



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“Asociación clínica de polimorfismos C3535T y G421T de los genes ABC B1 y ABC G2 con la toxicidad en el uso de quimioterapia como Metotrexate en pacientes con Diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda en fase de consolidación”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

ESPECIALISTA EN HEMATOLOGIA

PRESENTA:

Lorena Estefanía Loaiza Vivanco

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Christian Omar Ramos Peñafiel
Médico adscrito HGM UNAM.

COTUTOR(A) DE TESIS: Dra. Irma Olarte carrillo.
Bióloga Molecular HGM UNAM.

MÉXICO, CD. MX. AGOSTO 2018



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.

INDICE:

1. Resumen en español.....	3
2. Resumen en inglés.....	3
3. Antecedentes.....	4
4. Planteamiento del problema.....	7
5. Justificación.....	8
6. Hipótesis.....	8
7. Objetivos general y particulares.....	8
8. Metodología.....	9
Tipo y diseño de estudio	
Población	
Tamaño de la muestra	
Criterios de inclusión, eliminación y exclusión	
Definición de las variables a evaluar y forma de medirlas	
Procedimiento.	
Análisis estadístico	
9. Resultados y análisis.....	14
10. Conclusión.....	21
11. Referencias bibliográficas.....	23

1. RESUMEN EN ESPAÑOL

Leucemia Linfoblástica Aguda se define según la Organización Mundial de la Salud (OMS), como una neoplasia hematológica de precursores linfoides. El pronóstico ha mejorado gracias a los avances genéticos y moleculares, dirigiendo tratamientos específicos, que consisten en la combinación de múltiples agentes de quimioterapia, inmunoterapia, etc. Existen factores que permiten clasificar la probabilidad de recaída, evolución clínica, así como: alteraciones genéticas y polimorfismos, mismos que están íntimamente relacionados con la evolución clínica y respuesta a la quimioterapia.

La Leucemia Linfoblástica Aguda, ha sido una patología con prevalencia e incidencia significativa dentro de las patologías malignas clasificadas por la OMS; por lo que se ha visto necesario investigar alteraciones genéticas como ciertos polimorfismos que inducen mayor toxicidad por parte de ciertos quimioterapéuticos, reduciendo así el riesgo, permitiendo ajustar la dosis a fin de evitar mayor toxicidad, mejorando de esta manera las tasas de supervivencia global de la enfermedad.

Existen polimorfismos de genes en específico que se relacionan íntimamente con la respuesta clínica a la quimioterapia, sobre todo en cuanto a la toxicidad que generan, por lo que resulta inminente identificarlos como factores de riesgo, y poder así, predecir la respuesta en pacientes adultos con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda, haciendo posible el ajuste de dosis evitando exponer al paciente a mayores niveles de toxicidad por el quimioterapéutico; mejorando de esta manera la sobrevida de la enfermedad y calidad de vida de dichos pacientes.

2. RESUMEN EN INGLÉS (ABSTRACT)

Acute lymphoblastic leukemia is defined by the World Health Organization (WHO) as a hematologic neoplasm of lymphoid precursors. The prognosis has improved thanks to genetic and molecular advances, directing specific treatments, which consist of the combination of multiple agents of chemotherapy, immunotherapy, etc.

There are factors that allow classifying the probability of relapse, clinical evolution, as well as: genetic alterations and polymorphisms, which are closely related to the clinical evolution and response to chemotherapy.

Acute Lymphoblastic Leukemia, has been a pathology with prevalence and significant incidence within the malignant pathologies classified by the WHO; therefore, it has been necessary to investigate genetic alterations such as certain polymorphisms that induce greater toxicity on the part of certain chemotherapeutics, thus reducing the risk, allowing to adjust the dose in order to avoid greater toxicity, thus improving the overall survival rates of the disease.

There are specific gene polymorphisms that are intimately related to the clinical response to chemotherapy, especially in terms of the toxicity they generate, so it is imminent to identify them as risk factors, and thus be able to predict the response in adult patients with diagnosis of Acute Lymphoblastic Leukemia, making it possible to adjust the dose avoiding exposing the patient to higher levels of toxicity by the chemotherapeutic agent; thus improving the survival of the disease and quality of life of these patients.

3. ANTECEDENTES

GENES DE MULTIRESISTENCIA A DROGAS

La presencia de genes de multidrogoresistencia, como son los genes ABCB1 Y ABCG2, pertenecen al grupo de proteínas ABC, la importancia de la asociación clínica radica en la generación de mecanismos de resistencia o toxicidad a múltiples agentes quimioterapéuticos, sobre todo en pacientes con diagnóstico de neoplasias hematológicas, su efecto incide también, sobre las propiedades farmacocinéticas de dichas drogas. La característica más desconcertante de la expresión de genes de multidrogoresistencia, como los de la familia ABC es la capacidad para reconocer y transportar una amplia variedad de sustratos, así como excretar fosfolípidos, preferentemente esfingomiélin y colesterol. El colesterol puede llegar a ocupar el sitio de unión a fármacos contribuyendo así al reconocimiento éstos, aun a pesar de poseer diferentes estructuras y pesos moleculares. Este grupo de proteínas,

producto de la expresión de los genes ABC pueden conservar sitios de unión de sustrato similares, y movilizarlos unidos aún bajo un ciclo dependiente de ATP¹.

Su función finalmente es expulsar compuestos intracelulares entre los que se encuentran tanto antibióticos como quimioterapias (daunorrubicina, doxorrubicina, etopósido, vincristina o vinblastina, mitoxantrona). De todos los transportadores, tal vez dentro de los más relevantes se encuentran el gen ABCB1 que codifica una proteína de 170kd llamada como glicoproteína-P (gp-170) y la proteína de resistencia en cáncer de mama (BCRP/ABCG2).

