t(1;19), t(8;14), t(11;14)
Respuesta al tratamiento de inducción	MO=M1 (menos 5% blastos en el día 14)	MO=M3 (mayor 25% de blastos en el día 14)
Estado nutricional al diagnóstico	Normal	Deficiente

Cuadro 2. Clasificación de riesgo en leucemia aguda. MO, médula ósea. SNC: sistema nervioso central. (Ruiz Argüelles 1997)

De la mano, el pronóstico para los niños afectados con LAL ha mejorado dramáticamente durante las últimas décadas, gracias a una intensificación del tratamiento con agentes ya establecidos más que a la introducción de nuevas drogas. Asimismo, se entiende actualmente que el resultado del tratamiento no depende solamente de la terapia aplicada, sino de lo que es todavía más importante, los factores biológicos del huésped y los propios de las células leucémicas. Como ejemplo, cabe mencionar a los dos antimetabolitos usados con mayor frecuencia en el tratamiento de la LAL: metotrexato y 6-mercaptopurina, los cuales son sumamente efectivos en casos de LAL hiperdiploide. (Paredes 2007).

TRATAMIENTO DE LA LAL

Actualmente, aunque existen diferencias sutiles en los tratamientos ofrecidos a pacientes con LAL entre varios centros de distintos países, todos tienen en común cuatro componentes ó fases:

- 1) Fase de inducción a la remisión
- 2) Fase de reinducción/consolidación
- 3) Terapia de mantenimiento
- 4) Profilaxis sistema nervioso central (SNC)

Inducción a la remisión

El tratamiento planteado en esta fase tiene como objetivo erradicar los signos y síntomas de la enfermedad y restablecer una hematopoyesis normal. Al lograrse este objetivo se habla que el paciente ha logrado la remisión y el objetivo de las fases siguientes será mantener la “remisión completa continua”. Los niños en remisión completa no deben tener ninguna evidencia física de leucemia. Deben tener un recuento completo de células en sangre normal y una regeneración normal de médula ósea (con menos del 5% de células blásticas). Convencionalmente, la quimioterapia sistémica de inducción se administra en 4 a 6 semanas y da lugar a una tasa de remisión completa mayor del 95%. (Conter y cols. 2006)

Reinducción/Consolidación

Es bien sabido que la obtención de la remisión no es suficiente para lograr la curación de la LAL y que se requiere una terapia adicional antes de que la leucemia sea totalmente erradicada. Los estudios pasados han demostrado que sin terapia adicional después de la inducción a la remisión, la mayoría de los pacientes experimentará una recaída en un plazo medio de 1 a 2 meses (Paredes 2007).

Diferentes métodos biológicos (citomorfología, cultivo celular *in vitro*, análisis citogenético, entre otros) han documentado que la enfermedad leucémica oculta está presente con frecuencia en pacientes durante la “remisión completa”. Una prevención efectiva de la recaída necesita una terapia de postinducción que tenga como objetivo la citorreducción leucémica continuada, que no permita la aparición de un clon resistente a la droga (Paredes 2007).

Cada grupo cooperativo tiene su propio esquema en el tipo de reinducción/consolidación que ofrece. La terapia de consolidación/reinducción se define como uno o más periodos de tratamiento intensificado administrados después de la inducción de la remisión y es considerada un componente

fundamental en muchos protocolos quimioterapéuticos, particularmente en los pacientes con AR. Generalmente, los agentes y los programas están diseñados para minimizar el desarrollo de elementos resistentes a las drogas al comienzo de la enfermedad (Conter 2006).

Mantenimiento

El concepto de terapia de mantenimiento fue empleado inicialmente en regímenes paliativos en los cuales los medicamentos eran prescritos en forma única, ya sea en ciclos ó secuenciales y el concepto de remisión durante el mantenimiento era definido clínicamente mientras que el paciente no mostrará la enfermedad con manifestaciones clínicas y que no tuviera recidivas o progresión a la muerte. (Krivit 1968). Actualmente el objetivo del tratamiento de la terapia de mantenimiento es erradicar las células leucémicas de baja capacidad proliferativa, permitiendo que el sistema inmune endógeno participe en la erradicación de la enfermedad oculta y a la vez, permitir que los mecanismos de apoptosis supriman el crecimiento de blastos residuales (Lennard 2003).

El empleo de la terapia de mantenimiento ha sido objeto de pocos estudios clínicos, pero hace 30 años un estudio en el cual los pacientes eran asignados aleatoriamente a recibir dosis dos veces por semana de metotrexate (30 mg/m²sc) ó no recibir tratamiento posterior a 5 meses de terapia de inducción y consolidación, demostró resultados catastróficos: sólo 2 de 18 pacientes se encontraban en remisión completa continua dentro del grupo que no recibió tratamiento con metotrexate, comparado con 37 de 52 pacientes en remisión completa continua dentro del grupo que sí había recibido el antimetabolito. (Anonymous 1971).

Gale y Butturini postularon que durante la terapia de mantenimiento existen precursores de células B con rearrreglos anormales en los genes de cadenas pesadas ó ligeras de inmunoglobulinas y que continúan sobreviviendo para producir el clon maligno original. Estas células, si se reducen a un número mínimo y se suprimen por un período largo de tiempo, pueden eventualmente morir por el proceso de apoptosis que debió haber provocado su muerte inicialmente (Gale 1991).

Lo anteriormente mencionado, apoya el conocimiento de que la LAL requiere un tratamiento prolongado diseñado para prevenir el crecimiento de las células más que para reducir su número. El efecto terapéutico de la terapia de mantenimiento es visto pues, como un tratamiento inmunosupresor más que un tratamiento antineoplásico. Para ser exitoso debe ser sostenido y continuo; los niños que reciben dosis bajas e intermitentes durante su terapia de mantenimiento y que

atraviesan largos períodos sin quimioterapia son más propensos a recaídas. (Dolan y cols 1998, Chessells y cols 1986, Chessells y cols 1997, Relling, Pui y cols 1999).

Los niños que sobrepasan la terapia de inducción y consolidación deben tener muy pocas células malignas, con blastos residuales por debajo de 10^{-3} . Estas células probablemente no se encuentren dentro del ciclo celular, sino que se encuentran en estado quiescente (G0). Las células quiescentes no pueden ser eliminadas por las tiopurinas. Sin embargo, quizás, los antimetabolitos tóxicos acumulados, pueden llevar a la muerte de estas células por dos caminos:

1) Los antimetabolitos intracelulares suprimirán el reclutamiento de las células al ciclo celular, por lo que la célula eventualmente entrará en apoptosis por ser una célula que fracasó en la maduración (hipótesis de Gale) (Gale 1991).

2) La célula muere una vez que entra al ciclo celular debido a la incorporación de nucleótidos anormales durante la síntesis de DNA.

Independiente del camino mediante el cual se logre la eliminación de las células, está claro que si el tratamiento no es continuo y sostenido sólo una cantidad reducida de células podrá ser eliminada. Las concentraciones intracelulares de los antimetabolitos deben mantenerse altas durante períodos largos de tiempo. Asimismo, varios estudios han demostrado una mejor respuesta cuando se administra al límite de tolerancia basado en el grado de depresión medular que provoca el fármaco (Gale 1991).

Para lograr una concentración alta del antimetabolito se necesita pues, una terapia continua a las máximas dosis tolerables, ya que cuando no se logra lo anterior, existirán células malignas que logren entrar en mitosis y terminar el ciclo celular. Esto puede explicar porque un tratamiento interrumpido es menos exitoso que una terapia continua (Chessells 1986).

En conclusión, la terapia de mantenimiento es una terapia inmunosupresora, la que históricamente se ha basado en el uso de 2 medicamentos: metotrexate y 6-mercaptopurina. El primero, en un plan bisemanal y el último diariamente. De los dos componentes, la 6-mercaptopurina es tradicionalmente el elemento principal. Conforme el entendimiento de la farmacocinética de la 6-mercaptopurina crece, también crece el hecho de que la variabilidad individual en los pacientes es fundamental en su potencia clínica.

De acuerdo los protocolos establecidos en el Servicio de Hematología del INP, los pacientes clasificados como alto riesgo y riesgo habitual reciben 5 y 6 ciclos de terapia de mantenimiento respectivamente, cada uno con una duración de 3

meses. Lo anterior parece resultar contradictorio, sin embargo, se debe tomar en cuenta que la terapia de los pacientes catalogados como AR difiere en un ciclo menos de mantenimiento ya que reciben terapia intravenosa con diversos fármacos antineoplásicos diferentes a la 6-mercaptopurina (**Ver Anexo 1.1 y 1.2**).

Profilaxis a SNC

La prevención de la reaparición de la leucemia en el sistema nervioso central ha sido un concepto bien establecido desde 1960. Desde entonces quedó claro que la reaparición de la leucemia en el SNC podía representar el primer signo de resistencia a la leucemia y su progresión. Con los programas de terapia modernos que incluyen diferentes modalidades de terapia preventiva de infiltración al SNC, la incidencia total de recaída en este sitio se encuentra por debajo del 5%. El metotrexate intratecal solo ó la quimioterapia intratecal con triple droga y con metotrexate intravenoso a dosis altas ó moderadas parece capaz de proporcionar una protección equivalente para el SNC (Conter 2006).

Vigilancia

Al término de las fases de tratamiento descritas previamente (30 meses posteriores a la inducción a la remisión), el paciente se mantiene en vigilancia durante 7 años, con visitas periódicas al médico especialista. El análisis de los resultados obtenidos de varios estudios prospectivos a largo plazo donde se vigiló la evolución de los pacientes después de la suspensión electiva de la terapéutica, demostró que el riesgo de recurrencia es mínimo después de cuatro años y prácticamente nulo después de 7 años de suspensión del tratamiento, lo cual sugiere que los niños que han cursado sin ningún episodio 10 años después del diagnóstico se encuentran curados en su mayoría y es muy probable que tengan una expectativa de vida normal (Paredes 2007).

METABOLISMO DE LAS TIOPURINAS

- **TIOPURINAS**

Las tiopurinas comprenden tres fármacos: 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, y azatioprina. La 6-tioguanina se emplea en algunos protocolos durante el tratamiento de inducción de la LAL. Por otro lado, la 6-MP se emplea durante la fase de mantenimiento. La introducción de las tiopurinas junto con otros fármacos antineoplásicos incrementó la sobrevida de la LAL de menos de un 5% en los años '40 hasta un 80% hoy en día (Krynetski 2003). Todos estos fármacos fueron diseñados como análogos de las purinas ya que alteran la síntesis normal de DNA

y como tal, son metabolizados por las mismas vías que controlan la homeostasis normal de nucleótidos (Coulthard 2004).

La 6-mercaptopurina (6-MP) forma un componente esencial de la terapia de mantenimiento de la LAL. El fármaco (junto con la tioguanina) fue desarrollado por Hitchings y Elion hace 50 años y fue empleado clínicamente por primera vez en 1953 (Elion 1952). El conocimiento de éste fármaco ha ido acumulándose durante estos años, existiendo últimamente un renovado interés debido a los polimorfismos identificados en el gen que codifica la enzima que lo metaboliza en distintas poblaciones. Para entender éstos últimos conocimientos, es importante demostrar las bases farmacológicas de este medicamento y su acción en la terapia de mantenimiento.

- **METABOLISMO**

La 6-MP y la 6-tioguanina (6-TG) no poseen actividad intrínseca oncológica, son profármacos que atraviesan por extensos metabolismos hepáticos e intestinales para su conversión en nucleótidos de tioguanina para ejercer su citotoxicidad (Krynetski 1999). El principal mecanismo citotóxico de estos agentes es la incorporación de los nucleótidos de tioguanina al DNA y al RNA (**Figura 1**). La biotransformación ocurre a través de 3 vías competitivas: oxidación, metilación y formación de nucleótidos. En el hígado y en el epitelio intestinal todas las vías se encuentran disponibles, sin embargo, en muchos tejidos, incluyendo las células sanguíneas, únicamente partes de estas rutas metabólicas se encuentran activadas (Lennard 2003).

La 6-MP es una prodroga que requiere una activación. Como es un compuesto análogo de la hipoxantina, actúa como sustrato de la enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT) para formar la 6-tioinosina monofosfato (TIMP) en presencia de fosforibosil pirofosfato (PRPP) como cosustrato. En reacciones subsecuentes que involucran a la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPD) se transforma en tioxantina monofosfato (TXMP), que a su vez por acción de la enzima guanina monofosfato sintetasa (GMPS) se convierte en tioguanina monofosfato (TGMP), y por acción de la fosfocinasa (PK) se generan 6-tioguanina difosfato y trifosfato (TGDP y TGTP), que se conocen como nucleótidos de tioguanina (TGNs), los cuales son citotóxicos porque se incorporan en el DNA, por lo que su concentración se asocia a la eficacia y toxicidad del fármaco. No es claro si el mecanismo principal de la citotoxicidad es por la vía de incorporación de los TGNs, la cual induce la muerte celular programada (apoptosis) por un proceso que involucra la vía de reparación de apareamiento erróneo (“mismatch”); o bien ocurre por una segunda vía citotóxica, en la cual el metabolito TIMP es metilado por la tiopurina S-metiltransferasa TPMT en presencia de S-adenosin-L-metionina

(SAM), como cosustrato, y se produce metil TIMP (MeTIMP), el cual inhibe la síntesis de novo de las purinas (**Figura 1**) (Brouwer y cols. 2005, Coulthard 1998, Dervieux y cols. 2001, McLeod y cols. 1995). La activación de las tiopurinas se realiza intracelularmente; los nucleótidos de tioguanina compiten con sus contrapartes endógenas en muchas vías bioquímicas.

Existen dos enzimas importantes en la farmacología de las tiopurinas, porque participan en la inactivación de la 6-MP y sus metabolitos. La primera es la xantina oxidasa (XO), presente en la mucosa intestinal e hígado, la cual cataboliza la mayor parte de la dosis oral formando ácido tiúrico, que se excreta en orina (**Figura 1**). Esta vía es responsable de la baja biodisponibilidad del fármaco (hasta un 16%), por lo que la administración de alopurinol, un potente inhibidor de XO, incrementa cinco veces la biodisponibilidad de las tiopurinas. Los niveles de XO no presentan variación interindividual (Coulthard y cols 1998).

La segunda enzima, tiopurina metil transferasa (TPMT) cataliza la S-metilación de las tiopurinas formando las metil tiopurinas (**Figura 1**), que son metabolitos inactivos. Se ha demostrado que la actividad de esta enzima presenta variación interindividual (Alves y cols 2000, Brouwer y cols 2005, Coulthard y cols 1998). La actividad de la TPMT en los eritrocitos y en otros tejidos, incluyendo el hígado se encuentra bajo control de polimorfismos genéticos (Weinshilboum 1980). La metilación de la 6-MP es la vía de metabolismo más importante de los tejidos hematopoyéticos ya que, como se mencionó previamente, la actividad de XO se encuentra prácticamente ausente en el tejido hematopoyético (Krynetski 2003).

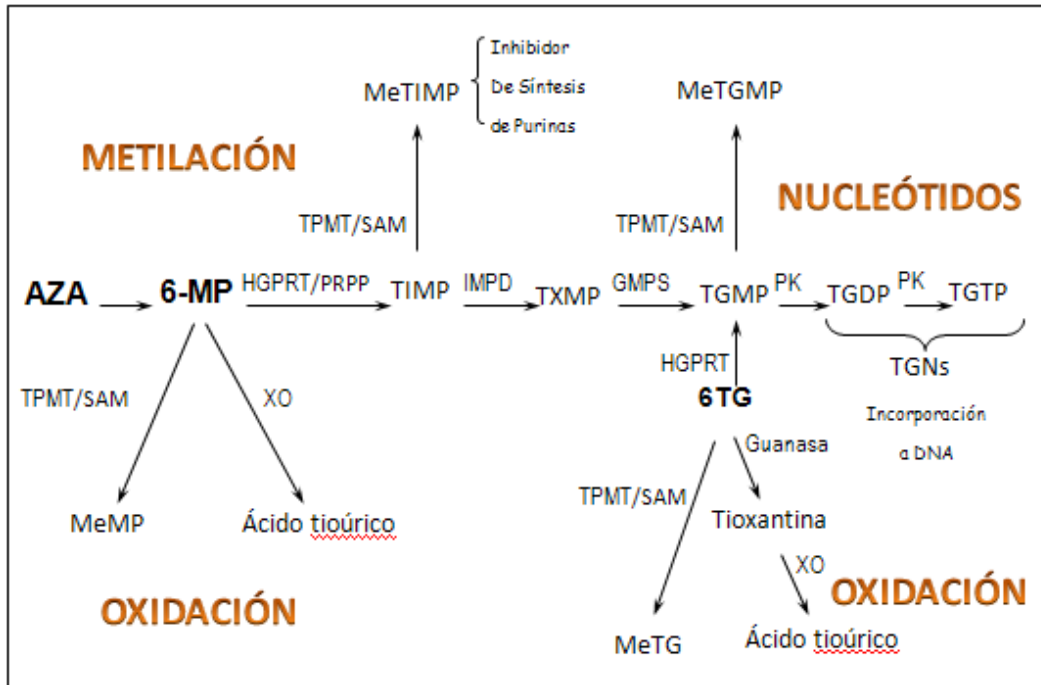


Figura 1. Esquema del metabolismo de las tiopurinas. Modificado de Corominas y cols. 2003 y Coulthard y cols. 2004. La oxidación de la 6-MP, catabolizada por la enzima xantina oxidasa (XO), es una vía que lleva a la formación de ácido tiourico (Weinshilboum 1980). La XO se encuentra presente en cantidades considerables en el epitelio intestinal e hígado, pero su actividad disminuye en el resto de los tejidos. La actividad funcional de la XO se encuentra ausente en las células sanguíneas circulantes. Los niveles de XO no presentan variación interindividual. (Coulthard 1998). **Metilación:** la metilación de la 6-MP se encuentra catabolizada por la enzima tiopurin S metiltransferasa (TPMT). Tanto la 6-MP como la 6-TG son el sustrato para la S-metilación por esta enzima. El nucleótido de mercaptopurina (6 tiouosina monofosfato, TIMP) es también un buen sustrato para la enzima TPMT. **Formación de nucleótidos:** La activación intracelular de la 6-MP lleva a la formación de una variedad de metabolitos activos de nucleótidos de tioguanina, los cuales se incorporan como falsas bases al DNA y provocan su destrucción. (Marathias 1999).

