



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO C677T CON EL
GRADO DE TOXICIDAD SECUNDARIA AL USO DE
ALTAS DOSIS DE METOTREXATO EN UNA COHORTE
PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA:

DRA. GABRIELA ALICIA HERNÁNDEZ ECHÁURREGUI

DIRECTORA DE TESIS

DRA. AURORA MEDINA SANSON

ASESORES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

M.C. ARTURO RAMÍREZ PACHECO / M.C. SELENE MORENO GUERRERO

CIUDAD DE MÉXICO. FEBRERO 2017





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.

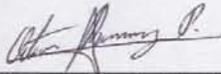
DRA. REBECA GÓMEZ CHICOVELASCO
DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

TUTOR DE TESIS

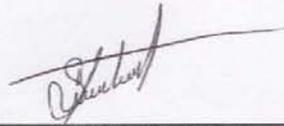


DRA. AURORA MEDINA SANSÓN
MEDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE ONCOLOGIA
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

ASESORES DE BIOLOGIA MOLECULAR



M. C. ARTURO RAMIREZ
PACHECO
LABORATORIO ONCOLOGIA



M. C. SELENE MORENO
GUERRERO
LABORATORIO ONCOLOGIA

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a mis padres Alicia y Andrés por orientar a sus hijas hacia profesiones intelectuales y que con sus enseñanzas siempre me alentaron a seguir adelante y a ser perseverante, gracias por su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos de mi vida, así como en las decisiones difíciles logrando que este sueño se hiciera realidad. A mi hermana Lucero que siempre ha estado a mi lado brindándome su apoyo.

A mi familia en general, en especial a mi abuelita Alicia y a mi tía Ana; porque siempre estuvieron apoyándome con su amor, su cariño, su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos a pesar de la distancia.

A mis compañeros y amigos presentes y pasados; quienes compartieron sus conocimientos, alegrías, tristezas y que hicieron de estos dos años una de las experiencias más especiales de mi vida.

A mis profesores que son un ejemplo a seguir, compartiendo sus conocimientos y proporcionando un cuidado excelente y de calidad a nuestros niños. En especial a la Dra. Aurora Medina que, como directora de esta tesis; me ha orientado, apoyado y corregido para mejorar mi desarrollo como profesional en salud.

Gracias.

INDICE

Introducción	1
Marco Teórico.....	2
Antecedentes.....	8
Planteamiento del Problema.....	10
Pregunta de Investigación	10
Justificación	11
Objetivos.....	11
Hipótesis.....	11
Métodos.....	12
Consideraciones Éticas	14
Plan de Análisis Estadístico.....	14
Descripción de Variables	14
Resultados.....	15
Discusión	17
Conclusiones	18
Limitación del Estudio.....	18
Cronograma de Actividades	19
Referencias Bibliográficas	20
Anexos.....	22

INTRODUCCION

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia más frecuente en la infancia, representa aproximadamente 30% de todos los casos de cáncer pediátrico, y el 75% de las leucemias en pediatría, con un pico de incidencia entre los 2 a 5 años. La etiología es incierta, sin embargo se describen factores predisponentes entre ellos genéticos, virales y ambientales. Las manifestaciones clínicas suelen ser la consecuencia de la ocupación de la médula ósea por blastos. El diagnóstico debe ser morfológico, citogenético y por biología molecular.

Los avances en el estudio y tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda en niños se citan usualmente como un paradigma del éxito en la actualidad. En general las tasas de curación en pacientes pediátricos con LLA han mejorado de cero en los años de 1940 hasta 75 a 85% actualmente. (19) Este éxito ha sido posible en gran medida debido al empleo de una terapia basada en el riesgo de falla al tratamiento. Esto permite que los pacientes con factores de buen pronóstico reciban un tratamiento menos intenso y se eviten complicaciones por toxicidad. Al contrario, los pacientes con factores adversos requieren de un tratamiento más intenso que puede aumentar su probabilidad de curación.

La última década se ha caracterizado por un progreso mínimo en las tasas de supervivencia, por ello el conocimiento de la patogénesis de la LLA y las bases de resistencia a la quimioterapia serán elementos que permitan ofrecer una terapia más individualizada y así continuar incrementando las tasas de supervivencia. (7)

La investigación ha permitido el desarrollo de agentes quimioterapéuticos activos, ha incrementado nuestro conocimiento de cómo dosificar y combinar estos fármacos con mayor efectividad y también ha mejorado el manejo de soporte en estos pacientes. El progreso en este campo está vinculado con la identificación de blancos moleculares y anormalidades genéticas en las células de leucemia así como un mejor entendimiento de las diferencias individuales en farmacogenética de los agentes antineoplásicos. (17)

Un objetivo a corto plazo es personalizar el tratamiento de la LLA, con el objetivo de ofrecer terapias dirigidas a las características individuales que mejoren la eficacia y disminuyan la toxicidad. (17)

Actualmente se ha integrado de forma rutinaria al tratamiento de la LLA el análisis de algunos polimorfismos que permiten identificar anticipadamente el riesgo de toxicidad al tratamiento o falla terapéutica. El análisis de los polimorfismos permite conocer características individuales de los pacientes que les confieren mayor susceptibilidad a los fármacos y mayor riesgo de toxicidad.

Dentro de los fármacos principales en el tratamiento de la LLA se encuentra el metotrexato. La MTHFR es una enzima clave del metabolismo del MTX y sus polimorfismos pueden modificar el efecto terapéutico del fármaco.

MARCO TEORICO

Epidemiología

La LLA es la neoplasia más frecuente en niños. Representa un cuarto de las neoplasias en niños y corresponde al 72% de todos los casos de leucemia en niños. Tiene una incidencia de 3 a 4 casos por 100 000 niños en Estados Unidos. El pico de incidencia ocurre entre los 2 y 5 años de edad. La incidencia de LLA en población hispana en Estados Unidos es discretamente mayor que en niños caucásicos y datos similares demuestran que cuentan con factores de mal pronóstico. La población hispana tiene menor porcentaje de casos que demuestren características de riesgo bajo además de contar con diferencias farmacogenéticas que disminuyen la eficacia de algunos de los fármacos utilizados más frecuentemente. (17)

Cuadro Clínico

Las principales manifestaciones corresponden a Síndrome anémico, la manifestación clínica más evidente es la palidez, astenia, adinamia, taquicardia. Síndrome hemorrágico, manifestado por petequias, púrpura y hemorragia. Síndrome febril, disminución del número de neutrófilos y mayor riesgo de procesos infecciosos. También se infiltran órganos extramedulares como linfadenopatías y hepatoesplenomegalia.

