



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**FARMACOGENÉTICA DEL TRANSPORTE DE METOTREXATO Y
SU RELACIÓN CON LAS CONCENTRACIONES DEL FÁRMACO EN
PACIENTES PEDIÁTRICOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE
PEDIATRÍA CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
AGUDA**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ESPECIALISTA EN ONOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA:

DRA. HAYDEÉ DEL PILAR SALAZAR ROSALES

TUTOR:

DR. MARTÍN PÉREZ GARCÍA

CO-TUTOR:

DR. JUAN LUIS CHÁVEZ PACHECO



CIUDAD DE MEXICO.

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

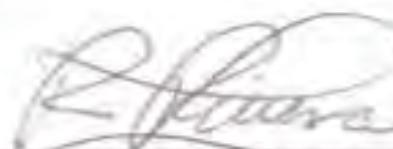
Farmacogenética del transporte de metotrexato y su relación con las concentraciones del fármaco en pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda.



DRA ROSAURA ROSAS VARGAS
DIRECTORA DE ENSEÑANZA



DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



DR. ROBERTO RIVERA LUNA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA



DR. MARTÍN PÉREZ GARCÍA
TUTOR DE TESIS



DR. JUAN LUIS CHÁVEZ PACHECO
CO-TUTOR DE TESIS

AGRADECIMIENTO

Doy gracias a Dios, que fue mi refugio y me permitió renovar mi fe y energías para superar día a día los momentos más difíciles; por las bendiciones e iluminar la mente para lograr alcanzar esta meta tan ansiada y haberme dado a mis padres, que sin su apoyo no hubiera logrado culminar con esta meta.

A CONACYT por el apoyo brindado para que este proyecto se llevara a cabo y permitirme ser parte de él y mis tutores por el tiempo dedicado en guiarme y transmitirme sus conocimientos, forjando mis capacidades.

También agradezco a todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido a que este trabajo llegue a su culminación.

Dra. Haydeé Salazar Rosales

DEDICATORIA

Agradezco a Dios por la vida, haber guiado mi camino y permitirme llegar a esta institución, así como culminar una nueva etapa de mi carrera.

En segundo lugar se lo dedico a Perla Rosales Rodríguez, mi madre, quien con dedicación y amor ha sido un pilar importante en mi vida con su apoyo incondicional, frases alentadoras, cariño infinito y cálido aun en la distancia, por mostrarme que la vida es una lucha continua en la cual la principal carrera es contra uno mismo y por dejarme pensar en un mañana grande. A mi padre por enseñarme a seguir adelante sin importar las adversidades y por mostrarme que uno puede levantarse con más fortaleza si analiza la caída. Gracias por ser los mejores padres que Dios me pudo haber dado, por creer en mí y darme la oportunidad de hacer lo que me apasiona. Hoy comparto y celebro con ellos esta meta alcanzada.

A Carmen Salazar, mi tía, por el apoyo incondicional y contribuir con este logro tan hermoso que sin usted tampoco hubiese sido posible.

A mis herman@s (Ninoska, Humberto, Perla, Ricardo, Alexandra, Gabriela) y Humbertito - mi hijo, por esas llamadas aunque esporádicas de calidad para cargar energía y compartir tanto los triunfos como levantar el ánimo para seguir adelante.

A mis amigas de toda la vida (Neysi, Olivia, Adriana, Gioconda y Auxiliadora) por esos lazos que se mantienen cual primer día aun en la distancia; a los nuevos lazos de amistad creados en esta institución que a pesar de tener culturas distintas compartíamos los mismos sentimientos, en ocasiones dificultades pero sobre todo la misma meta ser sub especialistas en lo que más quisiéramos (Pilar,

Rossela, Andrea, Aidy, Monserrat y Leslie); gracias por el cariño, regaños, palabras de aliento y ser ángeles de mi vida.

Al Dr. Juan Luis Chávez Pacheco y Dr Martín Pérez Garcia, por permitirme formar parte de este proyecto.

A todas las personas que me apoyaron en los momentos más difíciles.

Dra. Haydeé Salazar Rosales

RESUMEN

Antecedentes.

En México, la leucemia es una de las causas principales de morbilidad y mortalidad en población infantil, la de mayor frecuencia es la leucemia linfoblástica aguda (LLA) con el 75-80% de los casos; a nivel nacional esta neoplasia causó casi 800 decesos en el 2007 y más de 10,000 egresos hospitalarios en el 2008.

El tratamiento de esta enfermedad implica quimioterapia con fármacos citotóxicos como vincristina, daunorrubicina, 6-mercaptopurina, citarabina y metotrexato. Este último antineoplásico es el de mayor empleo en las fases de consolidación y mantenimiento durante el tratamiento de la LLA. La eficacia terapéutica del metotrexato radica en el ingreso y su permanencia en las células. Estos mecanismos están controlados por proteínas de transporte (ingreso-excreción) y enzimas (metabolismo intracelular). Se conoce que la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en los genes que codifican para estas proteínas puede afectar su actividad y en consecuencia modificar la respuesta citotóxica del antineoplásico (eficacia/resistencia).

Este estudio busca identificar SNPs asociados a bajos niveles intracelulares de MTX y Pg-MTX lo que podría estar relacionado con menor efectividad de la quimioterapia y mayor riesgo de eventos adversos, esto debido a que mayor cantidad de MTX se encuentra en circulación y puede afectar la viabilidad de células no blanco. También se pretende identificar SNPs relacionados a altos niveles intracelulares del fármaco y sus conjugados podrían pronosticar mayor

eficacia del tratamiento debido a que a mayor tiempo de residencia intraleucocitaria causa mayor citotoxicidad.

Esta investigación busca un impacto directo sobre un esquema de quimioterapia individualizada, la cual permita mejorar la eficacia terapéutica, la calidad de vida y disminuir la presencia de reacciones adversas.

El Objetivo de este estudio es determinar la frecuencia génica de algunos polimorfismos de los genes *RFC* (ID 6573), *FPGS* (Gene ID 2356), *GGH* (Gene ID 8836), *ABCG2* (Gene ID 9429) y *ABCB1* (Gene 2 ID 5243) en población pediátrica mexicana con diagnóstico de LLA y bajo tratamiento en el Instituto Nacional de Pediatría.

El tipo de estudio utilizado fue Prospectivo, Observacional, Analítico y Longitudinal

Población elegible. Pacientes del INP con diagnóstico de LLA de 1 a 17 años que no hayan recibido transfusión de sangre en los últimos 6 meses y sin falla renal o hepática. La muestra obtenida mediante el software G power con base en criterios de poder y significancia estadística es de 110 pacientes. Sin embargo en este trabajo con fines de tesis se realizará el primer corte de la población con 27 pacientes.

Materiales y Métodos. Se tomaron muestras de sangre de pacientes con diagnóstico confirmado de LLA que se encontraban recibiendo quimioterapia con metotrexato en la fase de consolidación y mantenimiento; de las cuales se

realizó la extracción del DNA empleando un kit de Qiagen y se cuantificaron los niveles de metotrexato y sus conjugados mediante UPLC y detección con UV a 313 nm. La determinación de SNPs de los genes en estudio se realizó mediante técnicas de PCR con sondas Taqman. Las sondas (primers) prediseñados se obtuvieron de Applied Biosystems o se diseñaron mediante software (AmplifiX y DnaMan). Para la determinación de correlación entre la concentración de fármaco intracelular y los SNPs de cada gen se realizó análisis estadístico ANOVA de mediciones repetidas.

Tabla de contenido	Pág.
AGRADECIMIENTO	i
DEDICATORIA	ii
RESUMEN	iii
I. INTRODUCCIÓN	7
II. ANTECEDENTES	8
III. JUSTIFICACIÓN	10
IV. PROBLEMA	11
V. HIPÓTESIS	12
VI. OBJETIVOS	13
VII. MARCO TEÓRICO	14
VIII. MATERIAL Y MÉTODO	32
IX. RESULTADOS	43
X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
XI. CONCLUSIONES	47
XII. RECOMENDACIONES	48
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	56
Tablas	61
Gráficos	65

I. INTRODUCCIÓN

Las leucemias son un grupo de enfermedades malignas que afectan la sangre y los tejidos hematopoyéticos de la médula ósea, del sistema linfático y del bazo; es una acumulación de células disfuncionales secundaria a una pérdida de la regulación de la proliferación celular.¹

El cáncer es la segunda causa de muerte en menores de 15 años, siendo la leucemia el más común en niños.

La leucemia linfoblástica aguda representa el 75% de todas las leucemias y constituye el 25% de todos los cánceres en la edad pediátrica.²

Diversos estudios refieren que los resultados del tratamiento de cada individuo con leucemia linfoblástica aguda puede verse afectada por la forma en que cada uno metabolice los agentes quimioterapéuticos según polimorfismos de la línea germinal.

El metotrexato es parte de la piedra angular en el tratamiento de las leucemias por lo cual es primordial estudiar los polimorfismos en FPGS y GGH descritos como agentes causales de resistencia en el tratamiento o incremento de reacciones adversas incluso con dosis bajas de forma respectiva.

El fin de este estudio es identificar si estos polimorfismos se encuentran en la población pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría y correlacionar con dosis alcanzadas posterior a la infusión de altas dosis de metotrexato. El poder identificar este tipo de polimorfismos, nos permitiría dar un tratamiento de forma más personalizada con el fin de disminuir eventos adversos, así como intensificar la dosis en los casos que presenten resistencia con el fin de optimizar nuestro tratamiento y disminuir el riesgo de fallas a la terapéutica.

II. ANTECEDENTES

Múltiples estudios han reportado que simples polimorfismos en los nucleótidos juegan un rol importante en la respuesta al tratamiento con metotrexato en pacientes con leucemia aguda linfoblástica aguda (LLA).

México

En el 2010, Organista en el estado de Guerrero, México en un período de 3 años (2005-2008) incluyó 70 niños con diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica. Este estudio muestra que GGH -variante alélica 401 C/T es asociada con un incremento de recaídas en pacientes que reciben metotrexato, en aquellos heterocigotos el riesgo fue 9.17 veces más recaídas durante el tratamiento y para aquellos con genotipo T/T el riesgo fue 10.83 veces más comparado con el genotipo C/C. Polimorfismo +452 no tiene asociación con recaídas.

Internacional

Hayashi y cols. en el 2007 estudiaron los polimorfismo genéticos de C452T (T127I) en GGH en población japonesa. La distribución del genotipo fue C/C 89.2% (n=240), C/T 10.4% (n=28), T/% 0.4% (n=1). La frecuencia de C fue 0.944 y T 0.56. La frecuencia alélica fue similar a africanos y americanos pero estadísticamente diferente a la caucásica.

Liu y cols. en el 2013 realizaron un estudio sobre el polimorfismo de FPGS rs1544105 en 164 niños con leucemia aguda linfoblástica aguda precursores de células B, asociando este genotipo con pobres resultados en supervivencia libre de eventos y recaídas durante el tratamiento en los de genotipo CC. No se encontró asociación con toxicidades.

En el 2014, se realizó un estudio sobre la influencia de los polimorfismos de FPGS, GGH y MTHFR sobre los niveles séricos de metotrexato en niños de la China con leucemia aguda linfoblástica, incluyeron 91 niños que se encontraban recibiendo altas dosis de metotrexato, mediante PCR determinaron el genotipo para FPGS (rs1544105 G>A), GGH (rs3758149 C>T) y MTHFR (rs1801133 C>T). La frecuencia de alelos que obtuvieron fue rs1544105 G (34.1%), rs3758149 T (19.2%), and rs1801133 C (48.4%), menor a la población europea. Encontraron niveles de metotrexato superiores al terapéutico en los que presentaban el polimorfismo rs3758149 pero significativamente más bajos en CC en comparación con principalmente los CT y TT.

III. JUSTIFICACIÓN

La relevancia del presente estudio radica en evaluar la correlación entre los genotipos (SNPs) de las proteínas involucradas en el transporte y metabolismo intracelular del metotrexato con las concentraciones de este fármaco y de sus glutamil-conjugados en plasma (libre) y en células de sangre periférica (intracelular). Este estudio se plantea la identificación de polimorfismos asociados a bajos niveles intracelulares de metotrexato y de Pg-metotrexato lo que podría estar asociado a baja efectividad de la quimioterapia y elevado riesgo de eventos adversos debido a que mayor fármaco se encuentra en circulación y puede afectar la viabilidad de células no blanco.

Es necesario impactar sobre los protocolos de quimioterapia contra la LLA en pacientes pediátricos, mediante el desarrollo de una línea de investigación que coadyuve en el pronóstico de la efectividad del tratamiento con antineoplásicos como el metotrexato.

