



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
SECRETARIA DE SALUD
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GOMEZ

**Polimorfismos del gen Tiopurina S-
Metiltransferasa y su influencia en la toxicidad a
6 Mercaptopurina en pacientes pediátricos
mexicanos con Leucemia Linfoblastica Aguda**

TRABAJO FINAL QUE PRESENTA

DRA. LIDIA GABRIELA ESTRADA GONZÁLEZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN

ONCOLOGIA PEDIÁTRICA

Directora de Tesis: Dra. Aurora Medina Sanson
Jefe del Departamento de Hemato-Oncología

MÉXICO D.F. Agosto 2012



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
SECRETARIA DE SALUD
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GOMEZ

Polimorfismos de gen Tiopurina S- Metiltransferasa y su influencia en la toxicidad a 6 Mercapopurina en pacientes pediátricos mexicanos con Leucemia Linfoblástica Aguda

TRABAJO FINAL QUE PRESENTA
DRA. LIDIA GABRIELA ESTRADA GONZÁLEZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
ONCOLOGIA PEDIATRICA

Dra. Rebeca Gómez Chico
Directora de Enseñanza y Desarrollo Académico
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dra. Aurora Medina Sanson
Asesor de Tesis
Jefa del Departamento de Oncología Pediátrica
Hospital Infantil de México Federico Gómez

MÉXICO D.F., Agosto 2012



AGRADECIMIENTOS.

A mi familia... mi refugio, mi inspiración y mi motor, gracias por cada minuto de comprensión, paciencia y amor, por hacer posible mis sueños en el emprendido camino de la vida.

A mi asesora de tesis... Dra Aurora Medina Sansón, por la confianza depositada en mi, por su paciencia en cada momento, por ser mi maestra y guía, há sido un honor.

A mis amigos...por compartir los momentos más bellos y más tristes de mi vida , por lo incondicional de su amistad y mi vuelta a la realidad, por tenderme la mano cuando lo he necesitado, Luis Enrique Moreno, Jackie Fernández, Daniela Covarrubias, Analli Cruz.

A todos los médicos que han participado en mi formación profesional... de quienes aprendí todo aquello que quiero y no quiero ser, gracias Dra. Elisa Dorantes por tu ecuanimidad, eres mi modelo a seguir, gracias Dr. Antonio Perales siempre mi consejero y amigo.

Al Hospital Infantil de México... mi casa en estos cinco años de vida profesional, el lugar que há forjado mi temple, mi esencia y mi compromiso con la niñez mexicana, gracias por permitirme ser parte de su historia.

A Fundación Teletón... por permitirme formarme como Oncóloga Pediatra por darme la posibilidad de ser parte de ustedes, estoy muy orgullosa.

A todos los niños del servicio de Oncología

“La vida no se mide por el número de veces que respiras, sino por el número de momentos que te dejan sin respiración”

George Carlin



ÍNDICE.

	Página.
1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	7
3. MARCO TEÓRICO.....	8
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
5. JUSTIFICACIÓN.....	20
6. OBJETIVOS.....	20
7. HIPÓTESIS.....	21
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
8.1. Diseño del estudio.....	21
8.2. Criterios de selección.....	22
8.3. Metodología experimental.....	23
8.4. Análisis Estadístico.....	24
9. RESULTADOS.....	25
10. DISCUSIÓN.....	28
11. CONCLUSIÓN.....	31
12. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	31
13. CONSIDERACIONES BIOSEGURIDAD.....	32
14. BIBLIOGRAFÍA.....	33
15. ANEXOS.....	37
15.1 Protocolo HIM 2003.	

RESUMEN

La 6-Mercaptopurina (6-MP) es un fármaco citotóxico, antimetabolito análogo de las purinas, específico de la fase S del ciclo celular y un agente esencial en el tratamiento de niños con leucemia aguda linfoblástica (LAL). La enzima tiopurina S-metiltransferasa (TPMT) cataliza la metilación y consecuente inactivación de la 6-MP y su análisis en pacientes con LAL representa uno de los ejemplos más notables de cómo la farmacogenética puede contribuir a individualizarla dosis de un fármaco. Los polimorfismos del gen de la TPMT generan variantes alélicas, cuyo fenotipo muestra disminución en la actividad de la enzima, aumento de los metabolitos activos (6-TGNs), mayor actividad farmacológica y mayor riesgo de efectos adversos. El gen que codifica para la TPMT se encuentra en el cromosoma 6p22.3 y sus alelos heredados de manera codominante. El alelo TPMT*1 corresponde a la forma silvestre, es el más frecuente y su fenotipo es de alta actividad enzimática. El resto son alelos asociados con menor actividad de TPMT. Estudios epidemiológicos han demostrado diferencias en las frecuencias de las variantes alélicas del gen TPMT según el origen étnico de las poblaciones. Hasta la fecha no existen estudios sobre el polimorfismo del gen de la TPMT en población pediátrica mexicana.

JUSTIFICACIÓN

El análisis de los polimorfismos del gen TPMT es de gran importancia debido a que estos se asocian con menor actividad enzimática y aumento en la toxicidad a 6-MP. En México solo existen dos estudios publicados sobre las frecuencias del gen TPMT, que tienen discrepancias entre sí, y ninguno de ellos relaciona el genotipo con la toxicidad. En este estudio analizamos, las variantes alélicas del gen TPMT en niños mexicanos con LAL y su impacto en la toxicidad al tratamiento con 6-MP, los resultados obtenidos no sólo incrementarán el conocimiento sobre la frecuencia variantes alélicas, sino que con esta información y la validación de la técnica permitirán ser el primer centro de Oncología Pediátrica en México en utilizar este biomarcador genético de riesgo de toxicidad en la evaluación del paciente tratado con 6-MP para otorgar una terapia individualizada a los pacientes pediátricos con LAL.

OBJETIVO.

Determinar la asociación entre las variantes alélicas del gen TPMT y el grado de toxicidad 6-MP en población pediátrica mexicana

HIPÓTESIS:

Los pacientes con la variante TPMT*3A, TPMT*3B y TPMT*2 del gen TPMT presentaran mayor grado de toxicidad al tratamiento en comparación con aquellos con el genotipo silvestre.

Material y Métodos: El presente, es un estudio ambispectivo, observacional analítico donde se analizaron pacientes pediátricos con LAL. Se obtuvieron muestras de sangre periférica por punción venosa y se extrajo el ADN por el método de columna. Se estandarizó la técnica PCR oligo-específica para la variante TPMT2 y PCR-RFLP para las variantes TPMT*3A, TPMT*3B y TPMT*3C. Una vez estandarizada la técnica se realizó la genotipificación del gen TPMT amplificando cada variable con sus oligonucleótidos específicos. El producto fue analizado en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Los datos obtenidos se analizaron para relacionar los genotipos de TPMT con el grado de toxicidad. Se incluyo a pacientes menores de 18 años con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda que estuvieron expuestos a 6 Mercaptopurina por más de 6 meses,

acorde al protocolo HIM 2003. Se relacionó los polimorfismos a toxicidad acorde a los grados definidos por la OMS.

VARIABLES. Independientes: Genotipo encontrado. Dependientes. Tipo de toxicidad, Grado de Toxicidad.

RESULTADOS. De un tamaño de muestra calculado en 94 casos y con el fin de aumentar la sensibilidad del estudio y poder identificar la distribución real de frecuencias alélicas, se incluyeron 192 pacientes, de los cuales 56% son de género masculino y 44% femenino, de ellos, 39 (20.8%) fueron clasificados como de bajo riesgo, 142 (79.1%) como de alto riesgo y se les administró el protocolo institucional correspondiente a cada grupo de riesgo, que en ambos casos incluye el uso de 6-MP.

Las frecuencias alélicas del gen TPMT fueron: TPMT-1 332 (86.46%), TPMT-2 11 (2-8%), TPMT-3A 11 (2-8%), TPMT-3B 17 (4.4%) y TPMT-3C 13 (3.3%), lo que representa un 13.54% de alelos variantes en todo el grupo de 192 pacientes. El momento

De los 192 pacientes incluidos, 2 abandonaron tratamiento, 5 fallecieron antes de la terapia con 6-MP y 44 aun se encuentran en fases iniciales del tratamiento por lo que no han tenido aun una exposición de mas de 6 meses a la 6-MP. Debido a lo anterior sólo se incluyeron 141 pacientes para el análisis de toxicidad.

De los 141 casos incluidos por haber tenido una exposición a 6-MP mayor o igual a 6 meses, 37 (26.2%) fueron heterocigotos para alguna variante, de ellos 9 pacientes desarrollaron al menos un evento de toxicidad infecciosa grado 3 o 4 de la OMS acompañados de toxicidad hematológica y 2 mas tuvieron toxicidad hematológica grados 3 o 4, sin toxicidad infecciosa grave, pero que condicionaron interrupciones prolongadas en el tratamiento debido mielosupresión persistente. Las variantes que se asociaron a toxicidad fueron TPMT2 (33%), TPMT3A (18%) y TPMT3B (25%). No hubo ningún caso de toxicidad entre los 13 pacientes portadores de la variante TPMT3C.

De acuerdo con lo anterior, el 30% de los pacientes heterocigotos desarrollaron toxicidad grave, sin embargo sólo en 8% de ellos (3/11) se realizaron reducciones en las dosis de 6 MP. Las reducciones de dosis fueron de 25% en un caso, del 50% en otro y un paciente requirió reducción del 75% de la dosis de 6-MP.

Aun no hemos concluido el análisis estadístico, sien embargo podemos identificar varias diferencias entre estudios previamente publicados y nuestros datos: 1) un porcentaje más alto de variantes alélicas, con mayor proporción de genotipos variantes, 2) mayor frecuencia de individuos con la variante TPMT3B que la reportada en poblaciones caucásicas, asiáticas y negras, 3) Menor necesidad de reducción de dosis de 6-MP en los pacientes que reportan alelos variantes.

Podemos concluir que en base a estos resultados tenemos una incidencia mayor de pacientes heterocigotos (26.6%) en comparación con lo descrito en otras series que van de 10 a 12%. Sin embargo a pesar de esto solo 8% requirió reducciones en la dosis de la 6 MP. Este constituye el primer estudio que provee datos de la frecuencia de las variantes de TPMT en la población mexicana pediátrica con Leucemia Linfoblástica aguda y su asociación a toxicidad.

INTRODUCCIÓN

En México el cáncer representa la segunda causa de muerte en los niños de 5 a 14 años, precedido sólo por los accidentes. Las leucemias agudas son el tipo de cáncer que más contribuye a esta mortalidad, con una tasa de 2.7/100,000 habitantes en el grupo de 5 a 14 años y de 2.4/100,000 habitantes en niños de 1 a 4 años.³ La Leucemia Linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer más frecuente de la edad pediátrica y representa 25-30% de las neoplasias malignas en niños. En los Estados Unidos se diagnostican anualmente casi 4,000 casos de LLA.¹ En nuestro país la incidencia promedio anual de LLA en menores de 15 años fue de 44.9 por millón entre 1996 y 2000. En el HIMFG, se reciben 90 a 110 casos nuevos de leucemia aguda por año, 35% de los cuales son LAL.⁴

El tratamiento de la leucemia aguda linfoblástica se basa en protocolos de quimioterapia que han derivado de décadas de estudios clínicos que iniciaron en los años 50's y que han llevado a las tasas actuales de curación cercanas al 80%.^{5,6,7}

La identificación de factores de riesgo ha hecho posible la estratificación de los pacientes, permitiendo con ello el empleo de terapias adaptadas al riesgo individual, y la disminución de la mortalidad asociada al tratamiento.¹ Sin embargo aun existe un 2.9% +/- 5.3% de pacientes que fallecen durante la inducción y mantenimiento.⁸

Las características farmacocinéticas o farmacogenéticas de cada paciente podría contribuir aun mas a individualizar la terapia, reduciendo el riesgo de toxicidad y muertes por esta causa.