La familia MDR pertenece a una superfamilia de 49 genes humanos ABC (adenosinetriphosphate (ATP) – BindingCassette) que están clasificados en 8 subfamilias que van de ABC-A hasta ABC-G y ANSA (arsenite and antimonitetransporter) en base al grado de homología entre sus secuencias. Estos genes están especializados en el transporte celular dependiente de energía y participan en un amplio rango de eventos como la expulsión de sustancias nocivas, secreción de toxinas, movilización de iones y péptidos y señalización celular. Los genes MDR se localizan en el brazo largo del cromosoma 7, banda 21.1 (7q21.1) y se encuentran separados uno del otro por 330 pares de bases. El gen MDR-1 codifica o expresa una proteína de 170 kd conocida como glicoproteína P (gp-170 [P de permeabilidad]) la cual es una molécula enlazadora de ATP con características de una proteína de membrana formadora de poro, que funciona como bomba dependiente de energía, la cual exporta o expulsa la droga fuera de las células. En los últimos años, se han descrito más de 15 polimorfismos del gen MDR1, el más relevante de ellos, por su progresión clínica, es el polimorfismo C3435T del exón 26 del gen, el único que se correlaciona con un fenotipo de menor expresión de la proteína en la membrana de la P-gp. La P-gp constituye un sistema de desintoxicación natural que se expresa en varios tejidos normales, como hígado, intestino delgado, riñón, placenta, células endoteliales del sistema nervioso central y testículo. Se han reportado como sustratos antitumorales de la gp-P170 a los alcaloides de la Vinca, Vincristina y Vinblasina; Atraciclinas como Daunorrubicina y Doxorrubicina; Epipodófilotoxinas como Etopósido y Tenopósido; Inhibidores de tirocincinasa como Imatinib².

La multidrogoresistencia (MDR), mediada por múltiples transportadores de fármacos ABC (ATP-bindingcassette), es un punto crítico en el tratamiento de leucemia aguda. Estudios han demostrado que la MDR intrínseca puede incrementarse debido a la expresión de perfiles génicos específicos y que la expresión inducida por drogas de glucoproteína-P (P-gp) y otras proteínas de MDR pueden resultar en resistencia adquirida. Numerosos fármacos antineoplásicos, incluyendo agentes comúnmente utilizados en leucemia aguda, como son doxorubicina, vincristina, mitoxantrona y metotrexate han mostrado ser sustratos de P-gp o ser susceptibles a la expulsión a través de otras proteínas MDR. Múltiples estudios clínicos han demostrado asociaciones entre la expresión de P-gp u otras proteínas MDR y la respuesta a la terapia o la sobrevida en leucemia aguda³.

Históricamente conocido su mecanismo de acción se sabe que el metotrexate inhibe competitivamente la dihidrofolato-reductasa, enzima responsable de convertir el ácido fólico a tetrahidrofolato, el cofactor necesario para la transferencia de un carbono en muchas reacciones metabólicas. Algunas de estas reacciones afectan la proliferación celular, incluyendo la síntesis de ácido timidílico y de los precursores nucleótidos del DNA y RNA. La inhibición de la timidilato-sintasa es, quizás, el efecto más importante del metotrexate resultando en una inhibición de la síntesis del DNA. Los efectos inhibidores del metotrexate dependen de sus concentraciones intracelulares, y los tejidos con mayor metabolismo celular y crecimiento más rápido son los más afectados. El metotrexato inhibe la proliferación celular en la fase S del ciclo celular, dando como resultado final la muerte provocada de células neoplásicas⁴.

La glucoproteína de permeabilidad (P-gp) fue identificada como el primer transportador ABC asociado con la resistencia a drogas, pero después se han identificado muchos más transportadores adicionales que confieren resistencia a una gran variedad de fármacos. Las tres proteínas más estudiadas de MDR son P-gp, codificada por el gen MDR-1, la proteína 1 asociada a multidrogo resistencia (MRP1) y la proteína de resistencia asociada al cáncer de mama (BCRP o ABCG2), los cuales han sido demostrados en estudios de líneas celulares neoplásicas que median mecanismos primarios de MDR. Los genes responsables de codificar para

estas proteínas, así como otros genes codificantes de transportadores ABC adicionales se saben involucrados en la resistencia a fármacos antineoplásicos. Estudios individuales⁵ han evaluado polimorfismos específicos de MDR1 y expresión de P-gp en leucemias agudas, con resultados inconsistentes. En un estudio, no hubo un efecto significativo sobre la resistencia a drogas mediada por P-gp en pacientes con leucemia aguda asociados con uno de los polimorfismos MDR1 C3435T, G2677T o T-129C; mientras en otros estudios el polimorfismo C3435T fue asociado con peor pronóstico en niños, pero no en adultos, con linfoma linfoblástico y no en adultos con LMA; sin embargo en otro estudio, el genotipo C/C y G/G de C3435T fue asociada con una alta probabilidad de remisión completa y larga sobrevida libre de evento.

Numerosos estudios han reportado asociación positiva entre polimorfismos génicos MDR1 específicos y respuesta y/o resultados al tratamiento. También se ha reportado ausencia de asociación entre el genotipo y la respuesta o los resultados, por ejemplo, Van der Holt y colaboradores reportaron no asociaciones entre genotipos de MDR1 C1236T, G2677T o C3435T y expresión de P-gp y función en células leucémicas, expresión de MDR1, tasa de RC o sobrevida en un análisis de 150 pacientes mayores de 60 años con LMA⁵. Un análisis de 53 pacientes con LLA no identificaron asociación entre el polimorfismo MDR1 C3435T y resistencia o pronóstico en LLA.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por todo lo expuesto anteriormente y aunque el Servicio de Hematología no cuenta con registros de la incidencia de casos de toxicidad asociada al uso de Metotrexate como parte del esquema de Quimioterapia establecido en pacientes diagnosticados de Leucemia Linfoblástica Aguda, pues se ha visto en la práctica clínica que el número de casos es frecuente, por lo que se ha decidido investigar la asociación clínica entre la expresión de polimorfismos C3435T y G421T de los genes antes mencionados para así resulten como determinantes directos de mayor toxicidad al

medicamento, de manera que, se pueda decidir esquemas alternos en dichos pacientes o a su vez ajustar dosis del medicamento a fin de evitar eventos adversos mayores.