IV. PROBLEMA

En nuestro Instituto, las neoplasias ocupan el 1er lugar de egresos hospitalarios en 2008 y 2009 (2,995 egresos totales) y el 2º lugar de mortalidad con 108 defunciones en el mismo periodo (Agenda Estadística INP).

En el Programa de Trabajo para la Dirección 2010-15, esta institución tiene como principal problema de atención el cáncer, principalmente por leucemias y linfomas. El costo del tratamiento representa el 27% del presupuesto total asignado al área asistencial y el 33% de toda la atención a la salud, con un costo mensual aproximado a \$9,000 pesos por paciente

La eficacia de la quimioterapia para el tratamiento de las neoplasias reside en diferentes factores, uno de estos es la constitución génica de cada individuo. Los niveles de expresión de algunos genes se han asociado con un mejor o peor pronóstico para la remisión de esta enfermedad. También se conoce que variantes alélicas (polimorfismos) en los genes que codifican para transportadores, enzimas y proteínas que participan en la distribución y metabolismo de fármacos antineoplásicos pueden modificar la expresión de estas proteínas o su actividad biológica, por lo tanto estos SNPs afectan las concentraciones plasmáticas del fármaco y en consecuencia afectan la citotoxicidad del compuesto.

En nuestro estudio planteamos la necesidad de implementar una línea de investigación en farmacogenética de antineoplásicos. Esta investigación debe buscar un impacto directo en el esquema de quimioterapia individualizada, la cual permita mejorar la eficacia terapéutica, la calidad de vida, disminuir la presencia de efectos adversos y finalmente, disminuir los costos de atención al generar nuevos protocolos de atención con mejores resultados.

V. HIPÓTESIS

Los polimorfismos de los genes involucrados en el transporte, metabolismo así como los que participan en el bombeo del metotrexato al exterior celular modifican la concentración total (sangre), sistémica (plasma) e intracelular del fármaco.

Las diferencias de niveles en plasma e intracelulares influirán en la eficacia, resistencia y presencia de eventos adversos de la quimioterapia con metotrexato.

VI. OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar la frecuencia génica de SNPs de los genes FPGS (Gene ID2356) y GGH (Gene ID8836) en población pediátrica con LLA.

Objetivos específicos.

Cuantificar la concentración de metotrexato y sus conjugados (Pg-MTX) en sangre, en plasma y en células obtenidas de sangre periférica de pacientes con LLA en fase de consolidación

Correlacionar los niveles de metotrexato total (en sangre), libre (en plasma) e intracelular con los SNPs de los genes analizados y con los eventos adversos inducidos por el fármaco.

VII. MARCO TEÓRICO

La leucemia puede definirse como “un grupo de enfermedades malignas que afectan la sangre y los tejidos hematopoyéticos de la médula ósea, del sistema linfático y del bazo; es una acumulación de células disfuncionales secundaria a una pérdida de la regulación de la proliferación celular”¹. Es una enfermedad multifactorial con componentes genéticos y ambientales; algunas anomalías cromosómicas, alteraciones genéticas; así mismo, se conoce que la exposición a diferentes sustancias químicas, fármacos, virus y a la radiación puede desencadenar los mecanismos para el desarrollo de leucemia en algunos individuos.

Esta patología se puede clasificar con base en a) desarrollo de la enfermedad: Agudas ó Crónicas; b) criterios morfológicos como el propuesto por el grupo de cooperación Franco-Americano-Británico (FAB): tipo L1, linfoblastos pequeños, cromatina homogénea, nucléolos no visibles o pequeños; L2, blastos grandes, cromatina heterogénea, nucléolos prominentes, basofilia y vacuolización del citoplasma variables y L3, blastos grandes y homogéneos en tamaño, cromatina homogénea, núcleo redondo a oval, nucléolos por lo general prominentes, citoplasma moderadamente abundante y muy basofilo¹. Recientemente la OMS propuso otra forma de catalogar los tipos de leucemia de acuerdo a características morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas y clínicas³.

7.1. Epidemiología de las leucemias en México. La base de datos del Sistema Nacional de Información en Salud reporta a los tumores malignos como una de las causas principales de morbilidad y mortalidad en el país con un total de 724,463 egresos hospitalarios en el periodo de 2004-20084. Las tres principales neoplasias fueron: tumores en el cuello del útero: 52,140 egresos, tumores malignos de la mama: 79,910 egresos y leucemias: 108,002 egresos, respectivamente. Durante este periodo los tumores del cuello del útero y de la

mama causaron el deceso de 2,165 y 2,778 mujeres, respectivamente, mientras que las leucemias provocaron 6,024 defunciones.

Esta neoplasia afecta a hombres y mujeres de cualquier edad. Rivera, et al. describió la epidemiología en México en niños con cáncer en el programa de seguro popular nacional del 2007 al 2012, encontrando un incrementado en el número de casos de forma anual con 2671 nuevos casos al año para el 2012, alcanzando un total de 7066 casos y una prevalencia de 49.8% en los 5 años reportados. La morbi-mortalidad infantil por leucemia se ha incrementado en los últimos años.

En el 2013, según el Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía en los menores de 20 años los tumores malignos representan la morbilidad hospitalaria más elevadas. El cáncer hematopoyético es la principal causa de morbilidad y mortalidad en esta población con una tasa de mortalidad de 2.57 por cada 100mil habitantes.

La Organización Mundial de la Salud en el 2014, menciona que en México el cáncer ocupa el 12% de las causas de mortalidad siendo la cuarta causa después de los accidentes cardiovasculares, diabetes y otras

En nuestro país, los gastos del tratamiento para cáncer infantil como la leucemia linfoblástica y mieloblástica aguda en pacientes que no son derechohabientes del IMSS o ISSSTE son absorbidos por el Seguro Popular mediante el Fondo de Protección para Gastos Catastróficos⁶, el cual incluye la adquisición de medicamentos como predisona, ácido fólico, hidrocortisona, ciclofosfamida, L-asparaginasa y antineoplásicos como citarabina, vincristina, 6-mercaptopurina y metotrexato; este último es el fármaco de mayor uso en la fase de consolidación para el tratamiento de la LLA (Protocolo de la Atención para Leucemia Linfoblástica⁷).

El Instituto Nacional de Pediatría está inmerso en la problemática de esta neoplasia, datos publicados en las Agendas Estadísticas muestran que las neoplasias tuvieron el 1er lugar en egresos hospitalarios con 1,409 eventos en 2008 y 1486 egresos en 2009; además obtuvo el 2º lugar en mortalidad 2008 y 2009 con 56 y 52 defunciones, respectivamente.

En el INP, datos del 2008 muestran que esta patología se ubicó en el 6º lugar en demanda de atención en Urgencias calificadas y 91 de los 251 casos nuevos de cáncer detectados fueron diagnosticados como leucemias (36%). Para el 2009 hubo 1,003 consultas de 1ª vez, 1,486 egresos hospitalarios y 52 defunciones por neoplasias, para la LLA se reportan 317 urgencias hospitalarias durante ese año.

7.2. Factores de riesgo

Se desconocen las causas de la leucemia linfoblástica aguda. Sin embargo, existen ciertos factores de riesgo que pueden aumentar las posibilidades de padecer esta enfermedad como son.³

➤ Ambientales:

1. Radiación ionizante: la relación dosis-respuesta para la producción de leucemia es lineal. El tipo de leucemia depende de la edad de exposición (en adultos es más frecuente la mielóide). El riesgo en niños se incrementa 5 veces si se expone en el primer trimestre y 1.5 veces más en el segundo y tercer trimestre. El efecto leucomogénico se ha reportado con dosis expuestas de 0.3 a 0.8Gy. Se estima que 8-30% de las LLA están relacionadas con radiación ionizante.
2. Exposición de pinturas para el hogar y solventes de pinturas
3. Tratamientos previos con alquilantes.
4. Exposición a herbicidas y pesticidas
5. Ingesta materno de alcohol, anticonceptivos y dietilestilbestrol

6. Exposición doméstica al radón
7. Contaminación química de las aguas subterráneas.

- Infecciones virales: como virus del Epstein Barr (VEB), virus linfotrópico humano I y II (HTLV I y II)
- Inmunodeficiencias: síndrome de Wiskott Aldrich, hipogammaglobulinemia congénita y Ataxia telangiectasia; tiene mayor riesgo de neoplasias linfoides.
- Mutaciones.
- Afecciones genéticas como:
 1. Síndrome de Down: 10 a 20 veces más riesgo de leucemia.
 2. Neurofibromatosis tipo 1 (NF1).
 3. Síndrome de Shwachman.
 4. Síndrome de Bloom.

Polimorfismos genéticos hereditarios.

En estudios de relación del genoma completo (GWAS), se observó que algunos polimorfismos genéticos (hereditarios) de la línea germinal se relacionan con la presentación de LLA infantil.⁷ Por ejemplo, los alelos de riesgo de ARID5B tienen una relación estrecha con la presentación de LLA de células B precursoras hiperdiploides. El ARID5B es un gen que codifica un factor de transcripción importante para el desarrollo embrionario, la expresión génica específica del tipo de célula y la regulación del crecimiento celular.^{8,9}

7.3. Manifestaciones Clínicas.

Las manifestaciones clínicas de la leucemia dependen del grado de infiltración de la médula ósea con células leucémicas y propagación de la enfermedad a otros órganos.³ La duración puede ser de días o meses.

Las manifestaciones clínicas que generalmente se presentan son:

- ✓ Fatiga.
- ✓ Disnea
- ✓ Dolores musculares.
- ✓ Dolor óseo (23%)
- ✓ Anorexia.
- ✓ Fiebre (61%)
- ✓ Sangrado (48%)

El examen físico puede encontrar:

- ✓ Palidez.
- ✓ Linfadenopatía (50%)
- ✓ Pérdida de peso
- ✓ Esplenomegalia (63%)
- ✓ Hepatoesplenomegalia (68%)

Diagnóstico

- **Examen físico y antecedentes (incluyendo tratamientos previos)**
- **Biometría hemática completa**

Porcentaje de pacientes con las siguiente distribución según:

Leucocitos	<10,000 (53%)	10,000 - 49,000 (30%)	>50,000 (17%)
Plaquetas	<20,000 (28%)	20,000 - 99,000 (47%)	>100,000 (25%)
Hemoglobina	<7 (43%)	7-11 (45%)	>11 (12%)

- **Estudios químicos de la sangre**
- **Aspiración de la médula ósea y biopsia:** Se pueden realizar las siguientes pruebas en el tejido que se extrae:

- **Análisis citogenético:** para verificar si hay ciertos cambios en los cromosomas de los linfocitos. Por ejemplo, cromosoma Filadelfia. También se pueden realizar otras pruebas, como la hibridización fluorescente in situ (HFIS) para detectar ciertos cambios en los cromosomas.
- **Inmunofenotipo:** permite caracterizar el origen celular y la etapa de diferenciación, tres subgrupos inmunológicos fueron delineados: células T, B y de células nulas (no T, no B)
- **Punción lumbar:** se extrae líquido cefalorraquídeo y se examina para identificar células leucémicas a fin de determinar si hay diseminación al sistema nervioso central.
- **Biopsia testicular:** este procedimiento se realiza solo si parece haber algo inusual en los testículos durante el examen físico.

7.4. Tratamiento para LLA en pacientes pediátricos. De acuerdo a los “Protocolos técnicos cáncer en niños”⁸, la LLA puede tratarse con diferentes esquemas de acuerdo al grado de riesgo (Cuadro 1). Cada esquema de tratamiento comprende al menos cuatro segmentos durante el tratamiento: a) Inducción a la remisión, b) Consolidación y c) Mantenimiento de la quimioterapia, y d) la fase final de cese electivo de la quimioterapia.

Los esquemas de tratamiento de acuerdo al tipo de riesgo se describen a continuación:

	Riesgo bajo	Riesgo habitual	Riesgo Alto	Riesgo muy alto
Edad	>1 y < 10 años	1 a 9 años	<1 y >10 años	
Género	Cualquiera	Cualquiera	Cualquiera	
Cuadro clínico	Leucemia reciente	Leucemia reciente	Leucemia avanzada	
Infiltración	Ausente	Ausente	Presente	
Leucocitos	< 10 000	>10000 y <50 000	>50 000	
Inmunofenotipo	PCB CD10+	PCB CD10- ó +	B madura, T	
Genética	Hiperploidia. Triple trisomía de cromosomas 4, 10 y 17, t(12/21)	Cariotipo normal, pseudoploidia. 1 ó 2 de las trisomías 4, 10 y 17.	Hipoploidia (30 a 43 cromosomas)	t(9;22)(q34;q11), t(4;11)(q21;q23), casi haploide <29 cromosomas
Índice de ADN	≥1.16	1 a 1.15	<0.8	<0.6
RT-PCR	TEL/ AML1	E2A/PBX1		Bcr-abl, MLL/AF4
Respuesta a prednisona	<1000 blastos en SP ó <25% de blastos en MO al día 7 de ventana	<1000 blastos en SP ó <25% de blastos en MO al día 7 de ventana	>1000 blastos en SP ó <25% de blastos en MO al día 7 de ventana	
Citorreducción temprana	MO en M1 al día 14 de la inducción	MO en M1 al día 14 de la inducción	MO en M2 al día 14 de la inducción	MO en M3 al día 28
ERM	Indetectable ó ≤10 ⁻⁴ a semanas 5 y 12	<10 ⁻³ a las semanas 5 y 12	>10 ⁻² a las semanas 5 y 12	>10 ⁻² a las semana 16

Cuadro 1. Sistema de clasificación del Children's Oncology Group. Adaptado de Rivera Luna⁸.