Diagnóstico

Los principales hallazgos de laboratorio son anemia arregenerativa normocítica normocrómica, trombocitopenia, leucocitosis o leucopenia, linfocitosis. Incremento del ácido úrico y DHL.

El diagnóstico de la LLA se sospecha con la clínica y se orienta con la citología hemática; sin embargo el diagnóstico definitivo es histopatológico y debe realizarse con aspirado de médula ósea. El diagnóstico se establece si se encuentra un porcentaje >25% de blastos linfoides.

Clasificación del Riesgo

Debe llevarse a cabo una evaluación minuciosa del riesgo de recaída en el momento del diagnóstico, de manera que los pacientes no sean sobretrotados o subtratados. La edad, el recuento de leucocitos, el Inmunofenotipo y el genotipo de las células leucémicas y la respuesta temprana al tratamiento de ventana esteroides son utilizados para la clasificación del riesgo. (20)

	Riesgo habitual	Alto Riesgo	Muy alto riesgo
Edad	>1 año y <10 años	<1año y >10 años	<1año y >10 años
Cuenta leucocitaria	< 50 mil	> 50 mil	> 50 mil
Inmunofenotipo	Pre B	T, bifenotipia coexpresión mieloide	T, bifenotipia, coexpresión mieloide
Translocaciones	t(12;21)	t(1;19), t(4;11)	t(9;22)
Respuesta a la ventana de esteroides	< 1000 blastos	> 1000 blastos	> 1000 blastos
Citorreducción	MO en M1 día 14	MO en M2 día 14	MO en M3 día 28

Tratamiento

El tratamiento se divide en fases con objetivos precisos. Inducción a la remisión. Es la fase inicial del tratamiento que tiene como objetivo reducir 100 a 1000 veces (2 a 3 logaritmos) la carga leucémica, eliminando en la medida de lo posible las células con resistencia primaria. La remisión se ve reflejada en la desaparición clínica de la enfermedad detectable, en la recuperación hematológica, en la disminución de los blastos en médula ósea a menos de 5%, ausencia de blastos en LCR y un nivel de enfermedad mínima residual detectable por PCR o citometría de flujo menor a 10^{-5} . Lo anterior puede lograrse en 98% de los casos mediante una combinación de cuatro a seis medicamentos en un programa intensivo, durante las primera cuatro a seis semanas e incluye el uso de quimioterapia intratecal. La primera semana incluye una ventana terapéutica con un esteroide que sirve para evaluar la respuesta al medicamento como factor pronóstico y reducir las complicaciones metabólicas relacionadas con la carga leucémica que se presentan al iniciar la quimioterapia. (20)

Consolidación. Uno de sus principales objetivos es intensificar de manera temprana el tratamiento a sitios santuarios (principalmente sistema nervioso central y testículos) administrando altas dosis de antimetabolitos con intervalos de una a dos semanas por tres a cuatro dosis. En pacientes de riesgo habitual se utilizan dosis de 2.5gm2/día y en pacientes de alto riesgo 5gm2/día. (20)

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 sistema nervioso central (SNC), fase de reinducción y el esquema de continuación. El tratamiento preseintomático al SNC tiene como objetivo reducir el número de recaídas a este sitio utilizando diferentes estrategias que incluyen la administración de triple quimioterapia intratecal así como altas dosis de metotrexato. (20)

El MTX es un agente quimioterapéutico que interrumpe el ciclo del ácido fólico, este actúa inhibiendo dos enzimas. Principalmente como análogo de folatos, el MTX es un potente inhibidor competitivo de la dihidrofolato reductasa. Esta enzima es responsable de convertir los folatos a tetrahidrofolatos, su forma activa, que son sustrato de la timidilato sintasa (TS). Después de esto, las formas poliglutamato del MTX inhiben directamente la TS. Posterior al tratamiento con MTX, las células no son capaces de sintetizar purinas y timidilato "de novo". Como resultado, se inhibe la síntesis de DNA. (15)

Las altas dosis de metotrexato (ADMTX) es parte fundamental del tratamiento en pacientes con LLA. El objetivo es alcanzar concentraciones citotóxicas en sitios santuario y eliminar clonas resistentes. Sin embargo, el MTX está asociado a toxicidad, incluyendo mucositis, mielosupresión, toxicidad gastrointestinal, toxicidad hepática, toxicidad hematológica y falla renal que puede resultar en la interrupción del tratamiento y subsecuentemente incrementar el riesgo de recaída. (1)

Los efectos tóxicos del MTX principalmente son mielosupresión y mucositis. La incidencia de estos efectos tóxicos dependen de la dosis, esquema y vía de administración. La mucositis aparece entre el día 3 a 7 posterior a la administración del fármaco y precede a la disminución de leucocitos o plaquetas. Ambas condiciones revierten dentro de dos semanas, a menos que la eliminación del fármaco se vea comprometida. Las ADMTX generalmente causan una breve elevación de enzimas hepáticas pero esta es rápidamente reversible, rara vez ocasiona daño a largo plazo. Usualmente las enzimas hepáticas regresan a la normalidad posterior a 10 días. (18)

Para sistematizar el análisis de la toxicidad derivada de la administración de quimioterapia es muy útil su clasificación por órganos y sistemas, así como su gradación según la afección. La clasificación más empleada es la de la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta divide las toxicidades en cada aparato según las diferentes manifestaciones clínicas que pueden presentarse. La gradación de los signos se refleja desde 0 (ausencia de toxicidad) hasta 4 (máxima toxicidad registrada). Tabla 1 (19)

En vista de la importancia del tratamiento con MTX en pacientes pediátricos con LLA particularmente durante la fase de consolidación y mantenimiento; identificar parámetros asociados a la sensibilidad y resistencia al MTX tiene relevancia directa con el tratamiento de los pacientes. Parámetros farmacológicos y biológicos que se correlacionan con la sensibilidad y resistencia al MTX en el tratamiento de la LLA incluyen: alteración intracelular del transporte del MTX, generación de cadenas largas de MTX poliglutamato catalizado por la enzima folipoliglutamato sintetasa (FPGS), niveles de dihidrofolato reductasa (DHFR) el blanco primario del MTX. (8)