5. JUSTIFICACION

En la actualidad el cáncer ha tenido repunte, probablemente en años anteriores era subdiagnosticado, pero en la actualidad contamos con múltiples métodos de diagnóstico, así como herramientas de seguimiento y tratamiento que permiten mejorar la supervivencia de dichos pacientes desde el momento de su diagnóstico.

La Leucemia Linfoblástica Aguda no es la excepción, hoy en día existen métodos genéticos y moleculares que modifican el curso evolutivo de la enfermedad, es por eso que en este estudio se evidenciará la relación clínica de presencia de los polimorfismos C3435T, G421T de los genes ABC B1 y ABC G2 que pertenecen al grupo de los genes de Multidrogo-resistencia que por múltiples mecanismos moleculares inducen a mayor toxicidad de los quimioterapéuticos en pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda, ya que se conoce en la actualidad que la presencia de los polimorfismos C3435T y G412T se relacionan con el éxito o fracaso del tratamiento así como mayores efectos adversos que inciden directamente en la supervivencia global de la enfermedad.

6. HIPOTESIS:

Si existe presencia de polimorfismos C3435T y G412T de los genes ABCB1 y ABCG2 entonces se podrían asociar con la presencia de toxicidad a agentes quimioterapéuticos como el metotrexate en pacientes diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda.

7. OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

- Conocer la asociación entre el polimorfismo C3435T del gen ABCB1 y G421T del gen ABCG2, con la toxicidad por el uso de agentes quimioterapéuticos como el metotrexate, en los pacientes portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda de reciente diagnóstico.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer la frecuencia alélica del polimorfismo C3435T del gen ABCB1 y G421T del gen ABCG2 en pacientes con LAL de nuestra población
- Determinar si la asociación del polimorfismo C3435T del gen ABCB1 y G421T del gen ABCG2, tiene relación con la presencia de toxicidad clínica con Quimioterapéuticos como Metotrexate en la fase de consolidación en Pacientes con LAL.

8. METODOLOGÍA:

TIPO Y DISEÑO DEL ESTUDIO:

Estudio prospectivo, longitudinal, experimental

POBLACION

Pacientes mayores de 18 años de edad con diagnóstico de novo de LAL bajo los criterios morfológicos Franco-Américo-Británicos (FAB) y corroborados mediante citometría de flujo. Se incluirán los casos de reciente diagnóstico en el periodo de noviembre 2017 a abril de 2018.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se realiza el cálculo de tamaño de la muestra en base a una proporción, con los datos obtenidos de acuerdo a la respuesta y nivel de toxicidad del Metotrexate según la experiencia institucional.

$$n = \frac{N \cdot Z_{\alpha}^2 \cdot p \cdot (1-p)}{e^2 \cdot (N-1) + Z_{\alpha}^2 \cdot p \cdot (1-p)}$$

- N=70 $Z_{\alpha 2} =$, $p = 0.27$ $e = 5\%$
- El cálculo de tamaño final de la muestra corresponde a 70 individuos

CRITERIOS DE INCLUSION

- Que cumpla con el diagnóstico de LAL por medio de aspirado de médula ósea o frotis de sangre periférico con la definición dada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que solicita 20% de blastos linfoides en el estudio morfológico
- Diagnostico confirmado de la estirpe por citometría de flujo.
- Ser mayor de 18 años de edad
- Cualquier sexo.
- Quienes cumplan fase de consolidación con Metotrexate como agente quimioterapéutico.
- **Firma del consentimiento informado por parte del paciente.**

CRITERIOS DE EXCLUSION:

- Pacientes mujeres embarazadas.
- Pacientes con nefropatía previa.
- Pacientes con datos clínicos y paraclínicos de hepatopatía previa.
- Pacientes con escala ECOG mayor a 2.
- Pacientes con comorbilidades que requieren manejo paliativo.

CRITERIOS DE ELIMINACION

- Abandono de tratamiento.
- Incumplimiento de tratamiento.
- Cambio de régimen durante su tratamiento.
- Transferidos a otra institución.

DEFINICION DE LAS VARIABLES A EVALUAR

VARIABLE DEPENDIENTE

- Toxicidad clínica al metotrexate.

VARIABLE INDEPENDIENTE

- Presencia del Polimorfismo C3435T del Gen ABC B1 y G421T del gen ABC G2 en pacientes con LAL.

Tabla de operacionalización de las variables				
Variable	Definición Operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Valores
Edad	edad al diagnóstico	cuantitativa	continua	18 años o más
Leucocitos	leucocitos al diagnóstico	cuantitativa	nominal	normales, entre 11 y 30 mil mayor a 30 mil.
Estirpe	estirpe linfocitaria	cuantitativa	dicotómica	Estirpe B/Estirpe T
Clasificación del riesgo	riesgo de recaída en un año	cuantitativa	continua	estandar, intermedio, alto.
Polimorfismo del Gen ABCB1 y ABCG2	presencia del polimorfismo	cuantitativa	dicotómica	si / no.
Toxicidad Clínica del Metotrexate	Renal, Hepática y mucosas producto de la administración de Me	cuantitativa	nominal	Lesión renal / hepática o mucositis.
Sexo	Sexo de pacientes	cuantitativa	dicotómica	hombre/mujer
Remisión	Remisión hematológica y morfológica	cuantitativa	dicotómica	si / no.
Respuesta final de inducción	respuesta clínica	cuantitativa	dicotómica	si / no.