LLA de muy bajo riesgo. Fase de inducción. Busca la reducción de 2 a 3 log de la carga leucémica, inicia con ventana de esteroide (prednisona) de 1 semana, seguido de la administración de vincristina y asparaginasa combinada con prednisona. El tratamiento incluye terapia intratecal (MTX, hidrocortisona y citarabina) a una dosis por semana. En la fase de consolidación se adicionan altas dosis de MTX(2g/m²sc) para atacar sitios santuarios (SNC y testículos) en cuatro administraciones (1 por semana). En la fase de mantenimiento el objetivo es erradicar la enfermedad mínima residual persistente a la inducción y consolidación, se administra 6-mercaptopurina y metotrexato así como vincristina y dexametasona (hasta por 120 semanas). De acuerdo a los parámetros y valores clínicos de biometría hemática, aspirado de médula ósea y punción lumbar se decide el cese electivo.

LLA de riesgo habitual. Se aplica ventana de inducción con prednisona (60mg/m²/día) seguido de vincristina (2mg/m²/día), asparaginasa (10,000UI/m²/día) y daunorrubicina (30mg/m²/día). MTX-hidro cortisona a dosis/edad. La consolidación se emplea con vincristina (2 mg/m²/día), ciclofosfamida (1,000 mg/m²/día), asparaginasa (80 mg/m²/día) y 6-mercaptopurina (50 mg/m²/día). El MTX se administra a 2 g/m²/día, 10% en bolo IV y lo restante en infusión continúa en 24 h. Una hora después de iniciar la infusión iniciar TTI con MTX-HC-Citarabina (dosis/edad). Doce horas después de haber concluido la infusión iniciar rescate con leucovorin. Para el mantenimiento se administra terapia IT por 6 meses, 6 mercaptopurina, L-asparaginasa y doxorubicina (1 semana) y a partir del día 120 se aplica metotrexato oral (20 mg/m²/semana) en 2 dosis/semana y 2 tomas/día.

LLA de alto riesgo. Se divide en las mismas fases que las dos tipos anteriores, sin embargo las dosis varían de acuerdo a la estirpe celular, en células pre-B se administra MTX a 2 g/m² y se incluye etopósido a la quimioterapia. Para el caso de linaje T se considera de pronóstico desfavorable y se incrementa la dosis de MTX a 5 g/m² así como etopósido.

LLA de muy alto riesgo. Pacientes con mala respuesta a la ventana de esteroide y/o no están en remisión completa después de inducción. Se inicia ventana de esteroides: prednisona (60 mg/m²) en 3 dosis/7 días y después con dexametasona (21 días consecutivos a 68.5 mg/m²/día) con etapa de re-inducción de 1 semana, vincristina a 1.5 mg/m² en bolo directo (días 8,15, 22 y 29), Ara-C a 75mg/m²/día en infusión IV de 30 min (del día 8 al 21), daunorrubicina a 30 mg/m² en infusión de 1 h (días 8 y 9), L-asparaginasa a 5000 UI vía IV en 1 h (días 15, 18, 22, 25, 29 y 33), así como a 10,000 UI vía IM en 9 dosis (1 por semana), Terapia IT de MTX a 6 mg para <1 año ó de 8 mg para >1 año los días 1 y 29, si se involucró al SNC entonces se aplica los días 1, 8, 22, 29 y hasta que se dé resultado negativo.

Ara-C en terapia IT se dosifica a 15 mg para ≤ 1 año o de 20 mg para > 1 año (día 15) y la hidrocortisona (terapia IT) a 12 mg para ≤ 1 año o de 15 mg para mayores y es concomitante a MTX y Ara-C. Después de la inducción se inicia Consolidación en 3 bloques: MARAM, OCTADD y VIMARAM, este último lo reciben todos los pacientes

El MTX y la 6-mercaptopurina son fármacos de amplio uso en la quimioterapia y con predominancia en el éxito terapéutico de ésta. El MTX es un fármaco clave en la fase de consolidación (cuadro 1), administrándose en dosis dependientes del tipo de riesgo. Así mismo, este medicamento es de uso frecuente en la etapa de mantenimiento:

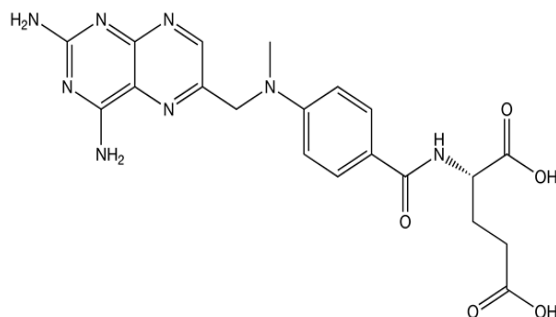
Tipo de riesgo Dosis Administración

Tipo de riesgo	Dosis	Administración.
Muy bajo	2g/m ²	4 sesiones (1 por semana)
Riesgo habitual	2g/m ²	3 sesiones (días 36, 68, 94)
Alto riesgo (pre-B)	2g/m ²	2 sesiones (días 47, 54)
Alto riesgo (pre-T)	5g/m ²	4 sesiones (días 8, 22, 36 y 50)
Muy alto riesgo	5g/m ²	4 sesiones (días 1 y 8 del curso MARAM y del VIMARAM)

Cuadro 1. Dosis administrada de metotrexato según el tipo de riesgo.

7.5 Metotrexato

Este conocido inmunosupresor fue inicialmente utilizado sólo como antineoplásico, fue introducido in 1948 por Farber et al¹⁶, para el tratamiento de la leucemia aguda.



Ácido(2S)-2-[(4-[(2,4-diaminopteridin-6-il)metil](metil)amino}benzoil)amino]pentanodioico.

Generalidades.

- Antimetabolito: análogo de folatos.
- Administración: PO, IM, IV, SC, Intratecal.
- Utilizado en el tratamiento de Cáncer (Leucemia), Psoriasis, Enfermedades autoinmunes (reumatismo).

Farmacocinética.

- **Absorción**

En pacientes pediátricos con leucemia, la absorción oral de MTX parece ser dependiente de la dosis, varía ampliamente con una concentración máxima (C_{máx}) de 4.998 – 10.452 µg/mL.

Existe también una amplia variabilidad en el tiempo en el que se presenta la concentración máxima (T_{max}), que va desde las 0.67 hasta las 4 horas después de la administración.

Ha sido demostrado que la comida retarda la absorción y reduce la concentración máxima.

El MTX generalmente se absorbe completamente en vías parenterales. Después de una inyección IM, las concentraciones séricas máximas se producen de 30 a 60 minutos.

- ***Distribución***

Después de la administración intravenosa, el volumen inicial de distribución es de 0.18 L/Kg (18% del peso corporal), y el volumen de distribución en estado estacionario es aproximadamente 0.4 a 0.8 L/Kg (40 a 80% del peso corporal).

El MTX tiene una unión a albúmina de 35 a 50%.

- ***Metabolismo***

Después de la absorción el MTX sufre metabolismo hepático e intracelular a poliglutamatos los cuales pueden convertirse de nuevo a MTX por enzimas hidrolasas.

Pequeñas cantidades de poliglutamatos de MTX pueden permanecer en tejidos durante periodos prolongados si se acumula en tercer espacio como derrame pleural o ascitis.

El MTX tiene buena biodisponibilidad oral a bajas dosis y es parcialmente metabolizado por la flora intestinal después de su administración.

La vida media (T1/2) del MTX es entre 8 y 15 horas a las dosis usadas en la terapia antineoplásica.

- ***Excreción***

La excreción renal es la principal vía de eliminación, cerca del 80% al 90% de la dosis administrada se excreta sin cambios en la orina dentro de las 24 horas.

Mecanismo de acción

Este fármaco ingresa a la célula mediante transporte activo secundario mediante el Transportador de Folato Reducido (Reduced Folate Carrier, RFC por sus siglas en inglés¹⁰), o por la Proteína de Unión a Folato (PUF), el cual tiene menor afinidad por metotrexato que el RFC¹⁰. En el interior celular el fármaco se metaboliza por la Folipoliglutamil sintetasa (FPGS), se conjuga con moléculas de glutamato (1-7 moléculas) produciendo poliglutamil-metotrexatos (Pg-MTX¹¹). Los conjugados tienen mayor inhibición sobre enzimas del metabolismo de folatos, también se reporta que a mayor grado de glutamilación mayor es el tiempo de residencia intracelular y por lo tanto mayor citotoxicidad¹².

Los Pg-MTX son a su vez hidrolizados en fármaco libre por la enzima Folipoliglutamil hidrolasa (γ -glu-X carboxipeptidasa ó γ -glutamil hidrolasa, GGH), se ha encontrado relación de su actividad con la eficacia/resistencia debido a que al disminuir la concentración intracelular de Pg-metotrexatos se disminuye la actividad del fármaco¹³. El fármaco y sus conjugados afectan la actividad de enzimas del metabolismo de folatos: inhiben a la dihidrofolato reductasa (DHFR) enzima que reduce el dihidrofolato en tetrahydrofolato, el cual es un cofactor necesario para la timidilato sintasa (TS). La TS sintetiza dTMP a partir de dUMP y tetrahydrofolato; en presencia de MTX se inhibe por dos mecanismos: a) por reducción del sustrato tetrahydrofolato generado por la DHFR y b) por inhibición directa por los Pg-MTX. La inhibición de las DHFR y TS conlleva a una disminución significativa en la concentración de dTMP.

La enzima AICAR transformilasa utiliza el 10-formiltetrahydrofolato para formar tetrahydrofolato y formil-5 amino 4-carboxamida ribonucleótido, este último metabolito es un precursor en la biosíntesis de nucleótidos como dGTP y dATP (Figura 6), la disminución de ambos compuestos compromete los mecanismos de replicación y reparación del DNA¹⁴. Como consecuencia de la disminución de 5-metil tetrahydrofolato se disminuye la síntesis de metionina y se afecta la capacidad de sintetizar proteínas, lo cual complica la viabilidad celular.

Farmacogenética

La respuesta farmacológica al medicamento es paciente-específica y está vinculada a factores genéticos y no genéticos; los cuales pueden alterar la absorción del fármaco, su distribución hasta su sitio de acción, la interacción con su sustrato (receptores y/o enzimas), su metabolismo (función hepática) y su excreción (función renal).

Por lo tanto, las diferencias en la secuencia de los genes, como las causadas por polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), pueden provocar cambios en la secuencia de aminoácidos. El cambio en la secuencia de la proteína puede alterar el efecto del fármaco y/o la actividad sobre éste, en consecuencia afectar la eficacia del tratamiento.

En el caso del metotrexato se han realizado múltiples ensayos para describir la relevancia de polimorfismos en enzimas relacionadas a su efecto (MTHFR, DHFR, AICAR) así como en proteínas de transporte- excreción (RFC, transportadores del tipo ABC) y en enzimas del metabolismo del fármaco (FPGS y GGH).

Algunos hallazgos en la farmacogenética de metotrexato:

- **MTHFR.** Dos SNPs del gen MTHFR han sido ampliamente estudiados. Primero, el SNP C677T (rs1801133, cambio de Ala222Val) provoca una disminución del 40% de la actividad enzimática en heterocigos y de un 70% en homocigos, este genotipo está presente en un 10% de la población caucásica¹⁵. Un meta-análisis reciente realizado a partir de 55 artículos científicos, involucrando a más de 1,400 pacientes con artritis reumatoide, ha mostrado que el C677T está asociado en forma significativa al incremento en toxicidad (Odd ratio=1.716). Asimismo, otros estudios han encontrado asociación del C677T con toxicidad y con una menor probabilidad de supervivencia en pacientes con LLA^{17,18,19},

aunque en otros estudios no se ha encontrado asociación alguna entre el C677T y algún tipo de riesgo.