6-MP	6-mercaptopurina	PRPP	fosforibosil pirofosfato
6-TG	6 tioguanina	SAM	S-adenosin-L-metionina
AZA	azatioprina	TGDP	6-tioguanina difosfato
GMPS	guanina monofosfato sintetasa	TGMP	tioguanina monofosfato
HGPRT	hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa	TGNs	nucleótidos de tioguanina
IMPD	inosina monofosfato deshidrogenasa	TGTP	6-tioguanina trifosfato
MeMP	metil 6-mercaptopurina	TIMP	6-tioinosina monofosfato
MeTG	metil 6-tioguanina	TPMT	tiopurina S-metiltransferasa
MeTGMP	metil 6-tioguanina monofosfato	TXMP	tioxantina monofosfato
MeTIMP	metil 6-tioinosina monofosfato	XO	xantina oxidasa
PK	fosfocinasa		

VARIABLES EN LA ACTIVIDAD DE LAS TIOPURINAS Y SU EFECTO EN EL TRATAMIENTO

De las tres vías de metabolismo mencionadas previamente, la vía de metilación y la respectiva acción de la enzima TPMT es la que ha demostrado mayores variantes de acuerdo a cada individuo. La primera sospecha de que la actividad de TPMT era variable en los individuos y que se asociaba a una profunda inmunosupresión surgió de observaciones en adultos que recibían azatioprina como agente inmunosupresor. En 1980 Weinshilboum y Sladek demostraron por primera vez la distribución trimodal de la actividad de TPMT en los eritrocitos en una serie de 298 pacientes (Weinshilboum 1980). De estos, 88.6% demostraron una actividad alta de la enzima, 11% una actividad intermedia y 0.3% una actividad indetectable. Esta distribución ha sido demostrada también en una serie de pacientes del noreste de Inglaterra por Coulthard y cols. (Coulthard 2000). Se ha determinado que el valor de 13.7 U/ml en eritrocitos es el sitio de corte entre los individuos con actividad de TPMT alta y los que poseen una actividad intermedia (Coulthard 2004).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA TPMT (FENOTIPO)

Hay dos estrategias para determinar la actividad enzimática de TPMT de los individuos, una es medir la actividad de la enzima TPMT en los eritrocitos, la segunda es determinar los niveles de los metabolitos nucleótidos (tioguaninas y metil tiinosin monofosfato) en los eritrocitos por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La actividad de la enzima se determina en los eritrocitos ya que ésta correlaciona con la actividad en linfocitos normales, blastos, plaquetas, hígado y riñón (Corominas y cols 2003, Relling Hancock y cols 1999, Lennard y cols. 1987, McLeod y cols. 1995, Tai y cols. 1996, Szumlanski y cols. 1992).

En los niños con LAL, la medición de la actividad de la enzima TPMT puede realizarse en los eritrocitos y dicha medición puede reflejar cómo se realiza el metabolismo de la tiopurinas y la toxicidad que se pudiera presentar durante la terapia de mantenimiento (Lennard y cols. 1997). La identificación de los pacientes con actividad enzimática disminuida de la enzima TPMT previo al manejo, brinda a los médicos la oportunidad de individualizar la dosis del antimetabolito y así prevenir los eventos relacionados con la toxicidad del fármaco en esta población y que pueden llevar a la interrupción de la terapia de mantenimiento. Es necesario recordar que la terapia de mantenimiento, como se mencionó en párrafos anteriores, debe ser continua y a la mayor dosis tolerada por los pacientes. Un evento adverso asociado a la terapia con 6-MP y que lleva a la suspensión del fármaco es la neutropenia grado III-IV, por lo que los pacientes que experimenten

periodos frecuentes de neutropenia durante la terapia de mantenimiento no cumplirán el objetivo terapéutico de esta fase y el riesgo de recaída de la enfermedad leucémica será mayor. (Relling y cols 2009, Coulthard y cols 2004, Krynetski 2003)

Por el contrario, los pacientes que poseen una actividad alta de la enzima TPMT forman concentraciones bajas de nucleótidos con dosis convencionales de mercaptopurina. Este subgrupo de pacientes tolera dosis ininterrumpidas del fármaco, con dosis altas y no experimentan eventos de citopenias (incluyendo neutropenias grado III-IV). Estos pacientes son aparentemente resistentes a los efectos citotóxicos de la 6-mercaptopurina (Lennard y cols. 1990).

DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE LA ENZIMA TPMT (GEN *TPMT*)

El gen de *TPMT* codifica para la enzima TPMT y se localiza en el cromosoma 6 (6p22.3) con un tamaño aproximado de 34 kb y consiste de 10 exones y 9 intrones (Szumlanski y cols. 1996).

La variación de la actividad de la enzima TPMT es el resultado de polimorfismos en el gen que la codifica, algunos de los cuales resultan en actividad disminuida de la enzima en eritrocitos (Szumlanski y cols. 1996) y células leucémicas (Coulthard y cols. 1998). Estudios familiares han establecido una herencia para los polimorfismos del gen, autosómica codominante (Krynetski 2003, Haglund y cols 2004).

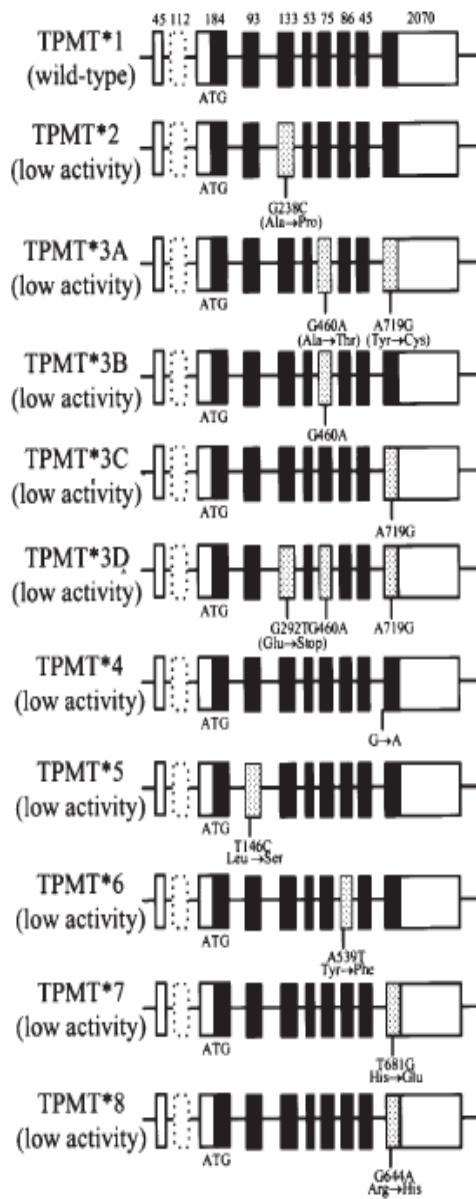


Figura 2. Variantes alélicas del gen *TPMT* (McLeod y cols. 2000)

Alelos

Se ha acordado que el gen no mutado ó también denominado “silvestre” se designe como *TPMT* *1. Este alelo posee otras dos variantes: *TPMT* *1S, que presenta una mutación silenciosa y que no afecta la actividad de la enzima. *TPMT* *1A con un polimorfismo único en el nucleótido 178 en el exón 1 (-178 C-T) se detectó en un individuo con actividad alta de TPMT (Spyre y cols. 1998).

La primera mutación alélica identificada fue la denominada *TPMT* *2, la cual contiene una transversión en la posición 238 G-C, llevando a la sustitución de una prolina por una alanina (Ala80Pro). Como resultado se obtiene una enzima inestable y con actividad enzimática disminuida (Krynetski y cols 1995). Cuando se evaluó este cambio en un sistema de expresión heterólogo, la actividad de TPMT se redujo 100 veces respecto de la actividad enzimática con la presencia del alelo *TPMT* *1 (Tai y cols. 1996, Krynetski y cols. 1995).

El alelo *TPMT* *3A fue clonado en 1996 por Tai y cols. Posee dos transiciones, G460A y A719G. La expresión heteróloga permitió conocer que cada una de las mutaciones reduce la actividad catalítica de la enzima TPMT, mientras que la presencia de ambas mutaciones lleva a la pérdida completa de la actividad. El cambio de los aminoácidos ocasiona que la proteína sea inestable y que sufra una proteólisis rápida (Tai y cols. 1997).

Posteriormente se han descrito otros alelos que poseen al menos una de las dos transiciones y se denominan de la siguiente forma: *TPMT* *3B quien posee únicamente la sustitución G460A, *TPMT* *3C quien posee sólo la sustitución A719G (Tai y cols. 1996).

Las variantes *TPMT* *2, *TPMT* *3A y *TPMT* *3C son las variantes alélicas predominantes en el ser humano, representan aproximadamente el 95% de las deficiencias de la actividad de TPMT (**ver Figura 2**). Las demás variantes alélicas se han observado en individuos aislados (en algunas ocasiones en una sola persona, sugiriendo que estas raras variantes son mutaciones y no variantes alélicas reales).

En relación a la variante *TPMT* *3B, esta es poco frecuente en la población, y en los reportes de frecuencias alélicas no ocupa los lugares principales, por lo que siempre se mencionan como las más frecuentes y que incluyen más del 95% de la población a las variantes *TPMT* *2, *TPMT* *3A y *TPMT* *3C.

Estudios poblacionales en caucásicos, africanos del este y del oeste, chinos, japoneses y asiáticos han establecido diferencias en la distribución de las variantes alélicas de *TPMT* (McLeod y cols. 2000, Weinshilbom 2001). Por

ejemplo, en India y Pakistán todas las variantes alélicas identificadas a la fecha corresponden a *TPMT* *3A. En contraste, en afro-americanos, la variante alélica *TPMT* *3C se presenta en aproximadamente el 50% de esta población. Estudios en japoneses demostraron la presencia únicamente de la variante alélica *TPMT**3C. La variante *TPMT* *3A se encuentra presente en aproximadamente el 80% de la población blanca en EUA y Norte de Europa, pero únicamente en el 17% de las variantes alélicas de los afroamericanos (**ver Cuadro 3**). La variante alélica *TPMT**2 es la menos común, representando 0.2-0.5% de todos los alelos. En población caucásica *TPTMT* *3A es el más común de los tres alelos mutantes con un porcentaje de presentación de 3.2 a 5.7%, mientras que *TPMT* *3C posee una frecuencia alélica de 0.2 a 0.8% (Black y cols. 1998, Coulthard y cols. 1998, Collie y cols. 1999, McLeod y cols. 1999).

	N	wt/wt %	wt/mut %	mut/mut %	<i>TPMT</i> *2 %	<i>TPMT</i> *3A %	<i>TPMT</i> *3C %
Caucásicos británicos (Ameyaw et al 1999)	199	89.9	9.6	0.5	0.5	4.5	0.3
Caucásicos franceses (de la Moureyere et al 1998)	191	85.9	13.6	0.5	0.5	5.7	0.8
Caucásicos americanos (Yates et al 1997)	calc.	92.5	7.4	0.14	0.2	3.2	0.2
Áfroamericanos (Hon et al 1999)	calc.	90.7	9.2	0.2	0.4	0.8	2.4
Kenianos (McLeod et al 1999)	101	89.1	10.9	0	0	0	5.4
Ghana (Ameyaw et al 1999)	217	85.3	14.4	0.5	0	0	7.6
Chinos (Collie-Duguid et al 1999)	192	95.3	4.7	0	0	0	2.3
Japoneses (Kumagai et al 2000)	553	97.3	2.4	0.4	0	0	1.5
Suroeste de Asia (Collie-Duguid et al 1999)	99	98	2	0	0	1	0

Cuadro 3. Variaciones étnicas de los alelos de *TPMT* (McLeod 2000) n=número de sujetos, incluyendo *TPMT* *2, *TPMT* *3A y *TPMT* *3C; wt= normal; mut= mutado. Calc= frecuencia alélica en población estimada por análisis de cohorte.

Estudios en población mexicana

Dentro de la población mexicana se han realizado 2 estudios con relación a la distribución de las variantes alélicas de *TPMT* (Taja-Chayeb y cols 2008, González del Ángel y cols 2009). En ambos estudios se encontró que la variante hipomorfa (variante alélica deficiente) más frecuente fue *TPMT* *3A (**Cuadro 4 y 5**).

El estudio realizado por Taja-Chayeb y cols. incluyó 108 muestras de DNA de pacientes sanos y 39 pacientes con LAL. Se reportó una frecuencia de estos polimorfismos de un 7.8% en población general y la población leucémica de 12.8%. Se administró 6-MP en 22 casos y se evaluó la toxicidad hematológica que presentaron, en 3 casos se documentó toxicidad hematológica relacionada a la presencia de estas variantes hipomórficas.

Población	Sujetos estudiados	<i>TPMT</i> *2	<i>TPMT</i> *3A	<i>TPMT</i> *3B	<i>TPMT</i> *3C
Mexicanos sanos (Taja-Chayeb 2008)	108	0.9%	3.24%	2.3%	1.4%
Mexicanos con LAL (Taja-Chayeb 2008)	39	2.7%	7.6%	No se encontró	2.5%

Cuadro 4. Porcentaje de polimorfismos del gen *TPMT* en 147 mexicanos (Taja-Chayeb 2008)

En el estudio de González del Ángel y cols. se determinó la frecuencia de las variantes alélicas *TPMT* *1, *TPMT* *2, *TPMT* *3A, *TPMT* *3B y *TPMT* *3C en una población de recién nacidos de la Ciudad de México. La frecuencia de variantes alélicas del gen *TPMT* se muestra en el **cuadro 5A**, mientras que en el **cuadro 5B** se muestra el genotipo de los niños estudiados. De los 720 alelos analizados (cada paciente posee 2 alelos) 49 poseían las variantes hipomorfas (6.81%). La variante alélica deficiente más frecuente fue *TPMT* *3A. 45 recién nacidos fueron heterocigotos para un alelo mutante y sólo 2 fueron homocigotos (mostraron dos alelos deficientes), así se observó que 47 de 360 (13.05%) recién nacidos en la Ciudad de México poseen uno ó dos alelos deficientes en el gen *TPMT*.

Alelo	N	Porcentaje	Frecuencia
<i>TPMT*1</i>	671	93.19	0.9319
<i>TPMT*2</i>	2	0.28	0.0028
<i>TPMT*3A</i>	41	5.69	0.0569
<i>TPMT*3B</i>	2	0.28	0.0028
<i>TPMT*3C</i>	4	0.56	0.0056

Cuadro 5A. Frecuencias alélicas del gen *TPMT* en 360 recién nacidos mexicanos. (González del Ángel y cols. 2009)

Genotipo	N	Porcentaje	Frecuencia
<i>TPMT*1/TPMT*1</i>	313	86.94	0.8694
<i>TPMT*1/TPMT*2</i>	2	0.56	0.0056
<i>TPMT*1/TPMT*3A</i>	38	10.56	0.1056
<i>TPMT*1/TPMT*3B</i>	2	0.56	0.0056
<i>TPMT*1/TPMT*3C</i>	3	0.83	0.0083
<i>TPMT*3A/TPMT*3A</i>	1	0.28	0.0028
<i>TPMT*3A/TPMT*3C</i>	1	0.28	0.0028

Cuadro 5B. Frecuencias genotípicas de los alelos de *TPMT* en 360 recién nacidos mexicanos. (González del Ángel y cols. 2009)

RELACIÓN ENTRE FENOTIPO Y GENOTIPO

La relación entre el genotipo de *TPMT* y el fenotipo ha sido demostrada en pacientes con las variantes alélicas *TPMT* *2, *TPMT* *3A y *TPMT* *3C en pacientes con leucemia y voluntarios normales (Coulthard y cols. 1998, Collie y cols. 1999).

La presencia de las variantes alélicas *TPMT* *2, *TPMT* *3A ó *TPMT* *3C (variantes hipomórficas) es predictiva del fenotipo en aquéllos pacientes homocigotos para estos alelos. Todos los pacientes heterocigotos (ej. *TPMT* *1/*TPMT* *2) tendrán actividad intermedia de la enzima y los sujetos homocigotos (ej. *TPMT* *2/ *TPMT* *2) ó heterocigotos compuestos (ej. *TPMT* *2/ *TPMT* *3A) para estos alelos tendrán actividad deficiente (Yates y cols. 1997). Existe una correlación fuerte entre la actividad de *TPMT* en eritrocitos como en otros tejidos, incluyendo células blásticas (Coulthard y cols. 1998, McLeod y cols 1995).

La genotipificación de las 3 variantes hipomorfas más comunes (*TPMT* *2, *TPMT* *3A y *TPMT* *3C) representa el diagnóstico molecular en más de 95% entre el fenotipo y el genotipo. Este nivel de concordancia ha sido establecido en diferentes poblaciones en diferentes instituciones, demostrando la confiabilidad de las técnicas de genotipificación para la detección de estos polimorfismos. Aunque claro está que también se reconoce que existen otros polimorfismos reportados así como mecanismos adicionales de variabilidad de la actividad de la enzima *TPMT* (Coulthard y cols. 1998, Yates y cols. 1997, Rossi y cols. 2001).

TOXICIDAD CLÍNICA DE LA 6-MP

El mecanismo principal de la citotoxicidad se realiza a través de 2 vías:

- 1) la vía de incorporación de los nucleótidos como falsas bases, lo cual induce a la muerte celular programada (apoptosis) por un proceso que involucra la vía de reparación de apareamiento erróneo (“mismatch”).
- 2) los nucleótidos de metilmercaptapurina, producidos a partir del nucleótido de mercaptopurina inhiben la síntesis *de novo* de la purinas (Coulthard y cols. 2004, Brouwer y cols. 2005, McLeod y cols. 1995, Dervieux y cols. 2001).

El efecto tóxico principal de la 6-MP es la depresión de la médula ósea; se encuentra considerado dentro de los fármacos que provocan mielosupresión moderada a severa (Schrappe 2003). Numerosos estudios han demostrado que los pacientes con las variantes hipomórficas en el gen *TPMT* se encuentran en mayor riesgo de toxicidad hematológica (Krynetski 2003). Al haber depresión de los elementos normales de la médula ósea, la interrupción de la administración de 6-MP por lo común permite la recuperación medular a muy corto plazo. El efecto medular más importante que define la continuación de la terapia con el

antimetabolito es la neutropenia grado III/IV, de la cual se hablará en párrafos posteriores.

En cerca del 25% de los adultos - como efecto de la administración de 6-MP- , los pacientes presentan anorexia, náusea y vómito; la mucositis y la diarrea son raras y son menos frecuentes en niños que en adultos (Chabner 1996). Además, la presencia de estas manifestaciones no lleva obligatoriamente a la suspensión del tratamiento, sino que se valora en cada caso la continuidad del mismo, situación que no ocurre ante la presencia de neutropenias grado III/IV.

La hepatotoxicidad con ictericia franca y elevación de las transaminasas aparecen en un 10-40% de los pacientes. No existe evidencia de aumento de hepatotoxicidad en pacientes con las variantes alélicas hipomórficas (Krynetski 2003).

Terapia de mantenimiento, toxicidad permitida y duración del tratamiento

De acuerdo a los principios generales de quimioterapia, es necesario mantener la máxima intensidad de la dosis, con intervalos mínimos entre los ciclos de quimioterapia. El intervalo libre de tratamiento entre los ciclos debe ser lo más corto posible que permita la recuperación de los tejidos normales más sensibles.

En cuanto a la toxicidad permitida del fármaco es conveniente ahondar en el protocolo actual BFM de Alemania (Berlín-Frankfurt-Münich), el cual se ha adecuado a los pacientes en el Servicio de Hematología del Instituto Nacional de Pediatría. Uno de los aspectos más importantes desde el punto de vista estratégico de los protocolos BFM, el cual ha contribuido en gran parte a su éxito con una supervivencia libre de enfermedad mayor al 75%, es el apego estricto a las especificaciones del protocolo, una de las cuales consiste en administrar el número de medicamentos estipulado y las dosis programadas por unidad de tiempo, lo cual se realiza en ocasiones aún durante los períodos de mielosupresión grave, cuando las condiciones generales del paciente así lo permiten.

En nuestro Instituto se sigue esta estrategia y - de acuerdo al protocolo - se mantiene un tratamiento quimioterapéutico durante 2.5 años posterior a la inducción a la remisión; este es ajustado de acuerdo a la cuenta de neutrófilos totales y estado clínico del paciente procurando mantener un tratamiento continuo para disminuir el riesgo de surgimiento de clones resistentes y evitar recidivas de la enfermedad.