Tabla 1. GRADOS DE TOXICIDAD (OMS)					
	GRADO 0	GRADO 1	GRADO 2	GRADO 3	GRADO 4
HEMATOLOGICA					
Hemoglobina	NL	10-NL	8 - 10	6.5 – 7.9	<6.5
Leucocitos	4000	3000-3900	2000-2900	1000-1900	<1000
Neutrófilos Totales	>2000	1500-1900	1000-1400	500-900	<500
Plaquetas	NL	75000-NL	50000-74900	25000-49900	<25000
Linfocitos	>2000	1500-1900	1000-1400	500-900	<500
HEPÁTICA					
Bilirrubinas	No	---	<1.5	1.5-3	>3 de NL
Transaminasas	No	2.5-NL	2.6-5.0	5.1-20	>20 de NL
Fosfatasa Alcalina	No	2.5-NL	2.6-5.0	5.1-20	>20 de NL
GASTROINTESTINAL					
Estomatitis	No	Eritema	Eritema doloroso, no tolera sólidos	Úlceras, solo tolera líquidos	Requiere soporte parenteral o enteral
Nauseas	No	Come	Disminución de la ingesta	Casi no ingiere VO	No come
Vómito	No	1 c/24h	2-5 c/24h	6-10 c/24h	>10 en 24h
Diarrea (evacuaciones/día)	No	2-3	4-6, cólico	7-9, incontinencia	>10, hematoquezia
RENAL					
Cr	NL	<1.5 NL	1.5-3.0	3.1-6.0	>6.0
Proteinuria	Negativo	1+ o <0.3g/dL	2-3+ o 3-10gdL	4+ o >10gdL	Sx nefrótico
Hematuria	Negativo	Microscópico	Macroscópico	Coágulos	Requiere transfusión

Las variaciones genéticas de las enzimas involucradas en el metabolismo de la quimioterapia en los pacientes con cáncer pueden jugar un papel importante en determinar la recaída y el riesgo de toxicidad. Estudios clínicos e in-vitro indican que polimorfismos comunes en genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de los folatos afectan la sensibilidad a la quimioterapia principalmente fármacos como el MTX. (14)

Se han descrito polimorfismos de genes relacionados con el metabolismo del fármaco, que pueden influir en la toxicidad individual al MTX, éstos incluyen la metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR).

El gen de MTHFR, contiene 11 exones y 10 intrones, está localizado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36.3). Dos polimorfismos en este gen, C677T y A1298C contribuyen a reducir la actividad de la enzima y alteraciones en el metabolismo de los folatos. (4-5)

La MTHFR es una enzima crítica para la homeostasis y metabolismo intracelular. Cataliza la reducción de 5,10-metilenetetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, que es la forma circulante predominante del folato y el donador primario de carbono para la re-metilación de la homocisteína a metionina. La disminución de la actividad de la MTHFR puede disminuir la reserva de folato y permitir la alteración en la toxicidad del MTX como mielosupresión, mucositis, falla renal y toxicidad del SNC. (6)

Hay dos polimorfismos bien descritos en los genes de MTHFR. El primero es la transición de C por T en el nucleótido 677 el cual resulta en el remplazo de alanina por valina en el codón 222, causando disminución en la actividad enzimática y subsecuentemente un incremento en homocisteína y una distribución alterada del folato; el segundo es la transición de A por C en la posición 1298, lo cual causa la sustitución del glutamato con alanina en el codón 429, lo que también reduce la actividad de MTHFR. (1)

El polimorfismo C677T de la MTHFR resulta en disminución de la actividad. El genotipo homocigoto variante TT, se asocia con cerca del 30% de la actividad de la enzima comparada con el tipo silvestre (CC) y está presente en 10 a 12% de la población blanca y asiática. Los heterocigotos (CT) (cerca del 60% de actividad enzimática) constituyen aproximadamente el 40% de la población. Se han observado variaciones en leucemia linfoblástica aguda, neoplasias colorrectales, defectos del tubo neural y enfermedades cardiovasculares. (12)

Se ha demostrado que el polimorfismo C677T de la MTHFR se ha asociado a un incremento en el riesgo de toxicidad inducida por MTX, principalmente toxicidad hepática, mielosupresión, mucositis y toxicidad gastrointestinal. Se ha observado una asociación significativa entre el polimorfismo C677T y toxicidad hepática en pacientes africanos y caucásicos, pero no en asiáticos. Sin embargo, se ha encontrado una asociación significativa para mucositis en pacientes africanos y asiáticos pero no en caucásicos. (1)

En la población del norte de Europa la incidencia varía entre 10 y 40% para individuos homocigotos y heterocigotos, respectivamente. Individuos homocigotos y heterocigotos para esta variante tienen un 30 y 60% de la actividad normal de MTHFR, respectivamente. Esta mutación predispone al individuo a efectos adversos a fármacos con efecto antifolato como el MTX, incluso a dosis bajas. (6)

ANTECEDENTES

La MTHFR C677T es una variante termolábil de la enzima, que fue descubierta por Kang en 1988 y que se distingue por su baja actividad específica y por su sensibilidad al calor. Se sugirió que esta variante era heredada de forma autosómica recesiva y que estaba presente en el 5% de la población general. Fue Frosst, en 1995, el que identificó la sustitución de C por T en el nucleótido 677 como responsable de la MTHFR termolábil. (11)

Chiusolo y cols estudiaron la incidencia del polimorfismo C677T en población italiana, se determinó que está presente en 18-20% en individuos homocigotos y 40% en heterocigotos, lo cual es mayor comparado con la población caucásica del norte de Europa; donde la incidencia es del 10% en individuos homocigotos. (2)

Cornelia Ulrich y cols estudiaron si el polimorfismo C677T MTHFR modifica la respuesta al metotrexato en pacientes sometidos a trasplante de médula ósea. Las medidas para evaluar la toxicidad por MTX incluyeron mucositis oral, velocidad del injerto (plaquetas y cuenta de granulocitos) y bilirrubinas. Pacientes con menor actividad de la MTHFR (genotipo TT) tiene 36% mayor riesgo de mucositis oral durante los días 1 a 18 y 20% mayor riesgo de mucositis entre los días 6 a 12. La cuenta plaquetaria se recuperó más lentamente en pacientes con genotipo TT comparado con el genotipo silvestre. Los pacientes con disminución en la actividad de la MTHFR tienen mayor riesgo de toxicidad por MTX. Debido a la mayor prevalencia del genotipo TT, los resultados podrían tener implicaciones en la dosificación del MTX. (12)

Hagleitner y cols evaluaron el papel del polimorfismo de la MTHFR C677T en hepatotoxicidad inducida por ADMTX, analizaron una cohorte de pacientes holandeses tratados con ADMTX. Los pacientes con polimorfismo C677T mostraron una mayor tendencia, pero no estadísticamente significativo, para desarrollar hepatotoxicidad. (13)