El SNP A1298C (rs1801131, cambio de Glu429Ala) de la MTHFR también ha sido analizado con respecto a la respuesta a MTX. Los resultados también han sido contradictorios pues algunos ensayos no han encontrado asociación del A1298C con toxicidad o riesgo por MTX, mientras que estudios en linfoma no Hodgkin²⁰, en enfermedad inflamatoria intestinal²¹ y en pacientes que recibieron trasplante de médula ósea²² mostraron que los homocigos 1298CC fueron más propensos a desarrollar reacciones adversas al MTX. Aunque el A1298C también se ha reportado como asociado al tratamiento para la artritis reumatoide, el meta análisis de Fisher¹⁶ concluye que este SNP no está asociado con la toxicidad inducida por MTX.

- **DHFR.** Es una de las enzimas blanco del fármaco, su inhibición desacopla la síntesis de tetrahidrofolato y afectan a las enzimas dependientes de folato. Se ha descrito que polimorfismos en la zona promotora incrementan su expresión y están asociados a mecanismos de resistencia a MTX^{23,24,25}.
- **ATIC.** Los conjugados de metotrexato con glutamato (Pg-MTX) poseen actividad inhibitoria sobre la enzima ATIC, enzima bifuncional que cataliza los procesos finales de la síntesis de purinas. Dervieux y colaboradores²⁶ encontraron que en los homocigos GG del SNP C347G (cambio de Treonina 116 a Serina) se incrementa la probabilidad de responder adecuadamente a MTX comparado con los genotipos heterocigos CG u homocigos CC.

Del mecanismo de acción se destaca que es necesario el ingreso del fármaco y un tiempo de residencia intracelular adecuado para ejercer su efecto en las células neoplásicas; esto recae en la actividad de las

proteínas de transporte como RFC (ingreso), ABCB1, ABCG2 (exporte mediante ATP) y de enzimas de metabolismo intracelular como FPGS (poliglutamilación) y GGH (hidrólisis de poliglutamatos).

- **RFC.** El polimorfismo más estudiado en el gen *RFC* (gen *SLC19A1*) es el 80G>A (rs1051266). Este SNP consiste en una sustitución de Guanina por Adenina en la secuencia CACACGAGG CGC CGCCAGGAC, con cambio de Arginina (CGC) por Histidina (CAC) en el aminoácido 27. Las frecuencias alélicas por poblaciones de acuerdo a la base HapMap indican diferencias de acuerdo al origen étnico :

Origen étnico	Alelo G	Alelo A
CEU (Europeo)	0.562	0.438
MEX (Mexicanos en USA)	0.670	0.330
HCB (Este de Asia)	0.488	0.512
JPT (Japonés)	0.442	0.558
YRI (Nigeria, África)	0.310	0.690
ASW(Africanos en USA)	0.531	0.459
CHB (Chinos de Beijing)	0.512	0.488
CHD (Chinos en USA)	0.535	0.465
GIH (Hindús en USA)	0.608	0.392

Frecuencia alélica reportada por HapMap para el SNP rs1051266

- **ABCB1.** Para este gen se han reportado diferentes polimorfismos, algunos de estos pueden afectar la actividad de excretar diferentes fármacos.

El SNP rs1045642, también nombrado C3435T, es un polimorfismo sinónimo (Ile) con secuencia de AAGAGAT [A/C/T] GTGAGGG. Se reportó que el genotipo TT disminuye la expresión de la proteína en líneas celulares de cáncer de mama y ovario³⁹; en relación a esto, Kafka y colaboradores⁴⁰ en su estudio realizado en 68 pacientes con cáncer de mama bajo quimioterapia con antraciclinas y taxanos muestran que existe una potencial correlación del genotipo con la respuesta terapéutica, el genotipo TT está relacionado con un incremento en la

respuesta farmacológica a la quimioterapia ($p= 0.029$, prueba exacta de Fisher). Para el genotipo CC se reporta que está asociado ($p= 0.16$) con un incremento en la “clarificación” de etopósido en niños con LLA41. Así mismo, se reportó que pacientes refractarios a los fármacos antiepilépticos poseían principalmente el genotipo CC del rs1045642 (OR= 2.66, 95% IC: 1.32 – 5.38; $p=0.006$), aunque este SNP se incluyó en un bloque extenso de desequilibrio de ligamiento, lo cual podría implicar que el polimorfismo per se es la causa de la resistencia farmacológica sino más bien estar ligado a la variante causal42.

Leal-Ugarte y colaboradores43 reportaron la frecuencia génica de este SNP para población pediátrica mexicana en 107 niños con LLA y 117 niños sanos, no se encontró asociación de genotipos con mayor riesgo de esta neoplasia (frecuencias: CC=0.17 vs 0.14; CT=0.61 vs 0.53 y TT=0.22 vs 0.33 en niños con LLA y sanos, respectivamente) aunque no se determinó riesgo por toxicidad, niveles plasmáticos de antineoplásicos o variables de mejoría entre los 16 pacientes, por lo tanto es de nuestro interés conocer la frecuencia alélica y génica de este SNP y su posible relación con los niveles intracelulares de metotrexato en pacientes con LLA.

Finalmente, otro SNP reportado para el gen Abcb1 con asociación clínica relevante es el rs2032582 (G2677T/A) que es del tipo no sinónimo con secuencia CTAGAAGGT GCT GGGAAGGT, el SNP GCT codifica para Alanina, TCT para Serina y ACT para Treonina en el aminoácido 893 de la secuencia proteica. La variante T posee un 2.6 mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, particularmente el llamado carcinoma de células escamosas (CI 1.7-40, $p <0.001$). Parece existir efecto de dosis génica, dado que los homocigos TT poseen mayor riesgo global (odd ratio= 6.75 comparado a los homocigos AA, CI 3.0-15.2). La frecuencia génica reportada por la base HapMap para los polimorfismos de Abcb1:

Origen étnico	rs2032582		rs1045642	
	Alelo T	Alelo C	Alelo A	Alelo G
CEU (Europeo)	0.469	0.531	0.571	0.429
MEX (Mexicanos en USA)	0.430	0.570	0.460	0.540
HCB (Este de Asia)	0.589	0.411	0.402	0.598
JPT (Japonés)	0.552	0.448	0.459	0.541
MKK (Kenia, África)	0.087	0.913	0.152	0.848
ASW(Africanos en USA)	0.094	0.906	0.202	0.798
CHD (Chinos en USA)	0.506	0.494	0.369	0.631
GIH (Hindús en USA)	0.653	0.347	0.597	0.403

Frecuencia alélica reportada por HapMap para los SNPs rs2032582 y rs1045642.

ABCG2. Para el gen *Abcg2* se han reportado 21 SNPs en la región codificante para la proteína y otros más en los intrones y en las regiones 5'UTR y 3'UTR. Se han reportado tres SNPs con relevancia clínica^{44,45}. El SNP C421A (rs2231142) ha sido reportado generar una proteína de baja expresión y con baja actividad y se ha asociado con eventos adversos por metotrexato⁴⁶. Este SNP tiene una secuencia AACTTA CAG TTCTCA con cambio de Glutamina (CAG) a Lisina (AAG).

Otro SNP reportado para *Abcg2* es el G34A (rs2231137) el cual se ha asociado con la susceptibilidad de linfomas de células B grandes difusas⁴⁷; este polimorfismo es del tipo no sinónimo y tiene una secuencia reportada de TTTTATCCCA GTG TCACAAGG, con cambio de Valina (GTG) a Metionina (ATG). La frecuencia génica reportada por la base HapMap para los SNPs de *Abcg2*

Origen étnico	rs2231142		rs2231137	
	Alelo T	Alelo C	Alelo A	Alelo G
CEU (Europeo)	0.889	0.111	0.983	0.017
MEX (Mexicanos en USA)	0.800	0.200	n.d.	n.d.
HCB (Este de Asia)	0.708	0.292	0.711	0.289
JPT (Japonés)	0.657	0.343	0.807	0.193
MKK (Kenia, África)	0.990	0.010	n.d	n.d.
ASW(Africanos en USA)	0.962	0.038	n.d	n.d.
CHD (Chinos en USA)	0.685	0.315	n.d.	n.d.
GIH (Hindús en USA)	0.938	0.062	n.d.	n.d.

Frecuencia alélica reportada por HapMap para el SNP rs2032582 y rs1045642.

Efectos adversos

Comunes: mucositis, náuseas, vómitos y diarrea

Mielosupresión: usualmente limitada a la dosis. El nadir de los leucocitos puede presentarse 4-7 días y recupera a los 14 días.

Menor frecuencia:

-Reacciones en piel como Síndrome de Steven Johnson, Necrosis epidérmica tóxica, dermatitis exfoliativa, necrosis, eritema multiforme.

-Toxicidad pulmonar: neumonitis por hipersensibilidad, fibrosis

-Neurotoxicidad: disfunción cerebral aguda presente a los 6 días de tratamiento y resuelve 48-72hrs. Encefalopatía crónica con demencia y disfunción motora puede presentarse meses después del tratamiento y llegar a ser permanente.

-Elevación de las enzimas hepáticas, por lo que se aconseja su monitorización. Con menor frecuencia y cirrosis hepática.

Se observa menos efectos adversos y abandono de tratamiento al adicionar ácido fólico en dosis moderadas (100-1,000mgm²) y dosis altas (mayor 1,000mgm²), sin una disminución en la eficacia clínica.^{11, 14}

Se deberá modificar la dosis en pacientes con falla renal o hepática.

VIII. MATERIAL Y MÉTODO

Es un estudio Prospectivo, Observacional, Analítico y Longitudinal.

Población: La población objetivo fueron los pacientes del servicio de Hemato-Oncología con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda.

Criterios de inclusión: Se incluyeron pacientes del Instituto Nacional de Pediatría (INP) con LLA entre 1 y 17 años de edad con tipo de riesgo definido por factores clínicos, morfológicos y moleculares. La quimioterapia debe incluir metotrexato en la fase de consolidación. Todos los pacientes tendrán una carta de consentimiento informado por parte de los padres y/o tutores, en el caso de que el paciente sea mayor de 10 años deberán firmar Carta de Asentimiento.(anexo 1)

Criterios de exclusión: Pacientes con falla renal, falla hepática, transfusión sanguínea previa al estudio, desnutrición de grado III y/o cualquier afección que pueda afectar la determinación de los niveles del fármaco.

Criterios de eliminación: Pacientes a quienes se les retiró el metotrexato de la quimioterapia, no acudan regularmente a su tratamiento (No apego al tratamiento: determinado por un porcentaje menor al 50% de administraciones efectivas), retiren voluntariamente su consentimiento y/o asentimiento para participar en el estudio y aquellos pacientes en los que no se obtenga la cantidad de muestras suficientes para el análisis de concentraciones del fármaco.

Ubicación del estudio: El proyecto se desarrolló en la Torre de Investigación “Dr. Joaquín Cravioto”, 3er. Piso, Laboratorio de Farmacología, en el Laboratorio de Hemato Oncología y de Inmunogenética Molecular del Instituto Nacional de Pediatría.

Toma de muestras: Se tomarán muestras de sangre (5 mL) a los pacientes antes de la administración de metotrexato (pre-dosis) así como a las 2, 24 y 36 horas del inicio de administración del fármaco durante la fase de consolidación (dosis de 2 ó 5 g/m²sc), esto en base a los Protocolos Técnicos Cáncer en Niños. Las muestras serán analizadas por HPLC para la cuantificación de metotrexato y sus metabolitos.

La cuantificación de metotrexato y sus metabolitos intracelular (poliglutamil metotrexatos) se realizará mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en muestras de sangre, plasma o células de sangre periférica de pacientes cursando leucemia y bajo quimioterapia con metotrexato.

Cuantificación de metotrexato en sangre periférica y plasma.

En el desarrollo del método analítico se adecuó un método de extracción y análisis por HPLC de tres diferentes artículos científicos citados; de los autores; (Assadullahi, 1990), (Sparreboom, 1999), (Moghbel, 2003).

Para establecer la curva de calibración y acorde al equipo utilizado en el laboratorio de farmacología del INP, se utilizó como referencia en el rango superior de cuantificación del artículo del autor (Sparreboom, 1999).

El método desarrollado consistió en lo siguiente:

- **Reactivos:** Metotrexato grado USP (98% pureza para HPLC) para la preparación de los estándares de calibración, Tetrahidrofurano, Dihidrógeno fosfato de sodio monohidratado (NaH₂PO₄.H₂O) ambos grado HPLC, fueron utilizados para la preparación de fase móvil, n-butanol, acetona, éter dietílico; grado analítico fueron utilizados en la extracción.

- Preparación de las disoluciones de MTX para la curva de calibración y concentraciones de la curva de calibración.