La enzima S-Metiltransferasa es uno de los mejores ejemplos de cómo la identificación de variaciones genéticas individuales puede reducir el riesgo de toxicidad a un fármaco antineoplásico.

MARCO TEÓRICO

Leucemia Linfoblástica Aguda

Definición

Las leucemias agudas son un grupo de enfermedades heterogéneas que alteran la médula ósea y se caracterizan por proliferación desordenada y rápida de células linfoides inmaduras o linfoblastos que invaden diferentes órganos y tejidos.

Epidemiología

La LLA constituye el 25% de todos los tipos de cáncer pediátrico y abarca el 75% de los casos de leucemia aguda; se define como la alteración citogenética que ocasiona la proliferación anormal de células linfoides inmaduras que invaden más del 25% de la médula ósea.

De acuerdo a los registros internacionales, se presenta con una incidencia anual de 3.5 casos nuevos por cada 100.000 niños menores de 15 años, con su más alta frecuencia en varones entre los 2 y 5 años.

Etiopatogenia

La causa que desencadena la LLA es aún desconocida. Se considera que su desarrollo, como otras neoplasias de origen hematológico, involucra un evento que causa la transformación en un progenitor celular que tiene la capacidad para expandirse clonalmente de manera indefinida.

También se han asociado con la LLA anomalías cromosómicas estructurales como trisomía 21 (Síndrome de Down), Síndrome de Bloom, Anemia de Fanconi y Ataxia-telangiectasia. Otras condiciones genéticamente determinadas son: agamaglobulinemia, Síndrome de Shwachmann, Síndrome de Blackfan-Diamond, Síndrome familiar de monosomía 7, Síndrome de Li Fraumeni y Neurofibromatosis.

Sin embargo, estos síndromes sólo explican una pequeña fracción de los casos. La exposición a mutágenos en útero puede ser un evento inicial importante en algunos casos, pero se requieren alteraciones genéticas adicionales. Para la mayoría de las leucemias, se necesita de múltiples y sutiles polimorfismos genéticos de enzimas que interactúen con el ambiente, la dieta, factores maternos y otros factores externos para el desarrollo de la leucemia.

La expansión monoclonal de una célula inmadura condicionará el cese y abatimiento de los elementos formes en la médula ósea así como la infiltración de las células leucémicas fuera de la médula ósea incluyendo las gónadas, sistema nervioso central y cualquier otro sitio del organismo. Por otro lado, el índice de proliferación y destrucción de las células malignas será elevado produciendo alteraciones tanto electrolíticas, metabólicas, hematológicas (anemia, neutropenia, trombocitopenia) e infecciosas.

Cuadro clínico

El cuadro clínico es heterogéneo. Los signos y síntomas de los niños con LLA reflejan la infiltración de la médula ósea por células leucémicas y la extensión de la enfermedad extramedular, llegando a ser del orden de 1×10^{12} células malignas al momento del diagnóstico.

Los principales son: fiebre (en 61% de los pacientes), sangrado (48%), dolor óseo (23%), linfadenopatía (50%), esplenomegalia (63%), hepatoesplenomegalia (68%), leucocitosis (47%), anemia (88%), trombocitopenia (75%). La duración de los síntomas en los niños con LLA, puede durar desde días hasta meses, y algunos otros síntomas pueden presentarse o continuar por el efecto de los agentes quimioterapéuticos.

Diagnóstico

El diagnóstico se establece con la presencia al menos de 25% de linfoblastos en la médula ósea de acuerdo a los criterios de la *French-American-British* (FAB). La infiltración al sistema nervioso central se establece si existen más de 5 células/microl en la muestra de líquido cefalorraquídeo, y en pacientes con signos neurológicos, con la presencia de infiltrados intracerebrales en la tomografía computada de cráneo.

Clasificación

Existen varios tipos de clasificaciones para las leucemias: morfológica, inmunológica, citogenética, bioquímica y de biología molecular.

La clasificación morfológica establecida por la FAB en 1976 define 3 subtipos de linfoblastos: L1 (blastos usualmente pequeños, con citoplasma escaso, cromatina homogénea, nucleolo regular y ocasionalmente indentado); L2 (más grandes, heterogéneas en cuanto a tamaño, con nucleolo prominente y citoplasma más abundante); y finalmente, L3 (son más grandes, basofilia intensa, vacuolados y morfológicamente idénticos a las células del linfoma de Burkitt). Aproximadamente el 85% de los niños con LLA tienen morfolología L1, 14% tienen el tipo L2 y el 1% L3.

La clasificación inmunológica consiste en la identificación de antígenos de membrana o intracelulares que identifican el linaje de los blastos y estado de diferenciación mediante citometría de flujo (técnica de análisis celular que se basa en la expresión de características de fluorescencia y absorción de la luz en una suspensión monodispersa de células). Teniendo de esta manera los siguientes inmunofenotipos: pre B, B temprana, pre B transicional, B madura y T.

El estudio citogenético determina la presencia de alteraciones cromosómicas que ocurren en los linfoblastos de la médula ósea en pacientes con LLA y que puede variar de acuerdo a las diversas series hasta 80%. Pueden dividirse en alteraciones numéricas y estructurales.

Las diferentes alteraciones citogenéticas observadas en niños con LLA proporcionan valiosa información pronóstica. Por ejemplo, las hiperdiploidías se asocian con pronóstico favorable, mientras que la translocación t(9;22)(q34;q11) y las hipodiploidías confieren un pronóstico desfavorable. Muchas de estas anomalías moleculares tienen importancia pronóstica independiente en el contexto de regímenes de tratamiento particulares.

En un estudio realizado en el HIMFG, se clasificaron 315 pacientes con LLA diagnosticados entre enero de 2003 y diciembre de 2007 encontrándose el subtipo morfológico L1 en 179 casos (56.8%) y L2 en 132 (43.2%). En cuanto al inmunofenotipo realizado a 282 (89.6%) de estos pacientes: 227 (72%) tuvieron LLA de precursores de células B, 44 (14%) de células T y 11 (3.5%) se clasificaron como bifenotípicas. El estudio citogenético de 141 de los 315 pacientes, detectó las siguientes alteraciones cromosómicas estructurales en 88 (62.4%): t(12;21) en 34 (24%), t(1;19) en 28 (19.8%), t(4;11) en 19 (13.4%) y t(9;22) en 7 (4.9%).

Factores pronósticos y definición de riesgo

Entre un 20-25% de los pacientes presentarán recaída de la enfermedad en algún momento de su evolución. Existen varios factores de riesgo para recaída relacionados al paciente (edad, cuenta leucocitaria al diagnóstico), a la enfermedad (inmunofenotipo, anormalidades cromosómicas, enfermedad mínima residual) y los relacionados a la respuesta al tratamiento. La identificación de estos factores ha permitido la asignación de un riesgo (riesgo estándar o habitual y alto riesgo) y, con ello, un pronóstico y tratamiento más racional. (Ver tabla 1).

Los factores pronósticos independientes más importantes son la edad menor de 1 año y mayor de 10 años y la cuenta de leucocitos al diagnóstico mayor de $50,000\text{mm}^3$, que confieren un peor pronóstico.

En estudios previos, el sexo masculino había sido considerado un factor de peor pronóstico, esto en gran parte a la asociación con factores de mal pronóstico como mayor incidencia de inmunofenotipo de células T así como por la posibilidad de infiltración testicular.

Existe una marcada influencia de la edad en el pronóstico de ciertos subtipos de LLA. Por ejemplo, el cromosoma Philadelphia positivo—translocación conocida como t(9;22) se asocia generalmente con un mal pronóstico en adolescentes pero los resultados en niños de 1 a 9 años es relativamente favorable si la cuenta leucocitaria al diagnóstico es baja.

Entre los pacientes con rearrreglos del gen MLL (en el cromosoma 11), los niños menores de 1 año se consideran de peor pronóstico de niños mayores. Otra consideración importante es que los rearrreglos del gen MLL ocurren no sólo en la leucemia del lactante sino también en aquellas inducidas por fármacos que inhiben la topoisomerasa II.

Los pacientes con hiperploidia tienen un pronóstico favorable. Más del 97% de los blastos hiperdiploides tienen 3 o 4 copias del cromosoma 21, el cual contiene el gen que codifica el transportador de metotrexate dentro de las células, por lo que, responden bien a los regímenes basados en el uso de este antimetabolito.

En la tabla 1 se describen los factores para clasificar a las LLA en riesgos. En el protocolo HIM 2003 que es el que se utiliza en el HIMFG se describen dos riesgos: estándar y alto riesgo. En la literatura están descritos muy bajo riesgo, riesgo estándar, alto riesgo y muy alto riesgo. Para fines de este estudio utilizaremos la clasificación local.

Tabla 1.- Clasificación de la LLA por riesgo

Riesgo	Estándar	Alto
EDAD	> 1 AÑO < 10 AÑOS	< 1 AÑO > 10 AÑOS
RESPUESTA A PREDNISONA	NO BLASTOS EN SANGRE PERIFERICA EL DIA 7	PRESENCIA DE BLASTOS EN SANGRE PERIFERICA EL DIA 7
RESPUESTA A LA INDUCCION	RESPONDEDOR TEMPRANO	RESPONDEDOR LENTO
CUENTA DE LEUCOCITOS	< 50,000	> 50,000
INMUNOFENOTIPO	PRO B, PRE B Y PRE B TRANSICIONAL	
CITOGENETICA	HIPERDIPLOIDIA t 12;21	t 1;19 t 4;11 (> 1 AÑO) t 9;22 t 4;11 U OTRO REARREGLO MLL EN PAC. < 1 AÑO
SNC STATUS	SNC 1	SNC2, SNC3
ENFERMEDAD EXTRAMEDULAR	AUSENTE	SNC TESTICULAR MEDIASINAL

Tratamiento

El tratamiento de las leucemias se basa en protocolos de quimioterapia diseñados por centros especializados, en el caso de la LLA, consta de 4 fases: la inducción a la remisión, la intensificación, la consolidación y el mantenimiento.

El protocolo de tratamiento de niños con LLA en el HIMFG se basa en el protocolo Total XIII del Hospital St Jude. Consta de un tratamiento común a todas las leucemias independientemente del riesgo que tengan; se administra una ventana de esteroide y la inducción a la remisión. En esta fase los pacientes reciben una semana con dexametasona a 6mgm2scd para evaluar la quimiosensibilidad *in vivo* (ventana de esteroide) y tiene como objetivo subdividir a los pacientes en “sensibles al esteroide y no sensibles”.

Posterior a la ventana de esteroide, continúa la inducción a la remisión, que constituye la primera fase del tratamiento y que tiene como objetivo disminuir la carga tumoral de 10^{12} a 10^9 células. En este periodo los pacientes empiezan a recuperar la función normal de la médula ósea con un requerimiento menor de productos hemáticos, mayor energía y de manera global mejor estado general. La inducción a la remisión se lleva a cabo con la combinación de Vincristina, Daunorrubicina, L Asparaginasa y Dexametasona, posteriormente en la fase de intensificación se incluye Etopósido y Arábínósido de Citosina.

