



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN
SECRETARIA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**"EVALUACIÓN DE SNPs EN LOS GENES INVOLUCRADOS
EN EL TRANSPORTE Y METABOLISMO
DE FOLATOS, COMO FACTOR PRONÓSTICO
DE RESPUESTA Y SUPERVIVENCIA
EN PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA"**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN HEMATOLOGÍA**

**PRESENTA
DR. JUAN OJEDA TOVAR**

ASESOR: DRA. MYRNA GLORIA CANDELARIA HERNÁNDEZ



AGOSTO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AUTORIZACIÓN DE TESIS

Dra. Sylvia Verónica Villavicencio Valencia

Subdirectora de Docencia

Instituto Nacional de Cancerología

Dra. Myrna Gloria Candelaria Hernández

Asesor de Tesis

Médico adscrito del Departamento de Hematología

Investigadora

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al todo el personal de Instituto Nacional de Cancerología por la contribución que ha tenido con mi enseñanza en la Hematología.

Al Dr. Juan Rafael Labardini Méndez por ser un ejemplo en lo que respecta al campo personal y profesional.

A la Dra. Myrna Candelaria por su dirección, apoyo, paciencia y conocimientos, así como a la Dra. Silvia Vidal y Quim. Olga Gutiérrez por su valiosa colaboración para la realización de esta tesis.

A mi familia, que siempre están a mi lado para acompañarme y apoyarme de forma incondicional desde el primer momento, en todas mis decisiones.

A mis compañeros que durante estos 3 años me permitieron formar parte de sus vidas y ellos de la mía.

A los pacientes que de forma noble están siempre dispuestos a colaborar con sus médicos.

INDICE

ANTECEDENTES	5
JUSTIFICACION	9
OBJETIVOS	9
HIPÓTESIS	9
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN	17
CONCLUSIONES	19
TABLAS Y FIGURAS	20
ANEXOS	25
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	39

Evaluación de SNPs en los genes involucrados en el transporte y metabolismo de folatos, como factor pronóstico de respuesta y supervivencia en pacientes con leucemia linfoblástica.

ANTECEDENTES

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) representa el 1% del total de casos de cáncer y 20% del total de leucemias en el adulto, siendo más frecuente en la edad pediátrica, ya que representa el 15% del total de casos de cáncer en esta edad. (1). Tiene una incidencia de 1.9/100,000 hombres y 1.4/100,000 mujeres, sin embargo se ha descrito alta incidencia en pacientes hispanos, comparada con la raza blanca, con una incidencia en hispanos de 2.5/100,000 hombres y 2.1/100,000 mujeres contra 2.0/100,000 hombres blancos y 1.5/100,000 mujeres blancas (2).

En el Instituto Nacional de Cancerología de México (INCan), se reportaron en el 2006 y 2007 un total de 79 nuevas leucemias agudas, correspondiendo el 67% a LAL, de las cuales el 92% correspondieron a LAL L2 por la clasificación de FAB.

El tratamiento de la LAL del adulto ofrece posibilidades de supervivencia libre de enfermedad a largo plazo del 20- 35 % (4, 5, 6). El pronóstico de esta entidad se asocia con características del huésped (edad, desempeño físico, función orgánica) y de la neoplasia, incluyendo, fenotipo de las células leucémicas y alteraciones citogenéticas, afección extramedular y sensibilidad al tratamiento administrado.

Esquema Hiper-CVAD

El esquema Hiper-CVAD descrito por Kantarjian y cols (4) incluye la administración de cuatro ciclos alternantes de metotrexate y citarabina, con ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y dexametasona, además de quimioterapia profiláctica intratecal y mantenimiento con 6-Mercaptopurina, metotrexate, vincristina y prednisona. Este esquema permitió la obtención de respuesta completa en 91 % de pacientes, con supervivencia global a 5 años del 39 %, en la actualidad se usa como tratamiento de primera línea en pacientes con LAL en el INCan.

Metotrexate

El metotrexate está indicado no sólo en el tratamiento del cáncer, sino también para el tratamiento de artritis reumatoide, psoriasis y prevención de enfermedad de injerto contra el huésped de pacientes sometidos a trasplante de médula ósea, Tiene buena biodisponibilidad a bajas dosis, pero su absorción es errática a dosis mayores de 25 mg/m^2 . A dosis convencionales se alcanza únicamente niveles en líquido cefalorraquídeo de 5 – 10% en comparación a niveles plasmáticos. Sin embargo a dosis mayores logra obtener niveles terapéuticos. El medicamento necesita poliglutamación a su forma activa por la enzima FPGS en el hígado. Se elimina por riñón. Se utiliza en diferentes neoplasias, incluyendo tumores sólidos como cáncer de mama, cabeza y cuello, coriocarcinoma, osteosarcomas, cáncer colorectal y de vejiga, así como neoplasias hematológicas como LAL y linfoma no Hodgkin. (9). Dosis moderadas y altas necesitan rescate con ácido fólico (4), la cual deberá ser iniciada 24 horas posteriores a la administración y continuarlas hasta que los niveles séricos sean menores a 50 nM. Se deberá medir niveles plasmáticos en todos los pacientes con disfunción renal.

El Metotrexate es un antagonista de ácido fólico con acción específica en la fase S del ciclo celular. Requiere ser transportado al interior de la célula a través del acarreador de folato reducido (10). Una vez que se encuentra en el interior de la célula se poliglutamina, con la adición de dos a 7 residuos de ácido glutámico a través de la enzima folilpoliglutamato sintetasa. Los poliglutamatos de metotrexate inhiben la enzima dihidrofolato reductasa, necesaria para la conversión de ácido fólico a ácido tetrahidrofólico, depletando folatos, ocasionando así la inhibición síntesis de DNA, RNA, timidilato y purinas, como se señala en la figura 1 (11):

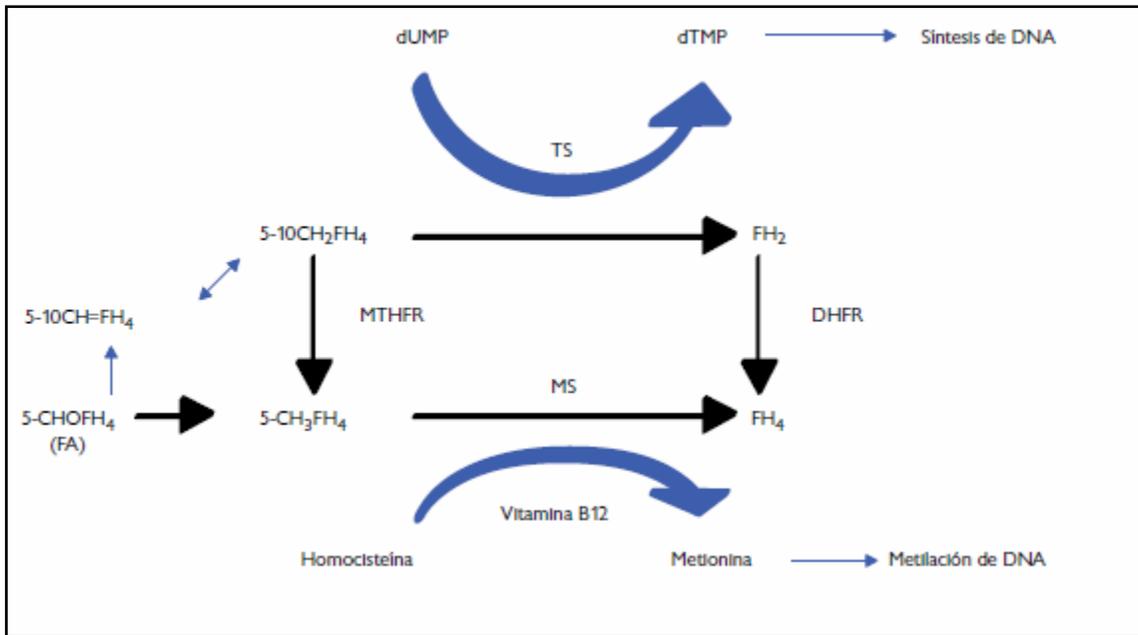


Figura. 1 Metabolismo del folato

Como se ha descrito previamente el Metotrexate es parte fundamental del tratamiento de LAL, por lo que alteraciones en la expresión del acarreador de folato (secundarios a polimorfismos) y/o de la MTHFR, pueden influir en la sensibilidad a este fármaco.