Acorde a la literatura consultada el MTX es soluble en SSI ligeramente alcalina, por lo que se preparó una solución stock de MTX a una concentración de 1mg/mL de la cual se realizaron disoluciones para obtener los 7 puntos de la curva de calibración y los tres controles de calidad.

De la solución stock de 1mg/mL, se obtuvo una segunda solución stock de 100µg/mL ambas utilizadas para la preparación de la curva de calibración.

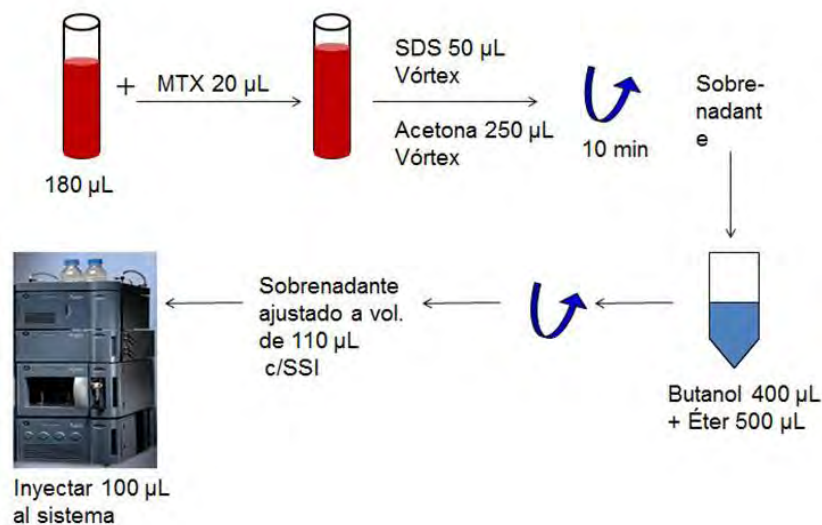
Punto de la curva.	Concentración final en sangre.	Concentración de la solución de trabajo.	mL a tomar de las soluciones stock.	Volumen a aforar.
1	0.25 µg/mL	2.5 µg/mL	125 µL de 100 µg/mL	5mL
2	0.50 µg/mL	5.0 µg/mL	250 µL de 100 µg/mL	5mL
3	1.00 µg/mL	10.0 µg/mL	500 µL de 100 µg/mL	5mL
4	2.50 µg/mL	25.0 µg/mL	125 µL de 1000 µg/mL	5mL
5	5.00 µg/mL	50.0 µg/mL	250 µL de 1000 µg/mL	5mL
6	7.50 µg/mL	75.0 µg/mL	375 µL de 1000 µg/mL	5mL
7	10.00 µg/mL	100.0 µg/mL	500 µL de 1000 µg/mL	5mL
Cb	0.75 µg/mL	7.5 µg/mL	375 µL de 100 µg/mL	5mL
Cm	4.00 µg/mL	40.0 µg/mL	200 µL de 1000 µg/mL	5mL
Ca	8.00 µg/mL	80.0 µg/mL	400 µL de 1000 µg/mL	5mL

Concentración de la curva de calibración y disoluciones para su preparación.

- Extracción. A un volumen de 250 µL de muestra (sangre, plasma o leucocitos) se adicionarán 50 µL de SDS 0.15M y se homogenizarán por 60s en un agitador de toque (Vórtex®). La extracción del compuesto se realizará con 250 µL de acetona mediante agitación en Vórtex por 5 min y posterior centrifugación a 10,000 rpm por 10 minutos. Se recolectará el sobrenadante y se descartará el precipitado.

Al sobrenadante se adicionarán 400 µL de butanol y 500 µL de éter dietílico para llevar a cabo una segunda extracción. Se homogeneizará la mezcla por 5 minutos en Vórtex y se centrifugará a 10,000 rpm por 10 min. Se recupera la

fase acuosa (inferior) descartando el sobrenadante de la segunda extracción. El volumen recuperado se aforará a 110 μL con SSI y se inyectarán 100 μL al sistema cromatográfico.



Imagen, método de extracción MTX en sangre.

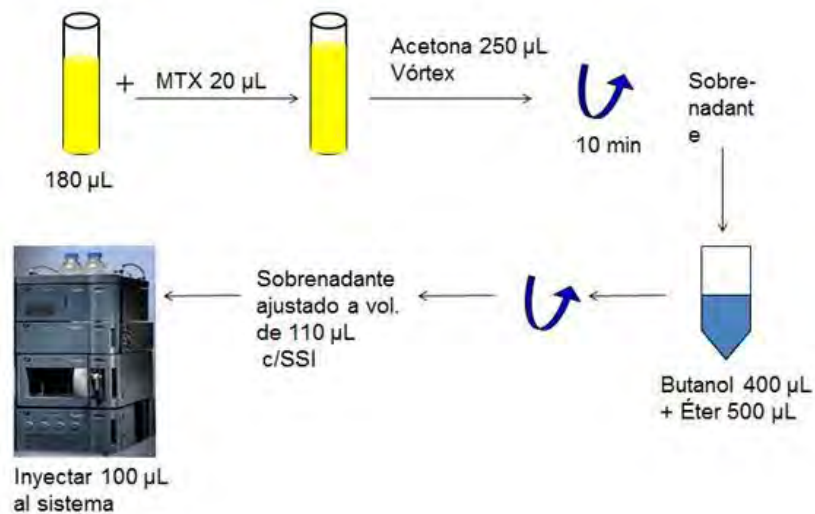


Imagen: Extracción MTX en plasma.

- Separación y detección. El sistema cromatográfico consiste en una bomba Waters modelo 515, un autoinyector Waters modelo 717 y un detector Waters UV/Vis modelo 486. La separación se llevará a cabo a temperatura ambiente en una columna Gemini C18 (Phenomenex) de

150 x 4.6 mm, 5 μ m, con fase móvil de fosfato monobásico de sodio pH 4.85 (50 mM) y tetrahidrofurano (95:5 v/v) a una velocidad de flujo de 1.0mL/min. El compuesto se detectará a 313 nm.

515 HPLC Pump



Autoinyector



Detector

- Cuantificación. Para determinar la cantidad de metotrexato en las muestras analizadas se empleará una curva de calibración con concentraciones de 25, 100, 200, 400, 800 y 1000 ng/mL del fármaco. Para determinar parámetros como repetibilidad y reproducibilidad del ensayo se emplearán concentraciones control de 75, 400 y 800 ng/mL. Se cuantificará el fármaco en las muestras por la relación de área bajo la curva del pico de metotrexato con respecto a la curva de calibración. La curva de calibración de seis puntos deberá tener un coeficiente de correlación (r) igual o mayor a 0.99 para ser empleada en la cuantificación del compuesto.
- Análisis de polimorfismos de genes involucrados en el metabolismo y transporte de MTX.

Obtención de leucocitos

La fracción enriquecida de leucocitos se obtiene de sangre total al centrifugar la sangre a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, se observan 3 diferentes fracciones: la capa clara superior (plasma); la capa intermedia (botón leucocitario) que

contiene la fracción enriquecida de leucocitos y la capa del fondo que contiene eritrocitos concentrados. El botón leucocitario se obtiene mediante pipeta Pasteur de punta larga cuidando de transferir la menor cantidad de plasma y eritrocitos.

Procedimiento de purificación

El botón leucocitario se lava con buffer RCLB (red cell lysis buffer) mediante centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos decantando tantas veces como sea necesario para que el sobrenadante aparezca claro. Se transfiere el botón lavado y se incuba en buffer AL® y proteinasa K a 56 °C durante un día. Posteriormente, se agrega etanol puro, se agita en Vortex por 30 segundos, se transfiere a columna QIAamp Mini Spin Column, se centrifuga a 8000 rpm por 1 minuto y se decanta.

A la columna se agregan 500 µL de buffer AW1®, se deja en reposo por 3 minutos, se centrifuga a 8000 rpm por 1 minuto y se decanta. A continuación, se agregan 500 µL de buffer AW2® se deja en reposo por 3 minutos, se centrifuga a 12000 rpm por 1 minuto y se decanta.

Finalmente, el tubo colector de la columna se cambia por uno nuevo y se eluye el ADN mediante 200 µL de buffer AL®, incubación a 60 °C por 10 minutos y 9000 rpm por 1 minuto.

El ADN extraído se almacena para preservación a 4 °C hasta su uso como dilución a 10 ng/µL.

Análisis de los polimorfismos

Se determinará la frecuencia génica de los SNPs **rs1544105** (FPGS), **rs3758149** y **rs11545078** (*GGH*) (Tabla 3) los cuales como se ha descrito en la sección de introducción han demostrado influir en la respuesta terapéutica del metotrexato. Los polimorfismos serán

genotipificados mediante ensayos de PCR en tiempo real empleando sondas Taqman para discriminación alélica validados por Applied Biosystems-TaqMan® SNP Genotyping Assays.

Gen	Gene ID	dbSNP	SNP	SondasTaqman	Sustitución	Cambio
<i>FPGS</i>	2356	rs1544105	hCV8342611	<u>C 8342611_10</u>	64G/A	Intrónico
<i>GGH</i>	8836	rs3758149	hCV27512347	<u>C 27512347_10</u>	401C/T	Promotor
		rs11545078	hCV25623170	<u>C 25623170_10</u>	452C/T	Tre 127 Ile

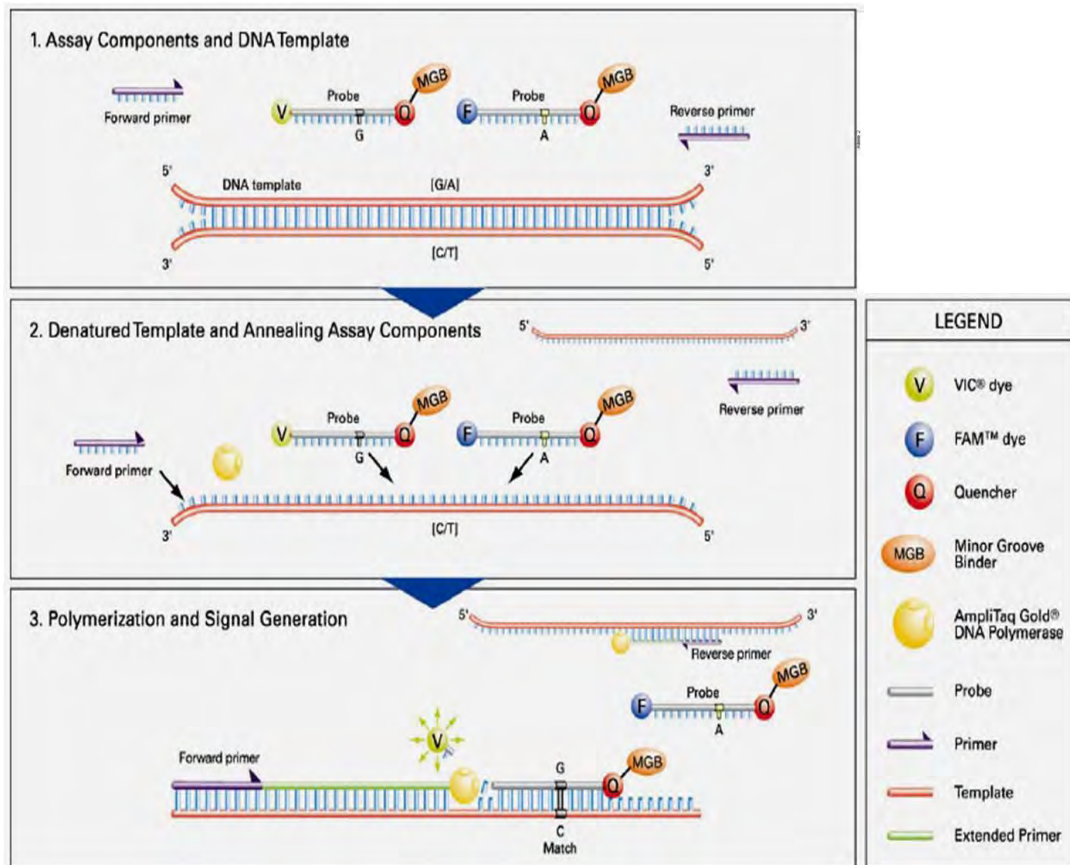
Variantes polimórficas a determinar en los genes en estudio.

- **Ensayos de genotipificación**

Los ensayos de genotipificación para cada SNP se llevarán 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 así como una molécula que “apaga” la fluorescencia (Non fluorescent quencher, NFQ). 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 en la figura



Discriminación alélica mediante amplificación por PCR y sondas Taqman.