Los pacientes que se encuentran en remisión se definen como aquellos que no tienen evidencia de leucemia cuando se evalúan de forma física o a través de pruebas hematológicas (aspirado de médula ósea y sangre periférica).

La siguiente fase es la Consolidación cuyo objetivo es intensificar de forma temprana el tratamiento a sitios santuarios (sistema nervioso central) empleando altas dosis de antimetabolitos a intervalos de 1 semana por 3 ocasiones. En nuestro protocolo se emplean altas dosis de metotrexate a 2 o 5 g m² dependiendo del riesgo establecido.¹⁴

El mantenimiento es la fase en la que se busca eliminar la enfermedad residual que persiste al final de la inducción y erradicar la clona leucémica. En esta fase se incluyen reinducción, reintensificación y reconsolidación, en caso de tratarse en un paciente clasificado como de alto riesgo se debe de dar tratamiento multiagente, semanal para evitar la resistencia.

6-Mercaptopurina

La 6-Mercaptopurina es un fármaco citotóxico, antimetabolito análogo de las purinas, específico de fase S del ciclo celular. Es uno de los principales fármacos usados en el tratamiento de niños con leucemia linfoblástica aguda. Se emplea principalmente como terapia de mantenimiento.

Mecanismo de acción.

La 6 Mercaptopurina y su prodroga azatioprina requieren activación intracelular por la hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa en monofosfato de tiinosina (TIMP) y subsecuentemente en nucleótidos de tioguanina (6TGNs) el metabolito citotóxico activo. Hay otras dos reacciones que completan este proceso. La xantina oxidasa oxida la 6 Mercaptopurina en 6 Tioxantina y subsecuentemente en el ácido 6 Tiúrico. Además la tiopurina S metiltransferasa (TPMT) convierte la 6 Mercaptopurina en un metabolito inactivo en 6 Metil Mercaptopurina y también metaboliza el TIMP en nucleótidos 6 Metilmercaptopurina los cuales son inhibidores potentes de la síntesis de purinas. La enzima TPMT, de forma indirecta influye en las concentraciones de 6 TGN.^{10,15,20}

La figura 1 esquematiza el mecanismo de acción de la 6-MP.

Efectos adversos

Los pacientes con disminución en la actividad d la TPMT están en riego severo, eventualmente fatal de sufrir toxicidad hematológica.^{10,17} Mientras que aquellos que tienen actividad aumentada tienen respuesta clínica disminuida con estos agentes.¹⁷

Las tiopurinas se asocian con dos clases de efectos adversos: Idiosincráticos (no dependiente de dosis) y dosis dependientes. Mas del 25% de los pacientes tratados con 6 Mercaptopurina presentan efectos adversos no dosis dependientes que incluyen náusea, fiebre, rash, síntomas flue like, artralgias que pueden requerir suspensión del tratamiento. En estudios retrospectivos que recibieron 6 Mercaptopurina la incidencia de pancreatitis se presentó en 3.3% y reacciones alérgicas en 2%.

La leucopenia (menos de 4000 leucocitos) es el principal efecto adverso hematológico que se presenta con la administración de dosis estándar de 6 Mercapopurina. Se ha documentado que ocurre de 2 al 15%. La leucopenia es habitualmente asintomática pero puede ser grave complicándose con sepsis en el 2% de los casos.²⁰

En Otro grupo de pacientes tratados con 6 Mercaptopurina la mielosupresión transitoria fue común reversible con reducción de la dosis y suspensión temporal del tratamiento. La incidencia de complicaciones infecciosas en este grupo fue del 7.4%, infecciones severas ocurre en el 1.8% de los pacientes, quienes también recibieron múltiples inmunosupresores, incluyendo corticoesteroides.²¹

Mecanismos de Resistencia

Se ha observado resistencia natural y adquirida a la 6 mercaptopurina. Un factor crucial consiste en las actividades relativas de las enzimas anabólicas y catabólicas que influyen en la conversión de los nucleótidos de 6 Tioguanina. Los mecanismos de resistencia son identificados para este fármaco incluyen la disminución de la expresión de la enzima activadora HGPRT, el aumento en la expresión de la enzima catabólica fosfatasa alcalina o de la enzima conjugante Tiopurina S-metiltransferasa, la disminución del transporte transmembranal del fármaco y la resistencia cruzada entre 6-Mercaptopurina y 6-Tioguanina.

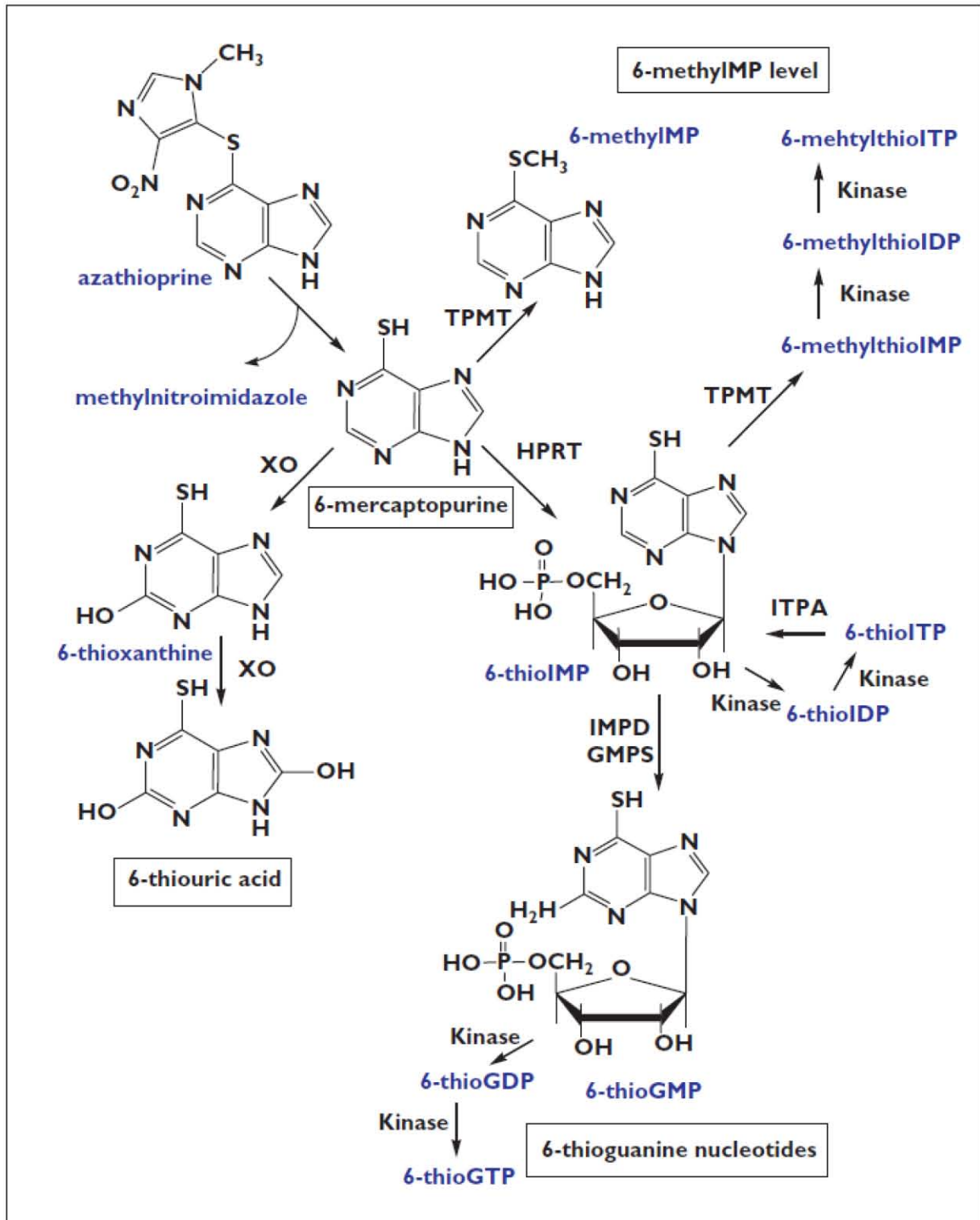


Figura 1 Mecanismo de acción de la 6 Mercaptopurina

Thiopurine metabolism. 6-MP, mercaptopurine; IMP, inosine monophosphate; IDP, ioinosine diphosphate; ITP, ioinosine triphosphate; GMP, guanosine monophosphate; GDP, guanosine diphosphate; GTP, guanosine triphosphate; XO, xanthine oxidase; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; TPMT, thiopurine methyltransferase; IMPD, inosine monophosphate dehydrogenase; GMPS, guanosine monophosphate synthetase; ITPA, inosine triphosphate pyrophosphatase

Tiopurina S-Metiltransferasa.

La Tiopurina S-Metiltransferasa (TPMT) es una enzima citosólica que cataliza la S Metilación de los compuestos sulfhidrilo, incluyendo 6 Mercaptopurina, 6 Tioguanina y la Azatioprina, dejando metabolitos S metilados inactivos.¹¹

La tiopurina S-metiltransferasa (TMPT) representa uno de los ejemplos más notables de cómo la farmacogenética puede contribuir a individualizar un fármaco.⁹

Antecedentes

La S metilación se reportó como una vía metabólica para las drogas tiopurínicas desde que se comenzaron a administrar en humanos. Los primeros estudios de la enzima que catalizaba esta reacción se realizó por Remy en los primeros años de los sesentas usando tejido de ratón. Sin embargo, no fue hasta los setentas que la actividad TPMT se estudio en humanos, con el objetivo claro de probar la hipótesis de que la variación individual en esta vía de la biotransformación de la tiopurina podría estar relacionada con diferencias individuales relacionadas con la toxicidad y la eficacia terapéutica, por lo tanto los ensayos iniciales realizados en humanos para determinar la actividad de la TPMT fue en tejidos accesibles como los eritrocitos. Esto se realizó con el objeto de desarrollar un examen clínico que pudiese ser válido si se comprobaba que la determinación de la actividad de la TPMT en eritrocitos correlacionada con otros sitios implicados en el metabolismo de la TPMT como el hígado. La primera aplicación de las medidas de la actividad de TMPT en eritrocitos implicó experimentos realizados en muestras de poblaciones grandes y familias nucleares. Estos estudios demostraron que los niveles de actividad de la TPMT se controlan por polimorfismos. En la siguiente década los experimentos se enfocaron en diseñar experimentos para caracterizar las propiedades bioquímicas de la enzima. El aumento en el conocimiento de la bioquímica y regulación de la TPMT en los tejidos humanos durante los ochentas de forma paralela aumento el entendimiento de la biotransformación de las drogas tiopurínicas en humanos. Se demostró que las tiopurinas como la 6 Mercaptopurina eran prodrogas que requerían activación metabólica para formar nucleótidos 6 tioguanina, los niveles de estos últimos medidos en eritrocitos correlacionaban con la eficacia y la toxicidad de la 6 Mercaptopurina. El primer reporte en 1989 por Lennard et al., en el cual se ve que en pacientes con actividad TPMT genéticamente baja que eran tratados con dosis “estándar” de estas drogas presentaban mayor riesgo de desarrollar toxicidad severa y de forma simultánea aquellos pacientes que tienen actividad incrementada de la TPMT presentan eficacia terapéutica disminuida.¹⁹

Polimorfismos del gen TPMT

Los polimorfismos son variantes genéticas en el genoma humano representando variaciones en las secuencias que ocurren en más de uno por ciento de los alelos en una población dada.¹⁰

La existencia de polimorfismo en el gen de la TPMT genera variantes alélicas, cuyo fenotipo muestra una capacidad disminuida en la S-metilación de 6-Mercaptopurina, determinando un aumento de los metabolitos activos (6-TGNs), lo que produce una mayor actividad farmacológica, pero también un mayor riesgo de efectos adversos.