Tantawy y cols investigaron si genotipos específicos de MTHFR están asociados a toxicidad y sobrevida en una cohorte de 40 pacientes con diagnóstico de LLA de riesgo estándar e intermedio en tratamiento con el protocolo BFM modificado. Se observó que la variante MTHFR 677 genotipo TT se asocia con un mayor riesgo de presentar, durante el tratamiento con antimetabolitos, efectos adversos como diarrea y mucositis comparado con los genotipos CT y CC. Además, en este estudio estos pacientes tienen mayor frecuencia de toxicidad hepática, mayor incidencia de neutropenia y mayor tiempo de recuperación en la cuenta de neutrófilos y plaquetas en comparación con los genotipos CT y CC. La frecuencia de recaída a 5 años en pacientes con genotipo TT fue de 56.3% comparado con 18.2% y 0% en los genotipos CT y CC respectivamente. (14)

Taub y cols demostraron que los pacientes pediátricos con LLA homocigotos para MTHFR 677 genotipo TT muestran mayor sensibilidad, comparados con pacientes con el genotipo silvestre CC o heterocigotos CT. Imanishi y cols describieron mayores concentraciones de MTX a la hora 48 posterior a su infusión en niños con LLA con genotipo TT de MTHFR 677, lo que sugiere que el polimorfismo MTHFR 677 genotipo TT se asocia a una eliminación menor y mayor toxicidad del MTX. (14)

Aráoz y cols evaluaron en población argentina la influencia de variantes genéticas de MTHFR, TMPT y GSTs en pacientes con respuesta al tratamiento para LLA, en términos de toxicidad y eficacia. Sin importar la variante genética de MTHFR y la toxicidad relacionada al fármaco, se encontró que los niños que reciben 2gm2día de MTX y con un alelo variante en la MTHFR muestran un riesgo significativamente mayor para desarrollar leucopenia y neutropenia grave durante la fase de consolidación. Al contrario, la variante en el alelo C677T no se observó que modulara la presencia de efectos adversos en pacientes que recibieron 5gm2día de MTX. Probablemente la variante C677T en la MTHFR tiene una baja penetrancia, y sus efectos solo pueden observarse en dosis menores (2gm2día). En dosis mayores (5gm2día) puede ser que otros factores, como dosis acumulada de MTX, estado nutricional del paciente y función hepática entre otros factores, tienen mayor asociación con la presencia de toxicidad grave. (16)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, el cáncer en niños 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. (9). La LLA es el principal tipo de cáncer a partir del segundo año de vida, y esto se mantiene hasta la adolescencia. La LLA tiene un impacto importante sobre la mortalidad en niños mexicanos, ya que ocupa el primer lugar entre todos los padecimientos oncológicos. (10)

El progreso en el tratamiento de pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda está vinculado con la identificación de blancos moleculares y anomalías genéticas así como un mejor entendimiento de las diferencias individuales en farmacogenética de los agentes antineoplásicos.

Existen publicaciones donde se demuestra que la respuesta al tratamiento en niños con leucemia linfoblástica aguda es diferente entre la población hispana y la norteamericana aun utilizando el mismo protocolo de quimioterapia. Por este motivo es importante conocer datos estadísticos de polimorfismos genéticos en población mexicana que podrían estar implicados en la alteración del metabolismo de fármacos esenciales para el tratamiento.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Cuál es la asociación entre el polimorfismo C677T y el grado de toxicidad secundaria al uso de altas dosis de metotrexato que presentan los pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda?

JUSTIFICACION

Hasta el momento no se han reportado estudios de polimorfismos del gen de la MTHFR en población mexicana. La identificación de dicho polimorfismo en nuestra población y su correlación con el grado de toxicidad nos permitirá identificar el papel pronóstico que esta variante pueda tener en el desarrollo de efectos adversos a ADMTX como toxicidad hepática, mielosupresión, mucositis y toxicidad gastrointestinal.

Además que nos permitirá establecer la frecuencia de este polimorfismo en la población estudiada. Esto con la finalidad de establecer si la presencia de este polimorfismo es un factor pronóstico que nos pueda servir para establecer medidas preventivas durante el tratamiento con ADMTX y a su vez impactar directamente en la morbilidad asociada al tratamiento en estos pacientes, los tiempos de estancia hospitalaria por complicaciones y el riesgo de recaída por retraso en el tratamiento.

OBJETIVOS

- Determinar la frecuencia del polimorfismo C677T en una cohorte pacientes con leucemia linfoblástica aguda.
- Evaluar la asociación entre el polimorfismo C677T y el grado de toxicidad secundaria al uso de altas dosis de metotrexato.

HIPOTESIS

Se espera que los pacientes que presenten genotipo homocigoto variante de la MTHFR desarrollen mayor toxicidad posterior a la administración de ADMTX.

MATERIAL Y METODOS

Diseño del estudio: Estudio de cohorte prospectiva.

CRITERIOS DE SELECCION:

- Pacientes pediátricos de 1 mes a 18 años del Hospital Infantil de México Federico Gómez con diagnóstico documentado de leucemia linfoblástica aguda por aspirado de médula ósea en tratamiento con protocolo HIM 2003. (Anexo 1).

CRITERIOS DE EXCLUSION:

- Pacientes en periodo neonatal.
- Pacientes que provengan de otra institución con tratamiento previo o con recaída.

CRITERIOS DE ELIMINACION:

- Cambio de Unidad hospitalaria.

Población de estudio: este estudio incluyó cien pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda diagnosticados y tratados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez. Tratados durante el periodo de Enero a Abril de 2016.

Recolección de datos. Los datos serán capturados en hoja de cálculo de Excel, donde se incluyeron las características epidemiológicas de los pacientes, datos de laboratorio, dosis administrada de MTX, toxicidad relacionada al tratamiento y la presencia del polimorfismo.

Obtención de las muestras: Las muestras de sangre periférica serán obtenidas por punción venosa como parte de las pruebas requeridas para el seguimiento de los pacientes, teniendo la precaución de hacerlo antes de que el paciente haya sido transfundido o de que hayan pasado al menos 3 meses desde la última transfusión. No se realizará una punción exclusivamente para el protocolo.

Análisis del polimorfismo genético de C677T del gen MTHFR. Extracción de ADN: El ADN se obtuvo por el método de columna de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial (Qiagen, QIAamp DNA blood, midi kit). En resumen, las células se lisaron incubándolas con solución de lisis, el producto de la lisis se incubó con proteinasa K (200ug/uL). Posteriormente se adicionó etanol absoluto volumen a volumen, se homogeneizó y se pasó a través de la columna, se realizaron dos lavados con las soluciones "AW1" y "AW2". Finalmente se colocó la solución de elusión en la columna y por centrifugación se obtuvo el DNA el cual se almacenó a -20°C hasta ser utilizado para la genotipificación.