El polimorfismo del acarreador de folato que tiene una sustitución de arginina por histidina en el codón 27 de la proteína FC (RFCG80A) influye en su funcionalidad (12), en un estudio de 204 niños con leucemia que se trataron con metotrexate y eran homocigos para la variante RFC 80AA tuvieron mayores niveles plasmáticos de metotrexate, en comparación con otros genotipos (13). Estos hallazgos concuerdan con los descritos por Dervieux (14, 15).

La enzima MTHFR se ha estudiado ampliamente, con respecto al metabolismo de metotrexate (12). Se han descrito por lo menos 15 polimorfismos de nucleótidos aislados (SNP's) de esta enzima (16), de los cuales dos son no sinónimos (C677T y A1298C). El polimorfismo C677T permite el cambio de un aminoácido (alanina por valina) en el codón 222; lo que disminuye la actividad enzimática: los heterocigos tienen actividad enzimática in vitro de aproximadamente el 60 % y los homocigos de 40 %, en población caucásica (17). El polimorfismo A1298C permite la sustitución de un aminoácido (ácido glutámico por alanina) en el codón 429 y también se asocia a menor actividad enzimática (12).

Van Ede (18) evaluó el polimorfismo C677T y demostró en 236 pacientes con artritis reumatoide un incremento en la toxicidad secundaria a metotrexate, en la población portadora de por lo menos un alelo T, en comparación con el genotipo CC. En esta población no se encontró diferencia en la respuesta a metotrexate. Estos resultados concuerdan con los publicados por Urano (19), quien demostró que la presencia del alelo C677T incrementó la toxicidad por metotrexate (27 %, en comparación con 8 %); el polimorfismo A1298C no correlacionó con toxicidad. Berkun (20) y Hughes (21) han evaluaron también los polimorfismos C677 T y A1298C y no encontraron asociación entre ellos y toxicidad. Estos resultados sugieren que el polimorfismo C677T puede ser un marcador de toxicidad, en particular hepato-toxicidad. Los resultados para el polimorfismo A1298C son inconsistentes (22).

Los polimorfismos descritos para el RFC y la enzima MTHFR han sido evaluados por diferentes técnicas, incluyendo DHPLC (22-25).

Farmacogenética

Las variaciones genéticas se relacionan con el metabolismo de los medicamentos antineoplásicos e influyen en su toxicidad y respuesta a la quimioterapia en pacientes con cáncer. Los polimorfismos se definen como variaciones genéticas presentes en más del 1 % de la población; generalmente tienen una alteración específica y pueden asociarse a cambios en la actividad del DNA que se encuentra alterado. La respuesta a los agentes de quimioterapia se determina primariamente por el genoma del tumor, pero la toxicidad depende primariamente del genoma en los tejidos sanos (7,8). La evaluación de los polimorfismos de nucleótidos aislados (SNP's, por sus siglas en inglés) constituye el objetivo de la farmacogenética. Existen diferentes técnicas para la determinación de los SNP's. El DHPLC (DHPLC, por sus siglas en inglés: *denaturing high-performance liquid chromatography*) es un método utilizado en múltiples laboratorios para el análisis de polimorfismos de nucleótidos aislados, así como de mutaciones conocidas y no conocidas en una variedad de enfermedades. El DHPLC consta de dos fases que separan ácidos nucleicos a través de intercambio aniónico. Se ajusta con temperatura para trabajar DNA en tres condiciones diferentes: no desnaturalizado, parcialmente desnaturalizado y completamente desnaturalizado. Se emplea para el análisis de genes que se sabe son altamente polimórficos, para los cuales se han descrito numerosas variantes alternativas o para genes susceptibles de una tasa alta de mutaciones esporádicas. Su alta sensibilidad del DHPLC combinada con la precisión del análisis de heteroduplex ha permitido el desarrollo de aplicaciones que rebasan los métodos tradicionales de secuenciación o genotipificación, ya que estas técnicas implican un alto costo y consumo de tiempo (8).

JUSTIFICACION

La leucemia aguda es la entidad neoplásica más frecuente de la edad pediátrica y en el Instituto Nacional de Cancerología de México se reportaron, en el 2006 y 2007, un total de 79 nuevas leucemias agudas, siendo el 67% leucemias linfoblásticas. El tratamiento de esta entidad incluye antimetabolitos, como el Metotrexate. En la actualidad, en el Instituto Nacional de Cancerología se utiliza el esquema Hiper-CVAD (Ciclofosfamida, Vincristina, Adriamicina y Dexametasona, alternado con Citarabina y Metotrexate) como primera línea de tratamiento en pacientes con esta entidad. Se ha reportado que polimorfismos en el acarreador de folato, (el mayor transportador de Metotrexate) y la enzima MTHFR, influyen en la supervivencia de pacientes con leucemia aguda linfoblástica. La administración individualizada de este medicamento, en función de la determinación de polimorfismos que influyan en la respuesta permitirá el uso racional del mismo en pacientes con leucemia aguda linfoblástica y mejorará la calidad de vida de estos pacientes.

OBJETIVOS

Evaluar mediante DHPLC la influencia de los polimorfismos de los genes involucrados en el transporte y metabolismo de folatos, en la respuesta y supervivencia de pacientes con leucemia aguda en México.

HIPÓTESIS

Los polimorfismos de los genes involucrados en el transporte y metabolismo de folatos correlacionan con la respuesta y supervivencia global de los pacientes con leucemia aguda linfoblástica tratados con esquema Hiper-CVAD en el Instituto Nacional de Cancerología.

MATERIAL Y METODOS

1. Universo de estudio y tamaño de muestra:

Se incluyeron a pacientes del Instituto Nacional de Cancerología, con diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica tratados con esquema Hiper-CVAD.

Diseño de estudio: Estudio piloto, prospectivo, abierto, exploratorio.

2. Criterios de inclusión:

Aceptación del paciente para participar voluntariamente en este estudio

Pacientes con diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica que acudan al Instituto Nacional de Cancerología.

Género: indistinto.

Edad: Mayor de 15 años

Función renal y hepática normales.

Candidatos a tratamiento con Hiper-CVAD.

Ausencia de tratamiento previo.

3. Criterios de exclusión:

Pacientes con antecedentes de hipersensibilidad al metotrexate u otros fármacos incluidos en el esquema Hiper-CVAD.

Imposibilidad de seguimiento del paciente.

4. Proceso de las muestras en el laboratorio:

Obtención del ADN:

Se aisló DNA de células mononucleares por métodos estándares a partir de una muestra de 15 ml de sangre periférica.

En resumen: se centrifugaron 15 ml de sangre total a 1500 rpm/10 minutos y se recuperó la capa de leucocitos, la cual se incubó con 3 volúmenes de Buffer de lisis de eritrocitos (NH₄Cl 0.15M, KHCO₃ 1 mM, EDTA 0.1 mM) y por 20 minutos a 37 °C. Se centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El botón se resuspendió en Buffer de extracción (Tris 10 mM, EDTA 20 mM, SDS 0.5 %) con proteinasa K (50ug/ml) y se incubó a 60°C por 3 hr, y se procedió a extraer con fenol-cloroformo. Se precipitó el DNA en 1 volumen de isopropanol y NaCl 0.2 M; se centrifugó a 14,000 rpm 3 minutos y se lavó el botón 2 veces con etanol al 70 %. Se dejó secar el botón y se resuspendió en 200 ul TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH7.6).

Amplificación por PCR.

1. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para la amplificación del gen que codifica para el acarreador de folatos:

Se: 5'-AGTGTCACTTCGTCCC-3'

AS: 5'-TCCCGCGTGAAGTTCTTG-3'

La amplificación por técnica de PCR se realizó en un volumen total de 25 μ l, que contiene 30 ng de DNA genómico, 2 pmol/ μ l de cada oligonucleótido, 200 μ M de dNTPs, 0.25 U de Taq polimerasa y buffer para PCR10x (15mM MgCl₂, Perkin Elmer).