Estas variantes alélicas resultan de mutaciones puntuales en la secuencia o mutaciones en sitios intron – exón.¹² El gen que codifica para la TPMT se encuentra en el cromosoma 6p22.3, mide 34kb y consiste de 10 exones, siendo sus alelos heredados de manera codominante y presenta variaciones genéticas que controlan la actividad enzimática.^{17,25}

El mecanismo molecular de la deficiencia de la TPMT fue descrito en 1995, cuando la primera variante alélica se descubrió, TPMT*2, posteriormente se descubrieron otras variantes alélicas.²⁴ Se han publicado a la fecha 25 variantes alélicas para el gen de la TPMT, siendo el alelo TPMT*1 el correspondiente al alelo *wild type*, el cual es el más frecuente y cuyo fenotipo es de alta actividad enzimática en el 90% de los casos. El resto corresponden a alelos asociados con actividad intermedia de TPMT 10%, de los cuales los alelos TPMT2, *3A y *3C dan cuenta de casos publicados de la disminución de actividad de la TPMT.^{9, 10, 17} Se ha documentado que 1 de cada 300 tiene baja actividad.¹¹ La actividad de la TPMT es clásicamente medida en los eritrocitos, ya que la medida de la TPMT en el hígado, riñón y los linfoblastos correlaciona con las medidas en los eritrocitos.¹⁸

La variante TPMT*2 corresponde a una transversión G238C, que causa la sustitución de un aminoácido en el codón 80 cambio de una alanina por una prolina. La variante TPMT*3^a contiene 2 transiciones G460A y A719G, que resultan en las sustituciones en el codón 154 cambio de una Alanina por Treonina y en el codón 240 cambio de una Tirosina por una Cisteína respectivamente. Para el alelo TPMT *3B se observa solo la transición G460A que resulta en el cambio de codón 154 cambio de una Alanina por Treonina y en el caso del alelo TPMT *3C existe solo la transición A719G resultando en el cambio en el codón 240 cambio de una Tirosina por una Cisteína.^{11,20,23,25}

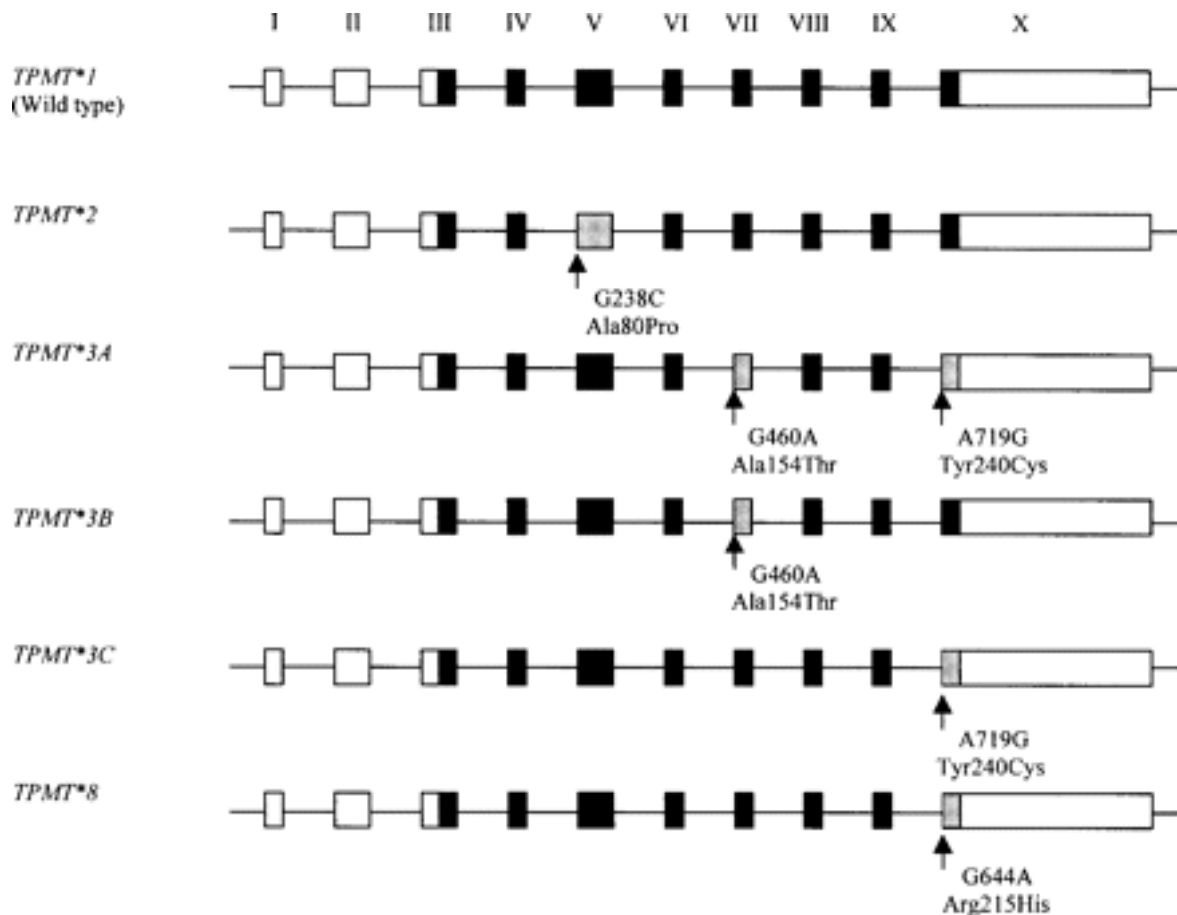


Figura 2. Variantes alélicas del locus TPMT.

Las cajas blancas son exones no traducidos, y las cajas negras representan exones en traducción. Las cajas grises representan exones que contienen mutaciones que resultan en cambios de aminoácidos. La variante TPMT*1 tiene alta actividad, el resto se relacionan a baja actividad.²⁵

La presencia de TPMT*2, TPMT*3, TPMT*3C es predictora de fenotipo, debido a que pacientes heterocigotos para estos alelos tiene actividad enzimática intermedia y los pacientes homocigotos para estos mismos alelos presentan deficiencia en la actividad.²⁴

Diferencias étnicas

Estudios epidemiológicos han demostrado diferencias en las frecuencias alélicas de las distintas variantes del gen de la TPMT según el origen étnico de las poblaciones. El TPMT*3A es el alelo más común en los Caucásicos (frecuencia aproximada del 5%)^{18,22}, mientras que el TPMT*3C es predominante en sujetos asiáticos y africanos (frecuencias de 0.3%-3% y 5.5-7.6% respectivamente).^{10,11,17}

Estudios realizados en Latinoamérica muestran una mayor frecuencia de alelo TPMT*3A en sujetos de Argentina, Colombia, Bolivia y Chile, mientras que en la población de Brasil el alelo más frecuente corresponde al TPMT*2. En Japón e India el alelo más frecuente corresponde al TPMT*3C.^{9,10,26} En Rusia el TPMT*3A se ha documentado como el más frecuente.²⁴

En México Taja Ch y cols. Determinaron la frecuencia de los polimorfismos alélicos de la TPMT, siendo el más frecuente el TPMT*3A (4.4%), TPMT*3B(1.7%), TPMT*3C (1.7%). De 39 pacientes mayores de 18 años con leucemia linfoblástica aguda, 22 fueron tratados con tiopurinas, y 5 de 10 con polimorfismo funcional desarrollaron toxicidad hematológica (4 moderado, 1 severa).²⁷

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La actividad enzimática disminuida de la TPMT da lugar a un aumento de metabolitos activos, produciendo mayor actividad farmacológica, pero también un mayor riesgo de efectos adversos como la mielosupresión severa. En México la información es limitada, hasta la fecha sólo hay dos estudios publicados sobre el tipo y frecuencias de las variantes alélicas del gen de la enzima TPMT, pero no existe ningún estudio publicado que analice la influencia de los polimorfismos de esta enzima en la toxicidad a 6-Mercaptopurina en pacientes mexicanos. Esta información es relevante en el tratamiento de las leucemias linfoblásticas agudas, ya que la 6 Mercaptopurina es parte del mantenimiento.

JUSTIFICACIÓN

El análisis de los polimorfismos del gen que codifica para la enzima tiopurina S metiltransferasa, enzima clave en el metabolismo de la 6-Mercaptopurina, es de gran importancia debido a que se asocian con una alteración en la actividad enzimática y aumento en la resistencia al fármaco. En México solo se han realizado dos estudios en poblaciones de adultos, con un número de muestra pequeño y no en todos los casos en pacientes con leucemia linfoblástica aguda, sin relacionar genotipo con toxicidad.

El genotipo de TPMT debe de ser estudiado de manera rutinaria en todos los pacientes con leucemia linfoblástica aguda para individualizar el tratamiento y evitar toxicidad grave, además de la relevancia de conocer las variantes alélicas de la TPMT en nuestra población pediátrica.

Este trabajo será el primero en realizarse en población pediátrica mexicana con leucemia linfoblástica aguda asociando con el polimorfismo del gen TPMT con la toxicidad a 6 mercaptopurina. Los resultados obtenidos serán la base para determinar biomarcadores genéticos de riesgo a toxicidad al tratamiento con mercaptopurina.

Al conocer esta información se podrá introducir como parte de la evaluación diagnóstica inicial y así ser el primer centro de Oncología pediátrica en México que la utilice, permitiendo al oncólogo pediatra ofrecer una terapia individualizada a los niños y adolescentes con leucemia linfoblástica aguda, con el fin de modificar la morbilidad y la supervivencia de estos pacientes.

OBJETIVOS

General

- Determinar las frecuencias de las variantes alélicas del gen TPMT en población pediátrica mexicana con leucemia linfoblástica aguda, para poder

evaluar la asociación entre dichas variantes del gen TPMT y el grado de toxicidad a 6 Mercaptopurina.

Particulares

- Obtener las frecuencias de las variantes del gen TPMT y su distribución en un grupo de pacientes pediátricos con LAL
- Determinar los genotipos del gen TPMT y su distribución en un grupo de pacientes pediátricos con LAL
- Establecer la asociación entre las variantes del gen TPMT estudiadas y la toxicidad a 6-Mercaptopurina en un grupo de pacientes pediátricos con LAL tratados con 6-MP.

HIPÓTESIS.

Los pacientes con la variante TPMT*3A del gen TPMT presentaran mayor grado de toxicidad al tratamiento en comparación con aquellos con el genotipo silvestre.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Observacional, ambispectivo, analítico.