8.1 Metodología /Procedimiento

Se colectarán muestras de pacientes que cuenten con diagnóstico reciente de Leucemia Linfoblástica Aguda para ser analizadas en el Laboratorio de Biología Molecular de hematología en búsqueda del polimorfismo C3435T del gen ABCB1 y G421T del gen ABCG2. Para lo cual se realizará el siguiente procedimiento:

Al inicio de la Fase de Inducción a la Remisión, una vez hospitalizado al paciente, se extrajo una muestra de sangre periférica, misma que sirvió para la extracción y separación de leucocitos.

En dicha muestra se realizará la extracción de DNA genómico mismo que será obtenido mediante el uso del reactivo comercial DNAzol® (Invitrogen) y mediante una variación al método de paso único de Chomczynski utilizando solución D.

Los paquetes celulares de aproximadamente 1×10^6 células serán homogeneizados en 700 μ L de DNAzol® y se agregarán 200 μ L de etanol absoluto.

La solución se homogeneizará por inversión hasta la aparición del paquete de DNA. A continuación, se dejará reposar durante 10 minutos y posteriormente, el DNA será transferido a un tubo nuevo, en el cual se realizará un lavado con etanol al 75%.

De nueva cuenta, se dejará reposar durante 10 minutos y el DNA será transferido a un tubo nuevo. El paquete de DNA se dejará secar a temperatura ambiente durante

5 minutos. Una vez seco, se resuspenderá en una solución TE 1X en un volumen proporcional al paquete de DNA.

Cuantificación y determinación de la calidad e integridad del material genético:

Se determinará la concentración y pureza del RNA y del DNA totales mediante la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda en espectrofotómetro UV-Vis (ThermoScientific, Genesys 10S UV-Vis). Las diluciones que se realizarán para cuantificar el RNA y el DNA serán a 1:1000 y 2:500, respectivamente. Para ambos casos, se corroborará la integridad del material genético mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5%, cargando 2µL de RNA/DNA mezclado con 2µL de buffer de carga y 2µL de TAE 1X; corriendo en cámara de electroforesis durante 40 minutos a 70 volts. EL RNA será almacenado a -80°C hasta ser requerido.

Genotipificación de los Polimorfismos C3435T del gen ABCB1 y G421T del gen ABCG2:

Además de la cuantificación de los niveles de expresión, se realizará un análisis genotípico de los genes ABC-B1 Y ABC-G2 con el fin de identificar los polimorfismos de nucleótido único (SNPs, en inglés) 3435C>T 421C>A respectivamente. Los ensayos se realizarán en un equipo StepOne™ (Applied Bio Systems, Life Technologies) con el kit de genotipificación TaqMan® GenotypingMasterMix (AppliedBioSystems, Life Technologies). Las sondas utilizadas serán C_11711720d_40 para el polimorfismo 3435C>T (ABC-B1) Y C_15854163_70 para el polimorfismo 421C>A (ABC-G2). Como control negativo, se utilizará agua libre de nucleasas.

Concomitantemente al proceso el paciente continúa con su tratamiento, consistente en fase de consolidación, recibiendo dosis plena de Metotrexate ajustada superficie corporal, haciendo seguimiento clínico de existir toxicidad en cualquiera de sus manifestaciones, dicho seguimiento clínico, los pacientes serán por el plazo de aproximadamente 1 mes, tiempo en el que el Metotrexate será administrado como parte de la fase de consolidación de la Quimioterapia, mismo seguimiento se

realizará tanto en la consulta externa como, en hospitalización para administración de la quimioterapia.

Una vez concluido el protocolo, las muestras serán desechadas.

Finalmente se correlacionará el resultado de la genotipificación realizada con el grado de toxicidad presentada de haberla presentado.

9. RESULTADOS Y ANALISIS:

Se estudiaron un total de 38 pacientes con diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica de novo tratados con un esquema de quimioterapia intensivo en base de Metotrexate a dosis mayores d 1.5g/m² SC como parte del esquema de consolidación y prevención de recaída a Sistema Nervioso Central. En cuanto al género, la mayoría de los pacientes correspondieron al género masculino (n=22, 57.9%). La media de edad fue de 32 años (rango de 18 a 57 años), siendo la edad menor para el género masculino que para el femenino (28 v 37 años). En cuanto a las características al momento del diagnóstico todos los pacientes contaban con una Leucemia Linfoide de estirpe B, sin infiltración al diagnóstico al Sistema Nervioso Central y sin la presencia de alteraciones citogenéticas específicas que pudieran influenciar sobre la supervivencia libre de enfermedad. La media de leucocitos al diagnóstico fue de 43 x 10³/ml (rango de 0.7 a 319 x 10³/mcl), de los 38 casos, el 47.4% (n=18) contaban con más de 30 x 10³/mcl leucocitos al momento del diagnóstico. Al clasificar acorde al Riesgo Clínico el 55.3% de los pacientes (n=21) contaban con riesgo alto al momento del diagnóstico. Todos los casos finalizaron la etapa de inducción a la remisión sin evidencia de toxicidad hepática y/o renal, continuando a la etapa de consolidación en Remisión Hematológica Clínica.

Resultados del Tratamiento.