Esta amplificación se inició con desnaturalización a 94° C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos con: 94°C por 30 segundos, 57 °C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos.

La extensión final fue a 72°C por 7 minutos.

Posteriormente los productos fueron evaluados en geles de agarosa y analizados por DHPLC.

2. Los fragmentos del gene que codifica para la enzima MTHFR, se amplificaron usando los siguientes oligonucleótidos:

Se: 5'-GGAGCTTTGAGGCTGACCTGAA-3'

As: 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'

La amplificación por técnica de PCR se realizó en un volumen total de 25 μ l, que contiene 30 ng de DNA genómico, 2 pmol/ μ l de cada oligonucleótido, 200 μ M de dNTPs, 0.25 U de Taq polimerasa y buffer para PCR10x (15mM MgCl₂, Perkin Elmer).

Esta amplificación se inició con denaturalización a 94° C durante 5 minutos, seguido de 38 ciclos con: 94°C por 30 segundos, 57 °C por 35 segundos, 72°C por 30 segundos. La extensión final fue a 72°C por 7 minutos.

Posteriormente los productos serán evaluados en geles de agarosa y analizados por DHPLC.

Análisis por DHPLC.

Los productos obtenidos por PCR se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos y se enfriaron lentamente hasta 50°C, con cambio de 1°C/minuto para permitir la formación de los homo o heteroduplexes.

Estos productos fueron analizados por DHPLC, de acuerdo con la técnica descrita inicialmente por Fang (23), que se resume en:

Acarreador de folato: Se inyectó a la columna de HPLC 7 µl de DNA con los siguientes buffers; Buffer A (acetato de tri-etil amonio 0.1 mol/L) y buffer B (acetato de tri-etil amonio 0.1 mol/L, conteniendo acetonitrilo 250 mL/L) en las proporciones y tiempos que a continuación se señalan: 52 %A- 48 % B basal, 47 % A-53 % B durante 0.1 minutos, 40 % A-60 % B durante 5.2 minutos, 0 % A- 100 % B durante 0.1 minutos, 52 % A- 48 % B durante 0.6 minutos. La fase móvil se realizó a 55 °C, que permite la detección de heteroduplex. Esta temperatura se obtuvo después de múltiples análisis con muestras analizadas 1-2°C por debajo y arriba de las temperaturas calculadas por el software del equipo DHPLC de transgenomics.

MTHFR: Se inyectó a la columna de HPLC 7 µl de DNA con los siguientes buffers; Buffer A (acetato de tri-etil amonio 0.1 mol/L) y buffer B(acetato de tri-etil amonio 0.1 mol/L, conteniendo acetonitrilo 250 mL/L) en las siguientes proporciones y tiempos: 54 %A- 46 % B basal, 46 % A-54 % B durante 1 minuto, 39 % A-61 % B durante 4.8 minutos, 0 % A- 100 % B durante 0.1 minutos, 54 % A- 46 % B durante 1.1 minutos. La fase móvil se realizó a 62 °C, que permite la detección de heteroduplex. Esta temperatura se obtuvo después de múltiples análisis con muestras analizadas 1-2°C por debajo y arriba de las temperaturas calculadas por el software del equipo DHPLC de transgenomics.

Interpretación de resultados del DHPLC.

La formación de heteroduplex fue evaluada con controles de DNA genómico secuenciado de tipo silvestre y con los polimorfismos. Se analizaron las curvas obtenidas por DHPLC: En el caso de heteroduplex se observaron y compararon con las curvas conocidas de DNA genómico secuenciado para esta alteración. En los casos de homoduplex (aparentes tipo silvestres), éste fue mezclado con DNA silvestre, para permitir la formación de heteroduplex en el caso de existir polimorfismos. Los resultados finales son informados como silvestre (*wt*) o con el polimorfismo detectado.

5. Evaluación de respuesta.

Todos los pacientes fueron evaluables para respuesta, por criterios internacionales, a través de aspirado de médula ósea y biometría hemática (Internacional Working Group [IWG] para leucemia aguda (37), como a continuación se resume:

La **remisión completa** (RC) requiere de todos los siguientes criterios:

Aspirado de médula ósea:

- Menos del 5 % de blastos

Biometría hemática:

- Cuenta absoluta de neutrófilos $> 1000/\text{mm}^3$
 - Cuenta de plaquetas $> 100,000 /\text{mm}^3$
 - Ausencia de blastos

Independencia de transfusión de productos de sangre.

Ausencia de leucemia extramedular.

La **remisión parcial** (RP) requiere de todos los siguientes criterios:

Aspirado de médula ósea:

- 5-19 % de blastos y una reducción mayor al 50 % a partir de la cifra basal.

Biometría hemática:

Cuenta absoluta de neutrófilos $\geq 1000 /\text{mm}^3$

Cuenta de plaquetas $\geq 100,000/\text{mm}^3$.

La definición de **mejoría hematológica** (MH) requiere de todos los siguientes criterios:

Aspirado de médula ósea:

5-19 % de blastos y una reducción mayor al 50 % a partir de la cifra basal.

Biometría hemática:

Cuenta absoluta de neutrófilos 500- 1000/mm³

Incremento de hemoglobina > 2 g/dL (si la hemoglobina pretratamiento es < 11g/dL).

Cuenta de plaquetas 30,000/mm³.

La **progresión de la enfermedad** (PE) se define por cualquiera de los siguientes criterios:

Aumento mayor al 50 % de blastos en médula ósea. Si el recuento relativo de blastos es menor al 20 %, entonces se requieren 2 elevaciones consecutivas en los recuentos.

Nuevo surgimiento de blastos circulantes confirmado, cuando menos 1 semana antes.

Nueva enfermedad extramedular.

Si la progresión se sospecha con base en el frotis de sangre periférica, deberá confirmarse mediante aspirado de médula ósea. .

Adicionalmente, se evaluó toxicidad, en cada una de las consultas del paciente con base en los criterios del Instituto Nacional de Cancer de Estados Unidos.

6. Análisis estadístico

Todos los datos reportados como línea de base (datos demográficos, historia médica relevante, examen clínico, diagnóstico, mediciones basales de eficacia, etc.) se resumieron de la siguiente manera: para las variables cuantitativas se calculará el promedio y los valores mínimo y máximo; para las variables de naturaleza cualitativa se elaboraron tablas de frecuencias.

Las variables de seguridad: se monitorizaron los datos clínicos y de laboratorio, la toxicidad y los eventos adversos que se presentaron. Los eventos adversos se listaron y se construyó una tabla de frecuencia para identificar su incidencia; se analizarán por subgrupos en función de la presencia o ausencia de polimorfismos del acarreador de folatos y del MTHFR.

Toxicidad: Las variables cualitativas y de laboratorio se evaluaron por categorías de acuerdo con los criterios del *NCI*.

RESULTADOS

Se incluyeron un total de 36 pacientes con diagnóstico de LAL en un periodo de tiempo de Enero del 2010 a Junio del 2011, de los cuales se excluyeron 4 pacientes que no recibieron tratamiento con el esquema Hiper-CVAD. Las características demográficas se muestran en la tabla 1.

De los 31 pacientes que se incluyeron, 15 (48.4%) son hombres y 16 (51.6%) mujeres, de acuerdo a la clasificación de la FAB, 24 corresponden a LAL L2, 2 a LAL L3 y 5 a Linfoma linfoblástico. El grupo etario que predominó fue de los 15 a los 29 años de edad con un 61.3% (Figura 2).

De acuerdo al riesgo, el 67.7% son de riesgo alto, al ingreso el 87.1% presentó un ECOG de 0 a 2, con respecto a la clasificación por inmunofenotipo, la presentación fue la siguiente: 3 pacientes con Pre B, 5 con Pro B, 21 con B común, 1 con B madura y 1 con inmunofenotipo T.

Al diagnóstico, el 16.1% tuvo comorbilidades, el 32.2% con riesgo alto de infiltración a sistema nervioso central (SNC), el 19.3% con leucocitos mayores o iguales a 30 000/uL, el 74.2% con Hb menor a 10 g/dL, el 70.9% con trombocitopenia menor a 100 000/uL, 64.5% con DHL aumentada, 32.2% con hiperuricemia, 58% con ADE alto, 19.3% con presencia de cromosoma Filadelfia, 10 de 12 pacientes con ferritina aumentada y 8 de 22 pacientes con CD 20 positivo.