Genotipificación del SNP C677T del gen MTHFR. La identificación del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) C677T se realizó mediante la metodología de PCR-RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism). El DNA genómico se amplificó con los oligonucleótidos específicos para el gen MTHFR, sentido 5'TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA3' y antisentido 5'AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG3', dNTP's, regulador 1X (20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄) y Taq ADN polimerasa obteniendo un producto de PCR de 198 pb. Después de la amplificación se realizó una restricción enzimática del producto de PCR mediante la endonucleasa de restricción Hinf1, obteniendo un fragmento de 198 pb para el genotipo CC (homocigoto silvestre), dos fragmentos uno de 198 pb y 175 pb para el genotipo CT (Heterocigoto) y un fragmento de 175 pb para el genotipo TT (Homocigoto variante). El producto de PCR y los fragmentos de restricción fueron visualizados y separados en un gel agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio.

La toxicidad será evaluada con base en los criterios de toxicidad de la OMS según los hallazgos clínicos y de laboratorio. Será clasificada en hematológica, hepática, gastrointestinal y renal.

Se determinará la frecuencia del polimorfismo en la cohorte de pacientes y se realizará un seguimiento clínico y por laboratorio estrecho de la evolución del paciente en búsqueda de datos de toxicidad secundaria al uso de ADMTX y su asociación con la presencia del polimorfismo C677T.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Las muestras de los pacientes se obtuvieron bajo consentimiento informado de los padres o tutor y bajo asentimiento informado del menor en caso de edad mayor o igual a 7 años.

PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Realizaremos un análisis de estadística descriptiva analizando frecuencias, porcentajes, medias, medianas y rangos de las variables utilizadas.

DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

Toxicidad: variable independiente dicotómica, definida como la presencia de toxicidad grave (grado 3 o 4 de acuerdo a los criterios de la OMS) y toxicidad leve 1, 2 y ausente 0 o como ausencia de toxicidad (grados 0, 1 y 2 de la OMS)

Polimorfismo Genético: variable independiente dicotómica, definido como variación en la secuencia de alelos de un gen entre individuos de una población. Se consideraron los siguientes polimorfismos.

- Homocigoto silvestre (677CC), fragmento de 198 pares de bases.
- Heterocigoto (677 CT), formado por dos fragmentos de pares de bases 198 y 175.
- Homocigoto variante (677 TT), formado por dos fragmentos de pares de base 175 y 23.

RESULTADOS

Características de los pacientes

Durante el periodo de Enero a Abril 2016, ingresaron a hospitalización un total de 100 pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda para tratamiento con ADMTX de los cuales se obtuvo muestra sanguínea para determinación de polimorfismo.

De la muestra total, 24 pacientes se consideraron en el grupo de riesgo habitual y 76 de alto riesgo.

En cuanto al grupo de riesgo habitual se observó predominio del sexo femenino con un total de 17 pacientes representando el 70% respecto del sexo masculino con un total de 7 pacientes que corresponde al 30%.

En cuanto a edad al diagnóstico, el promedio fue de 4.6 años con mediana de 5 años (rango de 2 a 8 años). En este grupo el 100% de los pacientes correspondió a Inmunofenotipo pre B.

En el grupo de alto riesgo se observó predominio del sexo masculino con un total de 39 pacientes representando el 51% respecto del sexo femenino con un total de 37 pacientes que corresponde al 49%.

La edad promedio al diagnóstico fue de 8.2 años con una mediana de 10 años (rango de 10 meses a 16 años). En este grupo de pacientes el 84% de los pacientes presentaron Inmunofenotipo pre B, 5% presentaron Inmunofenotipo T, 7% con Bifenotipia, 1.5% con Coexpresión mieloides y 2.5% no fue concluyente.

Información del Genotipo

Las frecuencias de los genotipos para el polimorfismo 677 del gen *MTHFR* fueron las siguientes; en el total de la población 27 pacientes presentaron genotipo CC (27%), 40 pacientes presentaron genotipo CT (40%) y 33 pacientes presentaron genotipo TT (33%). La frecuencia por alelo fue del 48% para el alelo C y 52% para el alelo T.

Toxicidad

La toxicidad observada en los pacientes se clasificó de acuerdo a los criterios de la OMS como grave grados 3 y 4, leve grados 1 y 2, nula grado 0. Se tomó en cuenta la toxicidad hematológica, hepática, gastrointestinal y renal.

Pacientes de Riesgo Habitual

En el grupo de 24 pacientes; 5 casos (21%) presentaron toxicidad hematológica, en 2 de estos (40%) se clasificó como grave y en 3 pacientes (60%) como leve.

Solo un paciente (4%) presentó toxicidad hepática grave. No se documentó toxicidad gastrointestinal o renal en ningún caso.

Dentro del grupo de 3 pacientes con genotipo TT del gen *MTHFR* 2 casos (67%) presentaron toxicidad hematológica y un caso (33%) hepática.

En los pacientes con genotipo CT, en total 3, se encontró toxicidad hematológica en el 100% y no se documentó toxicidad hepática.

El genotipo CC no se asoció con datos de toxicidad.

Pacientes de Alto riesgo

Dentro de este grupo de 76 pacientes, se identificó toxicidad hematológica en 19 casos (25%), en 14 (74%) fue grave y 5 pacientes (26%) leve.

En 10 pacientes (13%) se presentó toxicidad hepática, en 5 de ellos (50%) fue grave y en 5 pacientes (50%) leve.

Solo se documentó un caso de toxicidad renal leve. No se documentaron casos de toxicidad gastrointestinal.

En el grupo de pacientes con genotipo TT del gen *MTHFR* en total 13 casos, se asoció con toxicidad hematológica en 8 casos (61%) y 5 casos hepática (39%).

Dentro del grupo de 10 pacientes con genotipo CT del gen *MTHFR* se presentó toxicidad hematológica en 7 casos (70%) y 3 casos hepática (30%).

En los 6 casos con genotipo CC se documentó toxicidad hematológica en 4 pacientes (67%) y hepática en 2 casos (28%). La toxicidad renal se presentó en un caso (5%).

DISCUSIÓN

Recientemente, la influencia de polimorfismos de diferentes genes involucrados en el metabolismo de fármacos antineoplásicos incluidos los polimorfismos de la enzima MTHFR han sido estudiados en niños con diagnóstico de LLA. (14)

Se han identificado polimorfismos del gen *MTHFR* que pueden contribuir a la susceptibilidad para desarrollar toxicidad por MTX, esta susceptibilidad está influida por el genotipo que resulta de los alelos paterno y materno que cada individuo hereda (homocigoto silvestre CC, heterocigoto CT u homocigoto variante TT). En este estudio se analizó el impacto de los polimorfismos de la MTHFR y su relación con la toxicidad secundaria a la administración de ADMTX en pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA.