Cálculo de la muestra

En México, no existen datos publicados acerca de la relación entre variantes genéticas del gen TPMT y la toxicidad, por lo que utilizamos los datos reportados del genotipo TPMT de toxicidad hematológica para el polimorfismo TPMT 3 en población caucásica debido a que es una de las variantes más frecuentes que se asocia a toxicidad. Empleando una fórmula para estimación de riesgo relativo se obtuvo una muestra de 47 casos, sin embargo para aumentar la sensibilidad del estudio incrementamos la cifra, incluyendo a un total de 141 pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda.

$$n = z^2 \frac{(1-P_1)/P_1 + (1-P_2)/P_2}{1-\alpha/2 \cdot (\ln(1-\epsilon))^2}$$

$$n = \frac{1.96 (1-0.65) / 0.65 + (1-0.26)/0.26}{(\ln (1- 0.5))^2} = 46.74 = 47$$

Donde:

$Z_{1-\alpha/2} = 1.96$

P_1 = Proporción de expuestos al factor de estudio que presentaron el evento de interés = 0.65

P_2 = La proporción de no expuestos que presentaron ese mismo evento = 0.26

Nivel de confianza o seguridad = 0.99

Precisión relativa = 0.5

Criterios de selección

Criterios inclusión

- Edad menor de 18 años
- Cualquier sexo
- Diagnóstico de LAL establecido por al menos dos de tres criterios (morfología de acuerdo a la FAB, inmunofenotipo y citogenética)
- Tratados con el esquema de tratamiento vigente en el Servicio de Oncología del HIMFG (protocolo HIM-2003) Anexo 1
- Encontrarse en fase de mantenimiento o en vigilancia
- Haber recibido 6-Mercaptopurina por al menos 6 meses.

Criterios de exclusión.

- Muestra insuficiente (Cuando la cantidad de DNA extraída no permita la realización de todas las pruebas necesarias para el estudio)

Criterios de eliminación

- Abandono voluntario del tratamiento antes de que la toxicidad a 6 Mercaptopurina pueda ser evaluada.

Procedimientos

Recolección de la muestra

A cada paciente participante se trató conforme al protocolo para Leucemia Linfoblástica Aguda para riesgo habitual y alto riesgo HIM 2003 vigente en el

Departamento de Hemato Oncología del Hospital Infantil de México, Federico Gómez. (Anexo 1)

Se determinó el genotipo en eritrocitos por lo que se obtuvo la muestra de sangre (2ml).

Metodología Experimental

La extracción del DNA se realizó por el método de columna, las células se lisan incubándolas con la solución de lisis, el producto de la lisis se incubará en proteinasa K. Posteriormente se agregó etanol absoluto volumen a volumen, se homogeneizó y se pasó a través de la columna y por centrifugación se obtuvo el DNA.

Los alelos que se buscaron fueron el TPMT1 que corresponde al alelo silvestre. TPMT2 que corresponde a una transversión G238C, TPMT3A que contiene 2 transiciones G460A y A719G, TPMT3B en el que se observó la transición G40A y TPMT3C con una sola transición A 719G.

La identificación de alelos de ge TPMT se realizó mediante metodologías de PCR FLP y PCR alelo específica. Estos análisis utilizan pares de iniciadores que incluyen secuencias intrónicas y exónicas para asegurar la amplificación del gen TPMT y no de un pseudogen. Tabla 2.

SNP	Iniciador	Secuencia	Producto de la amplificación
G238C	P238W	5'GTA TGA TTT TAT GCA GGT TTG3 C3'	256
	P238C	5'TAA ATA GGA ACC ATC GGA CAC3'	
G238C	P238M	5'GTA TGA TTT TAT GCA GGT TTC 3'	256
	P238C	5'TAA ATA GGA ACC ATC GGA CAC3'	
G460A	P460F	5'ATA ACA GAG TGG GGA GGC TGC3'	365
	P460R	5'CTA GAA CCC AGA AAA AGT ATAG3'	
A719G	P719R	5'TGT TGG GAT TAC AGG TGT GAG CCA C 3'	236

Tabla 2.

Evaluación de la toxicidad

- La toxicidad fue evaluada con base en el sistema de toxicidad de la OMS (ver anexo 2)
- Se tomó en cuenta que la 6-MP hubiera sido administrada en las dos semanas previas al evento de toxicidad

Análisis estadístico

Para la presentación de la primera parte de los resultados, que es lo que comprende esta tesis, se realizó estadística descriptiva de los datos obtenidos empleando frecuencias simples y relativas de las variables categóricas con medias, medianas y rangos para las variables numéricas.

En una segunda fase de análisis se determinará la asociación entre el genotipo del gen TPMT identificado en cada paciente y el grado de toxicidad a 6-MP. Se obtendrán las razones de momios empleando intervalos de confianza al 95% para evaluar el riesgo de complicaciones y la necesidad de reducción de dosis entre los individuos con diferentes genotipos de TPMT y estratificando por grupo de riesgo.

CONSIDERACIONES ÈTICAS

Este estudio se realizó de conformidad con los principios que establece la 18ª Asamblea Médica Mundial (Helsinki, 1964) y todas las modificaciones aplicables establecidas por las Asambleas Médicas Mundiales y los lineamientos ICH para la Buena Práctica Clínica (GCP).

Es un estudio con riesgo mínimo debido a que en una sola ocasión se tomó de rango de edad de 2 ml de sangre periférica de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda de 0 a 18 años. Esta toma no alteró el tratamiento.

CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD

En el presente estudio, la toma de muestra se realizó en el área de hospitalización oncológica y fue procesada en el laboratorio de oncología de Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Los desechos biológicos fueron tratados y eliminados de acuerdo al manual de procedimientos del laboratorio. Los desechos fueron eliminados en los contenedores específicos de acuerdo al tipo de desecho, y recolectados por el área de control de medio ambiente del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

RESULTADOS

Población Estudiada

Se recolectaron muestras para la extracción de DNA en 144 pacientes con diagnóstico de LAL tratados en el Servicio de Oncología en el periodo comprendido de enero 2008 a diciembre 2010, de ellos se eliminaron 3 casos por abandono antes de haber cumplido 6 meses de tratamiento con 6-MP.

De los 141 pacientes incluidos para el análisis 85 (60.2%) fueron masculinos y 56 (39.7%) femeninos, el rango de edad al diagnóstico fue de 6 meses a 192 meses, con una mediana de 58 meses y un promedio de 70 meses. De los pacientes incluidos 106 (75.1%) fueron catalogados como de alto riesgo y 35 (24.8%) como de bajo riesgo. La tabla 3 describe las características generales de estos 141 pacientes.

Edad media al diagnóstico	Pacientes	
Género		
Femenino	56	39.7%
Masculino	85	60.2%
Riesgo		
Alto	106	75.1%
Bajo	35	24.8%
Morfología		
L ₁	66	46.8%
L ₂	75	53.1%
Inmunofenotipo		
PreB	93	65.9%
T	31	21.9%
Bifenotipia	2	1.4%
No cuenta estudio	15	10.6%

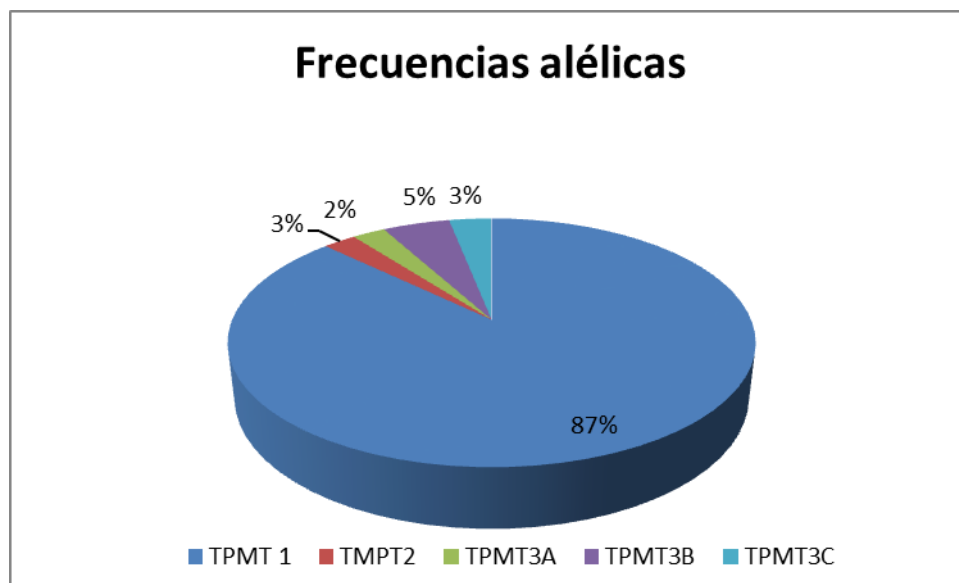
Tabla 3. Características generales de los 141 pacientes incluidos

De los 141 pacientes incluidos en el análisis 37 (26.2%) presentaron recaídas, 4 (2.8%) fueron tempranas y 33 (23.4%) tardías acorde a los criterios de Saint Jude, de las que se presentaron 24 (17%) fueron hematológicas, 10 (7.0%) aisladas a Sistema Nervioso Central, una aislada a testículo y 2 combinadas a Sistema nervioso central y médula ósea.

Se presentaron 12 (8.5%) defunciones en todo el grupo, de ellas 8 fueron por toxicidad y 5 por progresión de la leucemia. Una de las muertes por toxicidad podría ser atribuible a 6-MP.

Frecuencias alélicas y Genotipos del gen TPMT

Las frecuencias alélicas del gen TPMT fueron: TPMT-1 245 (86.8%), TPMT-2 7 (2.4%), TPMT-3A 7 (2.4%), TPMT-3B 14 (4.9%) y TPMT-3C 9 (3.1%), lo que representa un X% de alelos variantes en todo el grupo de 141 pacientes.



De los 141 casos incluidos, 104 (73.8%) fueron homocigotos silvestres, 37 (26.2%) heterocigotos para alguna variante y no encontramos ningún homocigoto para dos variantes.

Toxicidad por 6-Mercaptopurina

De los pacientes heterocigotos para alguna variante 8 pacientes (5.6%) desarrollaron al menos un evento de toxicidad infecciosa grados 3 ó 4 de la OMS acompañados de toxicidad hematológica y 2 mas tuvieron toxicidad hematológica grados 3 o 4, sin toxicidad infecciosa grave, pero que condicionaron interrupciones prolongadas en el tratamiento debido mielosupresión persistente condicionando recaída en 1 de ellos.

La toxicidad hematológica Grado 2 se encontró en este grupo en 13 pacientes (9.2%) de los cuales 4 tuvieron interrupciones prolongadas debido a mielosupresión persistente, sin presentar recaída hasta el momento.

Relación entre Toxicidad y Genotipo

Las variantes que se asociaron a toxicidad fueron TPMT2 3(42.8%), TPMT3A 2 (28.5%) y TPMT3B 4 (28.5%). No hubo ningún caso de toxicidad entre los 9 pacientes portadores de la variante TPMT3C.

De acuerdo con lo anterior, 10 (27%) de los pacientes heterocigotos desarrollaron toxicidad grave, sin embargo sólo en 8% de ellos (3/11) se realizaron reducciones en las dosis de 6 MP. Las reducciones de dosis fueron de 25% en un caso, del 50% en otro y un paciente requirió reducción del 75% de la dosis de 6-MP

Impacto del la Toxicidad a 6-MP en los Eventos de Recaída y Muerte

De los pacientes heterocigotos 6 (16.2%) tuvieron atrasos prolongados y 1 presentó recaída tardía por ello.

Pacientes heterocigotos que murieron por toxicidad por 6 MP 1 se puede atribuir a la misma consecuencia de mielosupresión y complicaciones infecciosas.