Se logró determinar polimorfismos en el acarreador de folato y en la enzima MTHFR en 27 y 29 pacientes respectivamente (tabla 2).

El 80.6% entró en remisión con la fase IA del esquema Hiper-CVAD, el 9.6% presentó infiltración al SNC, 4 pacientes se adicionaron con tratamiento con inhibidor de tirosin- cinasa, de los cuales, 2 presentaron respuesta citogenética completa y 2 con respuesta citogenética parcial.

Supervivencia global (SG) y supervivencia libre de recaída (SLR)

Para la cohorte completa de pacientes, la SG estimada a 18 meses fue de 51.6% [95% Intervalo de confianza (IC) 252-367 días] (Figura 3), de acuerdo al riesgo la SG fue de 47.6% vs 60% para riesgo alto y estándar respectivamente, sin embargo esto no fue estadísticamente significativo.

La supervivencia en relación con el inmunofenotipo es la siguiente: pre B 100%, pro B 60%, B común 47.6%, B madura y T no sobrevivieron (Figura 4).

Del total de 31 pacientes, 6 expresaron cromosoma Filadelfia y en estos la SG fue 50% vs 52% de los que no expresan Filadelfia.

La SLR fue del 83.9% (95% IC, 380-494) a 18 meses de seguimiento (Figura 5).

Se realizó análisis de regresión de Cox para evaluar los factores (polimorfismos del RFC y MTHFR, cromosoma Filadelfia, inmunofenotipo y riesgo) que influyeron en la SG y SLR. Solamente el inmunofenotipo y la variante alélica silvestre (wt) del RFC, fueron estadísticamente significativos (tabla 4).

Hubo 15 defunciones, de las cuales 8 se relacionaron con sepsis, 3 con progresión y 4 con otras causas.

Toxicidad

El 64.5% presentó toxicidad no hematológica grado 1 a 2, el 35.5% grado 3 a 4, el 100% presentó toxicidad hematológica grado 4 y el 54.8% desarrolló mucositis (tabla 5).

DISCUSIÓN

La LAL en el Instituto Nacional de Cancerología se presentó de forma predominante (61.3%) en la población de entre 15 a 29 años, se observó también predominio de LAL de riesgo alto (67.7%), sin embargo esto no resultó estadísticamente significativo al correlacionarlo con la SG.

La mayoría de los pacientes (87.1%) ingresa con un ECOG bajo, sin que esta característica se relaciona con la SG.

Los resultados del esquema Hiper-CVAD en la población evaluada en el Instituto Nacional de Cancerología son alentadores alcanzando una remisión completa con la Fase IA, en el 80.6% de los 31 pacientes, con una supervivencia global a los 18 meses de 51.6%, en comparación con los resultados del estudio de Kantarjian y cols. (4) donde se observó remisión completa en 91% de los 204 pacientes incluidos y una SG de 39% a 5 años. Hay algunas diferencias relevantes en las características demográficas comparando el estudio de Kantarjian y cols. y el nuestro como son la edad < 30 años (32% vs 61.3%), de 30 a 50 años (31% vs 16%), > 60 años (22% vs 12.9%), así mismo existe cierta concordancia en otras características como son el desempeño físico (7% vs 12.9%), cromosoma filadelfia (16% vs 19.4%), Hb < 10 g/dL (69% vs 74%), DHL elevada (59% vs 64%), Subtipo L3 (5% vs 6.5%), inmunofenotipo pre B (14% vs 9.7%), B común (53% vs 67.7%).

Se observó correlación entre el inmunofenotipo, polimorfismos del RFC y la SG, siendo de mejor pronóstico la presencia de inmunofenotipo pre B y pro B, así como la ausencia de polimorfismos del RFC.

La presencia de polimorfismos en el RFC a diferencia de la variante alélica silvestre, como factor de mal pronóstico ha sido descrita previamente en el estudio de Laberdiere y cols. (13), donde observaron que la variante A₈₀ tuvo un alto riesgo de eventos (recaída) a diferencia de la variante silvestre (57.1% vs 14.3%, OR= 3; 95% IC, 1.1-8.1 p= 0.03). En nuestro estudio se observó correlación entre los polimorfismos y la SG, siendo de mejor pronóstico la ausencia de polimorfismos del RFC. Así mismo el inmunofenotipo pre B y pro B también influyen de forma positiva para la SG.

La presencia de comorbilidades, infiltración a SNC, leucocitos mayores a 30 000/uL, Hb menor a 10 g/dL, trombocitopenia menor a 100,000/uL, DHL y ácido úrico elevados, cromosoma Filadelfia, antígeno CD 20 positivo y polimorfismos de la MTHFR, no correlacionaron con la supervivencia global de forma estadísticamente significativa.

Llama la atención que la presencia de cromosoma Filadelfia, así como la positividad para antígeno CD20 no influyó en la SG, como se ha descrito en la literatura, donde la positividad de CD 20 en LAL de precursores B influye en la duración de la remisión completa en un seguimiento a 3 años (20 vs 55%, $p < 0.001$) y en la supervivencia global (27% vs 40%, $p = 0.03$) (26). Esto podría estar en relación al tamaño de la muestra analizada en nuestro estudio.

CONCLUSIONES

En este estudio se encontró correlación entre la SG y algunas características propias del paciente como lo son el inmunofenotipo de la LAL y el polimorfismo del RFC, se observó también que el polimorfismo de la MTHFR no correlaciona con la SG.

Consideramos que es necesario tener una muestra mayor de pacientes, así como un periodo de seguimiento más amplio para probablemente observar una correlación más estrecha entre las características comentadas y la respuesta al tratamiento con Hiper-CVAD.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Características demográficas de 31 pacientes con Leucemia aguda linfoblástica.

Característica	No. (%)
Número de pacientes	31
Edad (años) mediana=28	
15 a 19	10 (32.3)
20 a 29	9 (29)
30 a 39	3 (9.7)
40 a 49	2 (6.5)
50 a 59	3 (9.7)
> 60	4 (12.9)
Género	
Masculino	15 (48.4)
Femenino	16 (51.6)
ECOG	
0 a 2	27 (87.1)
3 a 4	4 (12.9)
Subtipo	
LAL L2	24 (77.4)
LAL L3	2 (6.5)
Linfoma Linfoblástico	5 (16.1)
Riesgo	
Alto	21 (67.7)
Estándar	10 (32.2)
Inmunofenotipo	
Pre B	3 (9.7)
Pro B	5 (16.1)
B común	21 (67.7)
B madura	1 (3.2)
T	1 (3.2)
Comorbilidades	
Sí	5 (16.1)
No	26 (83.9)
Riesgo de infiltración a SNC	
Alto	10 (32.3)
Bajo	21 (67.7)
Leucocitos, /μL	
< 30,000	25 (80.6)
\geq 30,000	6 (19.4)
Hemoglobina, g/dL	
< 10	23 (74.2)
\geq 10	8 (25.8)
ADE	
Normal	13 (41.9)
Aumentado	18 (58.1)
Plaquetas, /μL	
< 100, 000	22 (71)
\geq 100, 000	9 (29)
DHL	
Normal	11 (35.5)
Aumentada	20 (64.5)

Ácido úrico	
Normal	21 (67.7)
Aumentado	10 (32.3)
CD20, %	
Positivo	8 (25.8)
Negativo	14 (45.2)
No se evaluó	9 (29)
Ferritina	
Normal	2 (6.4)
Aumentada	10 (32.3)
No se evaluó	19 (61.3)
Cromosoma Filadelfia	
Positivo	6 (19.4)
Negativo	25 (80.6)
Infiltración a SNC	
Sí	3 (9.7)
No	28 (90.3)

Tabla 2. Frecuencia de polimorfismos de RFC y MTHFR

Polimorfismos	
RFC	n=27
Silvestres	16 (59.3)
Homócigos	1 (3.7)
Heterócigos	10 (37)
MTHFR	n=29
Silvestres	8 (27.6)
Homócigos	10 (34.5)
Heterócigos	11 (37.9)

Tabla 3. Respuesta al Hiper-CVAD

Tipo de respuesta	No. (%)
Respuesta global	31 (100)
Respuesta completa	25 (80.6)
Respuesta parcial	6 (19.4)
Recaída	5 (16.1)

Tabla 4. Análisis de regresión de Cox para SG y SLR

Variables	SG	SLR
	Valor de p	Valor de p
MTHFR	0.183	0.379
RFC	0.039	0.463
Filadelfia	0.483	0.190
Inmunofenotipo	0.008	0.483
Riesgo	0.672	0.627

Tabla 5. Toxicidad con esquema HiperCVAD

Parámetro	Pacientes		
	No.	Grado 1-2	Grado 3-4
Hematológica	21		21
Renal	1	1	
Hepática	8	7	1
Gastrointestinal	31	21	10
Ocular	2	2	



Figura 2. Distribución por grupos de edad.