Encontramos que los pacientes clasificados como alto riesgo que presentan genotipo TT del gen *MTHFR* presentan mayor asociación con toxicidad y en pacientes de riesgo habitual el genotipo que se asoció a toxicidad fue el CT. Estos hallazgos concuerdan con el estudio realizado por Chiusolo y cols en Italia que reportaron mayor frecuencia de toxicidad combinada a nivel hepático y médula ósea en pacientes con el genotipo TT (14) y con lo descrito por Tantawy y cols en Egipto quienes observaron que la variante MTHFR 677 genotipo TT se asocia con un mayor riesgo de presentar, durante el tratamiento con antimetabolitos, efectos adversos de tipo diarrea y mucositis comparado con los genotipos CT y CC. Este autor encontró además, que el genotipo TT tienen mayor frecuencia de toxicidad hepática, mayor incidencia de neutropenia y mayor tiempo de recuperación en la cuenta de neutrófilos y plaquetas en comparación con los genotipos CT y CC.

En nuestro estudio se observó mayor toxicidad en pacientes de alto riesgo con genotipo TT, la toxicidad que predominó fue la hematológica y hepática, no se documentó toxicidad gastrointestinal. Sin embargo si se toma en cuenta la toxicidad por alelo observamos que la presencia del alelo T se asocia con mayor toxicidad hematológica y hepática en ambos grupos independientemente del riesgo.

Estos resultados sugieren que el polimorfismo 677 genotipo TT puede ser valorado como un predictor para el desarrollo de toxicidad durante el tratamiento con ADMTX en pacientes con LLA.

La frecuencia del genotipo homocigoto variante (TT) observada en este estudio fue en promedio del 32% en este grupo de 100 pacientes, lo cual es mayor a la reportada en estudios previamente mencionados en población caucásica como el de Turello y cols en Suiza donde el porcentaje oscila entre el 10 al 12%; lo cual sugiere que este genotipo puede ser más común en población Mexicana o hispana.

Por lo anterior la farmacogenómica vendrá a representar el mayor reto para lograr la medicina personalizada, algunos de estos polimorfismos podrían ser utilizados rutinariamente en la práctica clínica. El objetivo más grande será correlacionar el genotipo-fenotipo con la clínica del paciente para mejorar el tratamiento y pronóstico.

CONCLUSIONES

El genotipo TT del gen *MTHFR* se asocia con mayor frecuencia a la presencia de toxicidad hematológica y hepática durante la administración de ADMTX en pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de alto riesgo.

Este estudio demuestra la importancia de analizar la presencia de polimorfismos en la enzima MTHFR para anticipar la toxicidad inducida por la administración de ADMTX en pacientes con diagnóstico de LLA.

Debido a la prevalencia relativamente frecuente del genotipo TT en población Mexicana con diagnóstico de LLA, es necesario realizar estudios de base poblacional para documentar mayor evidencia de la existencia de polimorfismos de la MTHFR genotipo variante TT y de esta manera explicar la mayor toxicidad hematológica que presentan nuestros pacientes cuando se emplean ADMTX.

Los polimorfismos son un elemento a considerar para ajustar la dosis de MTX en estos pacientes o tomar medidas preventivas para evitar datos de toxicidad.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Se presentó retraso de un mes en la aceptación del pago para la compra de los reactivos necesarios para la determinación del polimorfismo, por lo que se retrasó el análisis de las muestras sanguíneas.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

	Diciembre 2015	Enero- Febrero 2016	Marzo- Abril 2015	Mayo 2016	Junio 2016
Selección de tema					
Revisión Bibliográfica					
Realización de protocolo					
Recolección de muestras					
Análisis estadístico					
Análisis de resultados					
Conclusiones					
Entrega de tesis					

BIBLIOGRAFÍA

1. Lin Yang. Xin Hu. Luhang Xu. Impact of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms on methotrexate- induced toxicities in acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Tumor Biology*. 2012, 33: 1445-1454.
2. P. Chiusolo. G. Reddiconto. I. Casorelli. Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate. *Annals of Oncology* 2002, 13: 1915-1918.
3. Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Oncology Clinics of North America* 2009, 23(4): 655- 674.
4. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends in Pharmacological Sciences* 2001, 22(4):195–201.
5. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genetics Journal* 1994, 7(2):195–200.
6. Rita Turello, Katharina Rentsch, Ermindo Di Paolo, Maja Beck Popovic. Renal Failure After High-Dose Methotrexate in a Child Homozygous for MTHFR C677T Polymorphism. *Pediatric Blood Cancer* 2008, 50: 154-156.
7. Ching-Hon Pui, Mary V. Relling, Pharm D, James Downing. Mechanisms of disease Acute Lymphoblastic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 2004, 350; 15: 1536- 1548.
8. JW Taub. Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methotrexate sensitivity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* (2002) 16, 764–765.
9. Mejía Aranguré JM, Ortega AMC, Fajardo GA. Epidemiología de las leucemias agudas en niños. Parte 1. *Revista Médica IMSS* 2005; 43(4): 323-333
10. Reyes López A. Miranda Lora AL. Dorantes Acosta E. Zapata Tarrés M. Muñoz Hernández O. Garduño Espinosa J. Factores pronósticos de supervivencia en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda afiliados al Seguro Popular. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2012; Vol. 69 (3), 197-204
11. González Martín-Moro B. Pérez B. Santiuste Puente C. Desviat LR. Ugarte M. Pérez ML. Pardo Vigo A. Maties Prats M. Estudio del polimorfismo C677T del gen MTHFR y las concentraciones plasmáticas de homocisteína. *Química Clínica* 2005; 24 (1) 41-45

12. Ulrich Cornelia M. Yasui Yutaka. Storb Rainer. Schubert Mark M. Wagner John L. Bigler Jeannette. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood Journal* 2001, Volume 98, Number 1.

13. MM Hagleitner. MUH Coenen. R Aplenc. A Patiño-García, P Chiusolo. D. Gemmati. M De Mattei. The role of the MTHFR C677T polymorphism in methotrexate-induced liver toxicity: a meta-analysis in patients with cancer. *The Pharmacogenomics Journal* 2014, (14) 115-119

14. Azza A.G. Tantawy, Eman A. El Bostany, Amira A.M. Adly, Mohammed Abou El Asrar, Eman A. El-Ghouroury, Esmat E. Abdulghaffar. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in Egyptian children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2010, 21:28-34.

15. Patrizia Chiusolo. Sabrina Giammarco. Silvia Bellesi. Elisabetta Metafuni. Nicola Piccirillo. Daniela De Rittis. Sara Marietti. The role of MTHFR and RFC1 polymorphisms on toxicity and outcome of adult patients with hematological malignancies treated with high-dose methotrexate followed by leucovorin rescue. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. 2012, 69: 691-696.