DISCUSIÓN

El análisis de los polimorfismos del gen TPMT es importante en la evaluación de pacientes que requieren tiopurinas como parte del tratamiento y representa uno de los mejores ejemplos de la aplicación clínica que tienen los estudios de farmacogenética. En algunos centros este análisis se realiza de manera rutinaria con el fin de individualizar las dosis de estos medicamentos.

La variación individual en la capacidad de S-metilación de la enzima TPMT, está determinada por el genotipo que resulta de los alelos paterno y materno que cada individuo hereda (homocigoto silvestre, heterocigoto u homocigoto variante)⁴⁰. Estudios *in vitro* han demostrado que cuando la variante TPMT*2 se presenta en forma heterocigota, la capacidad enzimática de la TPMT disminuye 100 veces³⁸ y cuando existe homocigocidad para la variante TPMT*3A, hay una pérdida total de la actividad enzimática⁴⁴. La disminución o pérdida de esta actividad da lugar a un aumento en los metabolitos activos de tiopurinas, incrementando la acción farmacológica y los efectos adversos de estos medicamentos.

Están bien demostradas las diferencias en la frecuencia de las variantes del gen entre grupos étnicos. En población caucásica, el alelo TPMT*3A tiene una frecuencia de 3.2-5.7%, el TPMT*3C se presenta en 0.2-0.8% y el TPMT*2 en 0.2-0.5%, y la frecuencia de la variante TPMT*3B no ha sido evaluada en la mayoría de las series que analizan a este tipo de población. Estudios realizados en latinoamérica muestran una mayor frecuencia de alelo TPMT*3A en sujetos de Argentina⁴¹, Colombia⁴² y Bolivia⁴³. En Brasil las variantes TPMT*2 y TPMT*3C son las más comunes^{18, 19}. En población asiática, la variante TPMT*3C es la más frecuente⁴⁶. Kapoor en la India analizó 25 pacientes con LAL, encontrando 4.1% de heterocigotos para el alelo TPMT*3C, ningún caso portaba el alelo TPMT*3A y no identificó homocigotos variantes⁴⁷.

En México la información publicada sobre el tipo y frecuencias de las variantes alélicas del gen de la enzima TPMT se limita a dos estudios. Taja-Chaveb publicó en 2008 el primer análisis de polimorfismos de este gen en población mexicana²², se estudiaron 39 pacientes adultos, 38 de ellos con LAL y uno con colitis ulcerativa crónica, además de 108 voluntarios sanos; las variantes fueron identificadas mediante DHPLC (*denaturing high performance liquid chromatography*). De sus resultados, que se detallan en la tabla 4, resalta la mayor frecuencia del alelo TPMT*3A, pero también la diversidad de alelos variantes y el hallazgo de porcentajes 2 a 3 veces más altos para las variantes TPMT*2, *3A y *3C en el grupo de pacientes con LAL, aunque hay que tomar en cuenta que el número de individuos en este último grupo fue reducido. El segundo trabajo, publicado por González del Ángel en 2009 fue realizado con DNA extraído de gotas de sangre seca colectadas en papel filtro, obtenidas de 360 recién nacidos del Distrito Federal y sugiere que aproximadamente 1 de cada 180 personas nacidas en la Ciudad de México podría tener actividad enzimática de TPMT baja o indetectable,

en este estudio se encontró también predominio de la variante TPMT*3A, con porcentajes menores al 1% para las otras tres variantes⁴⁸.

Hacemos énfasis en el hecho de que nuestro estudio representa un análisis descriptivo de base hospitalaria que no pretende en este momento hacer ninguna correlación clínica.

Analizamos a un grupo heterogéneo de neoplasias malignas pediátricas, que en su mayoría son leucemias agudas, y decidimos mostrar también los datos de los tumores sólidos, ya que en una pequeña muestra aleatoria de 9 pacientes encontramos un caso homocigoto para dos variantes de TPMT.

En esta serie encontramos una elevada frecuencia de individuos portadores de alelos variantes, con mayor frecuencia del alelo TPMT*3B y porcentajes altos para las cuatro variantes analizadas. Lo anterior contrasta con lo descrito en poblaciones caucásicas, asiáticas o africanas en las que existe claro predominio de alguna variante y en ninguna de ellas se reporta mayor frecuencia de la variante TPMT*3B, aunque como se puede observar en la tabla 4, el alelo TPMT*3B no fue determinado en muchas de las series que reportan las frecuencias en distintos grupos étnicos^{40, 43, 27, 48-51}.

La serie que muestra mayor semejanza con nuestros hallazgos en lo que respecta a la frecuencia y diversidad de variantes alélicas, corresponde al estudio realizado en el Instituto Nacional de Cancerología de México. El INCan, al igual que nuestro hospital es un centro de referencia que recibe a pacientes de todo el país y eso puede explicar en parte la diversidad de variantes. Es de notar que en el grupo de voluntarios sanos el alelo TPMT*3B se encontró en 2.3% de los casos, siendo el segundo en frecuencia, esta es una proporción considerablemente más alta a la encontrada en la mayoría de las series, que reportan por lo general menos del 1% de esta variante. Además de estas series mexicanas, hay dos estudios españoles que encontraron más 1% de este alelo; uno de ellos realizado en 44 pacientes con LAL en el que se encontraron 9% de heterocigotos para el gen TPMT, dos casos portaban el alelo TPMT*2 (4.5%) uno el TPMT*3B (2.27%) y uno el TPMT*3C⁵²; en el otro estudio se analizaron 276 españoles identificando 4 casos (1.45%) del alelo TPMT*3B⁴⁹. Aunque son pocos los estudios sobre frecuencias alélicas hasta ahora realizados en México, es posible que el alelo TPMT*3B sea más frecuente en población mexicana que en otras poblaciones, de ser así, sería interesante identificar si esta diferencia se limita a algún subgrupo étnico.

La población mexicana es étnicamente heterogénea, se compone de individuos de diferentes orígenes y aunque la mayor parte es mestiza, resultado de la mezcla de indígenas y españoles, también hay población caucásica, asiática y afromexicana cuya distribución se relaciona en parte con el lugar de origen. Los pacientes que estudiamos proceden de diversos estados del país y esto puede explicar al menos parcialmente la elevada frecuencia encontrada para las distintas variantes. Esta distribución de alelos variantes no sigue ningún patrón de los reportados en estudios previos, de hecho no hubo claro predominio de ninguna variante y la

diferencia entre algunas de ellas fue de uno a dos casos. Sin embargo creemos que estos datos deben tomarse en cuenta cuando se estudie el genotipo de la enzima TPMT en pacientes mexicanos, y más aun si se trata de un centro de referencia nacional como el Hospital Infantil de México.

Es importante considerar también que la frecuencia de genotipos variantes encontrada en este grupo de pacientes pediátricos con cáncer, de los cuales la gran mayoría corresponde a leucemias agudas, hace manifiesta la importancia de implementar esta prueba diagnóstica, ya que los protocolos nacionales mexicanos del Seguro Popular para el tratamiento de cáncer en niños incluyen el uso de 6-mercaptopurina, tanto para LAL como para LAM, además de que estas leucemias juntas representan en México más del 40% de todas las neoplasias malignas de la edad pediátrica^{53-54,4}. A pesar de lo anterior, no existen en México centros que atiendan a niños con cáncer en donde se realice el análisis rutinario de los polimorfismos del gen TPMT.

Ante la falta del recurso diagnóstico para determinar el genotipo de TPMT, está justificado ajustar la dosis de 6-MP cuando el paciente presenta toxicidad grados 3 ó 4 atribuible a este medicamento. Sin embargo, muchas veces no es posible asegurar que la toxicidad se debe a la 6-MP, ya que los pacientes reciben poliquimioterapia y no se puede tampoco asumir que es debida a genotipos variantes del gen TPMT. Una práctica frecuente es disminuir en 25% la dosis de más de un fármaco y esta reducción no elimina el riesgo de toxicidad grave a 6-MP en pacientes TPMT-deficientes. Siempre que se haga una reducción en la dosis de 6-MP hay que tener presente que esta acción puede dar lugar a bajas concentraciones intracelulares de TGNs, condicionando menor efectividad del fármaco y aumentando el riesgo de recaídas, además de que el uso de dosis subterapéuticas puede explicar al menos en parte el desarrollo de resistencia a agentes antineoplásicos. Hay que considerar también que pueden ser varios los factores que determinan toxicidad a 6MP, incluyendo la disminución en la tasa de excreción, la interacción del medicamento con otros fármacos, o polimorfismos en distintas proteínas que participan en su metabolismo o transporte.

En nuestro estudio en base a los resultados descritos tenemos una incidencia mayor de pacientes heterocigotos (26.6%) en comparación con lo descrito en otras series que van de 10 a 12%. Sin embargo a pesar de esto solo 8% requirió reducciones en la dosis de la 6 MP por lo que es controversial.

La identificación del genotipo de TPMT es un elemento objetivo que permite definir las dosis de tiopurinas de manera individualizada aun antes de iniciar el tratamiento. Esto reduciría el riesgo de toxicidad hematológica grave y modificaría de forma favorable la morbilidad y la supervivencia de los pacientes que requieren estos fármacos.

Las técnicas de PCR-RFLP y PCR-alelo específica son relativamente sencillas y no conllevan un costo elevado. En muchos centros de países desarrollados, la búsqueda de polimorfismos génicos empleando métodos basados en PCR ha caído en desuso, debido a la introducción de tecnologías para la secuenciación de

ADN, pero es innegable que las técnicas de PCR pueden ser fácilmente implementadas y ampliamente aplicadas a un bajo costo en centros que cuenten con un laboratorio básico de biología molecular.

CONCLUSIONES

- El polimorfismo genético de la TPMT representa el ejemplo del impacto potencial de la farmacogenética en la medicina.
- Se concluye que la individualización de la terapia con estos agentes es controversial.
- Las tiopurinas, tienen múltiples vías de transformación, sin embargo, a lo largo de la historia se ha destacado que el polimorfismo genético de la S metilación catalizado por la TPMT es el factor más importante responsable de la variación en el metabolismo, toxicidad y eficacia terapéutica.
- Este constituye el primer estudio que provee datos de la frecuencia de las variantes de TPMT en la población mexicana pediátrica con Leucemia Linfoblástica aguda y su asociación a toxicidad.
- En cuanto a la toxicidad pudimos corroborar que el 8% de los pacientes con polimorfismos del gen TPMT cursaban con toxicidad grave, pero no hubo consistencia entre la presencia del polimorfismo y la toxicidad grave a 6-Mercaptopurina