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 es el siguiente:

Preparar la mezcla de reacción mediante la adición de 5 µL de 2X Taqman universal PCR Master Mix, 0.25 µL de sonda adecuada SNP Genotyping assay mix , 3 µL de la muestra de ADN diluida a 10ng/µL y 1.75 µl de agua estéril libre de DNAsas. Configurar el sistema Abi Prism 7700 SDS para llevar a cabo la amplificación por tiempo real bajo las siguientes condiciones:

	Inicio	Desnaturalización	Apareamiento/Extensión
Tiempo	10 segundos	10 minutos	1.5 minutos
Temperatura	60 °C	95 °C	60 °C

Después de la amplificación, se debe realizar una lectura de placa de punto final. 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 basados en las señales de cada pozo. Con este software se puede determinar que alelos están presentes en cada muestra.

En el presente estudio, en cada una de las muestras de DNA de los pacientes en estudio se llevará a cabo un ensayo de genotipificación para cada SNP a determinar

Infraestructura

El laboratorio de farmacología experimental cuenta con los insumos, espacio, y equipos necesarios para el tratamiento de las muestras biológicas y la extracción del metotrexato, posee varios equipos cromatográficos que serán usados para las cuantificaciones del fármaco; 2 HPLC con inyectores automatizados, bombas y detectores de UV y fluorescencia (Waters, USA). Para el control de estos equipos se cuenta con software especializado, como Millennium 32 y Empower 2.

Equipo general de laboratorio: balanza analítica y granataria, potenciómetro, baño sonicador Branson Sonifier 450, micropipetas, cristalería, microcentrífugas de mesa, agitadores magnéticos, estufas de incubación, campana de extracción, equipo de extracción, un refrigerador ajustado a 4°C, otro a -20°C y un ultracongelador de -80°C.

Definición de variables.

Variable	Definición operacional	Clasificación	Categoría
Grupo de riesgo	Se definen por factores clínicos (edad, sexo, recuento de blastos) y biológicos (estirpe leucémica, antígenos de superficie, etc.) que inciden en el pronóstico de remisión.	Cualitativa ordinal	Bajo Habitual Alto Muy alto
Género	Características biológicas que permiten diferenciar entre hombre y mujer.	Cualitativa dicotómica	Masculino Femenino
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento del sujeto.	Cuantitativa continua	Años
Dosis de metotrexato	Cantidad de fármaco administrado por vía IV en infusión continua por 24 h	Cuantitativa discreta	2 g/m ² sc 5 g/m ² sc
Frecuencia alélica de polimorfismos	Proporción de un alelo respecto al conjunto de los que pueden ocupar un locus determinado en la población.	Cuantitativa continua	N
Niveles de Metotrexato	En sangre	Concentración de MTX en circulación determinada como la cantidad total de fármaco cuantificado a las 24, 36 y 42 h de administrado el compuesto (infusión IV continua por 24 h).	µM
	En plasma	Concentración de fármaco presente en la fracción plasmática, se entiende como el fármaco en circulación sistémica determinado a las 24, 36 y 42 h de iniciada la infusión.	µM
	Intracelular	Fármaco cuantificado dentro de células sanguíneas (linfocitos), se entiende como el fármaco en el sitio blanco. Se determinará a las 24, 36, y 42 h de iniciada la infusión.	nM
Eventos adversos	Daño hepático	Actividad de las enzimas Aspartato transaminasa y Alanina transaminasa. Se definirá daño hepático cuando el valor obtenido en alguna de las dos enzimas duplique (2N) el valor basal obtenido antes de la quimioterapia.	Cualitativa dicotómica Presente Ausente
	Daño renal	Nitrógeno ureico y creatinina sérica. Se describirá daño si se rebasa al menos uno de los límites máximos establecidos para Nitrógeno ureico (25 mg/dL) y de creatinina sérica (1.4 mg/dL).	Cualitativa dicotómica Presente Ausente
	Nausea	Sensación de urgencia de vomitar.	Cualitativa dicotómica Presente Ausente
	Vómito	Expulsión espasmódica del contenido del estómago a través de la boca.	Cualitativa dicotómica Presente Ausente
	Mielosupresión	La mielosupresión se determinará como: <u>Neutropenia</u> : si los valores de granulocitos son menores a $1.5 \times 10^9/l$. <u>Agranulocitosis</u> : (neutropenia grave) $<0.5 \times 10^9/l$. <u>Leucopenia</u> : Leucocitos totales $< 4.5 \times 10^9/l$. <u>Trombocitopenia</u> : Cuenta plaquetaria por debajo de $1.5 \times 10^9/l$ plaquetas.	Cualitativa dicotómica Presente Ausente
Esquema de tratamiento	Apego al tratamiento	Tratamiento oncológico durante el periodo de estudio, el cual incluye a todos los fármacos prescritos y sus administraciones en cada fase de la quimioterapia. Se determinará como el porcentaje de administraciones efectivas para cada fármaco durante el periodo de estudio.	Cuantitativa continua Porcentaje (%)
	Dosificación	Cantidad de fármaco prescrita para cada fase y para cada administración del tratamiento oncológico. Se determinará mediante: a) Cantidad de fármacos concomitantes del protocolo de atención/ cantidad de fármacos efectivamente administrados (% de esquema). b) Dosis calculada de MTX de acuerdo al área superficial/dosis administrada al paciente (% de dosis)	Cuantitativa continua Porcentaje (%)

Análisis estadístico

Se presentarán las frecuencias de las variables categóricas, y medidas de tendencia central de las variables continuas. Se realizará un análisis de varianza con una prueba ANOVA de medidas repetidas para comparar por grupos (polimorfismos) y la concentración de metotrexato total, así mismo, mediante prueba de ANOVA de medidas repetidas para comparar por grupos (polimorfismos) y la concentración de metotrexato libre. Este mismo tipo de análisis será realizado para comparar por grupos (polimorfismos) y la concentración de metotrexato intracelular. Se buscará la correlación entre los polimorfismos de los genes en estudio y la concentración del metotrexato. También se buscará la correlación entre estos SNPs y la presencia de reacciones adversas (nausea, vomito, inducidas por el fármaco).

Ética

Este estudio se basará en los principios de buena práctica clínica y acorde a los lineamientos del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación en Salud. De acuerdo al Art. 17 del Reglamento este estudio presenta un riesgo mínimo para el paciente (punción venosa con volumen menor a 450 mL en dos meses). Todos los datos personales de los pacientes en el estudio se mantendrán de manera confidencial mediante la codificación de los nombres y números de expediente. Se obtendrá el consentimiento de los padres y/o tutores de los pacientes pediátricos incluidos en este protocolo y el asentimiento para niños mayores de 10 años. Solo personal médico y/o de investigación participante en este proyecto tendrá autorización para la revisión/análisis de resultados. El presente estudio no interferirá y/o modificará de alguna manera el régimen de quimioterapia implementado por el oncólogo.

IX. RESULTADOS

El presente estudio realizado con 27 pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría con diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica muestra los siguientes resultados:

El rango de edad predominantemente afectado fue entre 2 y 10 años con 15 pacientes, equivalente al 56% de la población y el 44% restante es representado por las edades de riesgo, siendo mayoritario con un 37% (10 pacientes) los mayores de 10 años. **(Ver tabla N°1)**

El sexo que más predomina es el masculino con 17 pacientes, equivalente al 63% y el 37% restante es representado por 10 pacientes del sexo femenino. **(Ver tabla N°2)**

La procedencia de los pacientes eran 11 (41%) de Ciudad de México y Estado de México respectivamente y 1 (4%) de Hidalgo, Guanajuato, Morelos, Oaxaca y Baja California respectivamente. **(Ver tabla N° 3)**

El 93% de los pacientes, representado por 25 niños fueron clasificados de alto riesgo y apenas el 7% (2 pacientes) fueron de riesgo habitual. **(Ver tabla N°4)** Por dicha razón, 22 pacientes (81%) recibieron dosis de metotrexato a 5gm2do y el restante de pacientes a 2gm2do. **(Ver tabla N°5)**

De los 27 pacientes incluidos en este estudio, 15 pacientes (55%) tuvieron concentración de niveles de metotrexato en plasma mayor que en sangre durante las primeras 24hrs horas de la infusión, alcanzando niveles equiparables en plasma y sangre a las 36 hrs de infusión. **(Ver tabla N°6)**

Para el análisis de pacientes con polimorfismos se excluyeron 2 pacientes por no haber arrojado el ensayo de discriminación de alelos algún resultado,

quedando un total de 25 pacientes para dicho análisis. El 44% de la población en estudio (11 pacientes) presentaban algún tipo de polimorfismo en GGH (rs375149) o FPGS (rs1544105) y de estos 1 paciente presentaba ambos polimorfismos que les confiere riesgo de reacciones adversas o incremento en la resistencia al metotrexato. **(Ver tabla N°7)**

La frecuencia alélica del polimorfismo rs3758149 TT fue del 42%. El 50% de los pacientes que portaban este polimorfismo tenían concentraciones en plasma de metotrexato mayor de 5µmol/L a las 24hrs posterior a la infusión de metotrexato a altas dosis (2 o 5 gramos/m²/do). **(Ver tabla N°8)**

La frecuencia alélica del polimorfismo rs1544105 fue para AG 20% y AA 8%. El 37.5% de pacientes que portaban este polimorfismo tenían concentraciones en plasma de metotrexate inferior a 2 µmol/L a las 24hrs posterior a la infusión de metotrexato a altas dosis (2 o 5 gramos/m²/do) y niveles entre 0.19-1 µmol/L a las 36 hrs. **(Ver tabla N°9)**

X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De los resultados obtenidos en el estudio realizado podemos afirmar lo siguiente:

La mitad de los pacientes con polimorfismo rs3758149 TT debido a las concentraciones de metotrexato alcanzadas en plasma mayores incluso a 10 $\mu\text{mol/L}$ que es el límite superior reportado como de riesgo para algún tipo de toxicidad secundaria al metotrexato, lo que se correlaciona con la literatura basada en los estudios de China en los cuales se menciona que este tipo de polimorfismos les confiere a los pacientes 4.8 veces más riesgo de mayor producción de poliglutamatos y por ende más reacciones adversas incluso con bajas dosis de metotrexato.

La frecuencia alélica del polimorfismo rs3758149 es mayor a la reportada en la literatura de población China donde se menciona que la frecuencia para TT 2.2%, CT 13%, CC 84.8%, siendo en nuestros pacientes de 16%, 52% y 32% respectivamente. Sin embargo, en cuanto a T es similar a la reportada en la población europea (30.8%)

Menos de la mitad de los pacientes que presentaron polimorfismo rs1544105 tuvieron concentraciones de metotrexato en plasma inferiores a las esperadas a las 24 horas de infusión, alcanzando concentraciones equivalentes a las esperadas a las 42 o 54 hrs de infusión debido a que este tipo de pacientes tendrán pobre respuesta al tratamiento por la resistencia secundaria a la baja producción de poliglutamatos, confiriéndoles un riesgo de recaídas. Todo lo anteriormente descrito se correlaciona con la literatura.

La frecuencia alélica del polimorfismo rs1544105 es muy similar a la reportada en población China 34% y en nuestro pacientes del 32%. Al compararla con la

población europea, este tipo de alteración es menor en nuestros pacientes, ya que presentan un frecuencia del 64.2%.

XI. CONCLUSIONES

La frecuencia alélica del polimorfismo GGH (rs3758149) en nuestros pacientes con diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica es mayor a la reportada, de lo que se puede deducir que nuestros pacientes tiene mayor riesgo de presentar reacciones adversas durante las infusiones de metotrexato altas dosis por la susceptibilidad a presentarlas incluso con dosis bajas.

El polimorfismo de FPGS (rs1544105) se encuentra con una frecuencia similar a población China y en menor frecuencia que la población Europea. Los casos con este polimorfismo tuvieron concentraciones de metotrexato en plasma a las 36hrs subóptimos y equivalentes a lo esperado incluso hasta las 54hrs de infusión.