De acuerdo a este principio, en el Servicio de Hematología, la toxicidad que presentan los pacientes es evaluada mediante exploración física y parámetros de

laboratorio. En el caso de la neutropenia asociada a la administración de 6-MP, es importante tomar en cuenta que puede ser consecuencia de la disminución en la producción medular debido al efecto mielotóxico del fármaco, el cual favorece diversos grados de neutropenia, por lo que cuentas de neutrófilos totales por arriba de 1000/ μ l son permitidas en los pacientes. Las neutropenias grado III-IV (neutrófilos totales menor 1000/ μ l) se consideran no aptas para continuar tratamiento, tomando en cuenta que el grado y la duración de la neutropenia son factores predictivos importantes para la aparición de infección en el paciente con cáncer que puedan llevarlo hasta choque séptico ó incluso la muerte. (Schrappe 2003). En los casos de interrupciones frecuentes del tratamiento con 6-MP durante la fase de mantenimiento, el principio general de quimioterapia no se cumple y el riesgo de recidiva puede aumentar. Los pacientes que reciben una terapia de mantenimiento de forma continua en vez de periodos separados pueden tener una duración más larga de la remisión (Conter 2006 Dolan 1998, Chessells y cols 1986, Chessells y cols 1997, Relling, Boyett y cols 1999, Schrappe 2003).

En el caso de mielotoxicidad representada por anemia ó trombocitopenia, se proporciona apoyo transfusional a los pacientes y la decisión de suspensión del tratamiento se individualiza.

IMPORTANCIA CLÍNICA DEL POLIMORFISMO DEL GEN *TPMT*: RELACIÓN ENTRE FENOTIPO, GENOTIPO Y TOXICIDAD

Las células hematopoyéticas carecen de actividad de XO, por lo que dependen únicamente de la actividad enzimática de TPMT para inactivar los metabolitos de 6-MP, es por eso que los pacientes con LAL y actividad deficiente de la enzima TPMT pueden presentar efectos adversos mayores durante el tratamiento con 6-MP.(Weinshilboum 1980, Evans 2001, Corominas 2003).

En un estudio de 67 pacientes tratados con azatioprina para el tratamiento de artritis reumatoide, 6 pacientes (9%) fueron heterocigotos para los alelos mutantes del gen *TPMT* (Black y cols. 1998). Cinco de estos pacientes suspendieron la terapia debido a cuentas leucocitarias bajas al mes de haber iniciado el tratamiento. El paciente número 6 no cumplió con el tratamiento. Los pacientes con la forma del gen no mutada ó “normal” de *TPMT* recibieron el tratamiento por una media de 39 semanas comparado con una media de dos semanas en pacientes heterocigotos para el alelo mutante. Este estudio claramente demostró que un conocimiento del genotipo de *TPMT* ayudaría a los médicos al manejo con tiopurinas.

En 1991 Evans y cols. reportaron que en el Reino Unido anualmente se diagnosticaban aproximadamente 7500 casos de niños con leucemia aguda

linfoblástica, de los cuales se estimaba que cada año 25 de estos pacientes podrían presentar intolerancia a la tiopurina por actividad deficiente de la enzima TPMT. Adicionalmente 835 podrían estar en riesgo para presentar efectos tóxicos debido a los niveles intermedios de la actividad enzimática. Diversos grupos han documentado la toxicidad excesiva provocada por dosis completas de tiopurina administradas a niños con LAL y con actividad deficiente de la enzima TPMT (Andersen y cols. 1998, Ando y cols. 2001, Evans y cols. 1991).

El impacto de la presencia de alelos mutantes en los individuos también se observó en un estudio realizado en el Reino Unido el cual comprendió 147 niños con el diagnóstico de LAL. Se identificó una frecuencia de variantes heterocigotas para el gen mutante del 10.9%, con un paciente homocigoto para actividad deficiente de TPMT (0.7%). El paciente homocigoto con actividad deficiente de la enzima no recibió tratamiento durante casi más de la mitad de la duración de la terapia de mantenimiento (53%), debido a una severa toxicidad del medicamento (Dolan 1989).

Las situaciones clínicas que enfrentan los pacientes homocigotos para alelos mutantes (neutropenia, neutropenia y fiebre, infecciones) los coloca en una situación de alto riesgo de recidiva debido a la pobre continuidad en su tratamiento, ya que estas situaciones llevan a la suspensión temporal del fármaco hasta la mejoría del paciente (McLeod y cols. 1999), **Ver Figura 4.**

La mayoría de los pacientes con deficiencia de actividad de la enzima TPMT se identifican después de experimentar una severa toxicidad, por lo que la determinación de la actividad enzimática de TPMT es una forma de prevenir los efectos adversos (Relling Rivera GK y cols. 1999, Alves y cols. 2001). Aunque la determinación de la actividad de TPMT en eritrocitos se propuso como una medición de rutina antes de iniciar la terapia para dar la dosis adecuada de 6-MP, existen varios inconvenientes, uno de ellos son las variaciones de actividad durante las diferentes fases del tratamiento (Brouwer y cols. 2005, Lennard y cols. 1987, Lennard y cols. 1990, McLeod y cols. 1995) y además se debe considerar que hay medicamentos clínicamente importantes como sulfasalazina, olsalazina y salicilatos que pueden alterar la determinación debido a que son inhibidores de la enzima TPMT (Clunie 2004).

Actualmente se propone la genotipificación de *TPMT* para identificar aquéllos pacientes con alto riesgo de desarrollar toxicidad, previo a la administración del tratamiento, con la finalidad de establecer una dosificación individualizada de la 6-MP (Schaeffeler y cols. 2003).

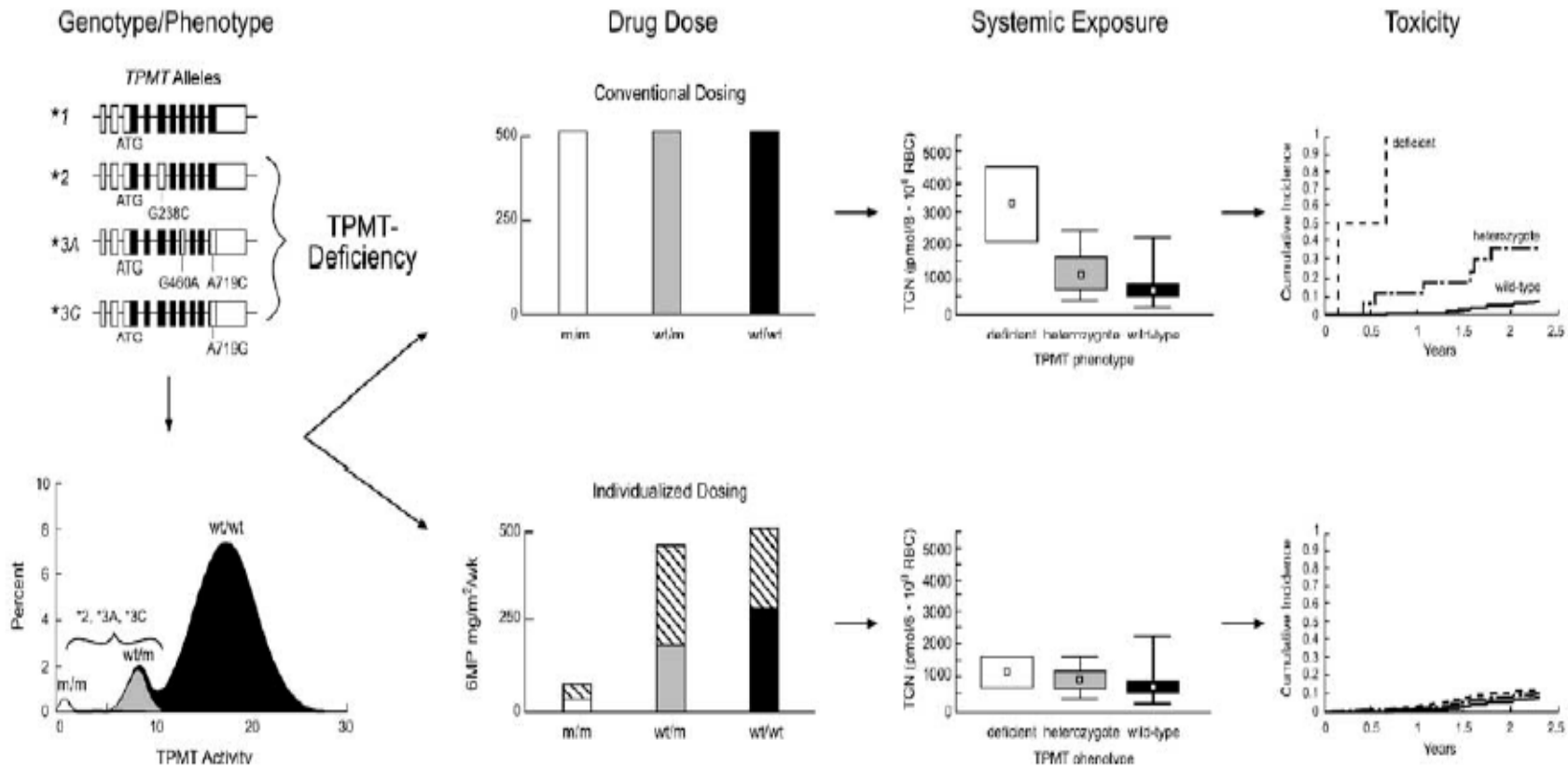


Figura 4. Polimorfismos genéticos de *TPMT* y su papel determinante en la respuesta a las tiopurinas. La imagen de la izquierda muestra los polimorfismos predominantes en humanos. Inmediatamente a la derecha, se muestra el acumulo de nucleótidos de tioguanina (TGN) en dosis convencionales de tiopurinas (homocigotos alelo mutante, 10 veces más, heterocigotos 2 veces más), lo que se traduce en una toxicidad hematopoyética mayor (imagen superior). En las imágenes inferiores, se muestra la individualización del tratamiento con tiopurinas con base a la genotipificación de *TPMT*, con lo que se logran concentraciones de TGN similares y sin eventos de toxicidad en los grupos (Krynetski 2003). *m*=alelo mutante *wt*=alelo silvestre

EVALUACIÓN DEL COSTO-BENEFICIO

Basados en un estudio reciente, la genotipificación de *TPMT* ha sido evaluada en cuanto a costo-beneficio. Después de considerar los costos de genotipificación, la frecuencia estimada de la presencia de pacientes con deficiencia de la actividad enzimática de *TPMT* y el costo por hospitalización relacionada con mielosupresión en 4 países europeos, se encontró que el costo anual ahorrado al realizar la genotipificación en los pacientes con LAL fue de 2100 euros, basados en un costo de genotipificación por paciente de 150 euros (Huang 2009).

Actualmente, la genotipificación previo al inicio de tratamiento es una rutina obligada en centros académicos seleccionados como el Hospital de San Judas en Memphis, EUA. El Grupo Oncológico de Niños (COG) también recomienda dentro de sus protocolos la realización de la genotipificación cuando se observa mielosupresión persistente.

En el año 2003, un comité de la FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos de Norteamérica recomendó agregar a la información del fármaco 6-mercaptopurina, datos concernientes a los polimorfismos y la toxicidad presentada. Lo anterior llevó a que en el año 2004 se incluyera en esta información la recomendación de realizar estudios de genotipificación ó actividad de *TPMT* y recomendaciones de dosificación en los pacientes deficientes de esta enzima (Huang 2009).

PERSPECTIVAS FUTURAS

El uso efectivo de la quimioterapia anticancerosa requiere un conocimiento de los principios de la biología tumoral, cinética celular, farmacología y resistencia a drogas. El desarrollo de nuevos y efectivos agentes quimioterapéuticos, junto con el conocimiento cada vez mayor acerca de la administración y combinación de estos agentes, resultará en mejoría de la atención clínica y aumento de las tasas de curación de la LAL, una enfermedad que desde hace muchos años ha servido de ejemplo de curación con quimioterapia de un cáncer diseminado.

Esto reducirá sustancialmente la necesidad de hospitalización y los costos asociados. El conocimiento de la secuencia de los genes y del polimorfismo genético de las enzimas que metabolizan los medicamentos permitirá identificar factores de riesgo genéticos relacionados con mayor propensión a generar la enfermedad y con el tipo de reacción al tratamiento.

III. JUSTIFICACIÓN

La LAL en niños representa un padecimiento grave que impacta de manera significativa la salud pública a nivel mundial. En México representa el padecimiento maligno más frecuente en este grupo etáreo. Se han logrado grandes avances en la sobrevivencia de los pacientes, sin embargo, aún falta mucho por hacer: los avances en la farmacogenética ofrecen un mecanismo que permite prescribir drogas apartándose del empirismo y no sólo identificar la mejor droga sino realizar recomendaciones de la dosis más segura y efectiva según el genotipo individual de cada paciente.

El conocimiento de los diversos polimorfismos genéticos de *TPMT* en los pacientes con LAL y su relación con la presencia de neutropenia grado III ó IV (evento adverso más frecuente) posterior a la administración de 6-MP, puede brindar al clínico la oportunidad de individualizar la dosis del fármaco y evitar la suspensión temporal del tratamiento al presentar este efecto adverso (Relling 1999). Asimismo, la presencia de neutropenia grado III ó IV puede condicionar en el paciente hospitalizaciones por neutropenia y fiebre, sepsis grave, choque séptico, recaída de la enfermedad si se presenta frecuentemente e incluso toxicidad fatal, eventos que podrían ser más frecuentes en la población con las variantes hipomorfas.

En la literatura mundial se recomienda analizar el genotipo de *TPMT* en pacientes con LAL antes de iniciar el tratamiento farmacológico para incrementar la eficacia y disminuir la toxicidad de la quimioterapia y el riesgo de recaída (Relling, Rivera GK y cols. 1999, Coulthard 2004, Evans y cols. 2001, Huang 2009, Compagni y cols. 2008, Duff y cols. 2008).

En el presente trabajo se pretende conocer la frecuencia de las variantes hipomorfas del gen *TPMT* en pacientes con LAL y si se relaciona su presencia con el antecedente de cuadros de neutropenia severa. De acuerdo a los resultados de este estudio, se podrá considerar en un futuro la realización de un estudio prospectivo que incluya a pacientes con LAL de reciente diagnóstico a quienes se realice la genotipificación de *TPMT* y cuyo tratamiento con 6-MP se individualice de acuerdo a las variantes alélicas con el fin de disminuir la presencia de efectos adversos como neutropenia.

Actualmente, en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética Humana y en el Servicio de Hematología del INP se cuenta con los pacientes, el personal, las herramientas y la infraestructura necesaria para realizar la determinación del genotipo de *TPMT*.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la frecuencia de los polimorfismos del gen *TPMT* en los pacientes supervivientes de LAL precursor de células B en el Servicio de Hematología Pediátrica del INP?

¿Existe relación entre los polimorfismos del gen *TPMT* y el antecedente de neutropenia severa que presentó esta población de pacientes?

¿Existe relación entre los polimorfismos del gen *TPMT* y el porcentaje de cumplimiento de tratamiento programado durante la fase de mantenimiento?

V. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

Determinar si la presencia de las variantes alélicas *TPMT* *2, *TPMT* *3A, *TPMT* *3B y *TPMT* *3C en los pacientes sobrevivientes de LAL Precursor de Células B se relacionó con el antecedente de neutropenia grado III-IV durante la etapa de mantenimiento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la frecuencia de las variantes alélicas del gen *TPMT* (*TPMT* *1, *TPMT* *2, *TPMT* *3A *TPMT* *3B y *TPMT* *3C) en los pacientes sobrevivientes con LAL precursor de células B en el Servicio de Hematología Pediátrica del INP.

Determinar si existe relación entre la presencia de las 4 variantes alélicas deficientes del gen *TPMT* y el antecedente de número de eventos de neutropenia grado III-IV que presentaron los pacientes sobrevivientes con LAL precursor de células B durante la terapia de mantenimiento.

Determinar si existe relación entre la presencia de las 4 variantes alélicas deficientes del gen *TPMT* y el porcentaje de cumplimiento programado durante la terapia de mantenimiento en los pacientes sobrevivientes con LAL precursor de células B.

VI. HIPÓTESIS

De acuerdo a los 2 estudios realizados en población mexicana, se espera que la frecuencia de variantes alélicas deficientes del gen de *TPMT* en los pacientes en vigilancia con el diagnóstico LAL precursor de células B en el Servicio de Hematología, corresponda a un 7%.

La frecuencia de variantes alélicas deficientes del gen de *TPMT* será mayor en los pacientes sobrevivientes con LAL precursor de células B que presentaron el antecedente de neutropenia grado III ó IV como efecto adverso al uso de 6-MP durante la fase de mantenimiento.

La frecuencia de variantes alélicas deficientes del gen de *TPMT* será mayor en aquellos pacientes que tuvieron un menor porcentaje de cumplimiento de tratamiento programado durante la terapia de mantenimiento en comparación a los pacientes homocigotos para el alelo silvestre.

VII. CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Estudio transversal, observacional, comparativo.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

A) CRITERIOS DE SELECCIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes con diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica Precursor de Células B menores de 18 años que hayan recibido tratamiento quimioterapéutico y se encuentren en fase de vigilancia.

Pacientes de cualquier género.

Aceptación por escrito de participación en el estudio.

CRITERIO DE EXCLUSIÓN

Pérdida del expediente clínico inicial y en el que no se incluya la información completa de la terapia de mantenimiento.

CRITERIO DE INCLUSIÓN DE GRUPO CON EFECTO ADVERSO

Pacientes con LAL Precursor de Células B con antecedente de neutropenia grado III ó IV durante la terapia de mantenimiento.

CRITERIO DE INCLUSIÓN DE GRUPO SIN EFECTO ADVERSO

Pacientes con LAL Precursor de Células B sin antecedente de neutropenia grado III ó IV durante la terapia de mantenimiento.

B) DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

1. *Ubicación del estudio*

La entrevista y captación de los pacientes se realizó en la Consulta Externa del Servicio de Hematología del Instituto Nacional de Pediatría.

El análisis de los polimorfismos de *TPMT* se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética Humana del INP.

Se realizó una revisión del expediente clínico de los pacientes para hacer una clasificación de ellos con base al protocolo de tratamiento recibido: riesgo habitual ó alto riesgo, de acuerdo a la clasificación de riesgo (ver Cuadro 2). Ambos grupos se dividieron a su vez, de acuerdo a la presentación o no de neutropenia grado III ó IV durante la terapia de mantenimiento. En cada uno de los grupos finales se evaluó el número de eventos de neutropenia grado III y IV, porcentaje de tratamiento completado, así como número de hospitalizaciones secundarias a los eventos de neutropenia (**Ver Figura 5**).

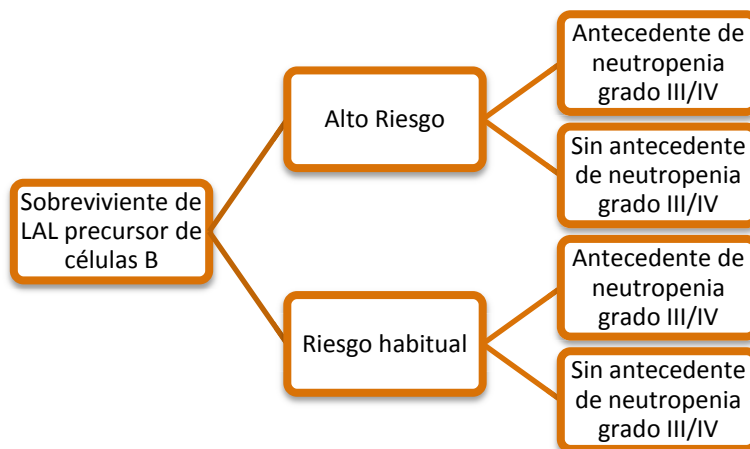
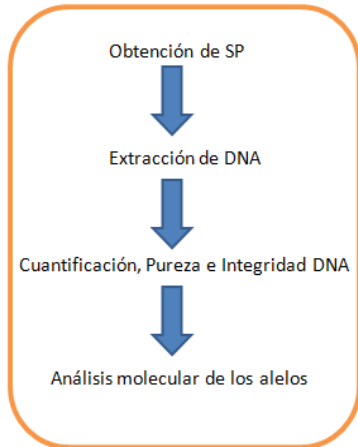


Figura 5. Clasificación de los pacientes sobrevivientes de LAL Precursor de Células B

2. Genotipificación

Se captó a los pacientes con diagnóstico de LAL precursor de células B en fase de vigilancia que asistieron a la Consulta Externa del Servicio de Hematología del INP. A los pacientes seleccionados - previo consentimiento informado - se les solicitó su asistencia al Laboratorio de Biología Molecular para extracción de 3 ml de sangre periférica en tubo colector con EDTA. Se extrajo el DNA genómico a partir de los leucocitos, las muestras de DNA fueron conservadas en refrigeración a una temperatura de 4°C hasta su análisis.