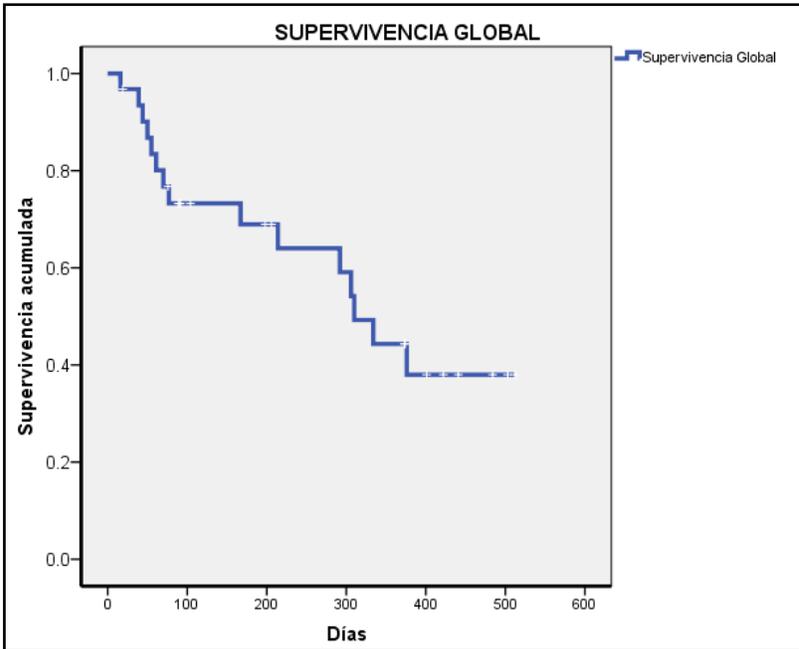


Figura 3. Supervivencia global

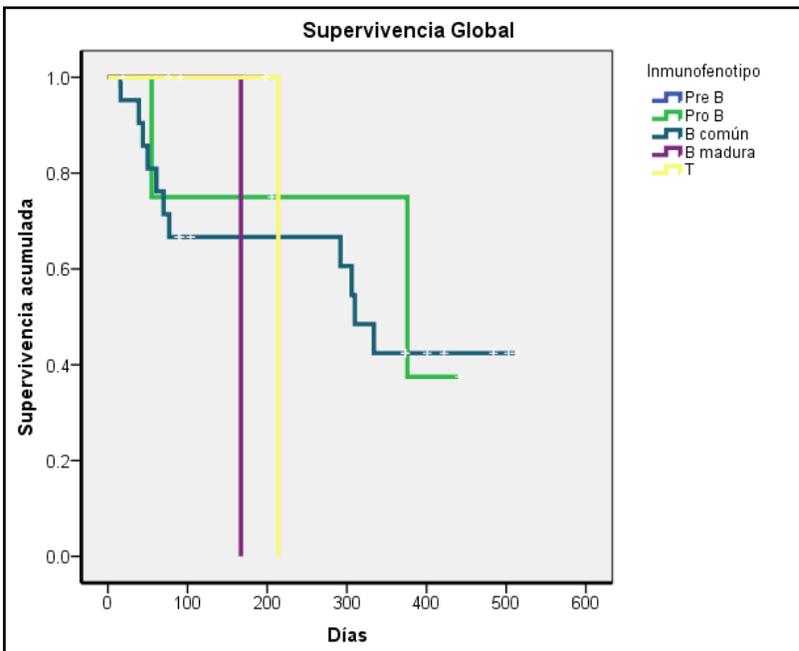


Figura 4. Supervivencia global en relación al inmunofenotipo

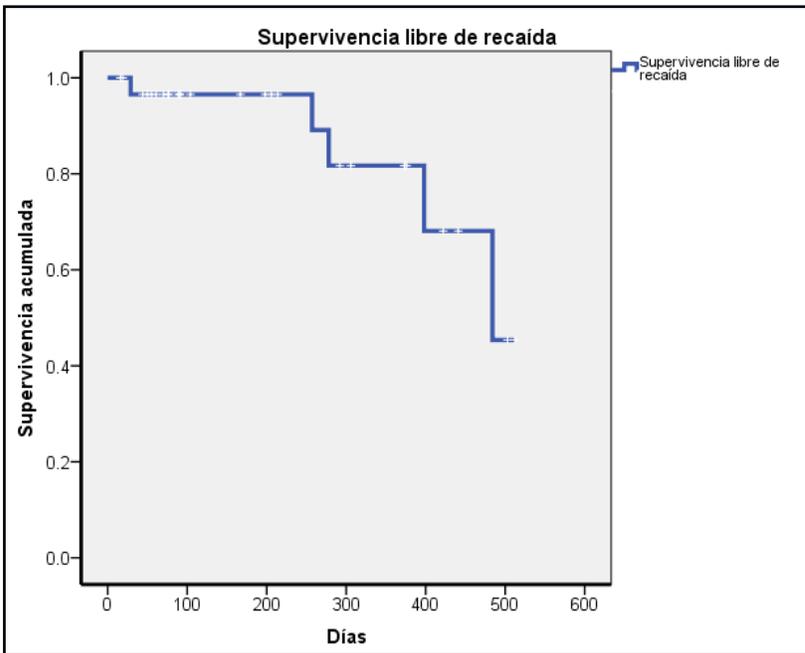


Figura 5. Supervivencia libre de recaída

ANEXOS

CRITERIOS DE TOXICIDAD, DE ACUERDO CON EL INSTITUTO NACIONAL DE CANCER DE ESTADOS UNIDOS.

CTC Versión 2.0: Ene. 30, 1998

SANGRE/MÉDULA ÓSEA					
Toxicidad	0	1	2	3	4
Conteo de células en la médula ósea	Normal para la edad	Ligeramente hipocelular o 25% de reducción del número de células normal para la edad	Moderadamente hipocelular o >25-≤50% de reducción del número de células para la edad o >2 pero <4 semanas para la recuperación del conteo celular normal de la médula ósea	Severamente hipocelular o >50-≤75% de reducción en la cantidad normal de células para la edad o 4-6 semanas para la recuperación de la cantidad celular normal de la médula ósea	Aplasia o >6 semanas para la recuperación del conteo celular normal de la médula ósea
Rangos normales:	90% cantidad celular promedio				
Niños (≤ 18 años)	60-70% cantidad celular promedio				
Adultos jóvenes (19-59)	50% cantidad celular				
adultos mayores (≥60 años)					
Nota: La clasificación de acuerdo al conteo celular de la médula ósea sólo para los cambios relativos al tratamiento, no a la enfermedad.					

