

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
U.M.A.E. HOSPITAL GENERAL "DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA" CENTRO MÉDICO
NACIONAL LA RAZA

TESIS:

**"FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA TIOPURINA s-METILTRANSFERASA
TIOPURINAS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA EN
CMN LA RAZA"**

PARA OBTENER EL GRADO DE SUBESPECIALISTA EN **HEMATOLOGÍA PEDIÁTRICA**

PRESENTA

DRA. AZALIA JUAREZ MOYA

Residente de segundo año de Hematología pediátrica del HG CMN La Raza.

E-mail: chayamoya@hotmail.com

Teléfono: (55)54527189

Matrícula: 98311800

Servicio: Servicios de hematología pediátrica

INVESTIGADOR PRINCIPAL

M. en C. Francisco Xavier Guerra Castillo

Unidad de Investigación Médica en Infectología e Inmunología.

Hospital de Infectología CMN "La Raza", IMSS. Av. Jacarandas s/n, Col. La Raza, Del. Azcapotzalco,
CP. 02990, México. CDMX. Teléfono: 5782-1088 ext 24322. pacoxguerra@gmail.com

INVESTIGADOR ASOCIADO

Dra. María Teresa Ramos Cervantes.

Médica adscrita al Servicio de Urgencias Pediátricas, Jefa de División de Investigación en Salud, Hospital
"Gaudencio González Garza" CMN "La Raza" Avenida Jacarandas esq. Seris, Colonia La Raza, México, D.F.
Tel 57245900 Ext.: 23362. Correo electrónico: tereramos.c@gmail.com

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO DEL 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE FIRMAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
U.M.A.E. HOSPITAL GENERAL "DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA" CENTRO MÉDICO
NACIONAL LA RAZA

Dra. María Teresa Ramos Cervantes.

Médica adscrita al Servicio de Urgencias Pediátricas, Jefa de División de Investigación en Salud, Hospital "Gaudencio González Garza" CMN "La Raza" Avenida Jacarandas esq. Seris, Colonia La Raza, México, D.F e Investigador asociado.

Dra. Elva Jiménez Hernández

Medico adscrito al servicio de Hematología Pediátrica del Hospital General "Dr. Gaudencio Gonzalez Garza" Centro Medico Nacional La Raza
Profesor titular del curso de Hematología Pediátrica

M. en C. Francisco Xavier Guerra Castillo

Investigador principal. Unidad de Investigación Médica en Infectología e Inmunología.
Hospital de Infectología CMN "La Raza". Investigador responsable.

Dra. Azalia Juárez Moya

Residente del segundo año de Hematología Pediátrica

INDICE

Agradecimientos	4
Resumen.....	5
Marco teórico.....	10
Planteamiento del problema.....	19
Pregunta de investigación	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos.....	20
Justificación.....	20
Material y métodos	21
Análisis estadístico.....	22
Criterios de selección.....	23
Variables de estudio	23
Descripción del estudio	25
Aspectos éticos	28
Resultados	29
Discusión	31
Conclusión.....	34
Cronograma de actividades.....	35
Anexos.....	36
Referencias bibliográficas.....	37

AGRADECIMIENTOS

De las cosas que más agradezco de esta etapa que ahora concluyó es la oportunidad de conocer a uno de los hombres más importantes de mi vida, a mi esposo **Jacobo Serrano** con el cual formo una familia, quien siempre me impulsó a seguir adelante a pesar de las adversidades. Gracias a mi padre y madre por su apoyo incondicional, mi hermana, sobrinos y a mí nueva familia Rosenda, Martín y Alejandro, tengo la dicha de poder decir que hay gente maravillosa que me apoya sin yo decir una sola palabra, sin embargo, una etapa como esta se debe al apoyo de muchas otras personas, tales como; mis compañeros, amigos y segunda familia (Susana, Luis) quienes siempre estuvieron ahí apoyandome de manera incondicional y agradezco que los tres estuvieramos unidos en todo, si uno se equivocaba el otro lo resolvía sin destacar fallas, unicamente omitiendo criticas constructivas, Dra. Elva Jimenez mujer a la cual respeto por sus logros y por la dedicación en su trabajo; Dra. Berenice Sánchez por la entrega a sus pacientes; Dra. Guadalupe Ortiz digna de admiración como persona y como profesionista; Dra. Paloma Loza como le dije un día, para mí no sólo es una mujer a la que admiro por su dedicación y forma de llevar las circunstancias, sino también una amiga con la que siempre pude contar; Dra. María de los Ángeles del campo, quien no sólo es excelente medico, sino que además como pocas personas esta llena de nobleza; Ana Lilia Hernandez gracias por ser tan alegre; Dra. Erika Miranda, siempre la recordare con cariño por todas sus enseñanzas y la fortaleza que tiene para levantarse de las adversidades; Dr. Octavio Martínez excelente persona y medico; Dr. Angel García quien siempre nos apoyo de manera incondicional y sobre todo nos supo escuchar; Dra. Anecy Hervert mujer perseverante; Dra. Ines Montero porque pese a nuestras diferencias siempre supe que usted es una gran persona y solo ve por el bienestar de sus pacientes; Dr. Ruy Pérez gracias por su paciencia, por sus enseñanzas y por cuestionarnos con el fin de enseñarnos; Dra. Abril Balam íntegra, gracias prestarme eternamente sus libros; Dr. Mario Noya eres un excelente compañero y te deseo mucho éxito; Dr. Francisco Guerre y Dra. M. Teresa Ramos sin su apoyo en la elaboración de mi tesis no lo hubiera logrado; Dra. N. Nancy Nuñez, Dra. Gabriela Fernández, Dra. Mejía, Dra. Laura Espinoza, a todos muchas gracias por lo mucho o poco que me enseñaron en mi camino, siempre estaré agradecida.

Así mismo hubo muchas otras personas que me apoyaron en el camino y sería difícil describir a todas y cada una de ellas, pero el personal de Hematología Especial, el personal de Banco de Sangre, personal de enfermería, a todos y cada uno de ustedes gracias, por último y no por ser menos importantes, sino todo lo contrario agradezco a Dios y a los guerreros maravillosos que son nuestros pacientes, que nos permitieron estar a su lado y de esta manera aprender. Nos permitieron rodearnos de angelitos que nos hacen ver las cosas que realmente valen la pena en la vida.

Definitivamente estos fueron los dos años donde me topé con más piedras en el camino, sin embargo de todo se aprende, y por mas obstaculos que la vida te ponga, el objetivo siempre es levantar la cabeza y seguir adelante. Concluyo con una frase de Gabriel García Márquez que dice **“La memoria del corazón elimina los malos recuerdos y magnifica los buenos, y gracias a ese artificio, logramos sobrellevar el pasado”**.

RESUMEN

TITULO: Frecuencia de polimorfismos del gen de la Tiopurina S-Metiltransferasa en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda en CMN "La raza".

ANTECEDENTES: La leucemia aguda es el resultado de la expansión clonal que da lugar a la proliferación incontrolada y acumulación de células inmaduras denominadas blastos. En el caso de la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) la afección clonal surge en la línea linfóide y representa el 85% de los casos en niños. Hasta el momento la etiología de la LLA es multifactorial, sin embargo se ha encontrado que en 5% se relaciona con aparición de síndromes genéticos, inmunodeficiencia hereditaria o adquirida, etc. Las manifestaciones clínicas de la LLA reflejan el grado de insuficiencia de la médula ósea, de infiltración extramedular y de agudeza. El diagnóstico debe ser complementado con radiografía de tórax, aspirado de médula ósea, inmunofenotipo, citoquímica, cariotipo y de biología molecular, así como punción lumbar para análisis de líquido cefalorraquídeo.

El éxito del tratamiento es atribuido en parte a la fase de mantenimiento que tiene como objetivo prolongar la remisión obtenida durante la primera fase. Los principales fármacos utilizados en los protocolos estándar y que son pilares en la fase de mantenimiento de la LLA son: metotrexate y los análogos de purinas (6-mercaptopurina), la combinación de estos dos da como resultado una acción sinérgica.

La 6-mercaptopurina se administra por 14 días a dosis de 50 mg/m²/d vía oral, en un esquema de 30 semanas. La 6-MP forma parte de las tiopurinas que son fármacos que actúan como falso sustrato en el proceso de síntesis, de los constituyentes esenciales de los ácidos nucleicos, provocando la síntesis de un ADN anómalo o incluso la detención del proceso de síntesis de los ácidos nucleicos.

El metabolismo de la 6-MP es por tres vías; xantina oxidasa (XO), tiopurina S-metiltransferasa (TPMT) e hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT). Estas vías tienen como finalidad la producción de sus metabolitos activos (meTIMP, 6-tio-ITP y 6-TGNs) pueden incorporarse al ADN e iniciar la muerte celular.

Uno de los efectos adversos más frecuentes es la toxicidad hematológica presentando anemia, leucopenia, trombocitopenia y neutropenia. La TPMT muestra un polimorfismo genético. El impacto de la dosis de 6-MP es un factor importante para la supervivencia libre de eventos en los niños con leucemia. Por lo tanto el análisis de los polimorfismos del gen TPMT es importante en la evaluación de pacientes que requieren tiopurinas como parte del tratamiento, en diversos estudios se han demostrado una frecuencia en la población de los polimorfismos de la TPMT con alta actividad en un 89-94%, actividad intermedia de 6-11% y muy raro en individuos con baja actividad de 0.3%. Bajos niveles de TPMT resultan en altas concentraciones de nucleótidos de tioguanina, lo que representa un factor de riesgo de toxicidad inducida por tiopurinas, mientras los individuos con muy alta actividad de TPMT tendrán respuestas terapéuticas reducidas a estos agentes.