Todos los pacientes integraron Remisión completa durante la primera etapa de tratamiento, manteniéndose en consolidación con dosis altas de Metotrexate como tratamiento para la prevención de infiltración al Sistema Nervioso Central de manera sistémica. Como parte del esquema de profilaxis se administró quimioterapia intratecal en base de dosis intratecales de Metotrexate. Ninguno de los casos presento efecto toxico asociado a la administración intratecal. Al momento del seguimiento el 73% de los casos (n=28) continuaban aún bajo tratamiento con una media de seguimiento de 140 días (rango 40 a 294 días). En cuanto a la actividad de la enfermedad un 39.5% (n=15) de los casos presentaron recaída a Médula ósea

con supervivencia libre de enfermedad de 110 días (rango de 10 a 259 días). Un total de 33% de los pacientes de Riesgo Alto (n=7) presentaron recaída a Médula ósea en comparación con un 47.1% (n=8) de los pacientes considerados como Riesgo Habitual sin ser el riesgo un factor de riesgo sobre la recaída temprana (p=0.299, 95% IC). Tampoco la cuenta de leucocitos por encima de 30 x 10³/mcl ni la edad por encima de 35 años demostraron ser un factor de riesgo sobre la recaída (p= 0.143 y p=0.126, 95% respectivamente).

Detección del polimorfismo C3535T del gen ABCB1

Se realizó la detección del polimorfismo C3535T sobre el gen de resistencia ABCB1, un total de 28.9% (n=11) de los casos fueron homocigotos para T/T, 34.2% (n=13) fueron heterocigotos para C/T y 36.8% (n=14) homocigotos para C/C. La expresión C/C fue considerada como la normalidad, por lo que un total de 28.9% de los casos (n=11) fueron considerados como de riesgo. En relación con las características clínicas solo 18.2% (n=2) de los casos contaban con más de 35 años al diagnóstico y 36.4% (n=4) mostraron una cuenta de leucocitos por encima de 30 x 10³/mcl. La media de leucocitos en los pacientes con polimorfismo fue menor en comparación con los casos de expresión normal (28.5 vs 50 x 10³/mcl) pero sin ser significativa esta diferencia (p=0.316, 95% IC). Al asociar el polimorfismo con la respuesta al tratamiento un 27.3% (n= 3) de los casos que expresaron el polimorfismo CT presentaron una recaída a nivel de médula ósea a diferencia del 44% (n=12) de los casos con expresión normal. Al analizar el comportamiento del polimorfismo CT sobre el riesgo de recaída este no demostró ser un factor de riesgo. (p=0.331, OR 0.4688, 0.101-2.162, 95% IC)

Detección del polimorfismo G421T sobre el gen de resistencia ABCG2

Del total de los 38 pacientes, un 63.2% (n=24) de los casos fueron homocigoto C/C, 7.9% (n=3) homocigotos A/A y 28.9% (n=11) heterocigotos para C/A. Los pacientes homocigotos C/C fueron considerados como normales y un 7.9% (n=3) se consideraron como de riesgo por ser homocigotos A/A. La media de leucocitos al diagnóstico de los casos con polimorfismo fue de 33.7 x 10³/mcl (rango 1.3- 76 x

103/mcl), sin ser esta diferencia significativa ($p=0.760$, 95% IC). La edad promedio de los casos homocigotos A/A fue de 26 años, ligeramente menor a la edad de los casos homocigotos A/A y heterocigotos C/A (26 versus 32 años) pero sin ser la diferencia significativa ($p=0.411$, 95% IC). Del total de los 15 casos de recaída, 13.3% ($n=3$) eran homocigotos A/A. A pesar de ser pocos los casos de recaída en el grupo del polimorfismo A/A, su presencia se asoció a un mayor riesgo de recaída ($p=0.384$, OR 3.3846, 0.278-41.08, 95% IC).

Toxicidad asociada al Tratamiento con Metotrexate.

Todos los casos contaban con tratamiento con Metotrexate, alrededor del 81.6% ($n=31$) mostraron algún tipo y grado de toxicidad. La mayor parte de los eventos fueron considerados de leve a moderados (52.6%, $n=20$), pero un 47.4% de los casos ($n=18$) mostraron una toxicidad severa o muy severa siendo la renal y hepática las principales. La toxicidad más frecuente fue a nivel de mucosa oral / trayecto gastrointestinal (65.8%, $n=25$) seguida de la toxicidad renal (36.8%, $n=14$) y hepática (36.8%, $n=14$). Las toxicidades múltiples se registraron en 42.1% de los casos ($n=16$) siendo la principal asociación entre mucosa oral y afección hepática. Dentro de los casos que presentaron algún grado de toxicidad el 32.3% ($n=10$) presentaron recaída temprana a médula ósea sin ser esta asociación significativa ($p=0.70$, 95% IC). Semejante a esto, tanto la toxicidad hepática, renal y en mucosas tampoco se asoció a un riesgo de recaída temprana. Al analizar la asociación entre las toxicidades múltiples (más de 2 toxicidades) sobre la posibilidad de recaída o muerte tampoco se identificó una asociación significativa ($p=0.551$ y $p=0.589$, 95% IC).

Asociación del polimorfismo C3535T de ABCB1 y la toxicidad asociada a Metotrexate

De los 38 pacientes, 47.4% ($n=18$) mostraron algún tipo de toxicidad severa (GIII/IV). Al asociar la frecuencia de la toxicidad con el polimorfismo T/T de ABCB1 y A/A de ABCG2, todos los casos heterocigotos T/T para ABCB1 mostraron algún tipo de toxicidad, siendo mayor la frecuencia de eventos adversos serios ($n=7$, 63.6%). Al analizar la frecuencia de toxicidad múltiple, no se apreció una diferencia

entre aquellos casos homocigotos T/T y aquellos heterocigotos C/T y Homocigotos C/C (n= 4, 36.4% versus n= 12, 44.4%, p= 0.466, 95% IC). En cuanto a las toxicidades específicas, el 36.4% (n=4) de los casos con heterocigotos T/T mostraron toxicidad hepática, 27.3% (n=3) toxicidad renal y 63.6% (n=7) a nivel de las mucosas. En ninguno de las toxicidades se demostró una asociación significativa

Asociación del polimorfismo G421T del gen ABCG2 y la toxicidad asociada a Metotrexate

Del total de los 38 casos, el 7.9% de los casos contaba con un fenotipo A/A sobre el gen de resistencia ABCG2, todos los casos mostraron algún tipo de toxicidad, siendo en su mayoría toxicidades leves a moderadas (n=2,66.7%). Acorde al tipo de toxicidad el 66.7% (n=2) contaron con toxicidad hepática (p=0.302, 95% IC), ninguno de los casos conto con toxicidad renal y uno de los casos mostró toxicidad en mucosa (n=11, 33%, p=0.265, 95% IC). Semejante al polimorfismo en ABCB1 tampoco se mostró una asociación significativa sobre la presencia del polimorfismo y la toxicidad.