En las muestras de DNA se caracterizaron las variantes *TPMT*1*, *TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3B* y *TPMT*3C* con las técnicas de PCR alelo específica y PCR y restricción (**Cuadro 6**).



Cuadro 6. Estrategia general de genotipificación. SP: sangre periférica

3. Determinación del genotipo

Extracción de DNA

Se empleó el método de precipitación fraccionada por sales; el DNA se disolvió en amortiguador TE (tris HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM) y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Cuantificación de DNA

Para cuantificar el DNA se realizaron diluciones con el buffer TE y se determinó la absorbancia a 260 nm (A_{260}) en un espectrofotómetro y se aplicó la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA}] \text{ mg/ml} = (A_{260}) \times (0.05) \times (\text{factor de dilución})$$

Se consideró una concentración de DNA adecuada cuando se tenían concentraciones iguales o mayores a 10 nanogramos/microlitro.

Las muestras con mayor concentración se diluyeron para ajustarse a 10 ng/ul.

A la reacción de PCR ARMS, que se realizó para el alelo *2, se agregó un microlitro (o sea 10 nanogramos) a un volumen de reacción de 20 microlitros.

En las reacciones de PCR para restricción de los alelos *3, se agregaron 3 microlitros (o sea 30 nanogramos) a un volumen de reacción de 50 microlitros.

Pureza del DNA

La pureza del DNA se calculó a partir del cociente de las lecturas de absorbancia a 240nm, 260nm y 280nm, el criterio de pureza que se empleó fue $A_{260}/A_{240} > 1.6$ y $A_{260}/A_{280} > 1.6$

Integridad del DNA

La integridad del DNA se evaluó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.75% a 100 V durante 30 minutos. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador de luz ultravioleta. El DNA se consideró íntegro cuando se presentó una banda única mayor a 23 kb.

Análisis molecular de los alelos de *TPMT*

La variante *TPMT*2* se analizó empleando la técnica de PCR alelo específica (la secuencia de los primers se muestra en el **Cuadro 7**); y las variantes de *TPMT*2* se interpretaron de acuerdo al **Cuadro 8**.

Alelos	Cambio en la secuencia génica	Exon	Primers	Secuencia
<i>TPMT*2</i>	G238C	5	P2W	5' gTA TgA TTT TAT gCA ggT TTg 3'
			P2M	5' gTA TgA TTT TAT gCA ggT TTC 3'
			P2C	5' TAA ATA ggA ACC ATC ggA CAC 3'
<i>TPMT*3A</i> y <i>TPMT*3B</i>	G460A	7	P460F	5' ATA ACA gAg Tgg ggA ggC TgC 3'
			P460R	5' CTA gAA CCC AgA AAA AgT ATA g 3'
<i>TPMT*3A</i> y <i>TPMT*3C</i>	A719G	10	P719R	5' TgT Tgg gAT TAC Agg TgT gAg CCA C 3'
			P719F	5' CAg gCT TTA gCA TAA TTT TCA ATT CCT C 3'

Cuadro 7. Lista de primers requeridos para analizar las 4 variantes hipomorfas.

Exon	Primer F	Primer R	Longitud (pb)	Alelo Asignado	
				<i>TPMT*1</i>	<i>TPMT*2</i>
5	P2W	P2C	254	Amplifica	No amplifica
5	P2M	P2C	254	No amplifica	Amplifica

Cuadro 8. Determinación de la variante *TPMT*2*

La amplificación se realizó bajo el siguiente protocolo: desnaturalización inicial 5 min a 95°; seguido por 30 ciclos de desnaturalización (30 seg a 94°), alineación (1 min a 57°) y extensión (1 min a 72°) y una extensión final de 7 min a 72°.

Genotipificación de los alelos *TPMT*3*

La determinación de los alelos *TPMT*3* se realizó por PCR (lista de primers en el **Cuadro 7**) y restricción de los exones 7 y 10 (**Ver Cuadro 9**). Los amplicones se restringieron con una enzima específica de acuerdo al **Cuadro 9**. Se consideró + si había restricción y – cuando no la había, así se formaron los haplotipos correspondientes para las diferentes variables, como se observa en el **Cuadro 10**.

Cambio en la secuencia génica	Exon	primers	Amplicon (pb)	Enzima de restricción	Patrón de restricción	SIGNO
G460A	7	P460F/P60R ¹	365	MwoI	267/98	+
			365		365	-
A719G	10	P719F/P19R ²	290	Accl	201/89	+
			290		290	-

Cuadro 9. Patrón de restricción de los amplicones de Exon 7 y Exon 10.

Las amplificaciones se realizaron de la siguiente forma:

1. *Desnaturalización inicial 2 min a 94°; seguido por 35 ciclos de desnaturalización (45 seg a 94°), alineación (45 seg a 57°) y extensión (45 seg a 72°) y una extensión final de 7 min a 72°.*

2. *Desnaturalización inicial 2 min a 95°; seguido por 30 ciclos de desnaturalización (30 seg a 94°), alineación (1 min a 57°) y extensión (1 min a 72°) y una extensión final de 7 min a 72°.*

ALELOS	RESTRICCIÓN	
	Exon 7 con MwoI	Exon 10 con Accl
TPMT*1	+	-
TPMT*3A	-	+
TPMT*3B	-	-
TPMT*3C	+	+

Cuadro 10. Haplotipos de restricción para los alelos TPMT*3, los alelos TPMT*1 se consideraron así cuando no se observó ninguna de las 4 variantes hipomorfas.

C) DEFINICIÓN DE VARIABLES OPERACIONALES

GÉNERO: Denominación que se da al sujeto según sus características fenotípicas y genotípicas. Cualitativa, nominal. Dicotómica.

EDAD: Tiempo transcurrido desde el nacimiento del individuo en estudio hasta el ingreso en el estudio. Cuantitativa. Continua.

FECHA DE NACIMIENTO: día, mes y año en el que se registró el nacimiento del paciente. Cualitativa. Nominal.

PROTOCOLO DE TRATAMIENTO: Esquema de quimioterapia utilizado desde el diagnóstico de la enfermedad. Cualitativa. Dicotómica.

POLIMORFISMO: Variante en la secuencia del DNA que se observa en por lo menos el 1% de la población sana. Cualitativa, nominal. Politémica.

ANTECEDENTE DE RECAÍDA: Infiltración por linfoblastos en un porcentaje > 25%, mediante el análisis con tinción de Wright del aspirado de médula ósea tomando en cuenta los criterios de la FAB, utilizando una aguja de Osgood, colocada en la espina iliaca posterior superior. Cualitativa. Dicotómica.

NEUTROPENIA: Descenso absoluto en el número de neutrófilos circulantes en la sangre, con cifra menor de 1000/mm³. Cualitativa. Dicotómica.

NÚMERO DE EPISODIOS DE NEUTROPENIA GRADO III: episodio con neutrófilos totales de 500 a 999 células/mm³ Cuantitativa. Discreta.

NÚMERO DE EPISODIOS DE NEUTROPENIA GRADO IV: episodio con neutrófilos totales menor de 499 células/mm³. Cuantitativa. Discreta.

NÚMERO DE HOSPITALIZACIÓN: Número de ocasiones en las que el paciente permaneció internado en el Servicio de Hematología. Cuantitativa. Discreta.

CUMPLIMIENTO DEL TRATAMIENTO: porcentaje de esquema de tratamiento recibido durante la fase de mantenimiento de acuerdo al protocolo inicial establecido. En el caso de los pacientes clasificados como riesgo habitual será de 72 semanas y en el caso de los pacientes clasificados como AR será de 60 semanas. Cuantitativa. Continua.

D) HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

1.- Nombre del Paciente	
2.- Edad	
3.- Registro de Expediente Clínico	
4.- Fecha de Nacimiento (dd/m/aa)	
5. Protocolo de tratamiento	a) Riesgo habitual ____ b) AR ____
6. Antecedente de recaída	a) Sí ____ b) No ____
7- ¿Desarrolló neutropenia grado III-IV durante la terapia de mantenimiento?	a) Sí ____ b) No ____
8.- ¿Cuánto tiempo se mantuvo en terapia de mantenimiento con relación al protocolo inicial? (%)	_____ %
9. Polimorfismo de <i>TPMT</i>	

D) HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

NOMBRE: _____

REGISTRO: _____

MEDICO TRATANTE: _____

EVENTOS DE NEUTROPENIA DURANTE CICLOS DE MANTENIMIENTO

	Fecha de inicio de terapia de mantenimiento	Fecha de termino de terapia de mantenimiento	# semanas en mantenimiento	Evento con cuenta de NT	Fechas del evento	Hospitalización y causa
1º						
2º						
3º						
4º						
5º						
6º						
7º						

Fecha inicio vigilancia:

Fecha de Revisión de Expediente:

Meses en vigilancia:

IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO E INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

En el caso de las variables cualitativas se buscaron las frecuencias simples de las variables: género, protocolo de tratamiento, antecedente de recaída, presencia de neutropenia grado III-IV en terapia de mantenimiento, polimorfismo de *TPMT*.

Se elaboraron contrastes entre el grupo al que pertenecían de acuerdo al genotipo *TPMT* con las variables cuantitativas utilizando la prueba de χ^2 . Se realizó esta prueba en cada uno de los grupos de acuerdo a la clasificación de riesgo.

Prueba de χ^2	
Grupo de polimorfismo <i>TPMT</i>	Número episodios de neutropenia III-IV en la terapia de mantenimiento Porcentaje de cumplimiento de tratamiento programado

Se exploró si las prevalencias en los eventos de neutropenia grado III/IV tenían diferencias estadísticas entre los pacientes de riesgo habitual y las variantes hipomorfas mediante una razón de momio (RM). Se realizó la misma estrategia en los pacientes pertenecientes al grupo de alto riesgo.

Mediante cuadros de 2x2 analizamos las probabilidades que tuvieron los pacientes de completar el tratamiento programado cuando poseían un genotipo normal ó heterocigoto.

Tamaño de la muestra

Utilizamos la fórmula para calcular la “*Precisión deseada en unidades absolutas de la proporción*”. Esta fórmula nos permitió determinar el tamaño de la muestra para estimar una proporción poblacional P , basada en una precisión pre-específica en unidades absolutas. Definiendo a la precisión como la distancia en cualquier dirección a la proporción poblacional.

Utilizando la fórmula (Lemeshow 1990):

$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 P(1-P)}{d^2}$$

Donde los datos de entrada con sus respectivos límites son:

α =probabilidad de error tipo I (.05)

P =proporción poblacional esperada “Proporción” (.87). $TPMT^*1$ (González del Ángel y cols. 2009, Taja-Chayeb 2008)

d =”Distancia a la proporción poblacional”: $TPMT^*2=.027$, $TPMT^*3A =.076$, $TPMT^*3C=.025^*$ (González del Ángel y cols. 2009, Taja-Chayeb 2008)

Dando como resultado

$TPMT^*1$ (0.87)	Una cola	Dos colas
Estimación de P	N	n
$TPMT^*2=0.027$	420	596
$TPMT^*3A =0.076$	53	76
$TPMT^*3C=0.025$	490	696

Por la estimación y por factibilidad se incluirán 490 pacientes con LAL que cumplan los criterios de inclusión para determinar las frecuencias de estos alelos. El reporte preliminar de este estudio incluyó 93 pacientes.

X. ÉTICA

El artículo 17 de la Ley General de Salud define como **investigación con riesgo mínimo** cuando se utilizan métodos diagnósticos rutinarios entre los que se encuentra la extracción de sangre por punción venosa, como es el procedimiento que se realizará en este estudio para la determinación de los polimorfismos en el gen *TPMT*. Nuestra legislación señala que el propio menor de edad puede otorgar su asentimiento cuando su capacidad mental y psicológica así lo permita. Todo niño deberá recibir explicación adecuada a su capacidad de comprensión acerca de lo que se hará, el tiempo que durará y las molestias que el estudio le causará. La participación en el estudio deberá ser voluntaria solicitando el consentimiento del padre o tutor por escrito. La negativa del paciente a participar no debe afectar la relación médico paciente.

Se solicitó al padre ó tutor del paciente que firmara la carta de consentimiento informado del paciente y carta de asentimiento informado si el paciente tenía la capacidad para emitir su voluntad de participar en el estudio (más de 10 años de edad y sin retraso mental). La información personal, de identidad y del genotipo fue manejada en forma estrictamente confidencial, siguiendo las normas establecidas por la declaración de Helsinki, las buenas prácticas del ELSI (del inglés "Ethical, Legal and Social Issues"). El asesoramiento genético se brindará en todos los casos de acuerdo a los resultados obtenidos del estudio molecular. **(VER ANEXO 2.1, 2.2)**

XI. RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS GENERALES

El presente estudio se llevó a cabo durante los meses de Octubre del 2010 a Enero del 2011. El reclutamiento inició a través de la revisión del expediente clínico de los pacientes candidatos que asistirían a la Consulta Externa de Hematología en los días posteriores. A través de esta revisión se seleccionó a los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y durante su asistencia a la Consulta Externa de Hematología, fueron invitados a participar en el protocolo. Previa firma de consentimiento y/o asentimiento informado, se realizó la extracción de 3 ml de sangre periférica en un tubo colector con EDTA para continuar con la extracción de DNA en el Laboratorio de Biología Molecular. Se logró realizar el análisis molecular de los alelos de *TPMT* en 93 de 96 pacientes. Tres pacientes fueron eliminados del estudio ya que la muestra sanguínea para genotipificación fue insuficiente.

Las edades de los pacientes incluidos fueron desde 4 años 3 meses hasta 18 años 10 meses, con un promedio de edad de 12 años 11 meses. La distribución por grupos etáreos se muestra en la **Figura 6**. Cincuenta y tres pacientes fueron del género masculino y 40 pacientes del género femenino, **Figura 7**.

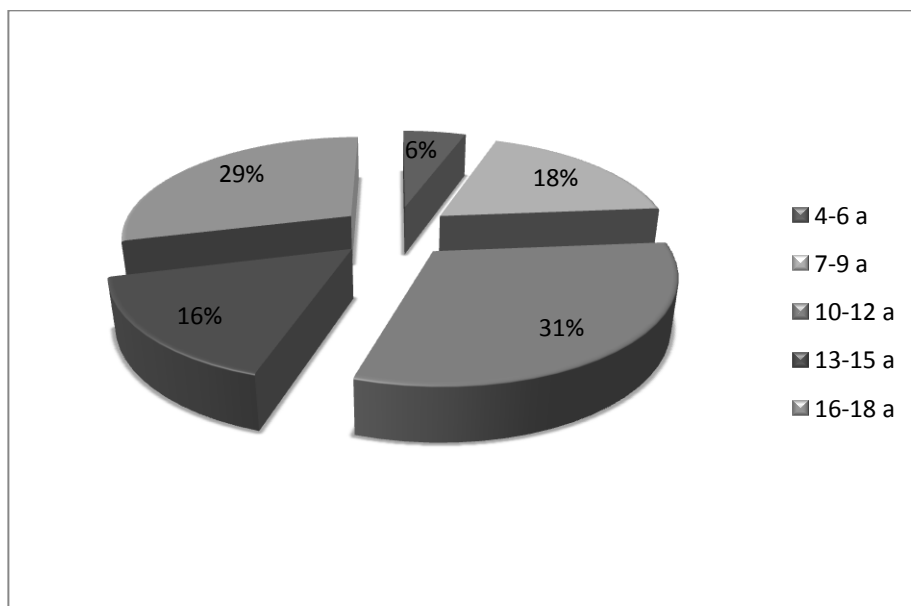


Figura 6. Distribución por grupos etáreos. a=años

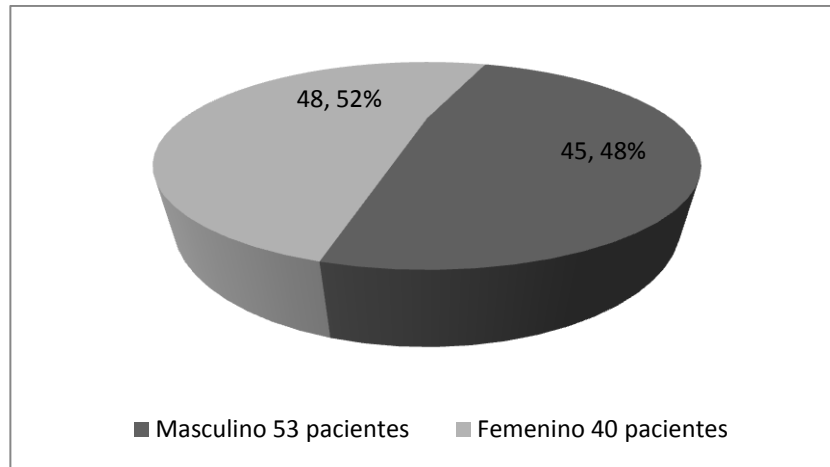


Figura 7. Distribución por género

En cumplimiento a la metodología propuesta, se dividió a los pacientes de acuerdo a la clasificación de riesgo (ver cuadro 2), ya que recordemos que en base a esta clasificación el protocolo de tratamiento es establecido y las semanas en que un paciente es sometido a la 6- mercaptopurina varían. Cuarenta y ocho pacientes fueron clasificados como riesgo habitual y 45 pacientes correspondieron a alto riesgo, **Figura 8.**

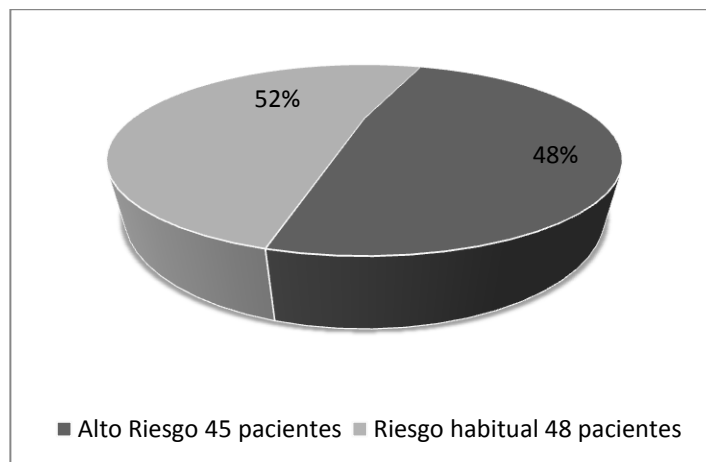


Figura 8. Distribución de los pacientes de acuerdo a la clasificación de riesgo

Las características generales de cada grupo se presentan en el **Cuadro 11**.