La frecuencia y el patrón de alelos mutantes TPMT es diferente entre las diversas poblaciones étnicas. Por ejemplo, los asiáticos (India, Pakistán) tienen una menor frecuencia de alelos mutantes de TPMT y todos los

alelos mutantes identificados hasta la fecha son TPMT*3A. En contraste con el Este y la población de África Occidental en el que la frecuencia de alelos mutante es similar a los caucásicos, donde todos los alelos mutantes encontrados en las poblaciones africanas son TPMT*3C. Entre Los afroamericanos, TPMT*3C es la más frecuente, pero también se encuentran TPMT*2 y TPMT*3A. La frecuencias varían desde 0.5 a 0.2% para TPMT*2, TPMT*3A de 0.8 a 5.7%. En los sujetos de raza blanca, TPMT*3A es la más común de los tres alelos, con una frecuencia de 3.2 a 5.7%, mientras que TPMT*3C en LLA tiene una frecuencia del alelo 0,2-0,8%. En México existen 3 estudios sobre polimorfismos de TPMT, el grupo de Investigadores encabezados por Taja-Chayeb, González del Ángel y Moreno-Guerrero coincidencio que el polimorfismo más frecuente fue el TPMT*1 (85.62% a 93.19%), otros polimorfismos encontrados son el TPMT*2 (0.28%-3.75%), TPMT*3A (5.69%), TPMT*3C (2.5%-3.54%).

El entusiasmo por la farmacogenética de TPMT se ha visto estimulado por la confirmación de que el genotipo de la TPMT se identifica en pacientes que están en riesgo de toxicidad secundaria a 6-MP. La información genética aportada por estos estudios, usados en combinación con otras características del paciente podrían ayudar a disminuir los efectos adversos y lograr una terapia individualizada beneficiosa para el paciente en cuestión.

JUSTIFICACIÓN

La leucemia linfoblástica aguda es el tipo de cáncer más común en menores de 15 años y la frecuencia de presentación en la Ciudad de México puede llegar hasta un 57.6 por millón de niños, el impacto a la salud es muy alto, llegándose a considerar es un tema prioritario de salud a nivel Nacional dentro del Instituto Mexicano del Seguro Social. El Centro Médico Nacional “La Raza”, es uno de los centros con mayor experiencia en el tratamiento de los pacientes pediátricos con LLA. La variabilidad de la respuesta a los esquemas de quimioterapia ha generado líneas de investigación a nivel mundial. Se ha demostrado que el genotipo de la TPMT se correlaciona directamente con la actividad de la enzima y esta a su vez tiene una correlación inversa con los niveles de TGNs dentro de los eritrocitos y células leucémicas. Numerosos estudios han demostrado toxicidad hematológica grave que puede poner en riesgo la vida, después de la administración de dosis estándar de tiopurinas a pacientes que portan variantes no funcionales de TPMT y el genotipo de TPMT predice el riesgo de toxicidad y parece influir en la respuesta al tratamiento en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda que reciben 6-MP. La detección y tipificación de polimorfismos genéticos como la TPMT que se propone en este estudio no se detecta de manera rutinaria en el servicio de Hematología Pediátrica y tampoco hemos evaluado las variaciones clínicas de los pacientes con LLA a las tiopurinas durante su esquema de quimioterapia.

Este trabajo permitirá evaluar la frecuencia de polimorfismos de TPMT que tenemos en nuestra población de pacientes pediátricos con LLA y de esta manera conocer si la pérdida congénita de la actividad del TPMT está asociada a la respuesta clínica que presentan los pacientes con LLA durante el tratamiento de quimioterapia a

base de tiopurinas. La información permitirá revisar y detectar condiciones de mejora para alcanzar las metas internacionales, así como difundir los resultados a la comunidad médica con fines de mayor apoyo y confianza en el tratamiento.

OBJETIVO: Conocer la frecuencia de polimorfismos de la tiopurina S-metiltransferasa (TPMT) en los pacientes con diagnósticos de leucemia Linfoblástica aguda en el servicio de hematología pediátrica de la UMAE centro medico nacional “la raza”. **OBJETIVOS ESPECIFICO:** Identificar las frecuencias alélicas y genotípicas de tiopurina S-metil transferasa

MATERIAL Y MÉTODOS:

DISEÑO DEL ESTUDIO

Observacional, descriptivo, Transversal, Riesgo mínimo.

Período del Estudio

Enero del 2015 a Enero 2017

UNIVERSO DE TRABAJO: Pacientes menores de 16 años de edad, de ambos géneros, con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda, atendidos en el servicio de Hematología Pediátrica de la UMAE Hospital General del Centro Médico Nacional La Raza.

TAMAÑO DE LA MUESTRA: De acuerdo al estudio realizado al grupo de Pérez-Saldívar y colaboradores en 2011, reporta que la leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el tipo más frecuente de leucemia presentada en la edad pediátrica constituyendo el 85.1% de los casos. Si consideramos que dentro de la presentación de los polimorfismos de TPMT que pudiera tener una repercusión clínica por tener una actividad intermedia, se presenta en el 6%, por lo que proponemos:

$$N = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.06) (0.94)}{(0.05)^2}$$

$$n = \frac{(3.84) (0.564)}{0.0025} = 86.6$$

n= 87 pacientes

Considerando un 10% de pérdidas, se considerará una muestra de 96 pacientes.

VARIABLES DE ESTUDIO

VARIABLES DEMOGRAFICAS:

EDAD

DEFINICIÓN CONCEPTUAL: Tiempo transcurrido desde el nacimiento del individuo hasta el diagnóstico de la leucemia.

DEFINICIÓN OPERACIONAL: Se verifico la edad en años desde el nacimiento hasta el diagnostico de LLA-B de riesgo habitual registrada en el expediente del paciente y se registrará en la hoja de recolección de datos.

TIPO DE VARIABLE: Cuantitativa

ESCALA DE MEDICIÓN: Discreta

INDICADOR: Años

GENERO

DEFINICIÓN CONCEPTUAL: Condición biológica que distingue entre hombre y mujer.

DEFINICIÓN OPERACIONAL: Se verifico en el expediente clínico que se consignó durante el examen físico.

TIPO DE VARIABLE: Cualitativa

ESCALA DE MEDICIÓN: Nominal dicotómica

INDICADOR: Hombre / Mujer

VARIABLE DEPENDIENTE

TIOPURINA

DEFINICIÓN CONCEPTUAL: Antineoplásico antimetabolito no nucleosídico de las bases púricas.

DEFINICIÓN OPERACIONAL: Se verifico en el expediente clínico.

TIPO DE VARIABLE: Cualitativa

ESCALA DE MEDICIÓN: Nominal dicotómica

INDICADOR: Toma o no toma el fármaco.

VARIABLE INDEPENDIENTE:

POLIMORFISMOS DE TIOPURINA S-METILTRANSFERASA

DEFINICIÓN CONCEPTUAL: Variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población.

DEFINICIÓN OPERACIONAL: Determinación por PCR tiempo real con sondas Taqman de los polimorfismos de TPMT (2, 3*A, 3*B, 3*C)

TIPO DE VARIABLE: Cualitativa politómica

ESCALA DE MEDICIÓN: Porcentaje

INDICADOR: Presente o ausente en uno o ambos alelos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Los resultados se analizaron y se presentan por medio de tablas o gráficas
- Para las variables cualitativas se determino las frecuencias de polimorfismos genéticos.
- Para las variables cuantitativas por medio de medidas de tendencia central y de dispersión.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

1. Pacientes mayores de 1 mes y menores de 16 años con Diagnóstico de LLA del servicio de Hematología Pediátrica del HG CMN Raza.
2. Que tutores o responsables firmen carta de consentimiento informado y con aceptación mediante carta de asentimiento informado para niños mayores de 8 años.
3. Que cuenten con expediente completo y con datos de laboratorio.
4. Pacientes sin comorbilidad durante el Tratamiento de LLA

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- a) Pacientes con hepatopatías y enfermedad renal primarias.
- b) Síndrome de Down
- c) Pacientes con LLA, que no cuente con expediente completo o que contenga los datos a analizar.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:

1. Pacientes que fallezcan durante su tratamiento.
2. Pacientes que no tengan completos los resultados de laboratorio.
3. Muestra insuficiente para detección de polimorfismo

Recursos e Infraestructura

La unidad cuenta con un laboratorio e instalaciones que permitieron de manera segura emplear técnicas de biología para realizar y llevar a buen término la propuesta de determinación de las variantes de tiopurina en estos pacientes con LLA que se incluirán como parte del estudio en este protocolo. Se tiene un sistema de recepción que asegura que la muestra sea procesada en un tiempo óptimo. Se cuenta con campanas de bioseguridad para el correcto aislamiento y extracción de DNA. También se cuenta con instalaciones que evitan la contaminación en los pasos críticos como es la adición de la mezcla y amplificación de la muestra con los iniciadores específicos. Se cuenta con equipo especializado para llevar a cabo las determinaciones de las variables con técnicas de biología molecular como es el empleo de sondas TaqMan.

ANTECEDENTES

DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

La leucemia aguda es el resultado de la expansión clonal que da lugar a la proliferación incontrolada y acumulación de células inmaduras denominadas blastos.¹ Es la neoplasia maligna más frecuente, representando un 25-30% de todas las neoplasias en niños.² En el caso de la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) la afección clonal surge en la línea linfoide² y representa el 85% de los casos en niños.³ La incidencia de nuevos casos por año en nuestro medio es de 49.3 por millón, lo que hace que sea una enfermedad de suma relevancia.³

ETIOLOGÍA

Hasta el momento la etiología de la LLA es multifactorial, sin embargo se ha encontrado que en 5% se relaciona con aparición de síndromes genéticos (ej. Síndrome de Down), inmunodeficiencia hereditaria o adquirida, como deficiencia de inmunoglobulina A; agammaglobulinemia, y síndrome de Wiskott-Aldrich, etc. El factor hereditario es raro, sólo juega un papel pequeño sobre el origen de este padecimiento.⁴ Otros factores de riesgo son: ambientales: como la exposición a rayos X en útero, o a reacciones nucleares; ocupacionales: como en tareas agrícolas, de soldadura, en la industria maderera, así como por el uso de pesticidas, plaguicidas, tintes de cabello y solventes; antecedente de quimioterapia y radioterapia previas; algunos fármacos como la fenitoína; tabaquismo antes y durante el embarazo como causa de leucemia linfoblástica aguda en niños, al igual que consumo materno de alcohol en el embarazo; dieta rica en nitratos. Se han estudiado diferentes tipos de procesos infecciosos predominantemente de tipo viral dentro de la etiología con resultados positivos,⁵ así como otros factores asociados a rearrreglos genéticos que hacen que tengan un mejor o peor pronóstico.⁶⁻⁷ Por todo esto se considera que la etiología de la LLA es multifactorial por lo que no existe como tal un modelo de prevención para esta patología.