Factores de Riesgo asociados a la Supervivencia

De los 38 pacientes, la supervivencia global fue del 62% a un año de seguimiento (media de seguimiento de 140 días, rango 40 a 294 días). Al final del seguimiento, 26.3% de los casos (n=10) fallecieron, asociados principalmente a la recaída a médula ósea (n=6). De los 10 casos fallecidos, el 18.2% (n=2) mostraron un fenotipo T/T en ABCB1 y solo un caso (10%) mostró un fenotipo A/A. No se identificó una asociación entre la presencia de los fenotipos de riesgo sobre la supervivencia global. La supervivencia global y la supervivencia acorde al tipo de fenotipo se describe en el Gráfico 1, Gráfico 2A y 2B

En el análisis multivariado la presencia de los polimorfismos sobre los genes de resistencia a multidroga ABCB1 y ABCG2 tampoco demostraron un impacto sobre la supervivencia global ni la supervivencia libre de enfermedad.

10. ANEXOS:

Figura 1. Supervivencia global.

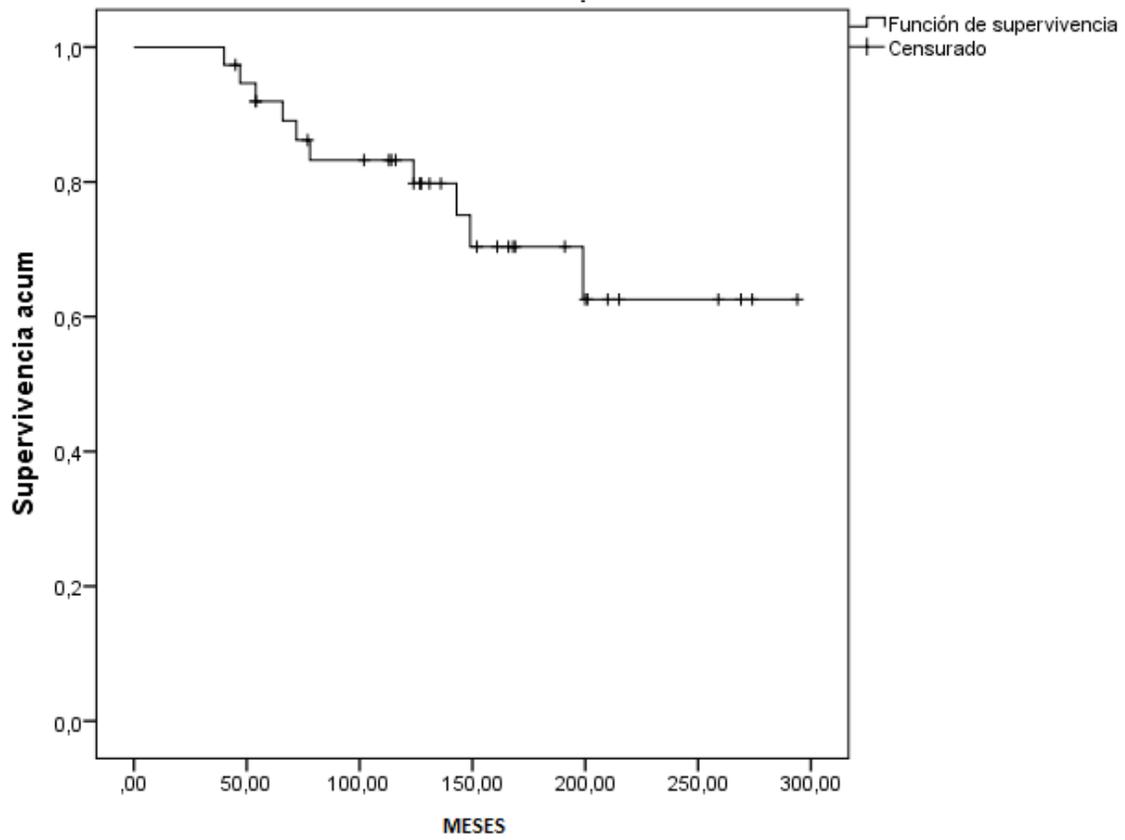


Figura 2A: Supervivencia global para polimorfismo ABC B1.