16. Hilda Verónica Aráoz. Karina D'Aloi. María Eugenia Foncuberta. Christian Germán Sanchez La Rosa. Pharmacogenetic studies in children with acute lymphoblastic leukemia in Argentina. *Leukemia & Lymphoma*, May 2015; 56 (5): 1370-1378.

17. Philip A. Pizzo. David G. Poplack. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Capítulo 19. Páginas 518-565

18. Bruce A. Chabner. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*. Capítulo 8. Páginas 109-138

19. Eduardo Díaz-Rubio. Javier García-Conde. *Oncología clínica básica*. Capítulo 17 Páginas 247-257

20. Roberto Rivera Luna. *Protocolos técnicos en niños*. Consejo Nacional para la prevención y el tratamiento del cáncer en la infancia y la adolescencia. Capítulos 2 a 5. Páginas 9 – 60.

ANEXO 1

Protocolo HIM 2003 para Leucemia Linfoblástica Aguda

Ventana de esteroides

Dexametasona 6mgm2dia Días 7 a 0

Inducción a la remisión

Dexametasona 6mgm2dia Días 1 a 21

Daunorrubicina 25mgm2do Días 1 y 8

L- asparaginasa 10 000 UIm2do Días 2, 4, 6, 9, 11, 13, 16, 18 y 20

Vincristina 2mgm2do Días 1, 8, 15 y 22

Intensificación

Citarabina 300mgm2do Días 22, 29 y 36

Etoposido 300mgm2do Días 22, 29 y 36

Consolidación

ADMTX Riesgo Habitual 2.5gm2do Días 44, 51 y 58

ADMTX Alto Riesgo 5gm2do

Mantenimiento

120 semanas de tratamiento adaptado
al riesgo

RIESGO HABITUAL					
Sem	Medicamentos	Sem	Medicamentos	Sem	Medicamentos
1	VCR + Dexa	41	VCR + Dexa	81	6MP + MTX
2	6MP + MTX	42	6MP + MTX	82	6MP + MTX
3	6MP + MTX	43	6MP + MTX	83	VCR + Dexa
4	6MP + MTX	44	6MP + MTX	84	6MP + MTX
5	VCR + DEXA	45	VCR + Dexa	85	6MP + MTX
6	6MP + MTX	46	6MP + MTX	86	6MP + MTX
7	6MP + MTX	47	6MP + MTX	87	VCR + Dexa
8	6MP + MTX	48	6MP + MTX	88	6MP + MTX
9	ADMTX (1)	49	ADMTX (7)	89	6MP + MTX
10	VCR + Dexa	50	VCR + Dexa	90	6MP + MTX
11	6MP + MTX	51	6MP + MTX	91	VCR + Dexa
12	6MP + MTX	52	6MP + MTX	92	6MP + MTX
13	6MP + MTX	53	6MP + MTX	93	6MP + MTX
14	DNR + VCR + ASP (3) + Dexa	54	VCR + Dexa	94	6MP + MTX
15	DNR + VCR + ASP (3) + Dexa	55	6MP + MTX	95	VCR + Dexa
16	VCR + Dexa	56	6MP + MTX	96	6MP + MTX
17	VCR + Dexa	57	6MP + MTX	97	6MP + MTX
18	VP16 + ARA C	58	ADMTX (8)	98	6MP + MTX
19	VP16 + ARA C	59	VCR + Dexa	99	VCR + Dexa
20	VP16 + ARA C	60	6MP + MTX	100	6MP + MTX
21	ADMTX (2)	61	6MP + MTX	101	6MP + MTX
22	ADMTX (3)	62	6MP + MTX	102	6MP + MTX
23	ADMTX (4)	63	VCR + Dexa	103	VCR + Dexa
24	VCR + Dexa	64	6MP + MTX	104	6MP + MTX
25	6MP + MTX	65	6MP + MTX	105	6MP + MTX
26	6MP + MTX	66	6MP + MTX	106	6MP + MTX
27	6MP + MTX	67	VCR + Dexa	107	VCR + Dexa
28	VCR + Dexa	68	6MP + MTX	108	6MP + MTX
29	6MP + MTX	69	6MP + MTX	109	6MP + MTX
30	6MP + MTX	70	6MP + MTX	110	6MP + MTX
31	ADMTX (5)	71	VCR + Dexa	111	VCR + Dexa
32	VCR + Dexa	72	6MP + MTX	112	6MP + MTX
33	6MP + MTX	73	6MP + MTX	113	6MP + MTX
34	6MP + MTX	74	6MP + MTX	114	6MP + MTX
35	6MP + MTX	75	VCR + Dexa	115	VCR + Dexa
36	VCR + Dexa	76	6MP + MTX	116	6MP + MTX
37	6MP + MTX	77	6MP + MTX	117	6MP + MTX
38	6MP + MTX	78	6MP + MTX	118	6MP + MTX
39	6MP + MTX	79	VCR + Dexa	119	VCR + Dexa
40	ADMTX (6)	80	6MP + MTX	120	6MP + MTX