CRITERIOS COMUNES DE TOXICIDAD (CTC)

Grado de toxicidad	0	1	2	3	4
Conteo de CD4	WNL	< LLN – 500/mm ³	200 – < 500/mm ³	50 - < 200/mm ³	< 50/mm ³
Haptoglobina	Normal	Disminuida	-	ausente	-
Hemoglobina (Hgb)	WNL	<LLN – 10.0 g/dl < LLN – 100 g/L < LLN – 6.2 mmol/L	8.0 - <10.0 gd/dl 80 - <100 g/L 4.9 - < 6.2 mmol/L	6.5 - < 8.0 gd/dl 65 – 80 g/L 4.0 - < 4.9 mmol/L	< 6.5 g/dl < 65 g/L < 4.0 mmol/L
Hemólisis (v.g. anemia hemolítica inmune, hemólisis relativa a la droga, otras)	Ninguna	Sólo evidencia de laboratorio de hemólisis [v.g. examen de esquistocitos en las anti-globulinas directas (DAT, Coomb)]	Evidencia de destrucción de glóbulos rojos y disminución de ≥2gm en hemoglobina, no es necesaria la transfusión	Se requiere de transfusión y/o intervención médica (v.g. esteroides)	Consecuencias catastróficas de la hemólisis (v.g. insuficiencia renal, hipotensión, broncoespasmo, esplenectomía de emergencia)
Considerar también Haptoglobina, Hgb.					
Leucocitos (WBC total)	WNL	< LLN – 3.0 x 10 ⁹ /L < LLN – 3,000/mm ³	≥2.0 – <3.0 x 10 ⁹ /L ≥ 2,000 - <3,000/mm ³	≥1.0 – <2.0 x 10 ⁹ /L ≥ 1,000 - <2,000/mm ³	< 1.0 x 10 ⁹ /L <1,000/mm ³
Linfopenia	WNL	< LLN – 1.0 x 10 ⁹ /L	≥0.5 – <1.0 x 10 ⁹ /L ≥ 500 -	<0.5 x 10 ⁹ /L <500/mm ³	-

			< LLN – 1,000/mm ³	<1,000/mm ³		
Neutrófilos / granulocitos (ANC/AGC)	WNL	≥1.5 - < 2.0 x 10 ⁹ /L	≥1.0 - < 1.5 x 10 ⁹ /L	≥0.5 - < 1.0 x 10 ⁹ /L	< 10.0 x 10 ⁹ /L	< 500/mm ³
		≥1,500 – <2,000/mm ³	≥1,000 – <1,500/mm ³	≥ 500 – <1,000/mm ³		
Plaquetas	WNL	< LLN - < 75.0 x 10 ⁹ /L	≥50.0 - < 75.0 x 10 ⁹ /L	≥10.0 - < 50.0 x 10 ⁹ /L	< 10.0 x 10 ⁹ /L <	50,000/mm ³
		< LLN – 75,000/mm ³	≥50,000 - < 75,000/mm ³	≥10,000 - < 50,000/mm ³		

CTC Versión 2.0: Ene. 30, 1998

CRITERIOS COMUNES DE TOXICIDAD (CTC)

Grado de toxicidad	0	1	2	3	4
Transfusión: Paquetes globulares También considerar Hemoglobina.	Ninguna	-	-	Sí	-
Sangre/ Médula ósea –Otros (Especificar, _____)	Ninguno	Leve	Moderado	Severo	Que amenaza la vida o inhabilitante

CRITERIOS COMUNES DE TOXICIDAD (CTC)

Grado de toxicidad	0	1	2	3	4
Hemorragia/sangrado con trombocitopenia grado 3 o 4	Ninguna	Leve sin transfusión		Requiere transfusión	Sangrado catastrófico que requiere de intervención mayor no-electiva
<p>Considerar también Plaquetas, hemoglobina, Plaquetas de transfusión, pRBCs de transfusión.</p> <p>Nota: Esta toxicidad debe ser clasificada para cualquier sangrado con trombocitopenia grado 3 o 4. Clasificar también el sitio o el tipo de hemorragia/sangrado. Si el sitio no se encuentra listado, clasificar como Otros en la categoría HEMORRAGIA.</p>					
Hemorragia/sangrado sin trombocitopenia grado 3 o 4	Ninguna	Leve sin transfusión		Requiere transfusión	Sangrado catastrófico que requiere de intervención mayor no-electiva
<p>Considerar también Plaquetas, hemoglobina, Plaquetas de transfusión, pRBCs de transfusión.</p> <p>Nota: El Sangrado en la ausencia de trombocitopenia grado 3 o 4 se clasifica aquí sólo si el sitio o el tipo específicos de sangrado no se encuentran listados en ninguna otra parte en la categoría HEMORRAGIA. Clasificar también como Otros en la categoría HEMORRAGIA.</p>					
Hemorragia/sangrado en el CNS	Ninguna	-	-	Sangrado detectado en la CT u otro escaneo sin consecuencia aclínica	Derrame hemorrágico o evento vascular hemorrágico (CVA) con signos y síntomas neurológicos
Epistaxis	Ninguna	Leve sin transfusión	-	Que requiere transfusión	Sangrado catastrófico que requiere de intervención mayor no-electiva
Hematemesis	Ninguna	Leve sin transfusión	-	Que requiere transfusión	Sangrado catastrófico que requiere de intervención mayor no-electiva

CRITERIOS COMUNES DE TOXICIDAD (CTC)

Grado de Toxicidad	0	1	2	3	4
Hematuria (En ausencia de sangrado vaginal)	Ninguna	Sólo microscópica	Sangrado total intermitente, sin coágulos	Sangrado total persistente o coágulos; puede requerir cateterización o instrumentación o transfusión	Cirugía abierta o necrosis o ulceración profunda de la vejiga
Hemoptisis	Ninguna	Leve sin transfusión	-	Que requiere transfusión	Sangrado catastrófico que requiere de intervención mayor no-electiva
Hemorragia/sangrado asociado con cirugía	Ninguna	Leve sin transfusión	-	Que requiere transfusión	Sangrado catastrófico que requiere de intervención mayor no-electiva
Nota: La pérdida de sangre esperada al momento de la cirugía no se clasifica como toxicidad.					
Melena/sangrado GI	Ninguna	Leve sin transfusión	-	Que requiere transfusión	Sangrado catastrófico que requiere de intervención mayor no-electiva
Petequia/púrpura (hemorragia/sangrado dentro de la piel o mucosa)	Ninguna	Petequia de la piel poco común	Petequia o púrpura en áreas dependientes de la piel	Petequia o púrpura generalizada de la piel o petequia en cualquier mucosa	-
Sangrado rectal/ hematoquecia	Ninguno	Leve sin transfusión ni medicación	Persistente, que requiere medicación (v.g. esteroides en supositorios) y/o	Que requiere transfusión	Sangrado catastrófico que requiere de intervención mayor no-electiva

CRITERIOS COMUNES DE TOXICIDAD (CTC)

Grado de toxicidad	0	1	2	3	4
Sangrado rectal/ hematoquecia (cont.)				interrupción del tratamiento de radioterapia	
Sangrado vaginal	Ninguno	Manchado, requiriendo <2 toallas sanitarias por día	Que requiere ≥ 2 toallas sanitarias por día, pero no requiere transfusión	Que requiere transfusión	Sangrado catastrófico que requiere de intervención mayor no-electiva
Hemorragia- Otros (Especificar, _____)	Ninguna	Leve sin transfusión	-	Que requiere transfusión	Sangrado catastrófico que requiere de intervención mayor no-electiva
HEPATICOS					
Fosfatasa alcalina	WNL	>ULN-2.5 x ULN	>2.5 – 5.0 x ULN	>5.0 –20.0 x ULN	>20.0 x ULN
GGT (Glutamyl transpeptidasa)	WNL	>ULN-2.5 x ULN	>2.5 – 5.0 x ULN	>5.0 –20.0 x ULN	>20.0 x ULN
Aumento del volumen hepático	Ausente	-	-	Presente	-
Nota: Clasificar el aumento del volumen hepático sólo para cambios relativos a la VOD u otra toxicidad relacionada con el tratamiento					
Hipoalbuminemia	WNL	<LLN – 3g/dl	≥ 2 - <3g/dl	<2 g/dl	-
Disfunción/ insuficiencia hepática (clínica)	Normal	-	-	Asterixis	Encefalopatía o coma
Nota: La hepatitis viral documentada se clasifica dentro de la categoría INFECCION					
Flujo en la vena portal	Normal	-	Flujo disminuido de la vena portal	Flujo reverso /retrógrado de la vena portal	-
SGOT (AST) (Transaminasa sérica glutámico oxalacética)	WNL	>ULN – 2.5 x ULN	>2.5 – 5.0 x ULN	>5.0 –20.0 x ULN	>20.0 x ULN

CRITERIOS COMUNES DE TOXICIDAD (CTC)