BIBLIOGRAFIA

1. Pui C-H, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998; 339: 605-15.
2. Mejía-Aranguré JM, Bonilla M, Lorenzana R, et. Al. *Incidence of leukemias in children from El Salvador and Mexico City between 1996 and 2000: Population-based data.* *BMC Cancer* 2005, 5:33
3. *Principales causas de mortalidad en edad preescolar y escolar (de 1 a 4 años).* SINAIS, 2008
4. Medina Sanson et al. *Pediatric Oncology at Hospital Infantil de México: fifty five years of accomplishment.* *Pediatr Hematol Oncol.* 2002; 19:383-387.
5. Pui CH, Sandlund JT, Pei D, et al. *Results of therapy for acute lymphoblastic leukemia in black and white children.* *JAMA.* 2003; 290: 2001–2007.
6. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, et al. *improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group.* *Blood.* 2000; 95: 3310–3322.
7. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, et al. *Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01.* *Blood.* 2001; 97:1211–1218.
8. Rubnitz JE, Lensing S, Zhou Y, et al. *Death during Induction Therapy and First Remission of Acute Leukemia in Childhood, the St. Jude Experience.* *Cancer* 2004; 101; 1677-1684.
9. Sasaki T, Goto E, Konno Y, et al. *Three novel single nucleotide polymorphisms of the human thiopurine S Metyltransferase gene in Japanese individuals.* *Drug. Metab. Pharmacoinet.* 2006;21: 332-336.
10. Pavlovic T, et al. *TPMT gene polymorphisms: On the doorstep of personalized medicine.* *Indian. J. Med.* 2009: 478-480
11. Yi HY, Fessing MY, Pui CH, et al. *Polymorphism of the thiopurine S methyltransferase gene in African Americans.* *Human molecular genetics.* 1999;8:371-376.
12. Srimartpiron S, Tassaneeyakui W, et al. *Thiopurine S metyltransferase genetic polymorphism in the Thai population.* *British Journal of Clinical Pharmacology.* 2004; 58: 66-70.
13. Sandman. *Multiple Thiopurine S Methyltransferase variation detection: A step toward personalized medicine.* *Clinical Chemistry.* 2008;54: 1598-1599.
14. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ. *Pediatric acute lymphoblastic leukemia.* *Am Soc Hematol Educ Program.* 2003;102-131.
15. Hawwa A, Millership J, Collier P, et al. *Pharmacogenomic studies of the anticancer and immunosuppressive thiopurines mercaptopurine and azathioprine.* *Br J Clin Pharmacol.* 2008; 66:4; 517-528.
16. Relling M, Pui CH, Cheng Ch, et al. *Thiopurine methyltransferase in acute lymphoblastic leukemia.* *Blood.* 2006;107:843-844.
17. Ameyaw M, Collie E, Powrie R, et al. *Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanian populations.* *Human molecular genetics.* 1999;8:367-370.

18. Tai H, Krynetski E, Yates Ch, 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. Genetic. 1996; 58:694-702.
19. Weinshilboum R. *Thiopurine pharmacogenetics: Clinical and molecular studies of Thiopurine methyltransferase*. Drug metabolism and disposition. 2001; 29: 601-605.
20. Sahasranaman S, Howard D, Roy S. *Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines*. Eur J Clin Pharmacol. 2008; 64:753-767.
21. Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, et al. *Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S methyltransferase locus*. J Natl Cancer Inst. 1999;91: 2001-2008.
22. Jacqz AE, Bessa E, Medard Y, et al. *Thiopurine methyltransferase activity in a French population: hplc assay conditions and effects of drugs and inhibitors*. Br J Clin Pharmacol. 1994;38:1-8.
23. Wu H, Hortn J, Battaile K, et al. *Structural basis of allele variation of human thiopurine S Methyltransferase*. PMS. 2009;67:198-208.
24. Samochatova E, Chupova N, Rudneva A, et al. *TPMT genetic variations in populations of the Russian federation*. Pediatr Blood Cancer. 2009;52:203-208.
25. Wang L, Pelleymounter , Weinshilboum R, et al. *Very important pharmacogene summary: thiopurine S methyltransferase*. Pharmacogenet Genomics. 2010; 20:401-405.
26. Álvarez L, Venegas M, Larrondo M, et al. *Thiopurine S methyltransferase gene polymorphism in Chilean blood donors*. Rev Med Chile. 2009;137:185-192.
27. Taja Ch, Vidal M, 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.
28. Relling MV, Hancock ML, Boyett JM, Evans WE, et al. *Prognostic importance of 6-Mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia*. Blood 1999; 93: 2817-2823
29. McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE. *Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2000; 14: 567-572
30. McLeod HL, Coulthards S, Thomas AE, Richards SM, et al. *Analysis of thiopurine methyltransferase variant alleles in childhood acute lymphoblastic leukemia*. British Journal Haematol, 1999; 105:696-700.
31. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. *Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukemia*. Lancet, 1990; 336: 225-229
32. Weinshilboum R. *Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase*. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2001; 29: 601-605.
33. Seki T, Tanaka T, Nakamura Y. *Genomic structure and multiple single-nucleotide polymorphisms (SNP's) of the thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene*. Journal Human Genetic, 2000;45:299-302

34. Coulthard SA, Howell C, Robson J, Hall AG. The relationship between Thiopurine Methyltransferase activity and genotype in blasts from patients with acute leukemia. *Blood* 1998; 92: 2856-62.
35. Schaeffler E, Zanger UM, Eichelbaum M, et al. Highly Multiplexed Genotyping of Thiopurine S-Methyltransferase Variants Using MALDI-TOF Mass Spectrometry: Reliable Genotyping in Different Ethnic Groups. *Clin Chem* 2008; 54: 1637-47.
36. Shufeng Z. Clinical Pharmacogenomics of Thiopurine S-methyltransferase. *Current Clinical Pharmacology*, 2006;1: 119-128
37. Stocco G, Cheek MH, Relling MV, Evans WE, et al. Genetic polymorphism of Inosine Triphosphate Pyrophosphatase is a determinant of Mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Pharmacol Ther*, 2009;85(2): 164-172.
38. Krynetski EY, Schutz JD, Gapin AJ, Evans WE, et al. A single mutation leading to loss of catalytic in human thiopurine s-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 949-53.
39. Schaeffler E, Fischer C, Brockmeier D, Schwab M, 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.
40. Yates CR, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE, et al. Molecular diagnosis of Thiopurine S-methyltransferase deficiency: Genetic basis for Azathioprine and Mercaptopurine intolerance. *Annals of internal medicine*, 1997;126:608-614.
41. Larovere LE, de Kremer RD, Lambooy LH, de Abreu RA. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase in Argentina. *Ann Clin Biochem* 2003;40:388-93.
42. Isaza C, Henao J, López AM, Cacabelos R. Allelic variants of the thiopurine methyltransferase (TPMT) gene in the Colombian population. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2003;25:423-9.
43. Lu HE, Sum MC, Hsuen SC, Chang JG, et al. Molecular analysis of the thiopurine S-methyltransferase alleles in Bolivians and Tibetans *Journal Clinical Pharmacology Therapy* 2005; 30: 491-6.
44. Boson WL, Romano-Silva MA, Correa H, Marco DL, et al. Thiopurine methyltransferase polymorphisms in a Brazilian population. *The Pharmacogenomics Journal*, 2003; 3: 178-182.
45. Reis M, Santoro A, Suarez-Kurtz G. Thiopurine methyltransferase phenotypes and genotypes in Brazilians. *Pharmacogenetics* 2003;13:371-3.
46. Qian Cao, Qin Zhu, Yan Shang, Min Gao, Jianmin Si. Thiopurine Methyltransferase Gene Polymorphisms in Chinese patients with inflammatory Bowel Disease. *International Journal Gastroenterology*, 2009; 79:58-63.
47. Kapoor G, Maitra A, Somalata and Brahmachari. Application of SNaPshot for analysis of thiopurine methyltransferase. *Indian J. Med Res* 2009; 129:0500-505.
48. Gonzalez del Angel, Bermudes-Lopez C, Alcantara-ortigoza MA, Torres-Espindola L, et al. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) genetic

- polymorphisms in Mexican newborns. *Journal Clinical Pharm Ther*, 2009; 34(6):703-708.
49. Corominas H, Doménech M, del Río E, Baiget M. Frecuencia y distribución de las variantes alélicas del gen de la tiopurina s-metiltransferasa en distintos grupos étnicos españoles. *Medical Clinical (Barcelona)* 2006; 126 (11): 410-2.
 50. McLeod HL, Pritchard SC, Githanga J, Collie-Duguid ESR, et al. Ethnic differences in thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: evidence for allele specificity in Caucasian and Kenyan subjects. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 773-776.
 51. Collie-Duguid ESR, Prichard SC, Powrie RH, McLeod HL, et al. The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 37-42.
 52. Badell, Baiget ME, Fernández-delgado R, Bure E, et al. Toxicidad en el tratamiento de mantenimiento del protocolo LAL/SHOP-2005. Estudio farmacogenético preliminary, *Anales de pediatría*, 2007; 4: 442-443.
 53. Fajardo-Gutiérrez A, Juárez-Ocaña S, González-Miranda G, Mejía-Aranguré et al. Incidence of cancer in children residing in ten jurisdictions of the Mexican Republic: importance of the Cancer registry (a population-based study). *BioMed Central Cancer* 2007;7:68.
 54. Juárez-Ocaña S, González Miranda G, Mejía Aranguré JM, Fajardo-Gutiérrez A. Frequency of cancer in children residing in Mexico City and treated in the hospitals of the Instituto Mexicano del Seguro Social (1996-2001). *BioMed Cancer* 2004,4:50.

ANEXO 1.- PROTOCOLO HIM 2003

EVALUACION INICIAL

Exámenes de laboratorio

A todos los pacientes con sospecha de LLA se les deberá realizar:

- Biometría Hemática completa con revisión del frotis de sangre periférica que deberá ser archivado en el laboratorio de oncología.
- Química Sanguínea: urea, creatinina, ácido úrico,
- Electrolitos séricos: sodio, potasio, calcio, fósforo, magnesio
- Función hepática: transaminasas (TGO, TGP), bilirrubinas, proteínas séricas
- Pruebas de coagulación: TP, TTP
- Otros: deshidrogenasa láctica, amilasa sérica, fosfatasa alcalina

Estudios de gabinete:

- Radiografía de tórax en proyecciones PA y lateral
- Ecocardiograma con determinación de fracción de eyección ventricular y fracción de acortamiento
- TC de cráneo cuando exista sospecha de Hipertensión o hemorragia intracraneanas o cuando se presenten crisis convulsivas

Toma y procesamiento de las muestras de Médula ósea

La punción de médula ósea deberá realizarse de acuerdo a la edad

- tuberosidad anterior de la tibia en menores de 3 meses
- cresta iliaca posterior: sitio de elección en la mayoría de los casos (la cresta iliaca posterior es alternativa en los casos de difícil toma)

Tomar tres muestras con diferentes jeringas

- La primera muestra debe ser de 0.2 a 0.3 ml. En todos los casos deberá teñirse con Wright, PAS.
- La segunda muestra se hará con jeringa de 10 ó 20 mL que contenga 1 mL de heparina y deberán aspirarse 5 mL. Esta muestra se empleará para anticuerpos monoclonales. El panel mínimo deberá incluir CD10, CD19, CD22, CD3, CD5, CD7, CD13, CD14, CD15, CD33.
- La obtención de tercera muestra se hará con heparina de la misma forma que la anterior para estudio citogenético y molecular.

Punción Lumbar

- Deberá realizarse en todos los casos en que se tenga la sospecha diagnóstica de LLA.

- Cuando se tenga certeza en el diagnóstico de LLA, podrá administrarse quimioterapia intratecal de acuerdo al esquema recomendado por edad (ver mas adelante)

El líquido obtenido de la punción lumbar diagnóstica deberá procesarse para citológico y citocentrífuga (para definir el Status SNC); en punciones subsecuentes podrá procesarse únicamente para citocentrífuga, a menos que se demuestre la presencia de blastos.