CUADRO CLÍNICO

La aparición de leucemia linfoblástica aguda varía según sus manifestaciones clínicas, que reflejan el grado de insuficiencia de la médula ósea, de infiltración extramedular y de agudeza. Casi la mitad de los pacientes cursa con fiebre, así mismo otras manifestaciones clínicas frecuentes son astenia y adinamia secundario a la anemia.⁸ Del 33 al 43% tiene hemorragias o petequias por trombocitopenia y 25% refiere dolor articular u óseo debido a la infiltración leucémica del periostio, hueso o articulación. Los signos que se observan en la piel y las mucosas son petequias y equimosis. El hígado, bazo y los ganglios linfáticos son los sitios extramedulares, encontrándose en 17% de los

pacientes hepatomegalia; en 44%, esplenomegalia, y en 15% linfadenopatía.¹ Otras manifestaciones clínicas que aparecen en pacientes con leucemia linfoblástica son: masa mediastínica, observada en 7 a 10% de niños, engrosamiento escrotal que puede ser signo de leucemia testicular o hidrocele secundario a obstrucción linfática, nódulos subcutáneos (leucemia cutis), engrosamiento de las glándulas salivales (síndrome de Mikulicz), parálisis de los pares craneales. La anemia, la neutropenia y la trombocitopenia son hallazgos comunes en pacientes recientemente diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda, que muestran grave afección de la médula ósea por las células leucémicas.⁸

DIAGNOSTICO

Respecto al diagnóstico clínico debe ser complementado con varios estudios de gabinete, tales como radiografía de tórax para la búsqueda de masas mediastinales,⁹ y dentro de los estudios de laboratorio que se necesitan se requiere de un aspirado de médula ósea para estudio morfológico, fenotipo, citoquímica, cariotipo y de biología molecular,¹⁰ así como punción lumbar para análisis de líquido cefalorraquídeo. Todo esto con el fin de realizar una adecuada clasificación del tipo de leucemia linfoblástica aguda y establecer de esta manera factores de mal pronóstico para modificar la intensidad del tratamiento basado en las características biológicas y genéticas de la LLA.^{11,12}

TRATAMIENTO

En los últimos treinta años se han logrado avances significativos de la LLA en países desarrollados donde cuentan con tasas de supervivencia libre de eventos a 5 años de más del 90% y con un rango de cura del 85%.¹³ En nuestra población se reporta una tasa de supervivencia libre de eventos a 5 años del 63.9%. Un factor importante en la supervivencia consiste en la reducción de la toxicidad de los fármacos, lo cual disminuye la interrupción de quimioterapia y menor porcentaje de recaídas de la LLA. Por lo tanto, hay una necesidad de adaptar el tratamiento al individuo con el fin de limitar la toxicidad relacionada con la droga y mejorar la supervivencia de los pacientes.¹⁴ El éxito del tratamiento es atribuido en parte a la fase de mantenimiento que tiene como objetivo prolongar la remisión obtenida durante la primera fase, con una duración aproximada que va de 18 a 24 meses.⁶ Los principales fármacos utilizados en los protocolos estándar y que son pilares del tratamiento en la fase de mantenimiento de la LLA son: metotrexate y los análogos de purinas (6-mercaptopurina), que son cruciales en esta patología. Ambos fármacos ejercen su efecto al inhibir la síntesis de novo de purinas. La combinación de estos dos fármacos a dosis bajas da como resultado una acción

sinérgica.¹⁴⁻¹⁵ La 6-mercaptopurina es fundamental en la fase de intensificación de la quimioterapia, se administra por 14 días a dosis de 50 mg/m²/d vía oral, en un esquema de 30 semanas.¹⁶

TIOPURINAS

INDICACIONES Y MECANISMO DE ACCIÓN

Las tiopurinas son fármacos se han clasificado dentro del grupo de drogas antiproliferativas o citotóxicas, tales como 6-tioguanina, azatioprina (AZA) y 6-mercaptopurina (6MP), estos son los fármacos inmunomoduladores más utilizados para el tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, leucemia linfoblástica aguda, así como otras enfermedades reumatológicas, inmunológicas e infecciosas. Desde las primeras descripciones en la década de los años setenta, numerosos estudios y series abiertas han corroborado la utilidad del tratamiento con estos medicamentos.¹⁶

La 6-MP es un antineoplásico antimetabolito no nucleosídico de las bases púricas. Actúa como falso sustrato en el proceso de síntesis, (actuando en la fase S del ciclo celular) de los constituyentes esenciales de los ácidos nucleicos, provocando la síntesis de un ADN anómalo o incluso la detención del proceso de síntesis de los ácidos nucleicos.¹⁷ La 6-mercaptopurina, 1,7-dihidro-6H-purina-6-tionina ó abreviadamente 6-MP es administrada como una dosis diaria oral durante la terapia de mantenimiento, en esta fase de tratamiento se usa bajas dosis de antimetabolitos orales y forma parte importante del éxito de la terapia.¹⁸

FARMACOCINETICA

En el tratamiento de la LLA la 6-MP se administra por vía oral, con una biodisponibilidad pobre de un 5-37%. Apenas atraviesa la barrera hematoencefálica.¹⁹ Su unión a proteínas plasmáticas es 20%. Estudios que han determinado curvas de concentración plasmática han encontrado que su vida media es entre 1-1.5 h, si se usa la vía intravenosa la vida media de aproximadamente 90 minutos.¹⁹ El metabolismo es principalmente hepático a través de la oxidación por la xantina oxidasa a metabolitos inactivos como el ácido 6-tiúrico o por la metilación, a través de la tiopurina S-metiltransferasa, dando lugar a la formación de la 6-metilmercaptopurina, que puede ser fosforilada y originar nucleótidos activos.²⁰ De esta manera la 6-MP actúa como antagonista de la purina, requiriendo inicialmente la captación celular y anabolismo intracelular para convertirse en nucleótidos de tioguanina para que sea citotóxica. Los metabolitos inhiben la síntesis *de novo* de las purinas y las interconversiones con nucleótidos de purina. La AZA y 6-MP determinan la apoptosis de los Linfocitos T secundario a la interacción inhibitoria de un metabolito de AZA, que es la 6-

tioGTP en combinación con Rac-1, la cual está involucrada en la vía de traducción de CD28, finalmente se convierte en una señal apoptótica.²¹⁻²²

FARMACODINAMIA

La 6-MP es análogo de la purina natural hipoxantina y guanina. La 6-MP es metabolizada por tres vías; xantina oxidasa (XO), tiopurina S-metiltransferasa (TPMT) e hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HPRT).¹⁶⁻²¹ La vía mediada por XO produce metabolito inactivo ácido 6-tioúrico (6-TU). La TPMT cataliza la producción de metil-mercaptopurina (meMP). La vía de la HPRT genera 6-tioinosina monofosfato (6-TIMP). Una vez formada, la 6-TIMP puede ser transformada por 3 vías; mediante las enzimas inosina 5-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) y guanina monofosfato sintetasa (GMPS), genera nucleótidos de tioguanina (6-TGNs), por medio de la TPMT es metilada a metil-tioinosin monofosfato (meTIMP) o puede ser fosforilada por la enzima inosina trifosfato pirofosfatasa (ITPasa) para generar 6-tio-inosina trifosfato (6-tio-ITP). Los metabolitos meTIMP, 6-tio-ITP y 6-TGNs son activos.^{23,24,25,26} Estos fármacos pueden incorporarse al ADN. La incorporación de 6-TGNs en el DNA puede iniciar la muerte celular, probablemente por reparación de una vía del genoma. Dos importantes reacciones inactivan a las tiopurinas *in vivo*, la oxidación catalizada por la xantina oxidasa y la S-metilación catalizada por tiopurina S-metiltransferasa (TPMT). Debido a la ausencia de xantina oxidasa a nivel hematopoyético, la metilación por la TPMT tiene un rol preferencial en la metabolización de las drogas tiopurínicas.²³⁻²⁷

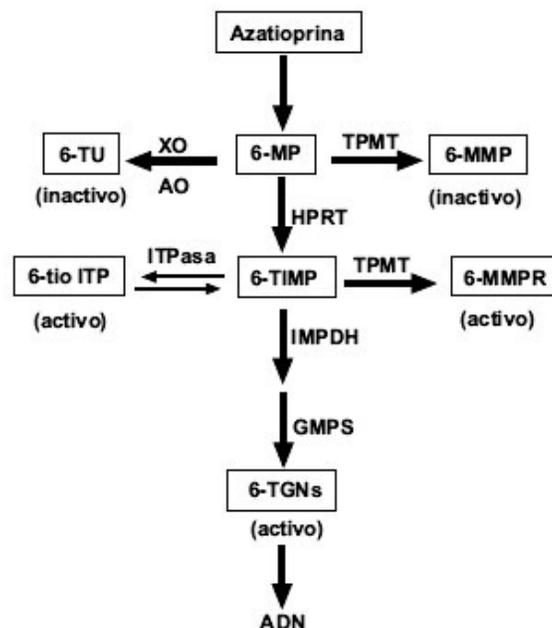


Figura 1: Metabolismo de las tiopurinas. (Luis Álvarez. *et al.*, 2009)

EFFECTOS ADVERSOS

Los efectos adversos a estos medicamentos se presentan en distintos sistemas: gastrointestinal, caracterizado por anorexia, colestasis, diarrea, mucositis, lesiones orales, náusea, pancreatitis, dolor abdominal, vómito, úlceras gástricas; genitourinario, presentando oligospermia, toxicidad renal, uricosuria; metabólico reportándose hiperglicemias; dermatológico con presencia de alopecia, hiperpigmentación, urticaria, rash en piel; hepático puede presentar ascitis, encefalopatía hepática, fibrosis hepática, necrosis hepática, hepatomegalia, hiperbilirrubinemia, hepatitis tóxica; inmunológico caracterizado por inmunosupresión; respiratorio con presencia de fibrosis pulmonar; sistema nervioso central pudiendo presentar fiebre o cefalea y finalmente uno de los efectos adversos más frecuentes es la toxicidad hematológica presentando anemia, leucopenia, trombocitopenia y neutropenia.²⁴