	RIESGO HABITUAL n=48	RIESGO ALTO n=45
Edad promedio	11 años 9 meses	14 años 1 mes
Género	H: 29 M:19	H: 24 M:21
Antecedente de Recaída	2	3
Antecedente de neutropenia grado III/IV	47 pacientes (98%)	38 pacientes (84%)
Tratamiento completado por arriba del 60%	35 pacientes	34 pacientes

Cuadro 11. Datos de recaída, antecedente de neutropenia y porcentaje de tratamiento completado en los pacientes incluidos de acuerdo al protocolo de riesgo establecido (LAL de riesgo alto o LAL de riesgo habitual). H: Hombre M: Mujer

GENOTIPIFICACIÓN

En el Laboratorio de Biología Molecular se realizó la extracción de DNA en cada uno de los pacientes seleccionados. Se obtuvo el DNA genómico a partir de los leucocitos, por la técnica de precipitación salina con el Kit Puregene™ (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA). Las muestras de DNA fueron conservadas en refrigeración a una temperatura de 4°C hasta su análisis. En las muestras de DNA se caracterizaron las variantes *TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3B* y *TPMT*3C* con las técnicas de PCR alelo específica y PCR con restricción. Cuando no se observaron ninguna de las 4 variantes se consideró que el paciente portaba la variante normal o silvestre *TPMT*1*.

En las **Figura 9 y 10** se muestran las imágenes de los geles de agarosa tras realizar la electroforesis de los 4 polimorfismos encontrados: *TPMT* *1/*1, *TPMT* *1/*2, *TPMT* *1/*3A y *TPMT**1/*3C.

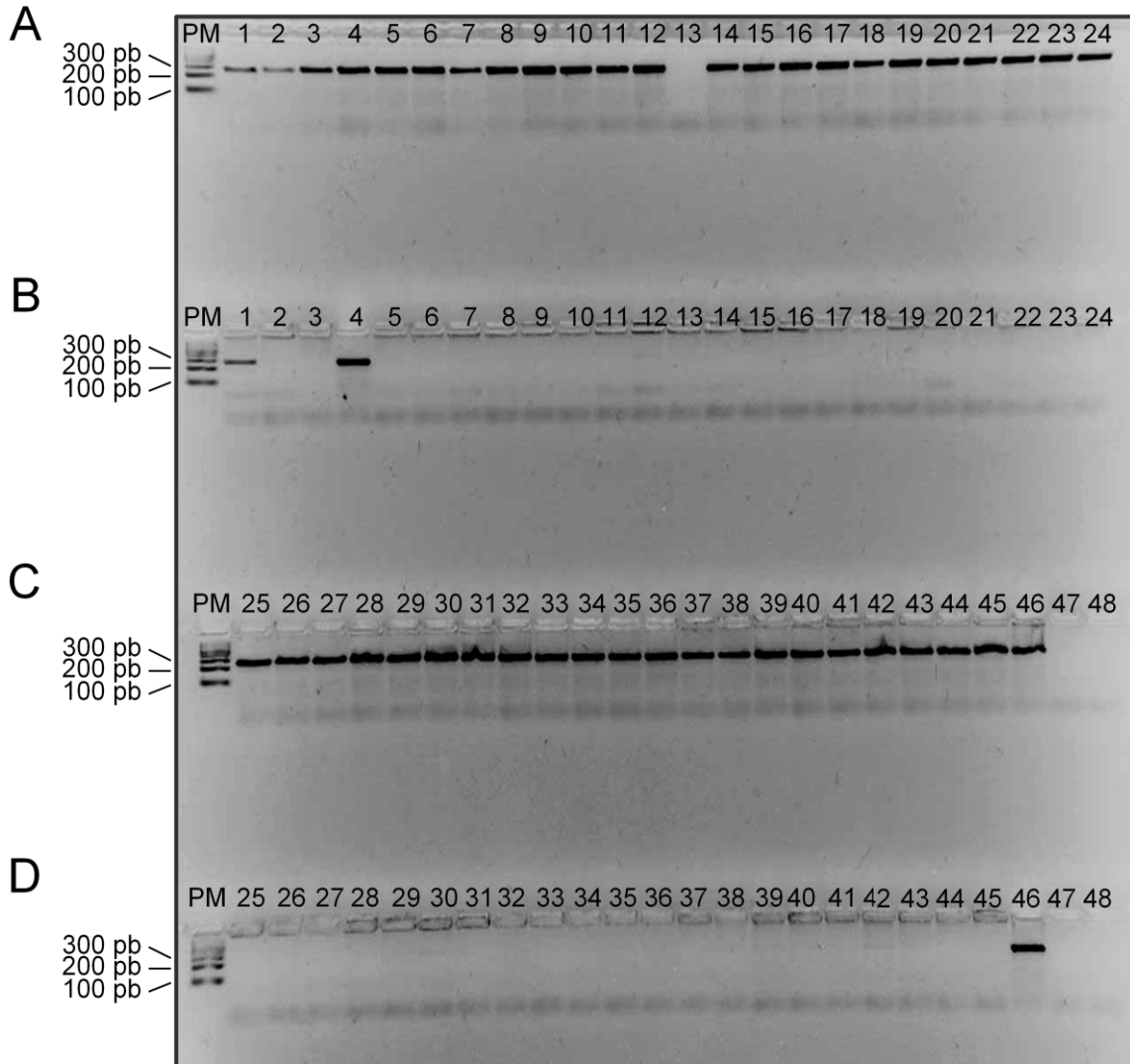


Figura 9. Análisis para el cambio G238C (*TPMT2) por medio de PCR alelo específica.** Los amplificados tienen un peso molecular de 254 pb. En las hileras A y C se muestran los amplificados con el primer silvestre (P2W) y el primer complementario (P2C), en B y D los amplificados con el primer mutado (P2W) y primer complementario (P2C). En los carriles **1 y 4** individuos heterocigotos (*TPMT**1/*2). En los carriles **2-3, 5-12 y 14-45** pacientes que no presentan el alelo *TPMT* *2. El carril **13-A** no amplificó. Carril **46** control heterocigoto con un alelo *TPMT* *2. Carriles **47 y 48** controles sin DNA. **PM** marcador de pesos moleculares escalera de 100 pb.

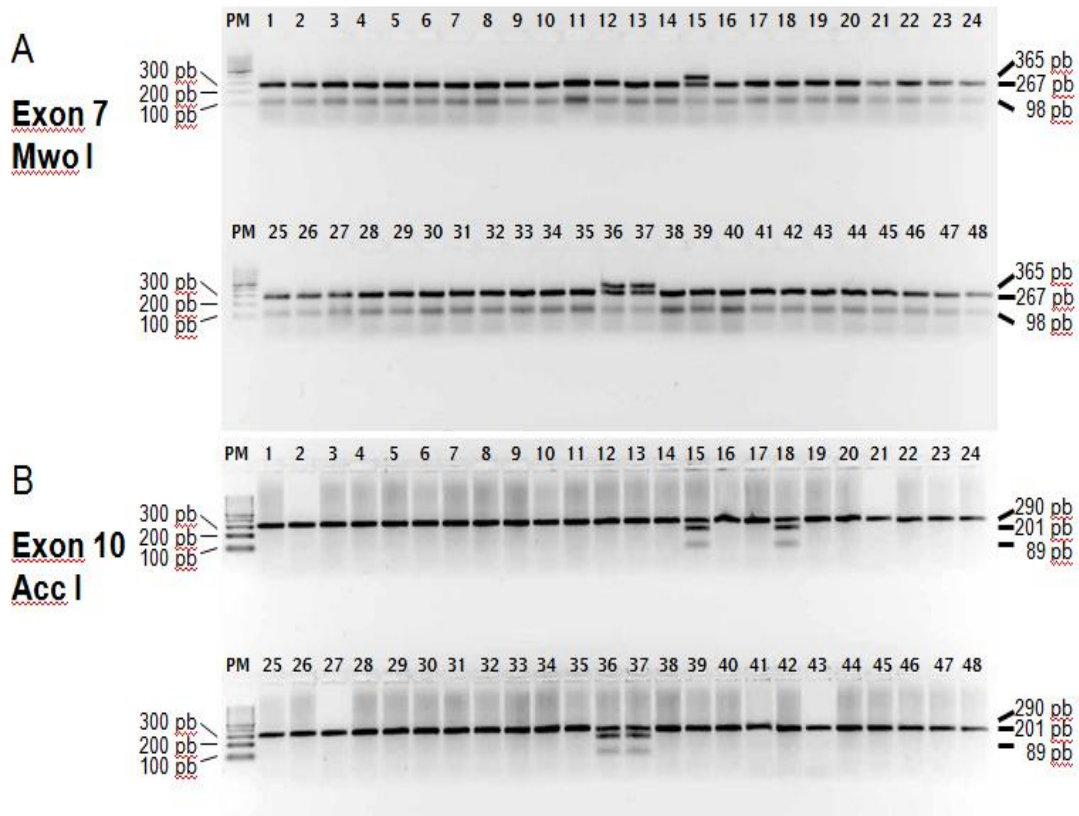


Figura 10. Determinación del genotipo de los alelos de *TPMT*3*. Cambios en la secuencia del exón 7 (G460A) y el exón 10 (A719G). Corrimientos electroforéticos de las restricciones. En (A) amplificados del exón 7 restringidos con *MwoI* en (B) amplificados del exón 10 restringidos con *AccI*. En los carriles **1-14, 16-17, 19-35 y 38-48** individuos homocigotos silvestres (*TPMT *1/*1*), carriles **15, 36 y 37** heterocigotos (*TPMT*1/*3A*), carril **18** heterocigoto (*TPMT *1/*3C*).

FRECUENCIA DE LAS VARIANTES ALÉLICAS EN EL GEN *TPMT*

La frecuencia de las variantes alélicas y los genotipos en nuestra población se muestran en los Cuadros 12 y 13. Todas las frecuencias alélicas obtenidas se encontraron en equilibrio de Hardy-Wienberg. ($p>0.05$).

De los 93 casos estudiados, se consideró que setenta y ocho pacientes presentaron la variante alélica normal (*TPMT*1*) en forma homocigota al no identificar en ellos alguna de las 4 variantes deficientes estudiadas (156 alelos), y 15 pacientes fueron considerados heterocigotos ya que al solo portar en un alelo una de las variantes deficientes se infirió que en el otro alelo presentaban la variante *TPMT*1*; ningún paciente presentó un genotipo con ambos alelos deficientes. Así, de los 186 alelos analizados, 15 correspondieron a pacientes heterocigotos (8.06%), la variante hipomorfa más común fue la *TPMT*3A* y la variante *TPMT*3B* no se encontró en esta población.

Alelo	Número (n=186)	Porcentaje	Frecuencia
<i>TPMT*1</i>	171	91.93%	0.9193
<i>TPMT*2</i>	2	1.07%	0.0107
<i>TPMT*3A</i>	12	6.45%	0.0645
<i>TPMT*3C</i>	1	0.53%	0.0053

Cuadro 12. Frecuencia de variantes alélicas identificadas en 186 alelos estudiados.

Genotipo	Número (n=93)	Porcentaje	Frecuencia
<i>TPMT*1/*1</i>	78	83.87%	0.838
<i>TPMT*1/*2</i>	2	2.15%	0.021
<i>TPMT*1/*3A</i>	12	12.90%	0.129
<i>TPMT*1/*3C</i>	1	1.07%	0.010

Cuadro 13. Frecuencia de genotipos identificados en 93 pacientes estudiados.

ANTECEDENTE DE NEUTROPENIA DE ACUERDO AL GENOTIPO EN *TPMT*

Con relación a la presencia de neutropenia grado III/IV y su relación con el genotipo, se encontró que los pacientes clasificados como con riesgo habitual y que presentaron en estado heterocigoto una de las variantes hipomórficas tuvieron en promedio 4.4 eventos de neutropenia grado III/IV durante su tratamiento; en comparación los pacientes clasificados con riesgo habitual y con genotipo considerado normal, cursaron en promedio con 3.9 eventos durante su tratamiento, ver **Cuadro 14**.

	Pacientes homocigotos con genotipo normal (n=38)		Pacientes heterocigotos con una variante hipomórfica (n=10)	
	Neutropenia III	Neutropenia IV	Neutropenia III	Neutropenia IV
Total de Eventos	69 eventos	80 eventos	21 eventos	23 eventos
Promedio	1.8 eventos	2 eventos	2.1 eventos	2.3 eventos
Hosp. Total	16		3	
Hosp. Prom.	0.42		0.3	

Cuadro 14. Pacientes con LAL con riesgo habitual y eventos de neutropenia de acuerdo a su genotipo en el gen *TPMT*. Hosp Prom. = hospitalizaciones promedio.

Con respecto a los pacientes con LAL clasificados como con riesgo alto, se observó que aquellos que presentaron un genotipo normal cursaron en promedio con 2.7 eventos de neutropenia grado III/IV durante su tratamiento, mientras que los pacientes con genotipo heterocigoto para alguna de las variantes alélicas hipomórficas presentaron 2.8 eventos durante su tratamiento. **Ver Cuadro 15**.

	Pacientes homocigotos con genotipo normal (n=40)		Pacientes heterocigotos con una variante hipomórfica (n=5)	
	Neutropenia III	Neutropenia IV	Neutropenia III	Neutropenia IV
Total de Eventos	49 eventos	61 eventos	8 eventos	6 eventos
Promedio	1.2 eventos	1.5 eventos	1.6 eventos	1.2 eventos
Hosp. Total	18		3	
Hosp. Prom.	0.45		0.6	

Cuadro 15. Pacientes con LAL con riesgo alto y eventos de neutropenia de acuerdo a su genotipo en el gen *TPMT*. Hosp Prom. = hospitalizaciones promedio.

Se exploró si las prevalencias en los eventos de neutropenia grado III/IV tenían diferencias estadísticas en los pacientes con riesgo habitual de acuerdo al genotipo normal o heterocigoto con una variante hipomorfa mediante una razón de momios (RM); se encontró que los pacientes con genotipo heterocigoto para las variantes hipomorfas tuvieron 0.06 veces más eventos de neutropenia grado III/IV en comparación con el grupo de pacientes con genotipo normal, con un intervalo de confianza del 95%, **Cuadro 16**.

CUADRO 16. RAZON DE MOMIOS DE PRESENTAR EVENTOS DE NEUTROPENIA GRADO III/IV EN PACIENTES CON LAL DE RIESGO HABITUAL CON GENOTIPO NORMAL VS HETEROCIGOTOS PARA UNA VARIANTE HIPOMORFA

	EVENTOS DE NEUTROPENIA GRADO III	EVENTOS DE NEUTROPENIA GRADO IV
PACIENTES HETEROCIGOTOS PARA UNA VARIANTE HIPOMORFA (n=10)	21	23
PACIENTES CON GENOTIPO NORMAL (n=38)	69	80
RM 1.06 (0.51 a 2.19) IC 95%		

Del mismo modo, se exploró si las prevalencias en los eventos de neutropenia grado III/IV tenían diferencias estadísticas entre los pacientes de alto riesgo con genotipo normal vs heterocigotos para una variante hipomorfa mediante una RM; se encontró que los pacientes que presentaron las variantes hipomorfas tuvieron 0.66 veces más eventos de neutropenia grado III/IV en comparación con el grupo de pacientes con genotipo normal, con un intervalo de confianza del 95%, **Cuadro 17.**

CUADRO 17. RAZÓN DE MOMIOS DE PRESENTAR EVENTOS DE NEUTROPENIA GRADO III/IV EN PACIENTES CON LAL DE ALTO RIESGO Y GENOTIPO NORMAL VS HETEROCIGOTOS PARA UNA VARIANTE HIPOMORFA

	EVENTOS DE NEUTROPENIA GRADO III	EVENTOS DE NEUTROPENIA GRADO IV
PACIENTES HETEROCIGOTOS PARA UNA VARIANTE HIPOMORFA (n=5)	8	6
PACIENTES CON GENOTIPO NORMAL (n=40)	49	61
	RM 1.66 (0.48 a 5.85) IC 95%	

PORCENTAJE DE TRATAMIENTO COMPLETADO Y GENOTIPO DE *TPMT*

Con relación al porcentaje de tratamiento completado encontramos que dentro del grupo de alto riesgo (n=34) que completaron su tratamiento por arriba del 60% de acuerdo al protocolo establecido, el 94% (n=32) de ellos presentaban las variantes normales, mientras que los pacientes con variantes hipomorfas en este mismo rubro correspondieron al 6% (n=2). Por otro lado, de los pacientes clasificados como riesgo habitual que completaron su tratamiento por arriba del 60% (n=35), tenían un genotipo heterocigoto 26% (n=9), mientras que los pacientes con el genotipo normal fueron el 74% (n=26). **Figuras 11 y 12.**

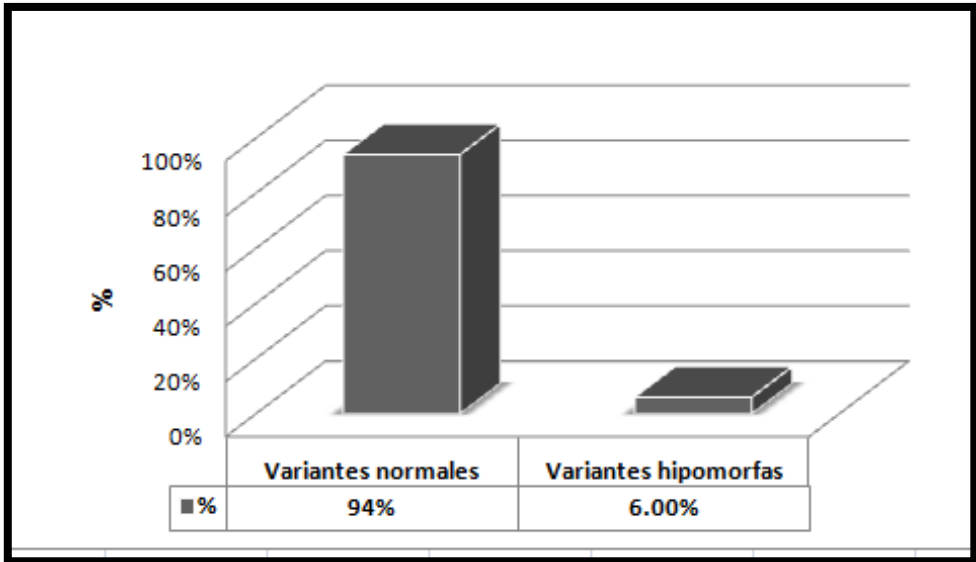


Figura 11. Porcentaje de pacientes que completaron su tratamiento por arriba del 60% en el grupo de alto riesgo de acuerdo al genotipo en *TPMT*.