TRATAMIENTO

El tratamiento se divide en fases que tienen objetivos precisos:

Inducción a la Remisión: es la fase inicial del tratamiento que tiene como objetivo reducir 100 a 1000 veces (2 a 3 log) la carga leucémica, eliminando en lo posible las células con resistencia primaria. La remisión se ve reflejada en la desaparición clínica de enfermedad detectable, en la recuperación hematológica, en la disminución de los blastos en MO a menos de 5%, ausencia de blastos en el LCR y un nivel de enfermedad mínima residual detectable por PCR o citometría de flujo menor a 10^{-5} . Lo anterior puede ser logrado en 98% de los casos empleando una combinación de 4 a 6 medicamentos en un programa intensivo durante las primeras 4-6 semanas e incluye el uso de quimioterapia intratecal.

En este protocolo esta fase de tratamiento dura seis semanas. La primera semana incluye una ventana con esteroide que se emplea con el fin de evaluar la respuesta al medicamento como factor pronóstico, además de reducir las complicaciones metabólicas relacionadas con la carga leucémica que se presentan al iniciar quimioterapia. Las siguientes 3 semanas consisten en la combinación de Vincristina, Daunorrubicina, L-Asparaginasa y Prednisona y las últimas dos semanas de Intensificación de la Remisión incluyen Etoposido y Arabinosido de Citosina. En esta fase debe iniciarse el tratamiento presintomático al SNC.

Consolidación: esta fase sigue a la inducción y uno de sus principales objetivos es intensificar de manera temprana el tratamiento a sitios santuarios (principalmente sistema nervioso central y testículo), empleando altas dosis de antimetabolitos con intervalos de 1 a 2 semanas por 3 a 4 dosis. En este protocolo se emplearán altas dosis de Metotrexate a 2 ó 5 g/m² dependiendo del grupo de riesgo, inmunofenotipo y características citogenéticas, por tres dosis con intervalos de una semana.

Mantenimiento: el objetivo de esta fase es eliminar la enfermedad residual que persiste al final de la inducción y erradicar la clona leucémica. Esta fase debe contemplar el uso de tratamiento presintomático al SNC, una fase de reintensificación y esquemas de continuación dirigidos al grupo de riesgo.

EVALUACION DE LA RESPUESTA

Durante esta fase de tratamiento se realizará MO cada semana (días 0, 7, 14, 21, 28) y en los casos en que no se obtenga remisión al día 28 se hará una MO más en el día 35.

En los días 0 a 7 el paciente recibirá una ventana de esteroide, al término de la cual se determinará la respuesta al medicamento mediante BH y aspirado de MO, considerándose buena respuesta cuando haya menos de 1000 blastos absolutos en sangre periférica.

Respondedor temprano rápido: MO en M1 el día 14 (tomando como día 1 el día de inicio del esteroide)

Respondedor temprano: MO en M1 hasta el día 21

Respondedor Lento: MO en M1 hasta el día 35

FALLA A LA INDUCCION.

La MO del día 21 (14 de quimioterapia + 7 de esteroide) evalúa la falla en esta fase de tratamiento

MO en M2 o M3: agregar ciclofosfamida 300 mg/m² dosis/6 dosis.

LEUCEMIA EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Es necesario definir el status de la enfermedad en Sistema Nervioso Central (SNC) al diagnóstico

SNC1: ausencia de blastos

SNC2: < 5 leucocitos/ μ L con evidencia de blastos en el examen de citocentrífuga

SNC3: > 5 leucocitos/ μ L con evidencia de blastos en el examen de citocentrífuga o pares craneales afectados

INTENSIFICACION

Etopósido (VP-16): se administra a dosis de 300 mg/m² en infusión de 2 horas el día 28, iniciando con la 4a dosis de VCR) posteriormente cada 5 días por dos dosis mas, días 33 y 38.

Arabinósido de Citosina (Ara-C): se administra a dosis de 300 mg/m² en infusión de 4 horas el día 28, iniciando con la 4a dosis de VCR, posteriormente cada 5 días por dos dosis mas, días 33 y 38.

CONSOLIDACION

Inicia 10 días después de la 3a dosis de VP16+ Ara-C si el paciente se encuentra en condiciones.

Dosis de Metotrexate

2 gramos/m²: recibirán esta dosis todos los pacientes de bajo riesgo y 5 gramos/m²: está dosis será empleada sólo en esta fase de tratamiento en los siguientes casos:

- Respondedor tardío

- Leucemia meníngea al diagnóstico
- Infiltración primaria a testículos
- Leucemia de Células T
- Traslocación 9;22
- Traslocación 1;19
- Traslocación 4;11

**TERAPIA DE MANTENIMIENTO
RIESGO ALTO Y MUY ALTO***

Semana	Medicamentos
1	MTX + 6MP IT
2	MTX +AraC 300
3	VCR + ASP+Dexa
4	CF + Ara-C 300
5	MTX + 6MP IT
6	VCR + DNR
7	ADMTX
8	Reinducción I DNR + VCR + ASP(3)+Dexa
9	Reinducción I DNR + VCR + ASP(3)+Dexa
10	Reinducción I VCR + ASP(3)+Dexa
11	Reinducción I IT VCR +Dexa
12	ADMTX
13	ADMTX
14	ADMTX
15	6MP + MTX IT
16	Reinducción II DNR + VCR + ASP(3)+Dexa
17	Reinducción II DNR + VCR + ASP(3)+Dexa
18	Reinducción II VCR + ASP(3)+Dexa
19	Reinducción II VCR +Dexa IT
20	VP 16 + Ara-C300
21	VP 16 + Ara-C300
22	VP 16 + Ara-C300
23	MTX + 6MP IT
24	MTX +AraC600
25	VCR + ASP+Dexa
26	CF + Ara-C300
27	MTX + 6MP IT
28	VCR + DNR
29	ADMTX
30	MTX + 6MP
31	MTX +AraC600 IT
32	VCR + ASP+Dexa
33	CF + Ara-C300
34	MTX + 6MP
35	VCR + DNR IT
36	ADMTX
37	MTX + 6MP
38	MTX +AraC600
39	VCR+ ASP+Dexa IT
40	CF + Ara-C300

41	MTX + 6MP
42	VCR + DNR
43	ADMTX
44	MTX + 6MP IT
45	MTX +AraC600
46	VCR + ASP+Dexa
47	CF + Ara-C300
48	MTX + 6MP IT
49	VCR + DNR
50	ADMTX
51	MTX + 6MP
52	MTX +AraC600
53	VCR + ASP+Dexa
54	CF + Ara-C300
55	MTX + 6MP
56	VCR + Dexa
57	ADMTX
58	MTX + 6MP
59	MTX +AraC600
60	VCR + ASP+Dexa
61	CF + Ara-C300
62	MTX + 6MP
63	VCR + Dexa
64	ADMTX
65	MTX + 6MP
66	MTX +AraC600
67	VCR + ASP+Dexa
68	CF + Ara-C300
69	MTX + 6MP
70	VCR + Dexa
71	ADMTX
72	MTX + 6MP
73	MTX +AraC600
74	VCR + ASP+Dexa
75	CF + Ara-C300
76	MTX + 6MP
77	VCR + Dexa
78	ADMTX
79	MTX + 6MP
80	MTX +AraC600
81	6MP + MTX
82	6MP + MTX
83	6MP + MTX
84	VCR + Dexa
85	6MP + MTX
86	6MP + MTX
87	6MP + MTX
88	VCR + Dexa
89	6MP + MTX
90	6MP + MTX
91	6MP + MTX
92	VCR + Dexa
93	6MP + MTX
94	6MP + MTX

95	6MP + MTX
96	VCR + Dexa
97	6MP + MTX
98	6MP + MTX
99	6MP + MTX
100	VCR + Dexa
101	6MP + MTX
102	6MP + MTX
103	6MP + MTX
104	VCR + Dexa
105	6MP + MTX
106	6MP + MTX
107	6MP + MTX
108	VCR + Dexa
109	6MP + MTX
110	6MP + MTX
111	6MP + MTX
112	VCR + Dexa
113	6MP + MTX
114	6MP + MTX
115	6MP + MTX
116	VCR + Dexa
117	6MP + MTX
118	6MP + MTX
119	6MP + MTX
120	6MP + MTX

TERAPIA DE MANTENIMIENTO RIESGO ESTANDAR

Semana	Medicamentos
1	VCR+Dexa
2	6MP + MTX
3	6MP + MTX
4	6MP + MTX
5	VCR+Dexa
6	6MP + MTX
7	ADMTX (1)
8	Reinduction I DNR + VCR + ASP(3)+Dexa
9	Reinduction I DNR + VCR + ASP(3)+Dexa
10	Reinduction I VCR + ASP(3)+Dexa
11	Reinduction I IT VCR +Dexa
12	ADMTX (2)
13	ADMTX (3)
14	ADMTX (4)
15	6MP + MTX IT
16	Reinduction II DNR + VCR + ASP(3)+Dexa
17	Reinduction I DNR + VCR + ASP(3)+Dexa
18	Reinduction II VCR + ASP(3)+Dexa
19	Reinduction II VCR +Dexa IT

20	VP 16 + Ara-C300
21	VP 16 + Ara-C300
22	VP 16 + Ara-C300
23	6MP + MTX
24	ADMTX (5)
25	VCR+Dexa
26	6MP + MTX
27	6MP + MTX
28	6MP + MTX
29	VCR+Dexa
30	6MP + MTX
31	6MP + MTX
32	ADMTX (6)
33	VCR+Dexa
34	6MP + MTX
35	6MP + MTX
36	6MP + MTX
37	VCR+Dexa
38	6MP + MTX
39	6MP + MTX
40	ADMTX (7)
41	VCR+Dexa
42	6MP + MTX
43	6MP + MTX
44	6MP + MTX
45	VCR+Dexa
46	6MP + MTX
47	6MP + MTX
48	ADMTX (8)
49	VCR+Dexa
50	6MP + MTX
51	6MP + MTX
52	6MP + MTX
53	VCR+Dexa
54	6MP + MTX
55	6MP + MTX
56	6MP + MTX
57	VCR+Dexa
58	6MP + MTX
59	6MP + MTX
60	6MP + MTX
61	VCR+Dexa
62	6MP + MTX
63	6MP + MTX
64	6MP + MTX
65	VCR+Dexa
66	6MP + MTX
67	6MP + MTX
68	6MP + MTX
69	VCR+Dexa
70	6MP + MTX
71	6MP + MTX
72	6MP + MTX
73	VCR+Dexa

74	6MP + MTX
75	6MP + MTX
76	6MP + MTX
77	VCR+Dexa
78	6MP + MTX
79	6MP + MTX
80	6MP + MTX
81	VCR+Dexa
82	6MP + MTX
83	6MP + MTX
84	6MP + MTX
85	VCR+Dexa
86	6MP + MTX
87	6MP + MTX
88	6MP + MTX
89	VCR+Dexa
90	6MP + MTX
91	6MP + MTX
92	6MP + MTX
93	VCR+Dexa
94	6MP + MTX
95	6MP + MTX
96	6MP + MTX
97	VCR+Dexa
98	6MP + MTX
99	6MP + MTX
100	6MP + MTX
101	VCR+Dexa
102	6MP + MTX
103	6MP + MTX
104	6MP + MTX
105	VCR+Dexa
106	6MP + MTX
107	6MP + MTX
108	6MP + MTX
109	VCR+Dexa
110	6MP + MTX
111	6MP + MTX
112	6MP + MTX
113	VCR+Dexa
114	6MP + MTX
115	6MP + MTX
116	6MP + MTX
117	VCR+Dexa
118	6MP + MTX
119	6MP + MTX
120	6MP + MTX