TIOPURINA S-METILTRANSFERASA (TPMT)

La metilación es una vía importante en el metabolismo de moléculas endógenas y exógenas, como los medicamentos. La tiopurina metiltransferasa (TPMT) es una de las más de 100 enzimas metiltransferasas identificadas hasta ahora, utiliza S-adenosil-L-metionina (SAM) como donador de grupos metilo y cataliza la S-metilación de los fármacos del grupo de las tiopurinas, entre ellos la 6-MP.^{16,23-27} Las enzimas que participan en el metabolismo de fármacos son responsables de su activación, inactivación o detoxificación. Variaciones en la secuencia de los genes que codifican estas enzimas, ya sea en uno o ambos alelos, pueden modificar su actividad catalítica y condicionar diferencias individuales en la respuesta o en la toxicidad a diversos fármacos.²⁴

La actividad de la TPMT muestra un polimorfismo genético, la deficiencia de TPMT se presenta en cerca de 1/300 como un rasgo autosómico recesivo. Si se trata con dosis estándar de tiopurinas, los pacientes con deficiencia, acumulan nucleótidos de tioguanina en los tejidos hematopoyéticos, lo que lleva a toxicidad hematológica severa que puede ser fatal.¹⁶ Sin embargo, los pacientes con deficiencia de TPMT puede ser tratados con éxito con una dosis 10 a 15 veces menor de estos medicamentos. El genotipo de TPMT se correlaciona bien con la actividad enzimática *in vivo* dentro de los eritrocitos y los blastos leucémicos y se asocia claramente con el riesgo de toxicidad.²⁵ El impacto de la dosis de 6-mercaptopurina, se determinó como un factor importante para la supervivencia libre de eventos en los niños con leucemia. Los estudios en curso tienen por objeto aclarar la influencia de la TPMT en la eficacia de tiopurina, la toxicidad aguda, y el riesgo de

toxicidad retardada. Juntos, estos avances ofrecen la promesa de mejorar la seguridad y eficacia de la terapia con 6-mercaptopurina.²³⁻²⁷

BASES MOLECULARES DE LA ACTIVIDAD ALTERADA DE TPMT

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 los últimos años se ha producido un gran avance en el conocimiento de los polimorfismos genéticos que afectan tanto a las enzimas involucradas en la activación y/o detoxificación de los agentes quimioterápicos como a determinadas dianas moleculares en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda.²⁸⁻²⁹ El objetivo de la farmacogenética es predecir la eficacia y la toxicidad de los fármacos en función del perfil genético de cada paciente, lo que permite seleccionar el medicamento más apropiado y las dosis óptimas para cada tipo de paciente y leucemia.³⁰

La eficacia y la toxicidad de las tiopurinas se relacionan con las concentraciones de los nucleótidos de tioguanina (TGN).²³ La TPMT tiene actividad variable por ser genéticamente muy polimórfica.²⁴ Como resultado de numerosos estudios poblacionales se ha demostrado que la actividad de la TPMT sigue un patrón de distribución trimodal, con niveles de actividad altos, intermedios y bajos. En diversos estudios se han demostrado una frecuencia en la población de los polimorfismos de la TPMT con alta actividad en un 89-94%, actividad intermedia de 6-11% y muy raro en individuos con baja actividad de 0.3%.²⁵ El polimorfismo genético de la TPMT se convierte así en el mayor determinante de la variabilidad interindividual en las respuestas tóxicas y terapéuticas a las tiopurinas. Bajos niveles de TPMT resultan en altas concentraciones de nucleótidos de tioguanina, lo que representa un factor de riesgo de toxicidad inducida por tiopurinas, como la mielosupresión, mientras los individuos con muy alta actividad de TPMT tendrán respuestas terapéuticas reducidas a estos agentes.²³⁻²⁷

FENOTIPOS

Dentro de las variantes polimórficas se determinan 3 fenotipos:

- a) Variante homocigota de tipo silvestre (actividad normal o alta): esto significa que hay dos copias del gen TPMT de actividad normal. Esto da como resultado una actividad normal de TPMT.²⁵
- b) Variante heterocigota (actividad intermedia): esto significa que hay un gen de actividad normal y una copia de un gen TPMT sin actividad. Estos pacientes tienen una actividad de

TPMT media y pueden requerir dosis más bajas de medicamentos con tiopurinas para evitar efectos secundarios.²⁵

- c) Variante homocigota (actividad baja o sin actividad): esto significa que hay dos copias del gen TPMT sin actividad y no hay una enzima TPMT normal. Estos pacientes tienen un muy alto riesgo de experimentar efectos secundarios de 6-MP o 6-TG, o azatioprina (1 de cada 400) muy alto riesgo.²⁵

Estas formas de presentación fenotípicas están dadas en su mayoría por las variantes de TPMT. De acuerdo a los resultados del estudio de Spire-Vyron en el año de 1998, que se llevó a cabo en 191 caucásicos europeos, en el que se describen los polimorfismos presentes en el cromosoma 6 (6p22.3) y se describen las 20 mutaciones y lugares de ocurrencia de estas, así como el impacto clínico asociado.²³⁻²⁷

GENOTIPOS

El gen TPMT fue mapeado en el brazo corto del cromosoma 6, en la banda 6p22.3, tiene aproximadamente 34 kb de longitud y consiste de 10 exones, 8 de los cuales codifican una proteína de 245 aminoácidos con peso molecular de 28 kDa. En este gen se han caracterizado un total de nueve alelos mutantes no funcionales, siendo prevalentes los alelos TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B y TPMT*3C. Estas variantes alélicas contienen mutaciones puntuales que provocan sustitución de aminoácidos (*2, *3A, *3B, *3C, *5, *6, *7), formación de un codón de terminación prematuro (*3D) o destrucción de un sitio de splicing alternativo (*4).²⁵

La pérdida de la actividad enzimática está asociada a los nucleótidos polimórficos únicos (SNPs) en el gen de la enzima TPMT, y está relacionada con la etnicidad. Hasta la fecha, ocho alelos de TPMT han sido identificados, incluyendo tres alelos (TPMT *2, TPMT * 3A y TPMT * 3C) que representan el 80-95% de los casos de actividad enzimática intermedia o baja. **TPMT*1**: corresponde a la forma silvestre, cuyo fenotipo es de alta actividad enzimática; **TPMT*2**: donde hay un cambio del nucleótido guanina por citosina en la posición 238 del gen (G238C), que se traduce en la sustitución de una alanina por una prolina en el codón 80 (Ala80Pro). **TPMT*3A**: contiene dos cambios, G460A y A719G, que resultan en las sustituciones de una alanina por treonina en el codón 154 (Ala154Thr) y de una tirosina por una cisteína en el codón 240 (Tyr240Cys), respectivamente. **TPMT*3B**: ocurre un cambio de guanina por adenina en la posición 460 (G460A) que resulta en el cambio de alanina por treonina en el codón 154 (Ala154Thr). Y por último la variante **TPMT*3C** donde existe un cambio A719G, que resulta en la sustitución de una tirosina por una cisteína en el codón 240 (Tyr240Cys).³¹

ESTUDIOS INTERNACIONALES Y NACIONALES

La frecuencia y el patrón de alelos mutantes TPMT es diferente entre las diversas poblaciones étnicas. Por ejemplo, los asiáticos (India, Pakistán) tienen una menor frecuencia de alelos mutantes de TPMT y todos los alelos mutantes identificados hasta la fecha son TPMT*3A. Esto está en contraste con el Este y la población de África Occidental en el que la frecuencia de alelos mutante es similar a los caucásicos, donde todos los alelos mutantes encontrados en las poblaciones africanas son TPMT*3C. Entre Los afroamericanos, TPMT*3C es la más frecuente, pero también se encuentran TPMT*2 y TPMT*3A. La frecuencias varían desde 0.5 a 0.2% para TPMT*2, TPMT*3A de 0.8 a 5.7%. En los sujetos de raza blanca, TPMT*3A es la más común de los tres alelos, con una frecuencia de 3.2 a 5.7%, mientras que TPMT*3C en LLA tiene una frecuencia del alelo 0,2-0,8%.²³⁻²⁷

En México el grupo de Investigadores encabezados por Taja-Chayeb desarrolló un estudio con el objetivo de determinar la frecuencia de polimorfismos de la TPMT, sus resultados mostraron que de los 39 pacientes con LLA el polimorfismo más frecuente fue el TPMT*1 con 87.2%, en segundo lugar TPMT*3A con 7.6%, TPMT*2 con 2.7% y TPMT*3C con 2.5% como se muestra en la tabla 1.³¹ El segundo estudio realizado en México en 2009 por González del Ángel, determinó la variabilidad genotípica de una muestra de recién nacidos de la ciudad de México, se analizaron 360 muestras de ADN y se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas. De los 720 alelos estudiados la frecuencia de presentación fue: TPMT*1 93.19 %, en segundo lugar TPMT*3A con 5.69% y finalmente se encontró la misma frecuencia para TPMT*2 y TPMT*3B con 0.28%. Los resultados de estudios realizados en la población mexicana no son concluyentes ya que muestran diferencias en la frecuencia y tipo de polimorfismo de TPMT. De acuerdo al estudio de González del Ángel sugiere que aproximadamente 1 de cada 180 personas nacidas en Distrito Federal presenta polimorfismo con una pobre o nula producción de TPMT, esta frecuencia es mucho más alta que lo reportado en las series internacionales en la población caucásica (1 en 300) (González del Ángel, 2009).³²

Alelos	HIMFG* n = 240	Mexicanos INCan ²²		INP** ²³ n = 360
		LLA n = 39	Sanos n=108	
<i>TPMT*1</i>	85.62	87.2	92.17	93.19
<i>TPMT*2</i>	3.75	2.7	0.9	0.28
<i>TPMT*3A</i>	2.91	7.6	3.23	5.69
<i>TPMT*3B</i>	4.1	0	2.3	0.28
<i>TPMT*3C</i>	3.54	2.5	1.4	0.56

Tabla 1 Frecuencias relativas de las variantes alélicas del gen de TPMT en 3 estudios mexicanos, Taja-Chayev (2008) INCan, González del Ángel (2009) INP, Moreno Guerrero (2013) HIM