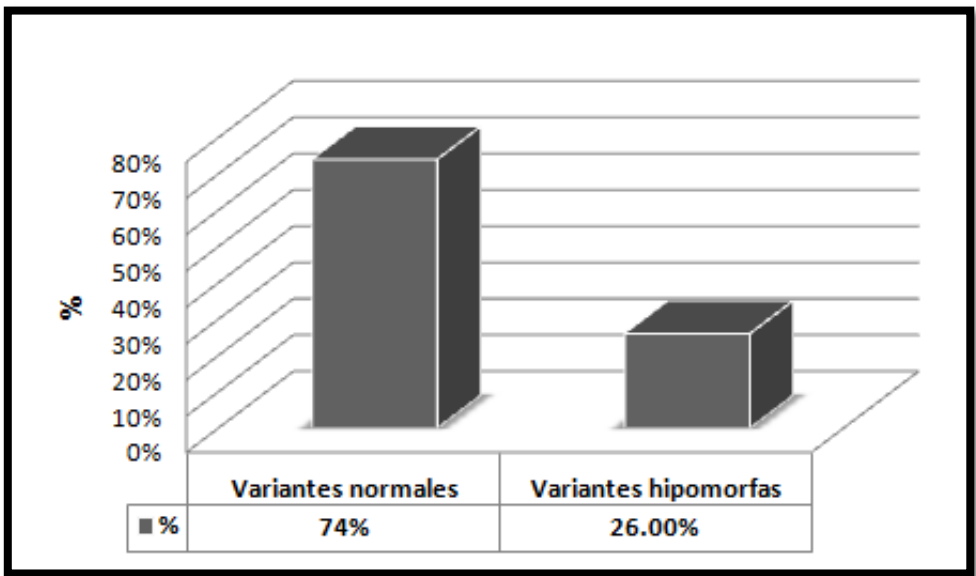


Figura 12. Porcentaje de de pacientes que completaron su tratamiento por arriba del 60% en el grupo de riesgo habitual de acuerdo al genotipo en *TPMT*.

También se analizó las probabilidades que tuvieron los pacientes de completar el tratamiento programado con relación a tener un genotipo normal ó heterocigoto para una de las variantes deficientes. En el **Cuadro 18** se observa que el ser un paciente con LAL de alto riesgo y tener un genotipo normal confiere 5 veces mayor probabilidad de completar como mínimo el 60% del tratamiento programado con un IC del 95%.

CUADRO 18. RAZÓN DE MOMIOS DE HABER RECIBIDO EL 60% O MÁS DEL TRATAMIENTO PROGRAMADO EN PACIENTES CON LAL DE ALTO RIESGO DE ACUERDO AL GENOTIPO EN *TPMT*.

	PACIENTES HETEROCIGOTOS PARA UNA VARIANTE DEFICIENTE	PACIENTES CON GENOTIPO NORMAL
PACIENTES CON PORCENTAJE DE TRATAMIENTO COMPLETADO <60%	3	8
PACIENTES CON PORCENTAJE DE TRATAMIENTO COMPLETADO >60%	2	32
RM 6 (0.65 a 64.49) IC 95%		

En el **Cuadro 19** se muestra que el ser un paciente con LAL de riesgo habitual y tener un genotipo normal confiere 3.15 veces más probabilidades de completar el tratamiento programado por arriba del 60%, con un IC del 95%.

CUADRO 19. RAZON DE MOMIOS DE HABER RECIBIDO DEL 60% O MÁS DEL TRATAMIENTO PROGRAMADO EN PACIENTES CON RIESGO HABITUAL Y GENOTIPO NORMAL VS HETEROCIGOTOS PARA UNA VARIANTE DEFICIENTE EN *TPMT*.

	PACIENTES CON GENOTIPO NORMAL	PACIENTES HETEROCIGOTOS HIPOMORFOS
PACIENTES CON PORCENTAJE DE TRATAMIENTO COMPLETADO <60%	12	1
PACIENTES CON PORCENTAJE DE TRATAMIENTO COMPLETADO >60%	26	9
RM 4.15 (0.44 a 97.55) IC 95%		

XII. DISCUSIÓN

Desde 1960, la investigación sobre el metabolismo de las tiopurinas ha llevado al estudio del complejo proceso enzimático involucrado en su metabolismo. Un gran avance en este campo ha sido la determinación de los polimorfismos genéticos en el gen de *TPMT*. La genotipificación de las variantes de *TPMT* antes del inicio del tratamiento con 6-MP se ha propuesto en algunos centros como una manera sencilla de individualizar el tratamiento con este fármaco para disminuir la incidencia de efectos adversos y aumentar la eficacia del tratamiento (Huang 2009). Este es el primer estudio de genotipificación de *TPMT* en pacientes pediátricos con LAL en México.

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Con relación a las características demográficas de nuestra población encontramos que se trató de una población heterogénea, proveniente de diversos estados de la República Mexicana, la cual fue captada cuando los pacientes asistieron a la Consulta Externa de Hematología. La relación hombre:mujer fue de 1.5:1 en los pacientes con LAL de riesgo habitual y 1.1:1 en los pacientes con LAL de alto riesgo, lo cual coincide con lo reportado en la literatura mundial, en donde la prevalencia de esta enfermedad es mayor en el sexo masculino (Rivera Luna 2006). La edad promedio de nuestra población fue de 11.9 años en el grupo de riesgo habitual y de 14.1 años en el grupo de alto riesgo, todos los pacientes incluidos fueron menores de 18 años de edad y habían completado su protocolo de tratamiento establecido por 30 meses.

FRECUENCIA DE EVENTOS DE NEUTROPENIA

Con relación a los eventos de neutropenia que presentó nuestra población, llama la atención que un 98% de los pacientes clasificados como LAL de riesgo habitual y un 84% de los pacientes clasificados como LAL de alto riesgo experimentaron eventos de neutropenia grado III/IV durante la etapa de mantenimiento y esto llevó a la suspensión de su tratamiento en estos períodos. Noventa y tres por ciento de los pacientes con genotipo heterocigoto experimentaron eventos de neutropenia grado III/IV (14/15), lo cual fue similar a lo observado en el grupo de pacientes con genotipo normal en donde los eventos de neutropenia grado III/IV se presentaron en el 92% de los casos (75/81).

Encontramos que un 83% y 71% de los pacientes clasificados como riesgo habitual y alto riesgo respectivamente, presentaron eventos de neutropenia grado IV (cifras menores 500 neutrófilos/mm³). Asimismo, 18.2% del total de nuestra población presentaron 4 o más eventos de neutropenia grado IV. Con relación a lo anterior, podemos mencionar que en pocos estudios se refiere la frecuencia de eventos de neutropenia, pero al compararnos con un estudio que registró estos eventos en los pacientes con LAL durante la terapia de mantenimiento (UKALL V), se encontró que de 105 pacientes pediátricos evaluados, 45% presentaron por lo menos 1 evento de neutropenia grado IV (Dolan y cols 1989), lo que muestra que en nuestra población el porcentaje de pacientes que experimentaron neutropenia grado IV fue considerablemente mayor. Cabe mencionar que el esquema utilizado durante la terapia de mantenimiento en el protocolo UKALL V fue el mismo que se emplea en el Servicio de Hematología en el INP, con 6-MP diaria y metotrexate semanal por lo que las diferencias observadas con nuestra población con relación a la frecuencia de eventos de neutropenia no se explicarían por diferencias en el manejo de los pacientes.

LAL Y POLIMORFISMOS EN *TPMT*

En este estudio analizamos las 4 variantes hipomorfas más frecuentes descritas en otras poblaciones en el gen *TPMT*, las cuales determinan alrededor del 95% de los pacientes con actividad enzimática intermedia ó disminuida (McLeod y cols 2000 y 2003, Evans 2001). En nuestro estudio la presencia de estos polimorfismos se encontró en el 8.05% de la población, pero ningún caso fue en estado homocigoto, sino sólo heterocigoto.

La frecuencia de presentación de las variantes responde a variabilidades interétnicas. Con relación a lo observado en población general, en el suroeste asiático, el genotipo heterocigoto fue detectado únicamente en el 2% de la población (las variantes más frecuentes fueron *TPMT*3C* y *TPMT*3a*), en los chinos el genotipo heterocigoto se encontró en el 4.7% de la población (*TPMT*3C* fue la variante más frecuente), mientras que en la población general caucásica, el genotipo heterocigoto se encontró en 10% de la población (las variantes que se presentaron fueron *TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3C*), lo que sugiere que *TPMT*3C* es la mutación más antigua y *TPMT*2* la más reciente (Lennard 2003, McLeod y cols 2001). Con relación a Latinoamérica, en las poblaciones de Argentina, Colombia y Bolivia predomina el alelo *TPMT*3A*, mientras que en Brasil, el alelo *TPMT*3C* es más común (Álvarez y cols 2009).

Con relación a la población general de origen mexicano, en los dos estudios previos realizados por Taja-Chayeb y González del Ángel, se reportó un porcentaje de presentación de éstas variantes del 7.8% y del 6.81% respectivamente. En nuestro estudio la frecuencia de los polimorfismos es similar a ambos (González del Ángel y cols. 2009, Taja-Chayeb 2008), con un porcentaje de presentación del 8.05%. En la población leucémica estudiada por Taja-Chayeb, el porcentaje de presentación fue levemente mayor (12.8%).

En nuestro estudio, las frecuencias de polimorfismos coincidió con lo reportado en población mexicana y caucásica, en donde la variante hipomorfa más frecuente fue *TPMT *3A* (González del Ángel y cols. 2009, Taja-Chayeb 2008, Black y cols. 1998, Coulthard y cols. 1998, Collie y cols. 1999).

Con relación a población mexicana y la variante *TPMT*3B*, encontramos que en el estudio realizado por González del Ángel y cols. se reportó con un porcentaje de presentación alélica del 0.28% (2 individuos heterocigotos) en los 360 recién nacidos analizados. En el estudio realizado por Taja-Chayeb en la población voluntaria sana que comprendió 108 sujetos, se encontró la variante en 2.3%, mientras que en la población leucémica que comprendió 39 sujetos, no se identificó. Por lo anterior, consideramos que esta variante se encuentra en población de origen mexicano pero el no haberla observado en este trabajo puede deberse al tamaño de la muestra de pacientes estudiados (n=93) por lo que se requieren continuar este análisis con un mayor número de casos para conocer la frecuencia real de esta variante en población pediátrica mexicana con LAL.

FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS EN POBLACION MEXICANA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA (INP)

En los **Cuadros 20 y 21**, realizamos un análisis de las frecuencias presentadas entre nuestra población y las reportadas por González del Ángel en el INP (González del Ángel y cols 2009). En ambas poblaciones analizadas las variantes alélicas más frecuentes fueron: *TPMT *1* Y *TPMT *3A*. Como se mostró previamente, en nuestro estudio no se presentó la variante *TPMT *3B* mientras que en el estudio de González del Angel y cols., se identificó en 2 pacientes, con una frecuencia alélica de 0.0028.

Cuadro 20. Comparación de las frecuencias alélicas en recién nacidos sanos de origen mexicano y pacientes con LAL analizados en este estudio

González del Angel y cols.				Presente Estudio		
ALELOS	n	Frecuencia	%	N	Frecuencia	%
<i>TPMT *1</i>	671	0.9319	93.19%	171	0.9193	91.93%
<i>TPMT *2</i>	2	0.0028	0.28%	2	0.0107	1.07%
<i>TPMT *3A</i>	41	0.0569	5.69%	12	0.0645	6.45%
<i>TPMT *3C</i>	4	0.0056	0.56%	1	0.0053	0.53%
Tendencia lineal por χ^2 0.187 p= 0.665						

Cuadro 21. Comparación de las frecuencias genotípicas en recién nacidos sanos de origen mexicano y pacientes con LAL analizados en este estudio

González del Angel y cols.				Presente estudio		
GENOTIPO	n	Frecuencia	%	n	Frecuencia	%
<i>TPMT *1/*1</i>	313	0.8694	86.94%	78	0.8387	83.87%
<i>TPMT *1/*2</i>	2	0.0056	0.56%	2	0.0215	2.15%
<i>TPMT *1/*3A</i>	38	0.1056	10.56%	12	0.1290	12.90%
<i>TPMT *1/*3C</i>	3	0.0083	0.83%	1	0.0107	1.07%
Tendencia lineal por χ^2 0.667 p= 0.414						

Realizamos un análisis comparando las frecuencias presentadas entre nuestra población (sólo de los alelos y genotipos encontrados en la población de nuestro trabajo) y las reportadas por González del Ángel en el INP (González del Ángel y cols 2009). Se exploró la posibilidad de encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ambas, sin hallarlas ya que se presentó una tendencia lineal por χ^2 en las variantes alélicas de 0.187 ($p= 0.665$) y en los genotipos de 0.667 ($p=0.667$). Esta falta de diferencia nos indica que los grupos son homogéneos y que las poblaciones fueron escogidas al azar y no selectivamente, dado que en ambas vimos que las variantes más frecuentes fueron *TPMT *1* Y *TPMT *3A*.

LAL Y VARIANTE ALÉLICA NORMAL *TPMT*1*

El alelo más frecuente en todas las poblaciones estudiadas es *TPMT*1* (Ameyaw y cols 1999, de la Moureyre y cols 1998, Hon y cols 1999, Kumagai y cols 2001, Schaeffeler y cols 2004). La variante normal *TPMT*1* también fue la más frecuente en nuestro estudio, reportándose en un 91.9% de nuestra población, lo cual es coincidente con las cifras en población general caucásica, con un porcentaje de presentación que varía de un 85.9% a un 92.5% (Black y cols. 1998, Coulthard y cols. 1998, Collie y cols. 1999, McLeod y cols. 1999).

En los 2 estudios previos realizados en población general mexicana por González del Ángel y por Taja-Chayeb en población leucémica y sana, este alelo fue el más frecuente, con un porcentaje de presentación del 93% y 91% respectivamente (**Ver Cuadro 4 y 20**). En población leucémica, el estudio de Taja-Chayeb, reportó un porcentaje de presentación del 87.2%.

LAL Y VARIANTE ALÉLICA *TPMT *2 G238C (Ala-Pro)*

La primera variante alélica hipomorfica identificada contiene una transversión en la posición 238 G->C, que permite la sustitución del anillo rígido de prolina por un residuo más flexible de alanina (Ala80Pro), como consecuencia, cambia la estructura terciaria de la proteína, por lo que favorece su inestabilidad y disminución de la actividad catalítica (McLeod 2000).

Se ha mencionado que el alelo *TPMT *2* es específico de población caucásica ó de grupos étnicos con mezclas caucásicas; ya que en poblaciones africanas este alelo no se ha encontrado, lo cual puede significar que esta variante ha sido adquirida evolutivamente de manera reciente (McLeod 1999). El genotipo *TPMT*2* se ha identificado en población general caucásica con un porcentaje de presentación de un 0.2 a un 0.5% (McLeod 2003). En nuestro estudio el resultado fue discretamente superior, con un porcentaje de presentación de 1.07%. En los **Cuadros 4 y 20** podemos ver la comparación con los 2 estudios previos realizados en población mexicana (0.28% y 0.9%) (González del Ángel y cols. 2009, Taja-Chayeb 2008); en nuestro estudio, la cifra de presentación fue discretamente superior.

LAL Y VARIANTE ALÉLICA *TPMT3A G460A y A719G (Ala-Thr y Tyr-Cys)**

*TPMT**3A contiene dos mutaciones en la posición 460G>A y en 719A>G lo que genera las sustituciones de 2 aminoácidos (Ala154Thr y Tyr240Cys) Se ha descrito que estos cambios condicionan una proteína altamente inestable y se asocian igualmente a disminución en la actividad de *TPMT* (Szumlanski y cols; Tai y cols 1996).

La variante más común encontrada en nuestro estudio fue *TPMT**3A, con un porcentaje de presentación de 6.45%, cifra coincidente con la literatura, la cual menciona una frecuencia en población general caucásica entre 3.2% a 5.7% (Krynetski y cols 2003; McLeod y cols 2000).

En población mexicana la variante hipomorfa más frecuente también ha sido *TPMT**3A; en los estudios de Taja Chayeb en población sana y con LAL, el porcentaje de presentación fue de 3.24% y 7.6% respectivamente; en el estudio de González del Ángel, el porcentaje de presentación fue de 5.69%, lo cual no muestra una diferencia significativa como ya se ha mencionado con lo observado en nuestro trabajo (Ver **Cuadros 4 y 5A**).

LAL Y VARIANTE ALÉLICA *TPMT3C A719G (Tyr-Cys)**

La variante *TPMT**3C es consecuencia de una sustitución nucleotídica en el marco de lectura abierto 719 A>G, con la consecuente disminución en actividad enzimática de *TPMT* (Krynetski 2003). *TPMT**3C a pesar de ser el segundo alelo más frecuente en población caucásica el porcentaje de presentación es más bajo (0.2% al 0.8%) que el del *TPMT**3A (McLeod y cols 2003).

En nuestro estudio este alelo fue el tercero en presentación más frecuente, con un porcentaje del 0.53%. En contraparte, en los 2 estudios previos en población general mexicana, *TPMT**3C fue el segundo en presentación más frecuente, González del Ángel reportó un porcentaje de presentación del 0.56%, mientras que Taja-Chayeb en población sana lo reportó en 1.4%. Taja-Chayeb al incluir población leucémica, encontró a *TPMT**3C como el tercero en presentación en este grupo de población (2.5%). (Ver **Cuadro 4 y 20**).

En población general africana, el alelo no funcional más frecuente es *TPMT**3C (7.6-14.8%) al igual que en afroamericanos (24.2%), y con menor frecuencia se observan *TPMT**3A (0.8%) y *TPMT**2 (0.4%), lo que refleja la presencia de genes caucásicos en estas poblaciones (Ameyaw y cols 1999, Evans y cols 2001, Haglund y cols 2004). Por otro lado en población general china y japonesa, el alelo hipomorfo más frecuente también es *TPMT**3C, con cifras de presentación del

2.3% y 1.6% respectivamente. Es bien conocido que la población Mexicana es étnicamente heterogénea por lo que no es sorprendente haber observado esta variante en nuestra población pero con una frecuencia similar a la descrita en poblaciones caucásicas.

LAL Y GENOTIPO HOMOCIGOTO NORMAL (*TPMT* *1/*TPMT* *1)

La mayoría de los individuos poseen un genotipo homocigoto normal para *TPMT*. En los estudios reportados en distintas poblaciones étnicas, el porcentaje de presentación va desde un 85.9% hasta un 98% (McLeod y cols 2000). En nuestro estudio el porcentaje de presentación de homocigotos normales fue del 83% acorde a lo descrito también en población mexicana.

LAL Y GENOTIPOS HETEROCIGOTOS

(*TPMT* *1/*TPMT* *2, *TPMT* *1/*TPMT* *3A, *TPMT* *1/*TPMT* *3B y *TPMT* *1/*TPMT* *3C)

Las variantes alélicas en *TPMT* pueden observarse en estado heterocigoto hasta en el 14.4% de la población general (McLeod y cols 1999, Schaeffeler y cols 2004, Brouwer 2005). En este trabajo al estudiar las 4 variantes deficientes más frecuentes en el gen *TPMT* (*2, *3A, *3B y *3C) se observó que sólo se encontraron en estado heterocigoto las variantes *2, *3A y *3C con un porcentaje de presentación de 16.12% (15/93 pacientes). Los individuos con este genotipo poseen un único alelo de *TPMT* funcional y en la literatura se ha descrito que el riesgo de toxicidad hematológica por tiopurinas es mayor que en los pacientes homocigotos normales (alrededor de 35% vs 7% respectivamente) (Krynetski y cols 2003).

El genotipo *TPMT* *1/*3A es el más común y se ha observado hasta en el 10% de la población caucásica (Krynetski 2001); en nuestro estudio el porcentaje de presentación de este genotipo fue del 12.9%, los genotipos *TPMT* *1/*2 y el *TPMT* *1/*3C se presentaron en 3/15 pacientes (3.22%).