Grado de toxicidad	0	1	2	3	4
SGPT (ALT) (Transaminasa sérica glutámico pirúvica)	WNL	>ULN – 2.5 x ULN	>2.5 – 5.0 x ULN	>5.0 –20.0 x ULN	>20.0 x ULN
Hepáticos – Otros (Especificar, _____ _____)	Ninguno	Leve	Moderado	Severo	Que amenaza la vida o inhabilitante
INFECCION/NEUTROPENIA FEBRIL					
Infección relacionada con el catéter	Ninguna	Leve, sin tratamiento activo	Infección moderada, localizada, que requiere tratamiento oral o local	Infección severa, sistémica que requiere antibióticos i.v. o tratamiento fungicida u hospitaliza- ción	Sepsis que pone la vida en peligro (v.g. shock séptico)
Neutropenia febril (fiebre de origen desconocido sin infección clínica o microbiológicamente documentada) (ANC < 1.0 x 10 ⁹ /L, fiebre ≥38.5°C) Nota: La hipotermia en lugar de fiebre puede estar asociada con neutropenia y se clasifica aquí.	Ninguna	-	-	Presente	Sepsis que pone la vida en peligro (v.g. shock séptico)
Infección (clínica o microbiológicamente documentada) con neutropenia grado 3 o 4 (ANC < 1.0 x 10 ⁹ /L) Nota: La hipotermia en lugar de la fiebre puede estar asociada con neutropenia y no se clasifica aquí. En la ausencia de infección documentada con neutropenia grado 3 o 4, clasificar como Neutropenia febril.	Ninguna	-	-	Presente	Sepsis que pone la vida en peligro (v.g. shock séptico)
Infección con ANC desconocido Nota: Este criterio de toxicidad se usa en los raros casos en los que el ANC es desconocido.	Ninguna	-	-	Presente	Sepsis que pone la vida en peligro (v.g. shock séptico)

CRITERIOS COMUNES DE TOXICIDAD (CTC)

Grado de toxicidad	0	1	2	3	4
Infección sin neutropenia	Ninguna	Leve, sin tratamiento activo	Infección moderada, localizada, que requiere tratamiento oral o local	Infección severa, sistémica que requiere antibióticos i.v. o tratamiento fungicida u hospitalización	Sepsis que pone la vida en peligro (v.g. shock séptico)
Infección/Neutropenia Febril - Otros (Especificar, _____)	Ninguno	Leve	Moderado	Severo	Que amenaza la vida o inhabilitante
Herida - infecciosa se clasifica dentro de la categoría DERMATOLOGIA/PIEL					
LINFATICO					
Linfático	Normal	Linfedema leve	Linfedema moderado que requiere compresión; linfoquiste	Linfedema severo que limita la función; linfoquiste que requiere cirugía	Linfedema severo que limita la función y con ulceración
Linfático - Otros (Especificar, _____)	Ninguno	Leve	Moderado	Severo	Que amenaza la vida o inhabilitante

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

- **TITULO DEL ESTUDIO**

Evaluación de SNPs en los genes involucrados en el transporte y metabolismo de folatos y la expresión del transportador y activador de citosin-arabinósido, como factor pronóstico de respuesta y supervivencia en pacientes con leucemia linfoblástica.

- **I. LA JUSTIFICACION Y EL OBJETIVO DEL ESTUDIO.**

Lo/la invitamos a que participe en un estudio de investigación. Los médicos del Instituto Nacional de Cancerología están interesados en estudiar la influencia de algunos genes en la respuesta y posibilidad de toxicidad secundaria a un grupo de medicamentos (quimioterapia: metotrexate, citarabina), que son requeridos para el tratamiento de pacientes con diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica. El objetivo de este estudio es determinar la frecuencia de estas alteraciones genéticas (polimorfismos) que pudieran influir en la respuesta a su tratamiento.

En este estudio no se administrarán medicamentos en experimentación. Usted recibirá el tratamiento indicado por su médico. Usted y su familia deben hacer todas las preguntas que deseen antes de que usted decida participar en este estudio. Asegúrese de obtener toda la información que necesita antes de tomar la decisión.

- **II. LOS PROCEDIMIENTOS MÉDICOS QUE SE REALIZARÁN AL SUJETO DURANTE EL ESTUDIO, ESPECIALMENTE LOS INVASORES.**

En este estudio se le realizará una punción venosa, para obtener una muestra de aproximadamente 15 ml (3 cucharaditas), a partir de la cual se obtendrá DNA (material genético) para evaluar las posibles variaciones que pudieran influir en la respuesta a la quimioterapia que su médico le indique. Posteriormente, el grupo de investigadores tendremos acceso a su expediente clínico, para registrar la respuesta al tratamiento y los efectos secundarios y grado de los mismos que presente.

El material genético será utilizado exclusivamente para fines de esta investigación. En caso de que futuras investigaciones requieran del uso de esta muestra, se le informará y solamente podrá utilizarse si usted acepta participar y firmar un nuevo consentimiento informado.

¿POR QUÉ SE ME SELECCIONÓ?

Se le invita a participar porque usted recibirá un tratamiento que incluye dos medicamentos que se llaman metotrexate y citarabina, ambos necesarios para el tratamiento de su enfermedad.

¿EN QUÉ CONSISTIRÁ MI PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO?

Si usted acepta participar se le realizará una punción venosa para obtener una muestra de 15 ml a partir de la cual se obtendrá DNA (material genético) para evaluar las posibles variaciones que influyen en la respuesta y desarrollo de toxicidad por tiopurinas.

- **LAS RESPONSABILIDADES DEL SUJETO.**

Al aceptar participar en este estudio, se le solicita atentamente asistir a sus consultas en las fechas que le indique su médico, para poder evaluar la respuesta al tratamiento. También le pedimos informar a su hematólogo tratante de cualquier malestar que presente durante su tratamiento. Si usted se muda o no regresa a la clínica, podrán tratar de llamarlo(la) para dar con usted y averiguar cómo se encuentra.

- **III. LOS BENEFICIOS ESPERABLES, Y UNA MENCIÓN CATEGÓRICA DE QUE NO SE ESPERAN BENEFICIOS CLÍNICOS PARA EL SUJETO, CUANDO SEA EL CASO.**

Este estudio pretende evaluar variaciones (polimorfismos) en su material genético, que permitirán en un futuro probablemente seleccionar a los pacientes con mayor respuesta al tratamiento que va a recibir.

- **IV. GASTOS ADICIONALES, COMPENSACIONES Y PAGO POR LESIONES RELACIONADAS CON EL ESTUDIO.**

A usted no se le cobrará ningún costo por la toma de muestra y procesamiento de la misma. No recibirá ninguna remuneración por su participación, ni pago por indemnizaciones.

El tratamiento que el médico indique para su enfermedad, estará a su cargo. Esta investigación no pagará por su tratamiento o otros estudios de laboratorio que requiera para su atención.

- **V. QUE EL CONSENTIMIENTO IMPLICA PERMITIR EL ACCESO A SU EXPEDIENTE MÉDICO A TERCEROS, CON UNA INDICACIÓN DE LOS MISMOS (QUE DEBERÁ INCLUIR AL COMITÉ). QUE TAL ACCESO SE REALIZARÁ CON RESPETO A SU PRIVACIDAD, Y QUE NO SE PUBLICARÁ SU IDENTIDAD, EN TANTO EN CUANTO LO PERMITA LA LEY.**

La información reunida para el estudio será confidencial. El grupo de investigadores tendrá acceso a su expediente clínico y los resultados serán capturados en una base de datos, donde usted no podrá ser identificado.

Podremos publicar los resultados del estudio o presentarlos en reuniones profesionales, pero su nombre no se divulgará, ni se mencionará en ningún informe o publicación. No es posible que terceras personas, amigos, o allegados suyos sepan de su enfermedad y conozcan otras cosas únicas acerca de su edad, sexo o enfermedad que pudieran identificarlo a usted en una publicación.

- **VI. QUE RECIBIRÁ OPORTUNAMENTE CUALQUIER INFORMACIÓN NUEVA QUE PUDIERA AFECTAR A SU DESEO DE PERMANECER EN EL ESTUDIO.**

Una vez obtenido el resultado de esta prueba en sangre, tanto usted, como su médico tratante serán informados del resultado.