Otro estudio donde se realizó la determinación de la frecuencia de polimorfismos fue realizado por Moreno-Guerrero, en el Hospital Infantil de México (2013) incluyendo a 240 niños con tumores sólidos y leucemias coincidiendo con los dos estudios previamente mencionados en que la variante más frecuente en nuestro medio es la TPMT*1 con un 85.62%, seguido de TPMT*2 3.75%, TPMT *3C con 3.54%, TPMT *3B con 4.1% y finalmente difiriendo con los dos estudios previos encontrando que la menos frecuente fue TPMT*3A. (Moreno-Guerrero, 2013).³³

El entusiasmo por la farmacogenética de TPMT se ha visto estimulado por la confirmación de que el genotipo de la TPMT se identifica en pacientes que están en riesgo de toxicidad secundaria a 6-MP. Con los datos recientes se demuestra la importancia clínica de la intensidad de la dosis de 6-MP en la supervivencia de los pacientes. La información genética aportada por estos estudios, usados en combinación con otras características del paciente como la edad, estado de salud general, medicamentos adyuvantes, etc., podrían ayudar a disminuir los efectos adversos y lograr una terapia individualizada beneficiosa para el paciente en cuestión.²³

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. Estudios realizados en Latinoamérica muestran una mayor frecuencia de alelo TPMT*3A en sujetos de Argentina, Colombia y Bolivia, en Brasil el alelo más frecuente corresponde al TPMT*2.^{23-27,34} Hasta la fecha existen pocos estudios sobre el polimorfismo del gen de la TPMT en población Mexicana y ninguno realizado en nuestra población de CMN "La Raza". El objetivo de este trabajo es determinar la presencia y prevalencia de los alelos de la TPMT en una población pediátrica con leucemia linfoblástica aguda.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leucemia linfoblástica aguda es el cáncer más común en niños, en las últimas 3 a 4 décadas se han logrado grandes avances en el tratamiento con incremento en la supervivencia hasta en un 85% en los países desarrollados. Uno de los fármacos principales que forma la base de los esquemas de tratamiento de la LLA es la 6-mercaptopurina, esta es inactivada por los polimorfismos de la enzima de tiopurina s-metiltransferasa (TPMT). La actividad enzimática de la TPMT presenta una amplia variabilidad interindividual, presentando una distribución polimórfica trimodal en caucásicos, donde aproximadamente 90% de los individuos tienen actividad elevada (tipo silvestre), 10% tienen actividad moderada (individuos heterocigotos) y 0.3% muestra una actividad metiltransferasa nula, porque heredan los dos alelos no funcionales. Las proteínas codificadas por estas variantes genéticas son degradadas rápidamente, resultando una baja actividad enzimática. Se ha demostrado que el genotipo de la TPMT se correlaciona directamente con la actividad de la enzima y esta a su vez tiene una correlación inversa con los niveles de TGNs dentro de los eritrocitos y células leucémicas. Existen numerosos estudios que demuestran que se puede presentar toxicidad hematológica grave posterior a la administración de dosis estándar de tiopurinas en pacientes que portan variantes no funcionales de TPMT y por lo tanto el genotipo de TPMT predice el riesgo de toxicidad e influye en la respuesta al tratamiento en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda que reciben 6-MP. En México existen pocos estudios sobre la distribución del polimorfismo del gen de la TPMT, sin embargo los 3 estudios publicados los cuales se realizaron en centros de referencia tales como INCan, HIM e INP, donde reportan que la variante más frecuente en nuestra población es la TPMT*1. Es por ello, que se considero importante conocer cual es la frecuencia de polimorfismos de la TPMT en los pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda en el servicio de hematología pediátrica de la UMAE Centro Médico Nacional "La Raza", ya que al establecer la relación de estos polimorfismos con la respuesta de cada paciente al tratamiento, permitiría valorar la modificación de las dosis de acuerdo al genotipo, disminuyendo de esta manera la toxicidad hematológica, y así disminuyendo los costos producidos por las hospitalizaciones secundarias a toxicidad hematológica e incrementando la supervivencia en nuestra población. Por lo anterior, deseamos contestar a la siguiente pregunta de investigación.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la frecuencia de polimorfismos de la tiopurina S-metiltransferasa (TPMT) en los pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda en el servicio de hematología pediátrica de la UMAE Centro Médico Nacional “La Raza”?

OBJETIVOS GENERAL

Conocer la frecuencia de polimorfismos de la tiopurina S-metiltransferasa (TPMT) en los pacientes con diagnósticos de leucemia Linfoblástica aguda en el servicio de hematología pediátrica de la UMAE centro medico nacional “la raza”.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar las frecuencias alélicas y genotípicas de tiopurina S-metil transferasa

JUSTIFICACIÓN

La leucemia linfoblástica aguda es el tipo de cáncer más común en menores de 15 años y la frecuencia de presentación en la Ciudad de México puede llegar hasta un 57.6 por millón de niños, el impacto a la salud es muy alto, llegándose a considerar es un tema prioritario de salud a nivel Nacional dentro de Instituto Mexicano del Seguro Social. El Centro Médico Nacional “La Raza”, es uno de los centros con mayor experiencia en el tratamiento de los pacientes pediátricos con LLA. La variabilidad de la respuesta a los esquemas de quimioterapia ha generado líneas de investigación a nivel mundial. Se ha demostrado que el genotipo de la TPMT se correlaciona directamente con la actividad de la enzima y esta a su vez tiene una correlación inversa con los niveles de TGNs dentro de los eritrocitos y células leucémicas. Numerosos estudios han demostrado toxicidad hematológica grave que puede poner en riesgo la vida, después de la administración de dosis estándar de tiopurinas a pacientes que portan variantes no funcionales de TPMT y el genotipo de TPMT predice el riesgo de toxicidad y parece influir en la respuesta al tratamiento en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda que reciben 6-MP. La detección y tipificación de polimorfismos genéticos como la TPMT que se propone en este estudio no se detecta de manera rutinaria en el servicio de Hematología Pediátrica y tampoco hemos evaluado las variaciones clínicas de los pacientes con LLA a las tiopurinas durante su esquema de quimioterapia.

Este trabajo permitirá evaluar la frecuencia de polimorfismos de TPMT que tenemos en nuestra población de pacientes pediátricos con LLA y de esta manera conocer si la pérdida congénita de la actividad del TPMT está asociada a la respuesta clínica que presentan los pacientes con LLA durante el tratamiento de quimioterapia a base de tiopurinas.

La información permitirá revisar y detectar condiciones de mejora para alcanzar las metas internacionales, así como difundir los resultados a la comunidad médica con fines de mayor apoyo y confianza en el tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

a. DISEÑO DEL ESTUDIO

Observacional, descriptivo, Transversal, Riesgo mínimo.

Período del Estudio

Enero del 2015 a Enero 2017

UNIVERSO DE TRABAJO

Pacientes menores de 16 años de edad, de ambos géneros, con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda, atendidos en el servicio de Hematología Pediátrica de la UMAE Hospital General del Centro Médico Nacional La Raza.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

De acuerdo al estudio realizado al grupo de Pérez-Saldívar y colaboradores en 2011, reporta que la leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el tipo más frecuente de leucemia presentada en la edad pediátrica constituyendo el 85.1% de los casos. Si consideramos que dentro de la presentación de los polimorfismos de TPMT que pudiera tener una repercusión clínica por tener una actividad intermedia, se presenta en el 6%, por lo que proponemos:

$$N = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.06) (0.94)}{(0.05)^2}$$

$$n = \frac{(3.84) (0.564)}{0.0025} = 86.6$$

n = 87 pacientes

Considerando un 10% de pérdidas, se considerará una muestra de 96 pacientes.

Detección de Polimorfismos:

La detección de las variantes se realizó a partir de extracción de DNA de 2 ml de sangre periférica con un kit comercial Pure Link™ (genomic DNA Mini Kit, Invitrogen).

Para la determinación de cada uno de las variantes (TPMT *2, *3A y *3C) se utilizará Sondas TaqMan (TaqMan® SNP Genotyping Assay, Life Technologies)

TPMT*3A rs1800460:

TCACCTGGATTGATGGCAACTAATG[T/C]TCCTCTATCCCAAATCATGTCAAAT

TPMT*3C, rs1142345 719>G o Y240C

TCTCATTTACTTTTTCTGTAAGTAGA[C/T]ATAACTTTTCAAAAAGACAGTCAAT

TPMT*2 rs1800462 A80P,

CCAACTACACTGTGTCCCCGGTCTG[C/G]AAACCTGCATAAAATCATACATTTA

Las muestras se amplificaron por PCR Tiempo Real en un termociclador,

De Applied Biosystems® 7500 (Fast Dx Real-Time PCR Instrument).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó utilizando:

- Los resultados se analizaron y presentaron por medio de tablas o gráficas.
- Para las variables cualitativas se determinó las frecuencias de polimorfismos genéticos.
- Para las variables cuantitativas por medio de medidas de tendencia central y de dispersión.

Recursos e Infraestructura

La unidad cuenta con un laboratorio e instalaciones que permiten de manera segura emplear técnicas de biología para realizar y llevar a buen término la propuesta de determinación de las variantes de tiopurina en estos pacientes con LLA que se incluirán como parte del estudio en este protocolo. Se tiene un sistema de recepción que asegura que la muestra sea procesada en un tiempo óptimo. Se cuenta con campanas de bioseguridad para el correcto aislamiento y extracción de DNA. También se cuenta con instalaciones que evitan la contaminación en los pasos críticos como es la adición de la mezcla y amplificación de la muestra con los iniciadores específicos. Se cuenta con equipo especializado para llevar a cabo las determinaciones de las variables con técnicas de biología molecular como es el empleo de sondas TaqMan.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

5. Pacientes mayores de 1 mes y menores de 16 años con Diagnóstico de LLA del servicio de Hematología Pediátrica del HG CMN Raza.
6. Que tutores o responsables firmen carta de consentimiento informado y con aceptación mediante carta de asentimiento informado para niños mayores de 8 años.
7. Que contaran con expediente completo y con datos de laboratorio.
8. Pacientes sin comorbilidad durante el Tratamiento de LLA

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- d) Pacientes con hepatopatías y enfermedad renal primarias.
- e) Síndrome de Down
- f) Pacientes con LLA, que no cuente con expediente completo o que contenga los datos a analizar.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:

4. Pacientes que fallezcan durante su tratamiento.
5. Pacientes que no tengan completos los resultados de laboratorio.
6. Muestra insuficiente para detección de polimorfismo

VARIABLES DE ESTUDIO

VARIABLES DEMOGRAFICAS:

EDAD

DEFINICIÓN CONCEPTUAL: Tiempo transcurrido desde el nacimiento del individuo hasta el diagnóstico de la leucemia.