En nuestros resultados ningún paciente presentó las variantes hipomorfas en su forma homocigota ó heterocigota compuesta, hallazgo que hubiera sido interesante, ya que se ha reportado que es precisamente esta población la que presenta mayor toxicidad hematológica al someterse a las tiopurinas, ya que presentan ambos alelos no funcionales para el gen de *TPMT*. Estos genotipos si se han observado en población mexicana previamente aunque con una frecuencia baja: en el estudio realizado por González del Ángel, la frecuencia de pacientes homocigotos hipomorfos ó heterocigotos compuestos fue de 0.28% respectivamente (González del Ángel y cols 2009), mientras que en el estudio realizado por Taja-Chayeb en 2008, no se encontraron pacientes hipomorfos. Por

lo que suponemos que el no haber observado genotipos hipomorfos en estado homocigoto o heterocigoto compuesto en el presente trabajo puede deberse al tamaño de muestra de pacientes analizados, por lo que consideramos importante continuar el análisis con un número mayor de pacientes para conocer la frecuencia real de estos genotipos y determinar su asociación con presencia de toxicidad al tratamiento en pacientes con LAL:

Las técnicas de PCR y restricción, pirosecuenciación, HPLC desnaturalizante y microarreglos para determinar el genotipo *TPMT* *3 son incapaces de discriminar entre los genotipos *TPMT**1/*3A y *TPMT**3B/*3C (González del Ángel y cols 2009); por lo cual es probable que algunos de los individuos clasificados con genotipo *TPMT* *1/*3A puedan ser heterocigotos compuestos *TPMT**3B/*3C. Sin embargo, en nuestro estudio no se presentó la variante *TPMT* *3B y la frecuencia de la variante *TPMT* *3C fue muy baja (0.53%), por lo que esta posibilidad es muy baja en nuestro estudio.

POLIMORFISMOS DE *TPMT* Y EVENTOS DE NEUTROPENIA GRADO III/IV

La concordancia entre actividad enzimática de *TPMT* y genotipo nos brinda la oportunidad de detectar a aquellos pacientes en riesgo de presentar toxicidad hematológica a través de la genotipificación (Evans y cols 2001). Numerosos estudios clínicos han demostrado que los pacientes deficientes en la enzima *TPMT* (por genotipos hipomorfos homocigotos, heterocigotos ó heterocigotos compuestos) se encuentran en riesgo de presentar mayores eventos de hematotoxicidad debido al acúmulo de metabolitos tóxicos después del tratamiento con dosis convencionales de tiopurinas (Colombel y cols 2000; Lennard y cols 1989; Evans y cols 2001).

En un estudio realizado en 2009, se analizó la toxicidad hematológica reflejada en cuenta leucocitaria y número de neutrófilos totales en una población que incluyó 167 pacientes pediátricos con el diagnóstico de LAL. Se encontró que los pacientes con las variantes *TPMT**2, *3A y *3C (todos en estado heterocigoto) presentaron eventos de neutropenia más frecuentes y cifras significativamente menores en cuenta de leucocitos y neutrófilos totales ($p=0.0025$ y 0.019 respectivamente) durante su tratamiento (Niedzielska 2009). En este estudio no se dividió a los pacientes de acuerdo a la clasificación de riesgo. Los resultados de este estudio apoyan lo encontrado en este reporte preliminar, en donde el número de eventos de neutropenia fue mayor para los pacientes con genotipo heterocigoto que para los pacientes con genotipo normal.

En nuestro estudio exploramos si las prevalencias en los eventos de neutropenia grado III/IV tenían diferencias estadísticas tanto en los pacientes clasificados como alto riesgo y riesgo habitual de acuerdo al genotipo normal o heterocigoto mediante una razón de momios (RM) (**Cuadros 16 y 17**). Encontramos que en nuestra población sí existe relación entre el antecedente de neutropenia grado III/IV y la presencia de las variantes alélicas deficientes del gen, aún cuando el número de casos con variantes hipomorfas es bajo (n=15) y el tamaño de la muestra analizada es preliminar. El estudio reportado por Evans y cols en 2001 apoya nuestros resultados; este trabajo incluyó 23 pacientes pediátricos que presentaban toxicidad al tratamiento con 6-MP y también se encontró una relación con su genotipo. Se encontraron seis pacientes con el genotipo homocigoto hipomorfo, 9 pacientes el genotipo heterocigoto y 8 pacientes con el genotipo normal; al realizar modificaciones al tratamiento de acuerdo al genotipo encontrado, se logro una reducción de la toxicidad hematopoyética en todos los pacientes heterocigotos y homocigotos hipomorfos, lo cual apoya el hecho de que el estudio de genotipificación puede beneficiar especialmente a esta población.

PORCENTAJE DE TRATAMIENTO COMPLETADO Y GENOTIPO *TPMT*

Con relación al porcentaje de tratamiento completado encontramos que dentro del grupo de alto riesgo, un 94% (n=32) de los pacientes con variantes normales su tratamiento por arriba del 60% de acuerdo al protocolo establecido, mientras que los pacientes con variantes hipomorfas en este mismo rubro correspondieron a un 6% (n=2). Por otro lado, los pacientes clasificados como riesgo habitual con genotipo heterocigoto y que completaron su tratamiento por arriba del 60%, fueron el 26% (n=9), mientras que los pacientes con el genotipo normal y que completaron su tratamiento por arriba del 60% fueron un 74% (n=26) En ambos grupos los resultados están acordes a lo descrito en la literatura, aún cuando el número de pacientes con variantes hipomorfas es bajo (n=15). En el estudio de Black y cols. se encontró que de 67 pacientes tratados con azatioprina para artritis reumatoide, 6 pacientes eran heterocigotos para una variante deficiente y la terapia se suspendió en 5 de estos pacientes (83.3% de los casos con variante deficiente) al mes de haberla iniciado; mientras que en los pacientes con genotipo normal (61 pacientes), en 12 de ellos (19.6% de los casos con variantes normales) se suspendió la terapia a las 6 semanas de iniciado el tratamiento. Los pacientes con el genotipo normal, recibieron el tratamiento con una media de 39 semanas sin complicaciones, comparado con los pacientes heterocigotos quienes toleraron con una media de 2 semanas (Black y cols 1998).

En un estudio reportado por Relling y cols en 1999 que incluyó población pediátrica, se encontró que los pacientes homocigotos normales (161 pacientes) toleraron dosis convencionales del fármaco durante un 84% del tratamiento programado, mientras que los pacientes heterocigotos con variantes hipomorfas (17 pacientes) toleraron una dosis completa durante el 65% del tratamiento programado y los pacientes homocigotos hipomorfos (2 pacientes) únicamente durante el 7% (Relling y cols 1999). En un estudio más reciente que incluyó 66 pacientes pediátricos, se encontró a 5 pacientes con el genotipo heterocigoto, 3 pacientes de este grupo (60%) tuvieron que recibir reajustes a las dosis convencionales de 6-MP (aproximadamente reducción de más del 10% de la dosis convencional ($p=0.07$)) (Salamun 2009).

Con relación a nuestro estudio, en los **Cuadros 18 y 19** analizamos mediante razón de momios la relación entre cumplimiento de tratamiento programado y variantes hipomorfas en los pacientes clasificados como riesgo habitual y alto riesgo, encontrando que también existe una relación entre los pacientes con genotipo heterocigoto ó normal y el porcentaje de tratamiento completado ya que los pacientes dentro del grupo de riesgo habitual con genotipo normal tenían 3.15 veces más probabilidades de completar su tratamiento que los pacientes con genotipo heterocigoto con una variante hipomorfa. Asimismo, dentro del grupo de alto riesgo, los pacientes con la variante normal presentaron 5 veces mayor probabilidad de completar como mínimo el 60% de su tratamiento programado.

LAL, RECAÍDA Y EVENTOS DE NEUTROPENIA GRADO III/IV

En nuestro estudio, de los 5 pacientes que experimentaron recaída durante su tratamiento, todos presentaron eventos de neutropenia grado III/IV e inclusive 2 de ellos tuvieron 4 eventos ó más de neutropenia grado IV, uno de estos pacientes correspondió al grupo de LAL de riesgo habitual con un alelo hipomorfo en *TPMT*, el resto perteneció al grupo de genotipo normal. Lo anterior refleja que el genotipo puede favorecer eventos de recaída; sin embargo, deben existir otros factores genéticos y ambientales que los condicionan que involucran al huésped, a la enfermedad y al tratamiento per se. Sin embargo, de los factores mejor estudiados y relacionados a respuesta a tratamiento es la presencia de variantes hipomórficas en *TPMT* por lo que consideramos que la genotipificación de estas variantes beneficiará a nuestra población, especialmente a aquellos que sean homocigotos hipomorfos (Evans y cols 2001, Krynetski y cols 2003).

XIII. CONCLUSIONES

Presentamos el primer estudio de genotipificación de *TPMT* en población leucémica infantil en México. Dentro de la población estudiada, la variante normal *TPMT*1* fue la más frecuente. La variante hipomorfa más común fue *TPMT*3A* (6.45%). Ambos resultados coinciden con los 2 estudios en población mexicana reportados previamente (González del Ángel y cols 2009, Taja-Chayeb y cols 2008).

A pesar de su composición étnica única, las frecuencias de polimorfismos en la población mexicana estudiada son similares a lo reportado en población caucásica.

En este estudio no encontramos pacientes homocigotos hipomorfos ó heterocigotos compuestos, lo cual puede deberse al tamaño de la muestra analizada, sin embargo, es probable que los identifiquemos al ampliar el tamaño de muestra.

En el presente trabajo encontramos que los pacientes con el genotipo heterocigoto con una variante hipomórfica presentaron 0.06 y 0.66 veces más eventos de neutropenia grado III/IV en los grupos de riesgo habitual y alto riesgo respectivamente durante la terapia de mantenimiento comparado con los pacientes con genotipo homocigoto normal, lo que sugiere que el genotipo influye con la presencia de neutropenia en la población estudiada.

Se encontró que en los grupos de pacientes con LAL de alto riesgo y riesgo habitual, el número de pacientes que completó su tratamiento por arriba del 60% de acuerdo al protocolo establecido, fue mayor en aquellos que presentaron el genotipo normal, lo anterior es coincidente con lo reportado en la literatura en donde los pacientes con genotipo normal tienen mayores probabilidades de completar su tratamiento debido a la menor presencia de eventos adversos que llevan a la suspensión del tratamiento.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez L., Venegas M., Larrondo L., y cols. Rev. méd. Chile 2009; 137: 185-192
2. Alves S., Amorim A., Ferreira F., Prata JM. Influence of the variable of tandem repeats located in the promoter region of the thiopurine methyltransferase gene on enzymatic activity. Clin Pharmacol Ther 2001; 70: 165-174
3. Ameyaw M-M, ESR Collie-Duguid, RH Powrie, D Ofori-Adjei, HL McLeod. Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanaian populations. Hum Mol Genet 1999, 8: 367-70
4. Andersen JB., Szumlanski C., Weinshilboum RM., Schmiegelow K. Pharmacokinetics, dose-adjustments and 6-mercaptopurine/methotrexate drug interactions in two patients with thiopurine methyltransferase deficiency. Acta Paediatric 1998; 87: 108-111
5. Ando M., Hasegawa Y., Sekito Y., Shimokata K., Horibe K. Genetic polymorphisms of thiopurine S-methyltransferase and 6-mercaptopurine toxicity in Japanese children with acute lymphoblastic leukaemia. Pharmacogenetics 2001; 11: 269-273
6. Anonymous. Treatment of acute lymphoblastic leukaemia. Comparison of immunotherapy (BCG), intermittent methotrexate, and no therapy after a five-month intensive cytotoxic regimen (Concord Trial). Preliminary report to the Medical Research Council by the Leukaemia Committee and the Working Party on Leukaemia in Childhood. BMJ 1971; 4: 189-194
7. Black AJ., McLeod HL., Capell HA., Powrie RH., Matowe LK et al. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. Ann Intern Med 1998; 129: 716-718
8. Brenner MK, Pinkel D. The cure of leukemia. Semin Hematol 1999; 37: 73-83
9. Brouwer C., De Abreu RA., Keizer-Garritse JJ., Lambooy LH., Ament K et al. Thiopurine methyltransferase in acute lymphoblastic leukemia: biochemical and molecular biologic aspects. Eur J Cancer 2005; 41: 613-623
10. Chabner B., Allegra C., Curt G., Calabresi P. Fármacos antineoplásicos en: Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw Hill, 1996; 1330-1335
11. Chessells JM., Durrant J., Hardy RM., Richards S. Medical Research Council leukaemia trial-UKALL V: an attempt to reduce the

- immunosuppressive effects of therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Report to the Council by the Working Party on Leukaemia Childhood. *J Clin Oncol* 1986; 4: 1758-1746
12. Chessells JM., Harrison G., Lilleyman JS., Bailey CC., Richards SM. Continuing (maintenance) therapy in lymphoblastic leukaemia: lessons from MRC UKALL X. Medical Research Council Working Party in Childhood Leukaemia. *Br J Haemato* 1997; 98: 945-951
 13. Clunie GP., Lennard L. Relevance of thiopurine methyltransferase status in rheumatology patients receiving azathioprine. *Rheumatology* 2004; 43:13-18
 14. Collie-Duguid ESR., Prichard SC., Powrie RH., Sludden J., Collier DA., Li T et al. The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics* 1999; 37-42
 15. Colombel JF., Debuysere H., Marteau P et al. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology* 2000; 118: 1025-1030
 16. Compagni A., Buehrlen B., Fattore G., Ibarreta D., Gutiérrez de Messa E. Avoiding adverse drug reactions by pharmacogenetic testing: A systematic review of the economic evidence in the case of TPMT and AZA-induced side effects 2008; 24: 294-302
 17. Conter V. y cols. Leucemia Linfoblástica Aguda Infantil. En: Sierrasesúmaga L. Antillón F. *Tratado de Oncología Pediátrica*. Prentice Hall, 2006: 266-269
 18. Corominas H., Doménech M., Laíz A., Gich I., Geli C et al. Is thiopurine methyltransferase genetic polymorphism a major factor for withdrawal of azathioprine in reumatoid arthritis patients *Rheumatology* 2003; 2: 40-45
 19. Coulthard SA., Howell C., Robson J., Hall AG. The relationship between thiopurine methyltransferase activity and genotype in blasts form patients with acute leukemia. *Blood* 1998; 92: 2856-2862
 20. Coulthard SA., Rabello C., Robson J., Howell C., Minto L et al. A comparison of molecular and enzyme-based assays for the detection of thiopurine methyltransferase mutations. *Br J Haematol* 2000; 110: 599-604
 21. Coulthard SA. Matheson EC., Hall AG and Hogarth LA. The clinical impact of Thiopurine methyltransferase polymorphisms on thiopurine treatment. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 2004; 23: 1385-1991
 22. Dervieux T., Blanco J., Krynetsky EY., Vanin E., Roussel et al. Differing contribution of thiopurine methyltransferase to mercaptopurine versus thioguanine effects in human leukemic cells. *Cancer Res* 2001; 61: 5810-5816

23. Dibenedetto SP., Guardabasso V., Ragusa R y cols. 6-Mercaptopurine cumulative dose: a critical factor of maintenance therapy in average risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 1994; 11: 251-258
24. Dolan G., Lilleyman JS and Richards SM. Prognostic importance of myelosuppression during maintenance treatment of lymphoblastic leukaemia. *Arch Dis Child* 1989; 64: 1231-1234
25. Duff M., Crown H. A personalized Approach to Cancer Treatment: How Biomarkers Can Help 2008; 54: 1770-1779
26. Elion G, Burgi E. Hitchings G. Studies on condensed pyrimidine systems. IX. The synthesis of some 6 substituted purines. *J Am Chem Soc* 1952; 74: 411
27. Evans WE., Hon YY., Bomgaars L., Coure S., Holdsworth M et al. Preponderance of thiopurine S methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *J Clin Oncology* 2001; 8: 2293-2300
28. Evans WE., Michelle MG., Chu YQ., Kalwinsky D., Roberts M. Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphocytic leukemia. *J Pediatr* 1991; 985-989
29. Fajardo-Gutiérrez A. Mendoza H., Valdez E., Mejía M., Yamamoto L., Mejía AM et al. Frecuencia de neoplasias malignas en niños atendidos en hospitales del Distrito Federal. Estudio multicéntrico. *Vol Med Hosp Infant Mex* 1996; 53: 57-66
30. Fakhoury M., Gallien J., Medard Y. Should TPMT genotype and activity be used to monitor 6-mercaptopurine treatment in children with acute lymphoblastic leukaemia?. *J Clin Pharm Ther* 2007; 32: 633-639
31. Gale RP., Butturini A. Maintenance chemotherapy and cure of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 1991; 338; 1315-1318
32. González del Ángel A., Bermúdez López C., Alcántara Ortigoza M. et al. Thiopurine S-methyltransferase (TMPT) genetic polymorphisms in mexican newborns. *J Clin Pharm Ther* 2009; 34: 703-708
33. Goodman L.S.; Qintrobe, M., y Danieshek, W., et al. Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis-(beta-chloroethyl) amino hydrochloride for Hodgkin's disease, lympho-sarcoma leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *JAMA* 1946; 132: 126-132
34. Haglund S., Lindqvist M., Almer S., Peterson C., Taipalensuu J. Pyrosequencing of TPMT alleles in a general Swedish population and in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Chem* 2004; 50: 288-295