XII. RECOMENDACIONES

Con base en las conclusiones obtenidas, se recomienda lo siguiente:

- Realizar nuevos estudios en donde se realice la correlación entre polimorfismos, niveles de metotrexate y reacciones clínicas.
- Individualizar la terapia de los pacientes según hallazgos encontrados con el fin de disminuir morbilidades y fallas en el tratamiento.
- En caso de no contar con estudios de farmacogenética, se sugiere tomar de forma seriada niveles de metotrexate para valorar depuración del metotrexato de cada paciente y evitar niveles sub óptimos o supra terapéuticos con dosis administradas de metotrexato.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lewis SM, McLean M, Ruff S. Enfermería Médico Quirúrgica. Capítulo 30. Trastornos hemotológicos. Página 750. 6a Edición en Español. Editorial Elsevier España S.A.
2. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandring G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. "Proposals for the classification of the acute leukemias: French-American-British (FAB) cooperative group". Br. J. Haematol. **33**: 451, 1976.
3. Harris NL, Jane ES, Diebold J, Flandrin G, Muller- Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of the hematologic malignancies report of the clinical advisory committee meeting. Airlie House, Virginia, November 1997. J Clin Oncol 1999,17: 3835-3849.
4. Dirección General de Información en Salud (DGIS). Base de datos de egresos hospitalarios por mortalidad en Instituciones Públicas, 2004-2007. [en línea]: Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). [México]: Secretaría de Salud. <<http://www.sinais.salud.gob.mx>> [Consulta: 12 enero 2011].
5. Dirección General de Información en Salud (DGIS). Base de datos de egresos hospitalarios por morbilidad en Instituciones Públicas, 2004-2007. [en línea]: Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). [México]: Secretaría de Salud. <<http://www.sinais.salud.gob.mx>> [Consulta: 12 enero 2011].
6. Catálogo de Intervenciones médicas cubiertas por el Fondo de Protección contra Gastos Catastróficos (FPGC). Página del Seguro Popular visitada el 05 de Abril de 2010
<http://www.seguro-popular.gob.mx/images/contenidos/FPGC/Catalogofpgc.pdf>.
7. Protocolo de la Atención para Leucemia Linfoblástica. Guía Clínica y Esquema de Tratamiento. Página del Seguro Popular en su Programa contra Cáncer en la Infancia y Adolescencia
<http://www.cancerinfantil.gob.mx/recursos/LEUCEMIA.pdf>

8. Rivera Luna R. Editor. Protocolos Técnicos Cáncer en Niños. Consejo Nacional para la prevención y el tratamiento del cáncer en la infancia y la adolescencia. 374 pp. Impreso en México ISBN 978-607-7817-10-9, 2010.
9. Bleyer WA. The clinical pharmacology of methotrexate. New applications for an old drug. *Cancer* 1978; **41**:36-51.
10. Kastrup IB, Worm J, Ralfkiaer E, Hokland P, Guldberg P, Grønbaek K. Genetic and epigenetic alterations of the reduced folate carrier in untreated diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol.* 2008; **80**(1):61-66.
11. van der Straaten RJ, Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Goekoop-Ruiterman YP, Allaart CF, Bogaartz J, Tiller M, Huizinga TW, Guchelaar HJ. Exploratory analysis of four polymorphisms in human GGH and FPGS genes and their effect in methotrexate-treated rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics.* 2007; **8**:141-50.
12. Fabre I, Fabre G, Goldman ID. Polyglutamylation, an important element in methotrexate cytotoxicity and selectivity in tumor versus murine granulocytic progenitor cells in vitro. *Cancer Res* 1984; **44**:3190 – 3195.
13. Rhee MS, Wang Y, Nair MG, Galivan J. Acquisition of resistance to antifolates caused by enhanced γ -glutamyl hydrolase activity. *Cancer Res* 1993; **53**:2227 – 2230.
14. Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP. Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology.* 2000; **47**:247-257.
15. Brattström L, Zhang Y, Hurtig M, Refsum H, Ostensson S, Fransson L, Jones K, Landgren F, Brudin L, Ueland PM. A common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation and longevity. *Atherosclerosis,* 1998; **141**(2):315-319.
16. Fisher MC, Cronstein BN. Metaanalysis of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Polymorphisms affecting methotrexate toxicity. *J. Rheumatol.*, 2009, **36**(3): 539-545.
17. Chiusolo P, Reddiconto G, Casorelli I, Laurenti L, Sora F, Mele L, Annino L, Leone G, Sica S. Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T

homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate. *Ann. Oncol.* 2002; **13**: 1915-1918.

18. Chiusolo P, Reddiconto G, Farina G, Mannocci A, Fiorini A, Palladino M, La Torre G, Fianchi L, Sora F, Laurenti L, Leone G, Sica S. MTHFR polymorphisms' influence on outcome and toxicity in acute lymphoblastic leukemia patients. *Leuk. Res.*, 2007, **31**: 1669-1674.

19. Shimasaki N, Mori T, Torii C, Sato R, Shimada H, Tanigawara Y, Kosaki K, Takahashi T. Influence of MTHFR and RFC1 polymorphisms on toxicities during maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia or lymphoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2008; **30**: 347-352.

20. Gemmati D, Ongaro A, Tognazzo S, Catozzi L, Federici F, Mauro E, Della Porta M, Campioni D, Bardi A, Gilli G, Pellati A, Caruso A, Scapoli GL, De Mattei M. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene variants in adult non-Hodgkin's lymphoma patients: association with toxicity and survival. *Haematologica* 2007; **92**: 478-485.

21. Herrlinger KR, Cummings JR, Barnardo MC, Schwab M, Ahmad T, Jewell DP. The pharmacogenetics of methotrexate in inflammatory bowel disease. *Pharmacogenet. Genomics*, 2005; **15**: 705-711.

22. Goekkurt E, Stoehlmacher J, Stueber C, Wolschke C, Eiermann T, Iacobelli S, Zander AR, Ehninger G, Kroger N. Pharmacogenetic analysis of liver toxicity after busulfan/ cyclophosphamide-based allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Anticancer Res.* 2007; **27**: 4377-4380.

23. Matherly LH, Taub JW, Ravindranath Y, Proefke SA, Wong SC, Gimotty P, Buck S, Wright JE, Rosowsky A. Elevated dihydrofolate reductase and impaired methotrexate transport as elements in methotrexate resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1995, **85**: 500-509.

24. Dulucq S, St-Onge G, Gagne V, Ansari M, Sinnott D, Labuda D, et al. DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood* 2008; **111**:3692–3700.

25. Patino-Garcia A, Zalacain M, Marrodan L, San-Julian M, Sierrasesumaga L. Methotrexate in pediatric osteosarcoma: response and toxicity in relation to

- genetic polymorphisms and dihydrofolate reductase and reduced folate carrier 1 expression. *J. Pediatr.* 2009, **154**: 688-693.
26. Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Walsh M, Kremer J. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; **50**:2766-2774.
27. Laverdière C, Chiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajinovic 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(10):3832-4.
28. Morin I, Devlin AM, Leclerc D. Evaluation of genetic variants in the reduced folate carrier and in glutamate carboxypeptidase II for spina bifida risk. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2003; **79**, 197–200.
29. Dervieux T, Kremer J, Lein DO, Capps R, Barham R, Meyer G, Smith K, Caldwell J, Furst DE. 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.
30. Drozdziak M, Rudas T, Pawlik A, Gornik W, Kurzawski M, Herczynska M. Reduced folate carrier-1 80G>A polymorphism affects methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *The Pharmacogenomics J.* 2007; **7**: 404–407.
31. Gregers J, Christensen J, Dalhoff K, Lausen B, Schroeder H, Rosthøj S, Carlsen N, Schmiegelow J, Peterson C. The association of reduced folate carrier 80GA polymorphism to outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia interacts with chromosome 21 copy number. *Blood*, 2010; **115**: 4671-4677.
32. Yoon SA, Choi JR, Kim JO, Shin JY, Zhang X, Kang JH. Influence of Reduced Folate Carrier and Dihydrofolate Reductase Genes on Methotrexate-Induced Cytotoxicity. *Cancer Res Treat.* 2010; **42**:163-171.
33. Whetstine JR, Gifford AJ, Witt T. Single nucleotide polymorphisms in the human reduced folate carrier: characterization of a high-frequency G/A variant at

position 80 and transport properties of the His(27) and Arg(27) carriers. *Clinical Cancer Research* 2001; **7**:3416–3422.

34. Cheng Q, Wu B, Kager L, Panetta JC, Zheng J, Pui CH, Relling MV, Evans WE. A substrate specific functional polymorphism of human gamma-glutamyl hydrolase alters catalytic activity and methotrexate polyglutamate accumulation in acute lymphoblastic leukaemia cells. *Pharmacogenetics*. 2004; **14**:557-567.

35. Rots MG, Pieters R, Peters GJ, Noordhuis P, van Zantwijk CH, Kaspers GJ, Hählen K, Creutzig U, Veerman AJ, Jansen G. Basal expression of the multidrug resistance gene 1 (MDR-1) is associated with the TT genotype at the polymorphic site C3435T in mammary and ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Lett*. 2002; **185**:79-85.

36. Sharma S, Das M, Kumar A, Marwaha V, Shankar S, Singh P, Raghu P, Aneja R, Grover R, Arya V, Dhir V, Gupta R, Kumar U, Juyal RC, K TB. Purine biosynthetic pathway genes and methotrexate response in rheumatoid arthritis patients among north Indians. *Pharmacogenet Genomics*. 2009 **19**:823-828.

37. Sanghani SP, Sanghani PC, Moran RG. Identification of three key active site residues in the C-terminal domain of human recombinant folylpoly-gamma-glutamate synthetase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*. 1999 Sep 17; **274**(38):27018-27.

38. Liani E, Rothen L, Bunni MA, Smith CA, Jansen G, Assaraf YG. Loss of folylpoly-gamma-glutamate synthetase activity is a dominant mechanism of resistance to polyglutamylation-dependent novel antifolates in multiple human leukemia sublines. *Int J Cancer*. 2003; **103**:587-99.

39. Sauer G, Kafka A, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, Deissler H. Basal expression of the multidrug resistance gene 1 (MDR-1) is associated with the TT genotype at the polymorphic site C3435T in mammary and ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Lett*. 2002; **185**:79-85.

40. Kafka A, Sauer G, Jaeger C, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, Deissler H. Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int J Oncol*. 2003; **22**:1117-21.

41. Kishi S, Yang W, Boureau B, Morand S, Das S, Chen P, Cook EH, Rosner GL, Schuetz E, Pui CH, Relling MV. Effects of prednisone and genetic polymorphisms on etoposide disposition in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2004; **103**:67-72.
42. Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, Brinkmann U, Smith A, Goldstein DB, Wood NW, Sisodiya SM. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *N Engl J Med*. 2003; **348**:1442-1448.
43. Leal-Ugarte E, Gutiérrez-Angulo M, Macías-Gómez NM, Peralta-Leal V, Durán-González J, De La Luz Ayala-Madrigal M, Partida-Pérez M, Barros-Núñez P, Ruiz-Díaz D, Moreno-Ortiz JM, Peregrina-Sandoval J, Meza-Espinoza JP. MDR1 C3435T polymorphism in Mexican children with acute lymphoblastic leukemia and in healthy individuals. *Hum Biol*. 2008; **80**:449-455.
44. Kondo C, Suzuki H, Itoda M, Ozawa S, Sawada J, Kobayashi D, Ieiri I, Mine K, Ohtsubo K, Sugiyama Y. Functional analysis of SNPs variants of BCRP/ABCG2. *Pharm Res*. 2004; **21**:1895-1903.
45. Ishikawa T, Nakagawa H. Human ABC transporter ABCG2 in cancer chemotherapy and pharmacogenomics. *J Exp Ther Oncol*. 2009; **8**:5-24.
46. Imai, Y., Nakane, M., Kage, K., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T. C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2002; **1**: 611–616.
47. Hu LL, Wang XX, Chen X, Chang J, Li C, Zhang Y, Yang J, Jiang W, Zhuang SM. BCRP gene polymorphisms are associated with susceptibility and survival of diffuse large B-cell lymphoma. *Carcinogenesis*. 2007; **28**:1740-1744.
48. Assadullahi TP, Dagli E, Warner JO. High-performance liquid chromatography method for serum methotrexate levels in children with severe steroid-dependent asthma. *J Chromatogr*. 1991; **565**:349-356.
49. Cotte S, von Ahsen N, Kruse N, Huber B, Winkelmann A, Zettl UK, Starck M, König N, Tellez N, Dörr J, Paul F, Zipp F, Lühder F, Koepsell H, Pannek H, Montalban X, Gold R, Chan A. ABC-transporter gene-polymorphisms are

potential pharmacogenetic markers for mitoxantrone response in multiple sclerosis. *Brain*. 2009; **132**:2517-30.

50. Baslund B, Gregers J, Nielsen CH. Reduced folate carrier polymorphism determines methotrexate uptake by B cells and CD4+ T cells. *Rheumatology* 2008; **47**:451-3

51. Hayashi H, Fijimaki C, Inoue K, Suzuki T, Itoh K. Genetic polymorphism of C452T (%12I) in human gamma glutamyl hydrolase in a Japanese population. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(4):839-41

52. Wang SM, Sun LL, Zeng WX, Wu WS, Zhang GL. Influence of genetic polymorphisms of FPGS, GGH and MTHFR on serum methotrexate levels in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014;74(2):283-9

53. Organista J, Gómez Y, Saavedra M, Rivera A, Terán M, Alarcón L et al. Polymorphisms of the γ glutamyl hydrolase gene and risk of relapse to acutelymphoblastic leukemia in Mexico. *Leukemia Research* 2010(34) 728-732.