DEFINICIÓN OPERACIONAL: Se verificara la edad en años desde el nacimiento hasta el diagnostico de LLA-B de riesgo habitual registrada en el expediente del paciente y se registrará en la hoja de recolección de datos.

TIPO DE VARIABLE: Cuantitativa

ESCALA DE MEDICIÓN: Discreta

INDICADOR: Años

GENERO

DEFINICIÓN CONCEPTUAL: Condición biológica que distingue entre hombre y mujer.

DEFINICIÓN OPERACIONAL: Se verificará en el expediente clínico que se consignó durante el examen físico.

TIPO DE VARIABLE: Cualitativa

ESCALA DE MEDICIÓN: Nominal dicotómica

INDICADOR: Hombre / Mujer

VARIABLE DEPENDIENTE:

TIOPURINA

DEFINICIÓN CONCEPTUAL: Antineoplásico antimetabolito no nucleosídico de las bases púricas.

DEFINICIÓN OPERACIONAL: Se verificará en el expediente clínico.

TIPO DE VARIABLE: Cualitativa

ESCALA DE MEDICIÓN: Nominal dicotómica

INDICADOR: Toma o no toma el fármaco.

VARIABLE INDEPENDIENTE:

POLIMORFISMOS DE TIOPURINA S-METILTRANSFERASA

DEFINICIÓN CONCEPTUAL: Variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población.

DEFINICIÓN OPERACIONAL: Determinación por PCR tiempo real con sondas Taqman de los polimorfismos de TPMT (2, 3*A, 3*B, 3*C)

TIPO DE VARIABLE: Cualitativa politémica

ESCALA DE MEDICIÓN: Porcentaje

INDICADOR: Presente o ausente en uno o ambos alelos

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se realizó en el Servicio de Hematología pediátrica de la UMAE Hospital General Dr. Gaudencio González Garza del Centro Médico Nacional La Raza, previo registro y aprobación del protocolo por el Comité Local de Investigación en Salud. Se incluyeron en el estudio a todos los pacientes que fueron diagnosticados como LLA de riesgo habitual en el periodo comprendido entre el año 2015 y 2017, menores de 16 años y de ambos generos.

a) Pacientes

A todos los niños mayores de 1 mes y menores de 16 años con Leucemia aguda se les invito a participar en el estudio con autorización bajo consentimiento informado de padres o tutores y a los mayores de 8 años con carta de asentimiento informado.

Como parte del protocolo de estudio de leucemia aguda, se requiere la realización de biometrías hemáticas, se tomo de éstas 2 ml de sangre en un tubo con EDTA.

Los pacientes con LLA se ingresaron al estudio y se destinó los 2 ml para el estudio de genotipificación.

b) Químicos

Medicamento: 6-mercaptopurina, 6-MP

Purinethol

Nombre genérico: Mercaptopurina

Nombre comercial: Purinethol® GLAXOSMITHKLINE

Cuadro básico del IMSS.

Para la Genotipificación de TPMT

1.- Extracción de DNA

La extracción de DNA de las muestras se realizará con el unikit comercial Pure Link™ (genomic DNA Mini Kit, Invitrogen). Según las especificaciones del Producto.

2.- Amplificación de TPMT

Para la determinación de cada uno de las variantes (TPMT *2, 3*A y 3*C) se utilizará Sondas TaqMan (TaqMan® SNP Genotyping Assay, Life Technologies) con número de referencia:

rs1800460 o A154T, codifica al alelo TPMT*3A

TCACCTGGATTGATGGCAACTAATG[T/C]TCCTCTATCCCAAATCATGTCAAAT

rs1142345 719>G o Y240C, codifica al alelo TPMT*3C

TCTCATTTACTTTTCTGTAAGTAGA[C/T]ATAACTTTTCAAAAAGACAGTCAAT

rs1800462 A80P, codifica a TPMT*2

CCAACTACACTGTGTCCCCGGTCTG[C/G]AAACCTGCATAAAATCATAATTTA

La determinación de TPMT*3B se hará por exclusión.

Las muestras serán amplificadas por PCR Tiempo Real en un termociclador,

De Applied Biosystems® 7500 (Fast Dx Real-Time PCR Instrument) diseñado para placas de 96-pozos.

Ensayos de genotipificación. Los ensayos de genotipificación se llevo a cabo mediante discriminación alélica con sondas Taqman. Este ensayo se basa en la amplificación por PCR de un segmento del gen que contiene el polimorfismo de interés mediante oligonucleótidos y posterior discriminación alélica mediante sondas que poseen unido covalentemente un compuesto fluorescente (colorante reportero), se emplean dos sondas: una que contenga uno de los dos tipos de colorantes (VIC ó FAM) y complementariedad por uno de los alelos y la otra sonda posee el otro colorante y complementariedad por el otro alelo. Ambas sondas contienen una molécula que es capaz de unirse al surco menor del DNA (Minor Groove Binder, MGB) y que aumenta la especificidad de unirse exclusivamente a su alelo (Figura 3) así como una molécula que “apaga” la fluorescencia (Non fluorescent quencher, NFQ).

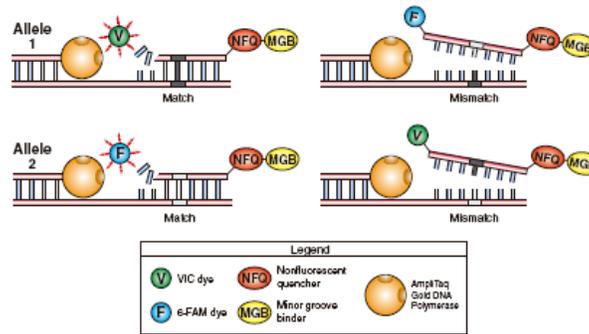


Figura 3. Discriminación alélica de polimorfismos mediante sondas Taqman.

Para la discriminación de alelos durante la amplificación por PCR deben de ocurrir los siguientes eventos:

Cada una de las sondas debe unirse específicamente a su secuencia complementaria ubicada entre los sitios de unión de los primers sentido y antisentido. Si la sonda Taqman está intacta, la cercanía entre el colorante reportero y la molécula NFQ resulta en la supresión de la fluorescencia. La DNA polimerasa corta solo el extremo 5' de las sondas Taqman que se hibridaron en su sitio blanco. El corte enzimático separa el colorante reportero del "quencher", lo cual resulta en un incremento en la fluorescencia específica para el reportero. Este incremento ocurre solo si la secuencia amplificada es complementaria a la sonda. Así, la señal fluorescente generada por el PCR indica a los alelos presentes en la muestra (Figura 3).

El incremento en una sola señal de fluorescencia indica homocigocidad (para el alelo 1 ó el alelo 2) mientras que el incremento en ambas señales de fluorescencia indica heterocigocidad. Por lo tanto para llevar a cabo el ensayo se requiere de 2 oligonucleótidos (primers) para amplificar la región de interés y 2 sondas Taqman-MGB para llevar a cabo la discriminación de alelos.

El procedimiento descrito para este ensayo por Applied Biosystems es el siguiente:

Se preparó la mezcla de reacción mediante la adición de la cantidad adecuada de 2X Taqman Genotyping PCR Master Mix (12.5 µl), 20X SNP Genotyping assay mix (1.25 µl), DNA genómico (1 a 20 ng) y adecuar a 25 µl con agua estéril libre de DNAsa. Se configuro bajo las siguientes condiciones el sistema Abi Prism 7500 SDS para llevar a cabo la amplificación por tiempo real. Se realizó una lectura Pre-read para analizar la fluorescencia de fondo y posteriormente se realiza una cuantificación absoluta el cual lleva el siguiente protocolo. El primer paso fue desnaturalización a 95 °C por 10 minutos; seguido de 40 ciclos de desnaturalización por 15 segundos a 95 °C y una extensión de 1 minuto a 60 °C. Después de la amplificación, se realizó una lectura de placa. En este paso el software SDS (Sequence Detection System) calcula las mediciones de fluorescencia realizadas durante la lectura de la placa y grafica los valores Rn basados en las señales de cada pozo. Con este software se puede determinar que alelos están presentes en cada muestra. En nuestro estudio, en cada una de las muestras de DNA de los pacientes en estudio se llevó a cabo un ensayo de genotipificación para cada SNP a determinar.

ASPECTOS ETICOS

Este proyecto de investigación fue de riesgo mínimo, con apego a la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, en el artículo 17, ya que se considera dentro de estos aquellos estudios prospectivos que emplean el riesgo de datos a través de procedimiento comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnósticos o tratamiento rutinarios entre los que se considera: toma de muestra de laboratorio de 2 ml.

Como parte del protocolo de estudio de leucemia aguda, se requiere la realización de biometrías hemáticas, por lo que a todos los niños mayores de 1 mes y menores de 16 años con Leucemia aguda se les invito a participar en el estudio con autorización bajo consentimiento informado de padres o tutores y a los mayores de 8 años con carta de asentimiento informado. Se tomó de éstas 2 ml de sangre en un tubo con EDTA y se destinó la muestra para el estudio de genotipificación.

La investigación se desarrolló con apego a la declaración de Helsinki del año 2013 y el reglamento de la ley General de salud en materia de investigación. Es importante destacar que las personas que participaron en el proyecto tienen respeto por la confidencialidad del paciente, así como sensibilidad hacia ellos, conociendo la importancia y el impacto que tiene el proyecto.

Los resultados se entregaran al servicio de Hematología Pediátrica del Hospital General “Dr. Gaudencio González Garza” para realizar un seguimiento y permitir estudios posteriores que permitan disminuir la toxicidad de la quimioterapia generada por la 6-MP.