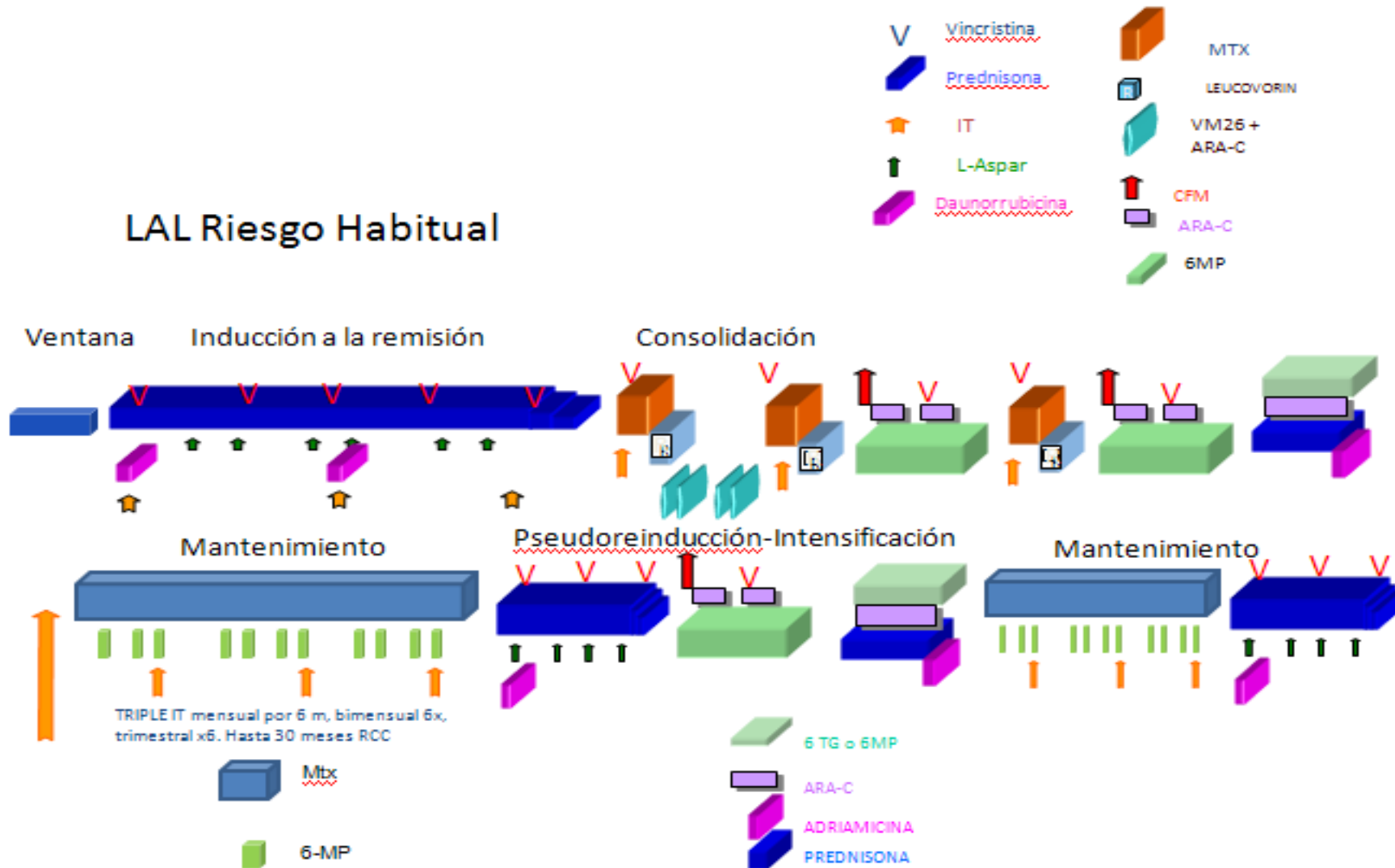
35. Hon YY, MY Fessing, C-H Pui, MV Relling, EY Krinetsky, WE Evans. Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 371-6
36. Huang R. Ratain M. *Pharmacogenetics and Pharmacogenomics of Anticancer Agents* 2009; 59: 42-54
37. Karas-Kuzelicki. Mlinaric-Rascan. Individualization of thiopurine therapy. Thiopurine s-methyltransferase and beyond. *Pharmacogenomics* 2009; 10: 1309-1322
38. Krivit W. Brubaker., Thatcher LG. et al. Maintenance therapy in acute leukemia of childhood. Comparison of cyclic vs. sequential methods. *Cancer*. 1968; 21: 32-356
39. Krinetski EY., Schuetz JD., Galpin AJ., Pui CH., Relling MV., Evans WE. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 949-953
40. Krinetski EY., Evans WE. Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy: the thiopurine S-methyltransferase paradigm. *Pharmaceut Res* 1999; 16: 342-349
41. Krinetski E and Evans W. Drug methylation in cancer therapy: lesson from the TPMT polymorphism. *Oncogene* 2003; 22: 7403-7413
42. Kumagai K., Hiyama K., Ishioka S et al. Allelotype frequency of the thiopurine methyltransferase (TPMT) gene in Japanese. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 275-278
43. Lemeshow, S, Hosmer, DW, Klar, J and Lwanga, SK. *Adequacy of sample size in health studies*. The World Health Organization and John Wiley and Sons, New York, NY. 1990.
44. Lennard L., Van Loon JA., Lilleyman JS., Weinshilboum RM. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin Pharmacol Ther* 1987; 41: 18-25
45. Lennard L., Van Loon JA., Weinshilboum RM. Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 1989; 46: 149-154
46. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon JA, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1990;336:225–229.
47. Lennard L, Lewis IJ, Michelangnoli M, Lilleyman JS. Thiopurine methyltransferase deficiency in childhood lymphoblastic leukaemia: 6-mercaptopurine dosage strategies. *Med Pediatr Oncol* 1997;29:252–255.
48. Lennard L, Welch J, Lilleyman JS. Thiopurine drugs in the treatment of childhood leukaemia: the influence of inherited thiopurine methyltransferase

- activity on drug metabolism and cytotoxicity. *Br J Clin Pharmacol* 1997;44:455–461.
49. Lennard L, Lilleyman J. Antipurines en: Ching-Hon Pui. *Treatment. Part III.* Humana Press, 2003: 405-414
 50. Marathias VM., Sawicki MJ., Bolton PH. 6 thioguanine alters the structure and stability of duplex DNA and inhibits quadruplex DNA formation. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 2860-2866
 51. McKenzie Shirlyn. Aspectos Generales y Clasificación de la Leucemia en: *Hematología Clínica. 2ª Edición. Manual Moderno, 2000: 431.*
 52. McLeod HL, Relling MV., Pui CH, Evans WE. Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic blasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 7: 1897-1902
 53. McLeod HL., Pritchard SC., Githang'a J., Indalo A., Ameyaw MM., Powrie RH., Booth L., Collie Duguid ESR. Ethnic differences in thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: evidence for allele specificity in Caucasian and Kenyan subjects. *Pharmacogenetics* 1999; 773-776
 54. McLeod HL., Coulthard S., Thomas AE., Pritchard SC., King DI et al. Analysis of thiopurine methyltransferase variant alleles in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1999; 105: 696-700
 55. McLeod HL., Krynetski EY., Relling MV and Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 567-572
 56. McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV and Evans WE. Genetic Polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 567-572
 57. Mejía JM., Ortega MC., Fajardo A. Epidemiología de las leucemias agudas en niños. *Rev Med IMSS* 2005; 43 (4): 323-333
 58. Metzger ML, Howard SC, Fu LC et al. Outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia in resource poor countries. *Lancet* 2003; 362:706
 59. Niedzielska E. Allelic variants of TPMT and the risk of leucopenia and neutropenia in patients treated for acute leukaemia. *Med Wieku Rozwoj* 2009; 13: 180-186
 60. Paredes R., Romero L., Del Campo A. Leucemias agudas. En: Loredó Abdalá. *Manual de Pediatría. McGraw-Hill Interamericana, 1999: 509-517*
 61. Paredes R. Leucemias Agudas. En: Rivera Luna. *El niño con cáncer. Editores de Textos Mexicanos, 2007: 41-59*
 62. Pinkel D. Five year follow-up of "Total Therapy" of childhood lymphocytic leukemia" *JAMA* 1971; 216: 648-652
 63. Pui CH., Evans W. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998; 339; 605-615

64. Relling MV., Hancock HL., Rivera GK., Sandlund JT., Ribeiro RC., Krynetski EY., Pui CH., Evans WE. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 2001-2008
65. Relling MV., Hancock ML., Boyett JM., Pui CH., Evans WE. Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1999; 93: 2817-2823
66. Rivera GK, Pinkel D., Simone JV, et al. Treatment of acute lymphoblastic leukemia – 30 years experience at St. Jude Children’s Research Hospital. *N Engl J Med* 1993; 329: 1289-1295
67. Rivera-Luna R., Leal Leal C., Cárdenas R., Martínez A. Meza C., Navarro I et al. A survey of 4,076 children with cancer. Certain epidemiological aspects from a single institution. *Bol Med Hos Infant Mex* 1996; 53: 598-605
68. Rivera Luna. Principios Generales. En: Rivera Luna. Hemato-Oncología Pediátrica. Editores de Textos Mexicanos, 2006; 12-14, 193-213
69. Rivera Luna Generalidades. En: Rivera Luna. El niño con cáncer. Editores de Textos Mexicanos, 2007: 2-4
70. Ross JA, Davies SM, Potter JD. Epidemiology of childhood leukemia, with focus on infants. *Epidemiol Rev* 1994; 16: 243
71. Rossi AM., Bianchi M., Guarnieri C., Barale R and Pacifici GM. *Eur J Clin Pharmacol* 2001; 57: 51-54
72. Ruiz Argüelles GJ., San Miguel JF. Actualización en leucemias. Editorial Panamericana 1ª edición 1997; 41-44
73. Salamun D., Poonkuzhali B., Ashish B., y cols. Frequency of TPMT alleles in Indian patients with acute lymphatic leukemia and effect on the dose of 6-mercaptopurine. *Med Oncol* 2009; 27: 1046-1049
74. Schaeffeler E., Stanulla M., Greil J., Scharppe M., Eichelbaum M., et al. A novel TPMT missense mutation associated with TPMT deficiency in a 5 year old boy. *Leukemia* 2003; 17: 1422-1424
75. Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, et al. Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics* 2004;14:407-417
76. Schrappe M. Stanulla M. Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia en: Ching-Hon Pui. Treatment. Part II. Humana Press, 2003: 98, 99
77. Simone J., Verzosa M., Rudy J. Initial features and prognosis in 363 children with acute lymphocytic leukemia. *Cancer* 1975; 36: 2099-2108
78. Simone J. History of the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: a paradigm for cancer cure. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2006; 19: 353-358

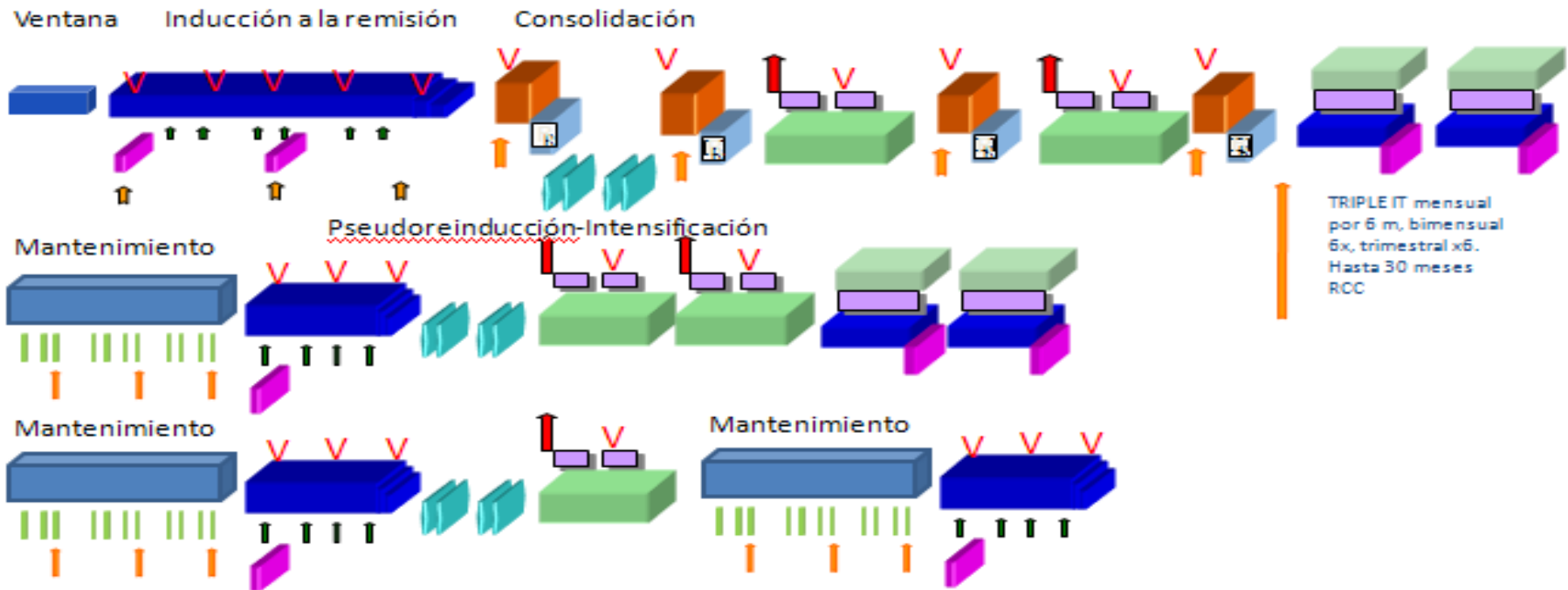
79. Smith M., Bleyer A., Crist W., Murphy S. y Sallan S. Uniform criteria for childhood acute lymphoblastic leukemia risk classification. *J Clin Oncol* 1996; 680-681
80. Spyre-Vayron C., Debuysere B., Mastain B., Vinner E., Marez D., Lo Guidice JM et al. Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *Brit J Pharmacol* 1998; 125: 879-887
81. Szumlanski CL., Honchel R., Scott MC and Weinshilboum RM. *Pharmacogenetics* 1992; 2: 148-159
82. Szumlanski CL., Otterness D., Her C., Lee D., Brandiff B et al. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol* 1996; 11: 17-30
83. Tai HL., Krinetsky EY., Yates Cr., Loennechen T., Fessing MY et al. Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am J Hum Gnet* 1996; 58: 694-702
84. Tai HL., Krynetski EY., Schuetz EG., Yanishevski Y., Evans W. Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase encoded by mutant alleles in humans (TPMT 3*A, TPMT*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *PNAS* 1997; 94: 6444-6449
85. Taja-Chayeb., Vidal-Millán., Gutiérrez O et al. Thiopurine S-methyltransferase Gene (TPMT) polymorphisms in a Mexican population of healthy individuals and leukemic patients. *Med Oncol* 2008; 25: 56-62
86. Weinshilboum RM., Sladck SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methultransferase activity. *Am J Huma Genet* 1980; 32: 651-662
87. Weinshilboum R. Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. *Drug Metab Dis* 2001; 29: 601-605
88. Yates CR., Krynetski EY., Loennechen T., Fessing MY., Tai HL., Pui CH et al. Molecular diagnosis of thiopurine S- methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* 1997; 126: 608-616

LAL Riesgo Habitual



Anexo 1.1 Protocolo de tratamiento para LAL de riesgo habitual. Se observan los periodos de mantenimiento los cuales son alternados por periodos de pseudoreinducción. Estos periodos se repiten hasta completar 30 meses en remisión. El periodo que se presenta en estas imágenes comprende 12 meses en remisión.

LAL Riesgo Alto



Anexo 1.2. Protocolo de tratamiento para LAL de AR. Como se observa en las imágenes, el tratamiento es más intenso que en riesgo habitual. En las imágenes se presentan 20 meses de tratamiento, al término de los cuales se alternará mantenimiento con pseudorreinducción hasta completar 30 meses.

ANEXO 2.1 Y 2.2

CARTAS DE ASENTIMIENTO Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO (mayores de 10 años de edad)

Frecuencia de polimorfismos del gen *Tiopurin S-Metiltransferasa* en pacientes sobrevivientes de Leucemia Aguda Linfoblástica Precursor de Células B y su relación con el antecedente de neutropenia como efecto adverso durante su tratamiento con 6-mercaptopurina

México D.F a ____ de _____ 20__

Por medio de la presente hago constar que yo, _____ paciente en vigilancia de remisión por tratamiento para Leucemia Aguda Linfoblástica durante la infancia estoy de acuerdo en participar en el estudio "**Frecuencia de polimorfismos del gen *Tiopurin S-Metiltransferasa* en pacientes sobrevivientes de Leucemia Aguda Linfoblástica Precursor de Células B y su relación con el antecedente de neutropenia como efecto adverso durante su tratamiento con 6-mercaptopurina**", registrado ante los comités de investigación y ética del INP con el número 67/2010.

Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere una muestra de sangre periférica (2-3 ml), la cual será tomada con todos los requisitos de seguridad. Se me ha informado ampliamente sobre los posibles inconvenientes durante la toma de la muestra, molestias que pudieran tratarse desde dolor al realizar la venopunción para la toma de sangre, hasta la formación de hematoma (moretón) los cuales son transitorios. Me han informado que de la muestra de sangre se obtendrá mi material genético (DNA), cuyo análisis permitirá identificar variantes en mi información genética que pueden relacionarse con la presencia de efectos adversos que pueden dar los medicamentos que emplearon para mi tratamiento. Es posible que en un futuro los resultados puedan servir para un mejor diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica.

Entiendo que mis datos personales en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y éstos no serán compartidos con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con mi autorización expresa y por escrito. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, se me ha asegurado que toda la información clínica e impresa de mi persona recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

Se me ha informado que la muestra de DNA quedará codificada bajo una clave que no incluya mi nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud por un periodo indefinido y acepto que esta muestra sea empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio de Leucemias Agudas y preservando siempre la confidencialidad de la información derivada.

Asimismo, se me ha indicado que toda información derivada del estudio es absolutamente confidencial y que mi participación es completamente voluntaria, por lo que si no deseo participar, ello no repercutirá en mi atención médica. Además, en el entendido que mi participación es total y absolutamente voluntaria, puedo abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en mi atención.

Se me ha informado que los resultados del estudio genético se me explicarán a través de un asesoramiento por parte del Dr. Rogelio Paredes Aguilera y la Dra. Ariadna González del Ángel. Asimismo, tengo aclarado que ninguno de los estudios que se me realicen con relación a este estudio, tendrán un costo para mí ni tampoco recibiré un pago por participar.

En caso de existir dudas o aclaraciones me podré comunicar con el investigador principal de este proyecto Dr. Rogelio Paredes Aguilera, al número 0155-1084-0900, extensión 1623 o Dra. Ariadna González del Ángel al número 0155.1084.09.00, extensión 1306.

DECLARACIÓN DE ASENTIMIENTO

Declaro que en forma libre y sin que nadie me presione decido participar en este estudio, una vez que he leído cuidadosamente esta forma y se me ha explicado en forma clara en que consiste este proyecto de investigación. Asimismo, entiendo que mi participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente hago constar que si deseo no participar, ello no repercutirá en mi atención médica.

ATENTAMENTE

_____	_____	_____
Padre ó Tutor	Firma	Fecha
_____	_____	_____
Paciente	Firma	Fecha
_____	_____	_____
Nombre Testigo	Firma	Fecha
_____	_____	_____
Nombre Testigo	Firma	Fecha
Obtuvo el consentimiento: _____	_____	_____
	Nombre	Fecha

Investigador Responsable: Dr. Rogelio Paredes Aguilera, al número 0155-1084-0900, extensión 1623.

Presidente del Comité de Ética: Dr. Marco Antonio Yamasaki. Tel 10840900 ext 1581

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (menores de edad)

Frecuencia de polimorfismos del gen *Tiopurin S-Metiltransferasa* en pacientes sobrevivientes de Leucemia Aguda Linfoblástica Precursor de Células B y su relación con el antecedente de neutropenia como efecto adverso durante su tratamiento con 6- mercaptopurina

México D.F a ____ de _____ 20__

Por medio de la presente hago constar que estoy de acuerdo en que mi hijo (a), _____, paciente en vigilancia de remisión por tratamiento para Leucemia Aguda Linfoblástica participe en el estudio **“Frecuencia de polimorfismos del gen *Tiopurin S-Metiltransferasa* en pacientes sobrevivientes de Leucemia Aguda Linfoblástica Precursor de Células B y su relación con el antecedente de neutropenia como efecto adverso durante su tratamiento con 6- mercaptopurina”**, registrado ante los comités de investigación y ética del INP con el número 67/2010.

Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere una muestra de sangre periférica (2-3 ml), la cual será tomada con todos los requisitos de seguridad. Se me ha informado ampliamente sobre los posibles inconvenientes durante la toma de muestra, molestias que pudieran tratarse desde dolor al realizar la venopunción para la toma de sangre, hasta la formación de hematoma (moretón) los cuales son transitorios. Me han informado que de la muestra de sangre se obtendrá el material genético (DNA), cuyo análisis permitirá identificar variantes en la información genética de mi hijo (a) que pueden relacionarse con la presencia de efectos adversos que pueden dar los medicamentos que usaron para su tratamiento. Es posible que en un futuro los resultados puedan servir para un mejor diagnóstico, pronóstico y tratamiento de pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica.

Entiendo que los datos personales en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y éstos no serán compartidos con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con mi autorización expresa y por escrito. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, se me ha asegurado que toda la información clínica e impresa recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

Se me ha informado que la muestra de DNA de mi hijo (a) quedará codificada bajo una clave que no incluya mi nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud por un periodo indefinido y acepto que esta muestra sea empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio de Leucemias Agudas y preservando siempre la confidencialidad de la información derivada.

También, se me ha indicado que toda información derivada del estudio es absolutamente confidencial y que nuestra participación es completamente voluntaria, por lo que si no deseamos participar, ello no repercutirá en la atención médica. Además, en el entendido que nuestra participación es total y absolutamente voluntaria, podemos abandonar el estudio y retirar el