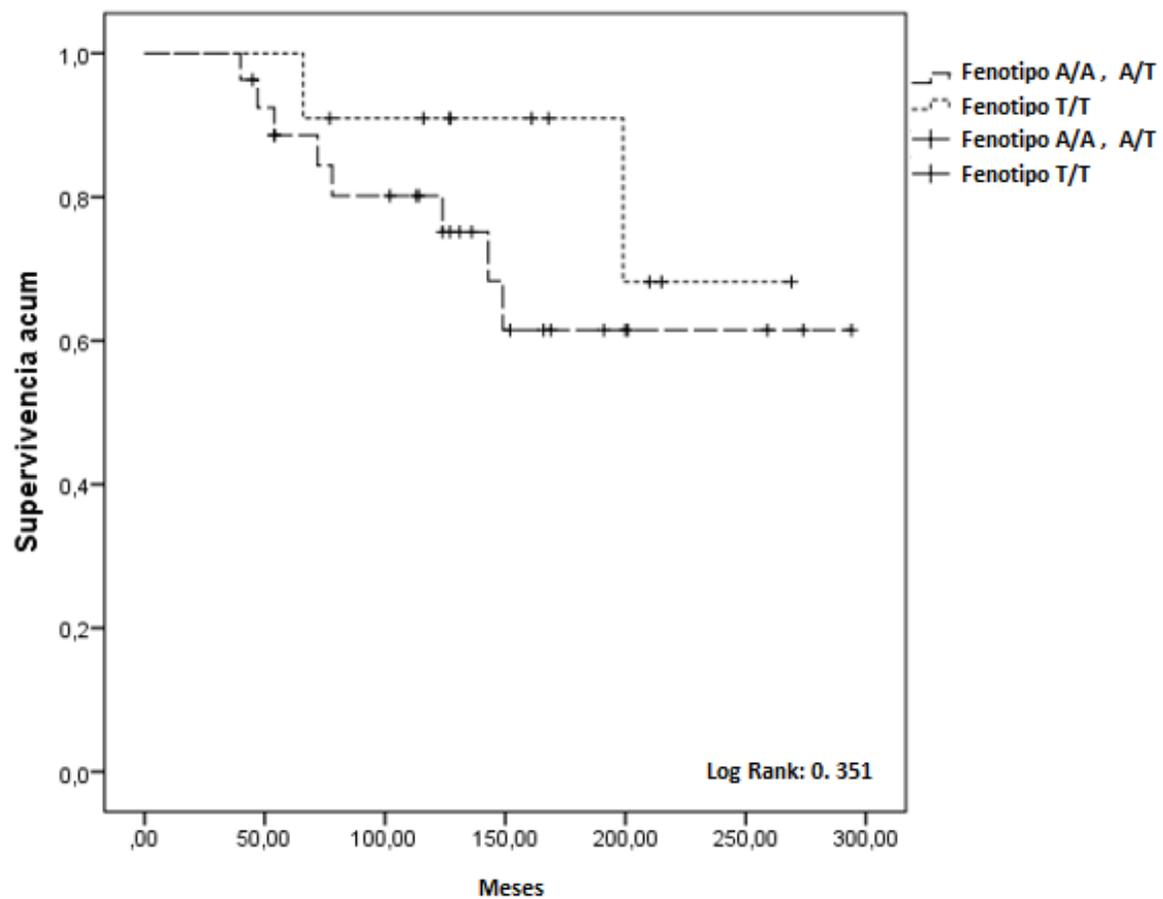
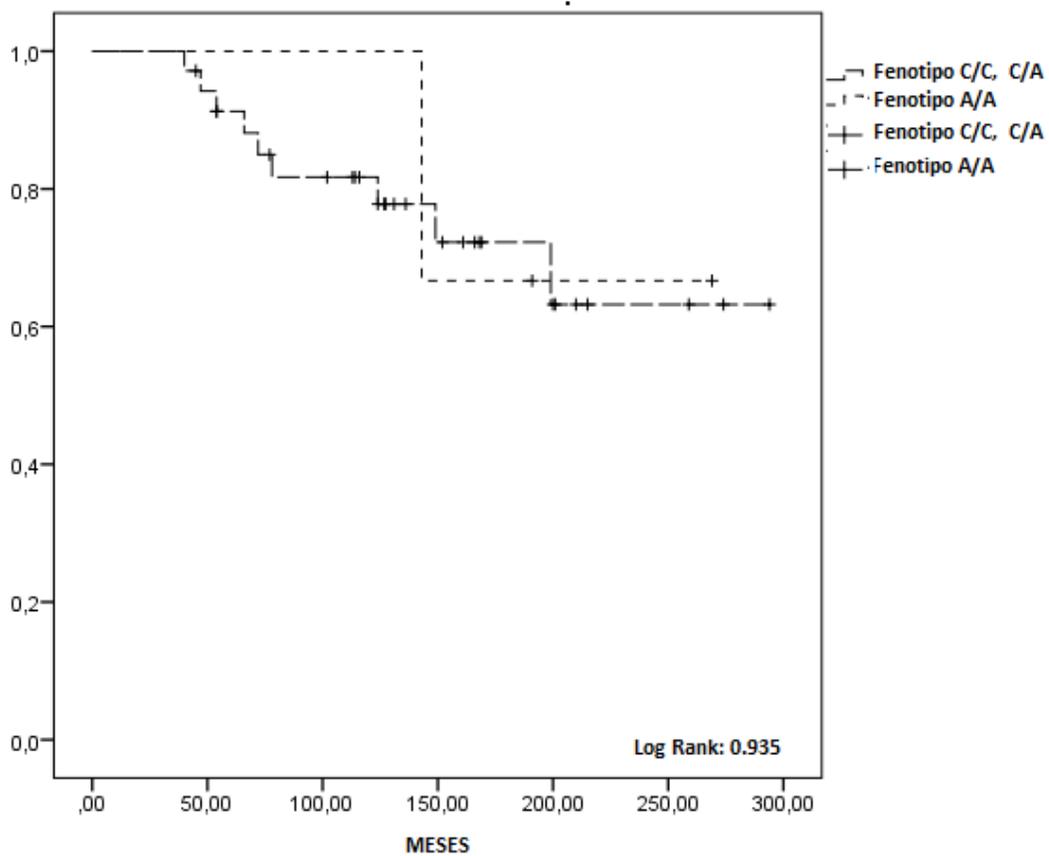


Figura 2B: Supervivencia global para polimorfismo ABC G2.