RESULTADOS

En el presente estudio se incluyeron 48 pacientes mayores de 1 mes y menores de 16 años con diagnóstico de LLA del servicio de Hematología Pediátrica del HG CMN Raza, que contaban con expediente completo y cuya muestra del botón leucocitario disponible en el banco del centro de investigación de la UMAE Centro Médico Nacional la Raza para analizar la muestra y sin comorbilidad durante el Tratamiento de LLA. De estos 48 pacientes 23 (49%) corresponden al género femenino y 25 pacientes del género masculino (51%), con un rango de edad de 6 meses a 15.5 años de edad, con una media de 7.9 años, 22 pacientes (45.8%) se encontraban dentro del rango de edad mayor a 9 años (Tabla 1).

Los pacientes que se incluyeron en este estudio se clasificaron por morfología e inmunofenotipo. De acuerdo al grupo Francés-Americano-Británico (FAB) la clasificación por morfología en nuestros pacientes fue con una distribución de 45 pacientes (93.85%) con morfología L1 y 3 pacientes (6.2%) con morfología L2 (tabla 1). De acuerdo al inmunofenotipo se encontró que 42 pacientes (87.5%) correspondían a células B y solo 6 pacientes con inmunofenotipo de células T (12.5%) (tabla 1).

	Numero	Porcentaje
GENERO		
Masculino	25	51
Femenino	23	49
EDAD		
< 1 año	1	2.2
>1-6 años	12	25
>6-9 años	13	27
>9 años	22	45.8
CLASIFICACIÓN DE LA FAB		
L1	45	93.8
L2	3	6.2
L3	0	0
INMUNOFENOTIPO		
Estirpe B	42	87.5
Estirpe T	6	12.5

Tabla 1.- Características generales de los pacientes estudiados.

Por otro lado, de acuerdo al riesgo los pacientes que se estudiaron se distribuyeron de la siguiente manera: 31 pacientes (64.5%) de riesgo alto y 17 pacientes (35.5%) de riesgo habitual (grafico 3).

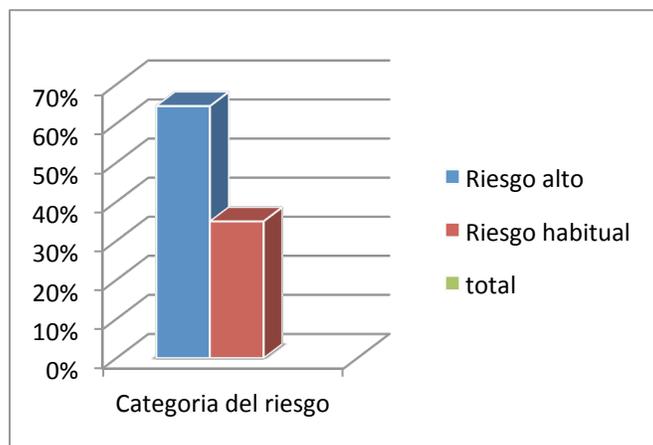


Grafico 3.- Clasificación del riesgo de la leucemia linfoblastica aguda.

En nuestro estudio el genotipo homocigoto silvestre *TPMT*1* se encontró en 45 pacientes (93.7%) y solo 3 pacientes (6.2%) presentaron alguna de las variantes alélicas, en forma de heterocigoto, 6.2% (N=3) tuvieron genotipo *TPMT*1/TPMT*3A*. Las frecuencias en los 96 alelos analizados fueron: *TPMT*1* en 93 (96.8%), *TPMT*3A* en 3 pacientes (3.2%). El cuadro 3 muestra las frecuencias por genotipo y por alelo en los 48 pacientes estudiados.

Fenotipo	Número	Porcentaje
TPMT*1/TPMT*1	45	93.7%
TPMT*1/TPMT*3A	3	6.2%
	48	100%

Tabla 3.- Genotipo de pacientes con Leucemia Aguda.

Se observa un predominio de presentación de la forma silvestre correspondiente a *TPMT*1/TPMT*1* con un 96.8% en los pacientes con leucemia linfoblastica aguda. Así mismo la segunda variante encontrada fue *TPMT*1/TPMT*3^a* con 6.2%.

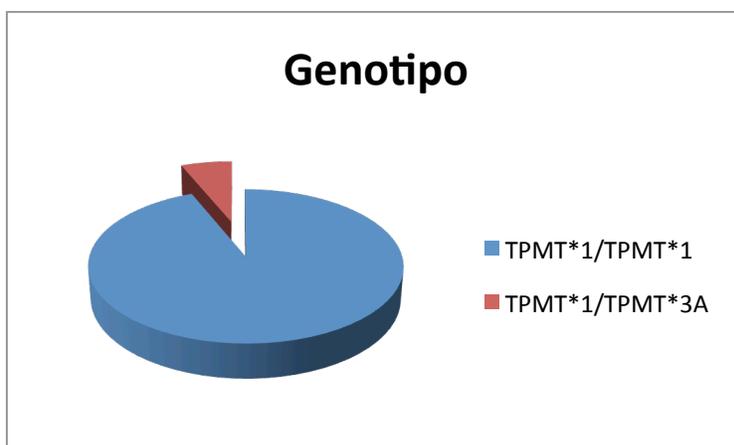


Grafico 4.- Genotipo de polimorfismo de TPMT.

Alelos	Número	Porcentaje
TPMT*1	93	96.8 %
TPMT*3A	3	3.2 %
TPMT*3C	0	0 %
TPMT*2	0	0%
Total	96	100 %

Tabla 4. Frecuencia de alelos estudiados.

DISCUSIÓN

El frecuente uso de 6-MP en el tratamiento de pacientes con LLA, ha despertado el interés del estudio de las variantes alélicas de la TPMT. Los efectos adversos descritos causados por la administración de estos fármacos han sido asociados a la presencia de polimorfismos en el gen de la enzima y obliga a la suspensión del tratamiento en 15-30% de los pacientes.⁷

El análisis de polimorfismos de la TPMT se realiza de manera rutinaria en algunos centros con el fin de individualizar las dosis de estos medicamentos, esta es importante en la evaluación de los pacientes que requieren tiopurinas como parte de su tratamiento de LLA. 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). 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.

En nuestra población se observa que la presencia de polimorfismo en la enzima TPMT es similar a la

descrita en los estudios realizados por Moreno-Guerrero, Taja-Chayec y Gonzalez del Angel, encontrando que la variante alélica más frecuente es la *TPMT*1* con 96.8%, sin embargo difiriendo respecto a la segunda variante alélica más frecuente encontrada con 3.2% es el *TPMT*3C*, ya que los estudios previamente realizados reportan la variante *TPMT*2* y *TPMT*3A* con mayor frecuencia. Observamos que el comportamiento de las frecuencias genotípicas es similar al reportado en la población caucásica americana siendo el genotipo homocigoto silvestre *TPMT*1/TPMT*1* el de mayor representación en la población de nuestro estudio encontrándose en 45 pacientes (93.7%), seguido de *TPMT*1/TPMT*3A* con 3 pacientes (6.2%). La serie que mostró mayor semejanza con nuestros hallazgos en lo que respecta a la frecuencia y diversidad de variantes alélicas, corresponde al estudio realizado en el INCan, que al igual que el Hospital General "Dr. Gaudencio Gonzalez Garza" UMAE Centro Médico Nacional La Raza, es un centro de referencia que recibe a pacientes de todo el país y eso puede explicar en parte la distribución de las variantes.

Además de estas series mexicanas, hay dos estudios españoles que encontraron más del 1% del *TPMT*3B*; uno de ellos realizado en 44 pacientes con LLA en el que se encontraron 9% (4 pacientes) de heterocigotos para el gen *TPMT*, dos casos portaban el alelo *TPMT*2* (4.5%) uno el *TPMT*3B* (2.25%) y uno el *TPMT*3C* (2.25%); en el otro estudio se analizaron 276 españoles identificando cuatro casos (1.45%) del alelo *TPMT*3B*. 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 y asiática, cuya distribución se relaciona en parte con el lugar de origen. Están bien demostradas las diferencias en las frecuencias de las variantes del gen entre las diferentes poblaciones.

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 se ha evaluado en la mayoría de las series que analizan a este tipo de población. La frecuencias varía desde 0.5 a 0.2% para *TPMT*2*, *TPMT*3^a* de 0.8 a 5.7%.¹⁶⁻¹⁹

Estudios realizados en Latinoamérica muestran una mayor frecuencia de alelo *TPMT*3A* en sujetos de Argentina, Colombia y Bolivia. En Brasil las variantes *TPMT*2* y *TPMT*3C* son las más comunes. En población asiática, la variante *TPMT*3C* es la más frecuente. 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 identificaron homocigotos variantes.

Es importante conocer la frecuencia de genotipos en pacientes pediátricos con LLA de nuestra población, para implementar esta prueba diagnóstica, ya que los protocolos para el tratamiento incluyen el uso de 6-mercaptopurina, además de que la LLA ocupa el primer lugar en las neoplasias malignas en niños en nuestro país. 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 o 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 múltiples fármacos quimioterapéuticos, por lo que no se puede asumir que es debida a genotipos variantes del gen *TPMT*, además no es el único factor involucrado, sino que existen varios 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, una práctica frecuente en nuestro medio es disminuir en 25% la dosis, teniendo en cuenta 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.

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 con LLA que requieren tratamiento con 6-MP.

CONCLUSIÓN

Este trabajo contribuye en el conocimiento de la variantes genéticas relacionadas con los polimorfismos que se consideran relevantes para la enzima TPMT, encontrándose una frecuencia similar a las descritas en los estudios realizados en la población mexicana.

Por lo tanto el beneficio en la la población pediátrica con LLA de la determinación de los polimorfismos para la enzima TPMT al diagnóstico contribuye a identificar aquellos pacientes que se beneficien por cambios en los regímenes terapéuticos, de esta manera se disminuye la toxicidad hematológica, la mielosupresión prolongada, el retraso de la quimioterapia secundario a la mielosupresión prolongada. Se necesitan incluir estudios posteriores para evaluar la actividad fenotípica de los pacientes y evaluar la supervivencia a 5 años en los pacientes que se presentaron los polimorfismos.