ALTO RIESGO

Sem	Medicamentos	Sem	Medicamentos	Sem	Medicamentos
1	MTX + 6MP	41	MTX + 6 MP	81	6MP + MTX
2	MTX + ARA C 300	42	VCR + DNR	82	VCR + Dexa
3	VCR + ASP + Dexa	43	ADMTX (7)	83	6MP + MTX
4	CFM + ARA C 300	44	6MP + MTX	84	6MP + MTX
5	MTX + 6 MP	45	MTX + ARA C 600	85	6MP + MTX
6	VCR + DNR	46	VCR + ASP + Dexa	86	VCR + Dexa
7	ADMTX (1)	47	CFM + ARA C 300	87	6MP + MTX
8	DNR + VCR + ASP (3) + Dexa	48	MTX + 6 MP	88	6MP + MTX
9	DNR + VCR + ASP (3) + Dexa	49	VCR + DNR	89	6MP + MTX
10	VCR + ASP (3) + Dexa	50	ADMTX (8)	90	VCR + Dexa
11	VCR + Dexa	51	6MP + MTX	91	6MP + MTX
12	ADMTX (2)	52	MTX + ARA C 600	92	6MP + MTX
13	ADMTX (3)	53	VCR + ASP + Dexa	93	6MP + MTX
14	ADMTX (4)	54	CFM + ARA C 300	94	VCR + Dexa
15	6MP + MTX	55	MTX + 6 MP	95	6MP + MTX
16	DNR + VCR + ASP (3) + Dexa	56	VCR + DNR	96	6MP + MTX
17	DNR + VCR + ASP (3) + Dexa	57	ADMTX (9)	97	6MP + MTX
18	VCR + ASP (3) + Dexa	58	6MP + MTX	98	VCR + Dexa
19	VCR + Dexa	59	MTX + ARA C 600	99	6MP + MTX
20	VP16 + ARA C	60	VCR + ASP + Dexa	100	6MP + MTX
21	VP16 + ARA C	61	CFM + ARA C 300	101	6MP + MTX
22	VP16 + ARA C	62	MTX + 6 MP	102	VCR + Dexa
23	MTX + 6MP	63	VCR + DNR	103	6MP + MTX
24	MTX + ARA C 600	64	ADMTX (10)	104	6MP + MTX
25	VCR + ASP + Dexa	65	6MP + MTX	105	6MP + MTX
26	CFM + ARA C 300	66	MTX + ARA C 600	106	VCR + Dexa
27	MTX + 6 MP	67	VCR + ASP + Dexa	107	6MP + MTX
28	VCR + DNR	68	CFM + ARA C 300	108	6MP + MTX
29	ADMTX (5)	69	MTX + 6 MP	109	6MP + MTX
30	6MP + MTX	70	VCR + Dexa	110	VCR + Dexa
31	MTX + ARA C 600	71	6MP + MTX	111	6MP + MTX
32	VCR + ASP + Dexa	72	MTX + ARA C 600	112	6MP + MTX
33	CFM + ARA C 300	73	VCR + ASP + Dexa	113	6MP + MTX
34	MTX + 6 MP	74	CFM + ARA C 300	114	VCR + Dexa
35	VCR + DNR	75	MTX + 6 MP	115	6MP + MTX
36	ADMTX (6)	76	VCR + Dexa	116	6MP + MTX
37	6MP + MTX	77	6MP + MTX	117	6MP + MTX
38	MTX + ARA C 600	78	MTX + ARA C 600	118	VCR + Dexa
39	VCR + ASP + Dexa	79	6MP + MTX	119	6MP + MTX
40	CFM + ARA C 300	80	6MP + MTX	120	6MP + MTX

ANEXO 2

CARTA DE CONSENTIMIENTO VOLUNTARIO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACION

Asociación del polimorfismo C677T con el grado de toxicidad secundaria al uso de altas dosis de metotrexato en una cohorte pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda

Nombre del paciente: _____

Nombre del tutor: _____

Se le hace una cordial invitación para que su hijo (a) participe en un estudio de investigación el cual tiene como objetivo evaluar la asociación entre los genes (ADN) de su hijo que se obtendrán de sus células sanguíneas con la toxicidad secundaria al uso de altas dosis de metotrexato, que es el medicamento que su hijo recibe como parte del tratamiento para su enfermedad.

Al aceptar por escrito la participación de su hijo (a), queda entendido que:

- La participación de su hijo (a) es completamente voluntaria.
- No se altera en ninguna forma el tratamiento de su hijo
- Existe riesgo mínimo, ya que al momento de obtener la muestra de sangre de su hijo (a), se realizará una punción en el brazo de su hijo (a) y puede sentir discreto dolor al introducir la aguja.
- La obtención de la muestra se realizará en conjunto con la toma de muestras de laboratorio de rutina por lo que no será necesaria una nueva punción.
- No tendrá ningún costo
- Se tomarán 2ml de sangre de los ya utilizados para sus pruebas rutinarias.
- Se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su persona
- Su hijo (a) puede tener o no un beneficio directo y ayudar más adelante a los niños que tengan esta enfermedad
- Dado que la información generada puede ser de importancia para su hijo (a) los datos se proporcionarán directamente a su médico, para que se utilice la información y la aplique de acuerdo al conocimiento médico.
- Usted tendrá acceso a la información o resultados que se obtengan sobre su hijo (a) como parte del estudio principal y esta información será proporcionada por el investigador.
- En cualquier momento puede retirar a su hijo (a) del estudio y solicitar la eliminación de la muestra, sin que esto afecte su tratamiento.

- En caso de que usted tenga alguna duda relacionada al estudio, usted puede preguntarla a los investigadores.
- Los resultados obtenidos de este estudio podrán ser publicados a nivel nacional e internacional, manteniendo siempre la confidencialidad del paciente.

Ante dos testigos y el investigador principal, firmo o imprimo mi huella dactilar como constancia de mi aceptación voluntaria en la participación de mi hijo (a) en este estudio, el día _____ del mes _____; 2016 en la Cd de México.

Firma o huella dactilar del padre o tutor

Testigo 1

Nombre y firma

Testigo 2

Nombre y firma

Investigador principal

Dra. Aurora Medina Sansón. Médico adscrito al servicio de oncología pediátrica.

Investigador suplente

Dra. Gabriela A. Hernández Echáurregui. Médico residente de quinto año oncología pediátrica.

ANEXO 3

CARTA DE ASENTIMIENTO VOLUNTARIO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACION

Asociación del polimorfismo C677T con el grado de toxicidad secundaria al uso de altas dosis de metotrexato en una cohorte pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda

Nombre del paciente: _____

Se te hace una invitación para que participes en un estudio de investigación el cual tiene como objetivo evaluar la relación entre tus genes (ADN), los cuales se obtendrán de células sanguíneas, con la toxicidad secundaria al uso de altas dosis de metotrexato, que es el medicamento que recibes como parte del tratamiento para tu enfermedad.

Al aceptar queda entendido que:

- La participación es completamente voluntaria.
- No se altera en ninguna forma el tratamiento
- La obtención de la muestra se realizará en conjunto con la toma de muestras de laboratorio de rutina por lo que no será necesaria una nueva punción.
- No tendrá ningún costo
- Se tomarán 2ml de sangre de los ya utilizados para sus pruebas rutinarias.
- Se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su persona
- Puedes tener o no un beneficio directo y ayudar más adelante a los niños que tengan esta enfermedad
- Tendrás acceso a la información o resultados que se obtengan como parte del estudio principal y esta información se dará por el investigador.
- En caso de que tengas alguna duda relacionada al estudio, puedes preguntar a los investigadores.
- Los resultados obtenidos de este estudio podrán ser publicados a nivel nacional e internacional, manteniendo siempre la confidencialidad del paciente.

Ante dos testigos y el investigador principal, firmo o imprimo mi huella dactilar como constancia de mi aceptación voluntaria en la participación de este estudio, el día _____ del mes _____; 2016 en la Cd de México.

Nombre o huella dactilar del paciente

Testigo 1

Nombre y firma

Testigo 2

Nombre y firma

Investigador principal

Dra. Aurora Medina Sansón. Médico adscrito al servicio de oncología pediátrica.

Investigador suplente

Dra. Gabriela A. Hernández Echáurregui. Médico residente de quinto año oncología pediátrica.