12. CONCLUSION

La Leucemia Linfoblástica Aguda es una de las neoplasias más frecuentes que se atienden alrededor del mundo. Su tratamiento requiere la combinación de diferentes estrategias siendo las principales las quimioterapias, el uso de anticuerpos monoclonales y los diferentes blancos moleculares. Debido a que esta variante de Leucemia muestra un tropismo específico para infiltrar al sistema nervioso central, es necesario el uso de medicamentos los cuales puedan atravesar de una manera más eficaz la barrera hemato-encefálica. Entre estos medicamentos se encuentra el uso de dosis altas de Metotrexate la cual requiere en general dosis superiores a 1.5 gramos para ser eficaz. Existen diversos factores los cuales pueden influenciar en el éxito del tratamiento, algunos dependientes de la enfermedad como son las alteraciones citogenéticas específicas o las diferentes mutaciones adquiridas durante el tratamiento, pero otras son inherentes de esta y se expresan de manera normal. Entre estas se encuentran los diferentes polimorfismos de genes cuya función es tanto el metabolismo como la absorción de los diferentes fármacos utilizados para el tratamiento de las leucemias. Tanto el Metotrexate como la mercaptopurina son los principales que muestran polimorfismo sobre enzimas implicadas en el metabolismo, pero otros genes codifican para transportadores que permiten tanto la entrada como la excreción de diversos fármacos incluyendo al Metotrexate. Tanto el Gen de resistencia a drogas ABCB1 como el Gen ABCG2 codifican a proteínas transmembrana dependientes de ATP para su funcionamiento y permite la detoxificación celular. Estos transportadores se encuentran expresados en todas las células incluyendo los hepatocitos como las células tubulares renales por lo que la presencia de variantes génicas puede incrementar el riesgo de toxicidad. Tanto el polimorfismo C3535T en el gen ABCB1 como el polimorfismo G421T en el gen de resistencia ABCG2 se ha asociado a una disminución en la eficacia de los diversos tratamientos oncológicos. El objetivo inicial de este estudio fue identificar la asociación de la presencia de los polimorfismos en los genes ABCB1 y ABCG2 sobre la toxicidad asociada al tratamiento con Metotrexate y su impacto sobre la recaída temprana. Al analizar la

respuesta al tratamiento, todos los pacientes que mostraron un polimorfismo mostraron toxicidad siendo la principal a nivel de mucosa oral y tracto gastrointestinal seguida de la toxicidad hepática. Al evaluar la asociación de estos polimorfismos sobre el riesgo de toxicidad no se identificó una asociación estadística tanto sobre la mortalidad como la recaída, pero polimorfismos principalmente ABCG2 muestran predominio sobre la toxicidad hepática. Al identificar las asociaciones entre toxicidad alrededor del 40% de los pacientes mostraron toxicidad múltiple severa la cual si se asocia a un mayor riesgo de muerte asociada al tratamiento. Finalmente, al analizar la presencia de cualquiera de los polimorfismos en conjunto con los factores de riesgo clínico clásicos, no se identificó una influencia sobre la supervivencia. En conclusión, la toxicidad al Metotrexate es una de las principales complicaciones del tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda, la cual en algunos casos puede limitar el éxito del tratamiento y poner en riesgo la vida de los pacientes. En conjunto con el polimorfismo clásico sobre la MTHF sugerimos que la detección de otros polimorfismos principalmente sobre los genes de resistencia a multi-drogas pueden ser de utilidad para la personalización del tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda del Adulto.

13. BIBLIOGRAFIA:

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide; sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*.2015, 136: 359-386
2. Bray F. Piñeros M. Cancer patterns, trend and projections in Latin America and the Caribbean: a global context. *SaludPublica Mex*.2016; 58 (2): 104-117
3. Linton KJ. Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)*.2007;22:122-130
4. Mei Z, Liang M, Li L, Zhang Y, Wang Q, Yang W. Effects of Statin on Cancer Mortality and Progression: A Systematic Review and Meta-analysis of 95 Cohorts including 1,111,407 Individuals. *Int J Cancer* 2017; 140 (5): 1068-81.
5. El-Awady R, SalehE, Hashim A et al. The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy. *Front Pharmacol*.2017, 10 :535-41
6. Chen Z, Shi T, Zhang Let all. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett*.2016; 370: 153 –164
7. Wijdeven RH, Pang B, Assaraf YG, Neefjes J. Old drugs, novel ways out: Drug resistance toward cytotoxic chemotherapeutics. *Drug Resist Updat*.2016; 28 :65-81
8. Fletcher JL, Williams RT, Henderson MJ, Norris MD, Haber M. ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resist Update*. 2016; 26: 1 -9
9. Fukuda Y, LianS, Schuetz JD. Leukemia and ABC transporters. *Adv Cancer Res*.2015; 125.171-196
10. Olarte Carrillo I, Ramos Peñafiel C, Miranda Peralta E, et al. Clinical significance of the ABCB1 and ABCG2 gene expression levels in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*. 2016;14: 1-6

11. Locher KP. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat StructuMol Biol.*2016; 23 (6): 487- 493
Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO Classification of Lymphoid Neoplasm And Beyond: Evolving Concepts And Practical Applications. *Blood* 2011;117(19):5019-32
12. Aldoss IT, Marcucci G, Pullarkat V. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults: Applying Lessons Learned in Children. *Oncology (Williston Park)* 2016; 30 12: 1080-91.
13. Thomas X, Le Jeune C. Treating adults with acute lymphocytic leukemia: new pharmacotherapy options. *Expert Opin Pharmacother* 2016; 17: 2319-30.
14. Paul S, Kantarjian H, Jabbour EJ. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clin Proc* 2016; 91 (11): 1645-66.
15. Kansagra A, Litzow M. Treatment of Young Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2017; 12 (3): 187-96.
16. Kantarjian H, Stein A, Gökbüget N, Fielding AK, Schuh AC, Ribero JM, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *NEJM* 2017; 376 (9): 836-47.