Nuestro Hospital es un centro de referencia con una incidencia alta de LLA en pacientes pediátricos, por lo que la determinación de polimorfismos de la enzima TPMT al diagnóstico por 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, lo que posibilita el inicio de un tratamiento mas individualizado, sin necesidad de la metodología de ensayo y error usada tradicionalmente y de esta manera se modificaria de forma favorable la morbilidad y supervivencia de los pacientes

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
 UMAE. CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA
 HOSPITAL GENERAL "DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA"

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

	REGISTRO DE ACTIVIDADES						
	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE
Delimitación del tema a estudiar							
Revisión bibliográfica							
Elaboración del protocolo							
Revisión del comité local de investigación							
Recolección de la información							
Análisis de los resultados							
Presentación del examen de tesis							

|

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

COORDINACION DE INVESTIGACION EN SALUD
UNIDAD DE INVESTIGACION EN INMUNOLOGIA
CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA.

México D.F., a _____ de _____ de 20_____.

Carta de Consentimiento Informado

Por medio de la presente autorizo que el paciente (nombre)

de quien soy (padre/madre o tutor(a)) _____ participe en el estudio titulado: **“FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA TIOPURINA s-METILTRANSFERASA TIOPURINAS EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA EN CMN LA RAZA”**, registrado ante el Comité Local de Investigación en ética en Investigación en Salud, con el número: _____

El estudio de investigación involucra pacientes menores de edad (de 16 años) de la UMAE Hospital General Dr. Gaudencio González Garza del CMN La Raza del IMSS, a quienes se hayan diagnosticado diagnóstico de Leucemia Aguda. La Leucemia Aguda es una enfermedad que se desarrolla por varios factores ambientales, pero también tiene causas hereditarias que se encuentran en la información genética de cada individuo y que se manifiesta de diversas formas, sus síntomas más frecuentes son la anemia, sangrados, multiplicación en la sangre de muchas células leucémicas (leucocitos), fiebre, cansancio, etc.

La información genética de cada persona hace que esta enfermedad y la respuesta a los tratamientos como la quimioterapia varíen de persona a persona. Es por ello que resulta importante estudiar cuáles son los cambios en los genes relacionados con el metabolismo de algunos medicamentos (la forma en que se comportan los medicamentos en nuestro cuerpo) que se usan en la quimioterapia como los son las tiopurinas.

Se me ha explicado que la participación del paciente a quien represento consistirá en donar una pequeña muestra de sangre que será extraída de las mismas muestras tomadas para realizar los estudios como parte del protocolo de estudio de la leucemia, esto implica que **no** se realizará una punción extra para este estudio.

La toma de la muestra de sangre no tiene mayores consecuencias que las de dolor al momento de la punción y solo en algunos casos dejar un pequeño moretón en esa zona que se quitará en el transcurso de unos días.

Los beneficios de este estudio es saber si mi paciente tiene algún cambio genético relacionado al uso de los medicamentos llamados tiopurinas y que pudiera hacer que se conozca mas sobre su tratamiento de quimioterapia.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de la participación en el estudio.

No se guardará ninguna parte del material biológico obtenido para otro estudio no especificado.

El Investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

El Investigador Responsable me ha dado la seguridad de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio.

Marque con una "X" la opción que usted considera más conveniente con respecto a la autorización para recolección de la muestra de sangre periférica:

_____ No autorizo que se tome la muestra

_____ Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio

_____ Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros

FIRMA Y FECHA	
Nombre del Paciente	_____
Investigador Principal Dra. Vilma Carolina Bekker Méndez	_____
Investigador Asociado Dra. María Teresa Ramos Cervantes Matricula 10864903	_____
Nombre y firma del padre o tutor	_____
Nombre y firma de la madre	_____
Nombre y firma del Represente Legal	_____
Nombre y firma del testigo	_____

Av. Jacarandas y Vallejo Sin Número. Col La Raza
Tel 57245900, ext 23383 y 84

BIBLIOGRAFIA

1. Labardini et al, *Cancerología* 6(2011): 111 – 115.
2. Pieters R, Carroll WL. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Pediatr Clin North Am.* 2008;55:1-20.
3. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2006;354:166-178.
4. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2008;371(9617):1030-1043.
5. Pérez-Saldivar. et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer.* 2011; 11:355
6. A. Daniel-Cravioto, C. R. Gonzalez-Bonilla, J. M. Mejia-Arangure et al., "Genetic rearrangement MLL/AF4 is most frequent in children with acute lymphoblastic leukemias in Mexico City," *Leukemia and Lymphoma*, vol. 50, no. 8, pp. 1352–1360, 2009.
7. Bekker-Méndez VC, et al. Prevalence of gene rearrangements in mexican children with acute lymphoblastic leukemia: a population study-report from the mexican interinstitutional group for the identification of the causes of childhood leukemia. *Biomed Res Int.* 2014;2014:210560. doi: 10.1155/2014/210560. Epub 2014 Jul 17.
8. Hunger S., Mullighan C. Acute lymphoblastic leukemia in children. *NEJM.* 2005; 373(16): 1541-1551.
9. Prior-González OA, et al. Farmacogenética y su importancia clínica: hacia una terapia personalizada segura y eficiente. *Medicina Universitaria* 2011; 13(50):41-49
10. Calderón Pizaña D, Reyes-Hernández OD, García-Jiménez E, Bonilla-Delgado J, Chávez-Ocaña SC, García-López ES, Cortés-Malagón EM, Acosta-Altamirano G, Sierra-Martínez M. Identificación de marcadores cromosómicos en pacientes con leucemia linfoblástica aguda. *Rev Hosp Jua Mex* 2012; 79 (4): 243-251
11. Nachmnan JB, Sather HN, Sensel MG, et. al. Augumented post-induction therapy for children with high-risk acute lymphoblastic leukaemia show response to initial therapy. *N Engl J Med.* 1998;338:1663-1671
12. Treviño RL, et. al. Germline genomic variations associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2009 September ; 41(9): 1001–1005.
13. Jiménez-Hernández E., Jaimes-Reyes E., Arellano-Galindo J. Survival of Mexican Children with acute lymphoblastic leukaemia under treatment with the protocol from the Dana-Farber Cancer Institute 00-01. *BioMed Research International.* 2015; 1-7.
14. Pui CH. *Childhood leukemias.* Cambridge: third edition.
15. Pui CH, Carroll WL, et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an uptodate. *J Clin Oncol.* 2011; 29(5): 551-565. Yates CR., Loennechen T., Fessing MY., et al. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *American College of Physicians.* 1997; 126(8): 608-614. Cheok M., Evans W. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nature Publishing Group.* 2006; 6: 117-127.
16. Yates CR., Loennechen T., Fessing MY., et al. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *American College of Physicians.* 1997; 126(8): 608-614.
17. Cheok M. Evans W. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenetics of cancer therapy. *Nature Publishing Group.* 2006; 6:117-127.

18. Kapoor G., Maitra A., Brahmachari. Application of SNaPshot for analysis of thiopurine methyltransferase gene polymorphism. *Indian J Med Res.* 2009; 129; 500-505.
19. Schmiegelow K, Nielsen SN, Frandsen TL, MD, PhD, Nersting J, Mercaptopurine/Methotrexate Maintenance therapy of childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical facts and fiction. *J Pediatr Hematol Oncol* 2014;36:503–517.
20. Sayani FA, Prosser C, Bailey RJ, Jacobs, Fedorak RN. Thiopurine methyltransferase enzyme activity determination before treatment of inflammatory bowel disease with azathioprine: Effect on cost and adverse events. *Can J Gastroenterol* 2005; 19(3): 147-151.
21. Patel A, Swerlick R, McCall C. Azathioprine in dermatology: The past, the present, and the future. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55(3):369-89
22. Jorquera A. et. Al. Genotipo y fenotipo de la enzima tiopurina metiltransferasa en población chilena. *Rev Med Chile* 2012; 140: 889-895
23. Relling MV., Gardner EE., Sandborn WJ., Schmiegelow K., Pui CH, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clinical pharmacology and therapeutics.* 2011; 89(3): 387-391.
24. Beaumais T., Fakhoury M., Medars Y., et al. Determinants of mercaptopurine toxicity in paediatric acute lymphoblastic leukemia maintenance therapy. *British journal of clinical pharmacology.* 2011; 71(4): 575-584.
25. McLeod HL., Krynetski EY., Relling MV, et al. Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nature.* 2000; 14: 567-572.
26. Eichelbaum M., Ingelman-Sundberg M and Evans W. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu. Rev. Med.* 2006; 57: 119-137.
27. Karran P and Attard N. Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. *Nature Publishing Group.* 2008; 8: 24-35.
28. Lares-Asseff I, Trujillo-Jiménez F. La farmacogenética y su importancia en la clínica. *Gac Méd Méx.* 2001;137 (3):227-236.
29. Hongxia W. Yinsheng W. 6-Thioguanine Perturbs Cytosine Methylation at CpG Dinucleotide Site by DNA Methyltransferases in Vitro and Acts as a DNA Demethylating Agent in vivo. *Biochemistry.* 2009; 48(10): 2290–2299
30. Castillejos-López MJ, García-Sancho MC, Torres-Espíndola LM, Pérez-Padilla JR. Aspectos metodológicos y éticos de la farmacogenómica en los ensayos clínicos aleatorizados. *Rev Invest Clin* 2006; 58(5):512-524.
31. Taja-Chayeb L, et al. Thiopurine S-methyltransferase Gene (TMPT) polymorphisms in a Mexican population of healthy individuals and leukemic patient. *Med Oncol* (2008) 25:56–62.
32. González-del Angel A. et al. TPMT polymorphisms in newborns from Mexico City. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics.* 2009; 34: 703–708.20
33. Moreno-Guerrero SS, Ramírez-Pacheco A, Dorantes-Acosta EM, Medina-Sanson A. Análisis de los polimorfismos génicos de Tiopurina S-Metiltransferasa (YMPT) en pacientes pediátricas mexicanos con cáncer. *Rev Invest Clin* 2013; 65(2):156-164
34. Cao Q, Zhu Q, Shang Y, Gao M, Si J. Thiopurine Methyltransferase Gene Polymorphisms in Chinese patients with inflammatory Bowel Disease. *Digestion* 2009; 79: 58-63