- **VII. LAS PERSONAS A CONTACTAR EN CASO DE TENER PREGUNTAS SOBRE EL ESTUDIO, CON SU NOMBRE COMPLETO Y TELÉFONO DE CONTACTO.**

Cualquier pregunta que usted pueda tener acerca de cualquier aspecto del estudio, ahora o en cualquier momento en el futuro. Le alentamos a que obtenga respuestas a todas sus preguntas comunicándose con la Dra. Myrna Gloria Candelaria Hernandez, al 56-28-04-79, investigadora principal.

Es posible que quiera que un amigo o familiar lea el formulario y hable con el médico del estudio junto con usted. Usted puede también hablar con su médico personal acerca de lo que debe hacer. Hablar de las cosas puede ayudarle a tomar la decisión correcta.

- **VIII. LAS PERSONAS (Y SUS TELÉFONOS) A CONTACTAR EN CASO DE TENER PREGUNTAS ACERCA DE SUS DERECHOS COMO PARTICIPANTE EN EL ESTUDIO, O EN CASO DE CREER QUE HA SUFRIDO UNA LESIÓN COMO RESULTADO DE SU PARTICIPACIÓN. ESTAS PERSONAS SERÁN MIEMBROS DEL COMITÉ Y SU IDENTIDAD SE COMUNICARÁ A LA COMUNIDAD DE INVESTIGADORES PARA QUE PUEDAN TENERLO EN CUENTA A LA HORA DE REDACTAR LOS CONSENTIMIENTOS.**

Para información acerca de los derechos de los sujetos de investigación, usted puede comunicarse con el Secretario Técnico del Comité de Etica, Dra. Mary Cruz Pérez Amador, al teléfono 56.28-04-00, extensión 338.

- **IX. LA DURACIÓN ESPERADA DE LA PARTICIPACIÓN DE CADA SUJETO.**

Si usted decide participar, se revisará su expediente durante 12 meses para conocer el estado de su enfermedad.

- **X. EL NÚMERO DE SUJETOS A INCLUIR EN TODO EL ESTUDIO Y EN EL CENTRO DEL INVESTIGADOR.**

Se incluirán aproximadamente 30-35 pacientes en esta Institución.

- **XI. UNA MENCIÓN EXPLÍCITA Y BIEN DIFERENCIADA QUE INDIQUE QUE LA PARTICIPACIÓN ES TOTALMENTE VOLUNTARIA Y QUE EL SUJETO PUEDE:**

Su participación es completamente voluntaria. Usted puede optar por no participar, y puede retirar su consentimiento en cualquier momento. Es decir, si una vez tomada la muestra de sangre usted decide que no se analice, ésta no se procesará. Su decisión acerca de la participación no afectará a la atención que recibe en el hospital, ahora o en el futuro. Sin embargo, aún si usted se retira del estudio, los médicos del estudio agradecerían poder examinar sus registros médicos en el futuro para ver cómo le ha ido a usted, pero usted puede también negarse a que se haga esto. Si usted cambia de parecer, se le atenderá igual que a cualquier paciente.

Le agradecemos su consideración. Si está dispuesto(a) a participar en esta investigación, por favor, firme a continuación.

Autorización:

Yo, _____, he leído todo lo antes mencionado, se me han contestado mis preguntas y, por voluntad propia, doy mi consentimiento a participar en este estudio de investigación, en el entendido de que el mismo incluye un examen por el personal de investigación de mis registros médicos para anotar mi diagnóstico definitivo y resultado del tratamiento. Este consentimiento seguirá en vigor hasta la recopilación completa de los datos del estudio, a menos que yo retire mi consentimiento. Mi firma a continuación indica que he recibido una copia de este formulario de consentimiento.

Nombre y (Firma del Participante)

(Fecha)

Dirección

Teléfono

INVESTIGADOR:

Nombre y firma de la persona que obtiene el consentimiento (Fecha)

TESTIGOS

Nombre y (Firma del testigo 1)

(Fecha)

Dirección

Teléfono

Nombre y (Firma del testigo 2)

(Fecha)

Dirección

Teléfono

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/aly1.html>.
2. Farber S, Diamond LK, Mercer RD. Temporary remission in acute leukemia in children produced by the folic acid antagonist, 4-aminopteroyl glutamic acid. *N Eng J Med* 1948;238:187-193.
3. Gokbuget N et. al; Educational. Program. *ASH*. 2006: 133-141.
4. Kantarjian HM, O'Brien S, Smith TL, Cortés J, Giles FJ, Beran M, Pierce S. Results of treatment with Hyper-CVAD, a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2000;18:547-561.
5. Hoelzer D, Thiel E, Loffler H. Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood*. 1988;71: 123-31.
6. Radford JE, Burns CP, Jones MP. Adult acute lymphoblastic leukemia. Results of the Iowa HOP-L protocol. *J Clin Oncol*. 1989; 7: 58-66.
7. Candelaria M, Taja-Chayeb L, Arce-Salinas C, Vidal-Millan S, Serrano-Olvera A, Dueñas-González A. Genetic determinants of Cancer Drug efficacy and toxicity. Practical considerations and perspectives. *Anticancer Drugs*. 2005; 16: 923-33.
8. Taja-Chayeb L, Vidal-Millán S, Gutiérrez O, Ostrosky-Wegman P, Dueñas-González A, Candelaria M. Importance of the polymorphisms of the Thiopurine S-methyltransferase Gene (TMPT) determination in Mexican Mestizo Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Medical Oncology*. 2008; 25 (1):56-62
9. Bertino JR. Cancer research: from folate antagonism to molecular targets. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009 Dec;22(4):577-82.
10. Genestier L, Paillet R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP. Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology*. 2000;47: 247-257.
11. Wiemels JL, Smith RN. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:4004
12. Hider SL, Bruce IN, Thomson W. The pharmacogenetics of methotrexate. *Rheumatology*. 2007;46:1520-1524.
13. Laverdiere C, Hiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajcinovic M. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate

plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002; 100: 3832-4.

14. Dervieux T, Kremer J, Lein DO. Contribution of common polymorphisms in reduced folate carrier and gamma-glutamylhydrolase to methotrexate polyglutamate levels in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics*. 2004; 14: 733-9.

15. Dervieux T, Kremer J, Lein DO. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidilate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthrit Rheum*. 2004; 50: 2766-74.

16. Rozen R. Molecular genetics of methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *J. Inherit Metab Dis*. 1996; 19: 589-94.

17. Ranganathan P, McLeod HL. Methotrexate pharmacogenetics: the first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthrit Rheum*. 2006; 54: 1366-77.

18. Van Ede AE; Laan RF, Rood MJ. Effect of folic or folinic acid supplementation on the toxicity and efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis: a forty –eight week, multicenter, randomized, double-blinded, placebo controlled study. *Arthritis Rheum*. 2001; 44: 1515-24.

19. Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics*. 2002; 12:183-90.

20. Berkun Y, Levartovsky D, Rubinow A. Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene. *Ann Reum Dis*. 2004; 63: 1227-31.

21. Hughes LB, Beasley TM, Patel H. Racial or ethnic differences in allele frequencies of single-nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and their influence on response to methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2006; 65: 1213-8.

22. Fisher MC, Cronstein BN. Meta-analysis of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms affecting methotrexate toxicity. *J Rheumatol*. 2009; 36: 539-545.

23. Fang N, Lin L, Ren J, Wu D. Detection of C677T mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene by denaturing high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*. 2004; 18: 625-9.

24. Stanislawska-Sachadyn A, Mitchell Le, Woodside JV, et. al. The reduced folate carrier (SLC19A1) c.80G>A polymorphism is associated with red cell folate concentrations among women. *Ann Hum Genet.* 2009; 73: 484-91.

25. Li CM, Zhang C, Lu XL, Feng HY, Su QX, Zhang HL, Qiu SL. Detecting the polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene by denaturing high performance liquid chromatography. *Zonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2006; 23: 184-5.

26. Thomas D, O'Brien Susan, Jorgensen J, Cortes J, Faderl Stefan, García Manero G, Kantarjian H. Prognostic significance of CD20 expression in adults with de novo precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009; 113: 6330-6337