54. Liu SG, Gao C, Zhang RD, Jiao Y, Cui L, Li WJ et al. FPGS rs1544105 polymorphism is associated with treatment outcome in pediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell Int*. 2013;13(1):107

ANEXOS

Carta de consentimiento informado



Yo C. _____ doy fe que he sido informado(a) e invitado(a) a participar en el protocolo: "Farmacogenética del transporte de metotrexato y su relación con las concentraciones del fármaco en pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda", el cual está enfocado en conocer la cantidad del fármaco metotrexato presente en el paciente después de haber sido administrado para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda; así mismo, busca identificar componentes genéticos que afectan la cantidad de fármaco y su eficacia.

He sido notificado que el estudio ha sido aprobado por los Comités de Investigación y de Ética del INP con número de registro OXX/2012. Me han informado que para el estudio es necesaria la toma de 5 mL de sangre el día en el que se administre el metotrexato y tres tomas de sangre más a las 24, 36 y 42 horas de que se inyectó el medicamento.

Me indicaron que las tomas realizadas a las 24 y 42 h forman parte del tratamiento y se requieren para medir la cantidad de metotrexato en forma rutinaria. He sido informado que una de las muestras se usará para obtener el material genético (ADN), el cual será utilizado para el análisis genético. Me indicaron que el ADN sólo será usado para este estudio y almacenado por 2 años para posteriormente eliminarlo. Se me comunicó que las tomas de muestra serán realizadas por personal capacitado y que la punción venosa es de riesgo mínimo de acuerdo al reglamento de la Ley General de Salud (Artículo 17).

Entiendo que mi participación en el estudio es voluntaria y no tendrá costo. Declaro que no recibiré pagos o bonificaciones por participar en el proyecto. Soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento y sin que esto tenga consecuencia alguna.

Los investigadores responsables se han comprometido a manejar la información en forma confidencial los resultados del estudio y a proteger la identidad de mi hijo(a). He leído y entendido todo lo antes escrito, los investigadores me han dado información suficiente y han resuelto mis dudas y me han indicado que están en la disposición de responder todas las que tenga durante el avance del proyecto.

Por lo anterior doy mi conformidad para que mi hijo(a) participe en este estudio.

Firmas

Nombre del Participante

Nombre y firma del Padre o Tutor

Nombre y firma de la Madre o Tutor

Nombre y firma del testigo no. 1

Nombre y firma del testigo no.2

Nombre y firma del Investigador responsable

Fecha

Responsables: Dr. Juan Luis Chávez Pacheco Ext. 1426 Dr. Martín Pérez García Ext. QFB. Francisco Juárez Nicolás Ext. 1855 QFB. Hugo Juárez Olguín Ext. 1428

Para mayor información puede contactar a la Dra. Matilde Ruíz, presidente del Comité de Ética, Tel. 10840800 Ext. 1851

Consentimiento Informado Protocolo 085/2011 Folio XXX Hoja 1 de 1

Carta de asentimiento informado.



Yo C. _____ en mi calidad de paciente del Instituto Nacional de Pediatría declaro que he sido invitado a participar en el protocolo "Farmacogenética del transporte de metotrexato y su relación con las concentraciones del fármaco en pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda", el cual está enfocado en conocer la cantidad del fármaco metotrexato presente en el paciente después de haber sido administrado para el tratamiento de la leucemia; así mismo, busca identificar componentes genéticos que afectan la cantidad de fármaco y su eficacia.

Me informaron que mi participación implica la toma de 5 mL de sangre en el día que acuda a quimioterapia y que son necesarias 3 tomas después de que me inyecten el medicamento. Me comentaron que 2 de las muestras se toman de rutina en mi tratamiento y se utilizan para medir la cantidad de medicamento que hay en mi cuerpo.

El investigador me indicó que en las muestras se medirá la cantidad de metotrexato y se obtendrá mi material genético (DNA) para los objetivos de este estudio. Mi DNA solo se usará para este estudio y después de 2 años lo eliminarán. Me explicaron que la obtención de sangre será hecha por enfermeras y/o personal capacitado y que esto es de bajo riesgo para mí.

He sido informado de que mi participación es voluntaria y mis papás no deberán pagar nada por este estudio. Soy libre de retirarme del proyecto en el momento que lo decida sin que esto afecte mi tratamiento. Declaro que no recibiré pago o beneficio alguno por mi participación.

Los investigadores responsables se han comprometido a manejar los resultados del estudio en forma confidencial y a proteger mi identidad. He leído y entendido todo lo antes escrito, los investigadores me han dado información suficiente y han resuelto mis dudas y me han indicado que están en la disposición de responder todas las que tenga durante el avance del proyecto.

Firmas

Nombre del Participante

Nombre y firma del Padre o Tutor

Nombre y firma de la Madre o Tutor

Nombre y firma del testigo no. 1

Nombre y firma del testigo no.2

Nombre y firma del Investigador responsable

Fecha

Responsables: Dr. Juan Luis Chávez Pacheco Ext. 1426 Dr. Martín Pérez García Ext.
QFB. Francisco Juárez Nicolás Ext. 1655 QFB. Hugo Juárez Olguín Ext. 1428

Para mayor información puede contactar a la Dra. Matilde Ruiz, presidente del Comité de Ética,
Tel. 10840900 Ext. 1851

ANEXO 2. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

Farmacogenética del transporte de metotrexato y su relación con las concentraciones del fármaco en pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda



Responsables:

Dr. Juan Luis Chávez Pacheco Lab. de Farmacología Ext. 1428
Dr. Martín Pérez García Servicio de Oncología Ext.
QFB. Francisco Juárez Nicolás Lab. de Inmunogenética Molecular Ext. 1655
Dr. Hugo Juárez Olguín Lab. de Farmacología Ext. 1428

Datos personales:

Fecha: _____ Iniciales del paciente: _____ Clave del paciente: _____
Día Mes Año

Nombre: _____ Edad: ____ Sexo: M
F

¿Se diagnosticó leucemia linfoblástica aguda?

Si No

Fecha del diagnóstico: _____

El tipo de riesgo es: Bajo Habitual Alto Muy alto

El paciente ha recibido transfusión de sangre en los 8 meses previos a la fecha:

Si No

¿Ha presentado falla hepática o renal previa a este estudio?

Si No

¿El padre o tutor otorgó el Consentimiento Informado?

Si No

¿Si el paciente es mayor de 10 años ha dado su Asentimiento Informado?

Si No

El paciente se encuentra en fase de consolidación

Si No

Clave del paciente _____ Ciclo _____

Dosis de metotrexato calculada _____ g/Kg/m²sc

Dosis de metotrexato administrada _____ g/Kg/m²sc



Datos clínicos

1.- Signos vitales

Peso _____ Kg Talla _____ cm IMC _____

Temperatura corporal _____ °C Presión arterial _____ mmHg

Frecuencia cardíaca _____ latidos/minuto

2.- Análisis de laboratorio

Fecha de toma de muestra

Fecha de resultados

_____/_____/_____
Día Mes Año

_____/_____/_____
Día Mes Año

Hematocrito _____ (%) Hemoglobina _____ (g/dL)

Eritrocitos _____ (10¹²/L) VCM _____ fL

Plaquetas _____ (10⁹/L) Leucocitos _____ (10⁹/L)

Neutrófilos _____ % Linfocitos _____ % Monocitos _____ %

Eosinófilos _____ % Basófilos _____ %

Alanina transaminasa _____ (mU/mL)

Aspartato transaminasa _____ (mU/mL)

Creatinina _____ (mg/dL) Nitrógeno ureico _____ (mg/dL)

3.- Fármacos concomitantes administrados en la fase de consolidación

- 1) _____ Dosis _____ 2) _____ Dosis _____
3) _____ Dosis _____ 4) _____ Dosis _____
5) _____ Dosis _____ 6) _____ Dosis _____
7) _____ Dosis _____ 8) _____ Dosis _____
9) _____ Dosis _____ 10) _____ Dosis _____

4.- Reacciones adversas observadas antes o durante la administración del fármaco:

Nausea Si No Vomito Si No

5. Determinación de metotrexato

Nivel en sangre (total) _____ (µg/mL)

Nivel en plasma (libre) _____ (µg/mL)

Nivel intraleucocitario _____ (ng/mL)

Observaciones:

Tablas

Tabla 1. Distribución por rangos etáreos de los pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA.

<2 años	2-10 años	>10 años	Total
2	15	10	27
7%	56%	37%	100%

Tabla 2. Distribución por sexo de los pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA.

Femenino	Masculino	Total
10	17	27
37%	63%	100%

Tabla 3. Distribución por lugar de procedencia de los pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA.

Procedencia	N°	%
Ciudad de México	11	41%
Edo México	11	41%
Hidalgo	1	4%
Guanajuato	1	4%
Morelos	1	4%
Oaxaca	1	4%
Baja California	1	4%
Total	27	100%

Tabla 4. Distribución de los pacientes pediátricos según riesgo al diagnóstico de LLA

Alto	Habitual	Total
25	2	27
93%	7%	100%

Tabla 5. Dosis de metotrexato administrada durante la consolidación a los pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA

2gm2do	5gm2do	Total
5	22	27
19%	81%	100%

Tabla 6. Concentración de metotrexato en sangre y plasma de pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA. Datos presentados en $\mu\text{mol/L}$ de fármaco.

	SANGRE TOTAL ($\mu\text{mol/L}$)			PLASMA ($\mu\text{mol/L}$)		
	2HRS	24HRS	36HRS	2HRS	24HRS	36HRS
LAL-1	53.35	7.00	0.66	80.95	10.40	0.91
LAL-6	41.82	14.58	0.69	59.53	20.24	0.89
LAL-8	38.17	9.39	1.00	46.10	9.81	0.36
LAL-10	22.93	18.48	0.41	33.85	14.52	20.34
LAL-11	33.73	2.92	1.27	62.71	0.00	2.05
LAL-14	6.91	0.43	0.22	17.75	0.32	0.32
LAL-19		32.87	1.04	17.47	24.46	1.31
LAL-21	35.22	37.36	0.72	51.81	55.54	0.66
LAL-22	27.58	16.24	0.40	29.18	15.62	1.75
LAL-23	44.43	22.75	2.03	37.87	29.82	1.46
LAL-24	49.13	25.40	1.28	57.02	40.81	1.90
LAL-25	37.70	0.90	0.67	60.59	26.37	0.85
LAL-26	77.83	24.14	1.60	82.37	1.19	1.19
LAL-28	68.24	2.44	0.00	59.57	2.41	1.39
LAL-30	23.29	16.16	0.51	21.62	11.59	0.25
LAL-31	90.21	27.57	0.28	78.65	25.73	2.27
LAL-32	13.71	3.39	1.38	23.71	5.65	0.64
LAL-38	60.08	44.24	0.52	50.79	39.05	2.10
LAL-39	4.56	4.02	2.87	35.29	5.29	4.88
LAL-41	9.43	9.44	0.37	19.73	11.44	0.40
LAL-1M	17.01	7.86	0.11	36.76	33.60	1.11
LAL-2M	11.79	1.08	0.05	27.27	22.12	0.19
LAL-3M	30.47	9.07	0.52	21.92	15.44	0.48
LAL-7M	10.54	3.92	1.65	22.23	6.31	1.26
LAL-8M	19.69	2.44	0.41	39.29	1.59	1.46
LAL-9M	11.73	1.76	1.61	33.39	1.44	0.77
LAL-10M	12.37	1.89	1.72	23.99	1.98	1.77

Tabla 7. Determinación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de los genes FPGS (rs1544105) y GGH (rs3758149).

	Polimorfismos	
	rs358149	rs1544105
LAL-1	CT	GG
LAL-6	CC	GG
LAL-8	TT	GG
LAL-10	CC	GG
LAL-11	CC	AA
LAL-14	CT	GG
LAL-19	CT	AA
LAL-21	CC	GG
LAL-22	TT	GG
LAL-23	CT	GG
LAL-24	CT	AG
LAL-25	CT	GG
LAL-26	TT	AG
LAL-28	CT	GG
LAL-30	CT	GG
LAL-31	CC	AG
LAL-32	CC	GG
LAL-38	CT	GG
LAL-39	CT	GG
LAL-41	CT	AG
LAL-1M	CT	GG
LAL-2M	CC	AG
LAL-3M	CC	GG
LAL-7M	U	U
LAL-8M	U	U
LAL-9M	CT	AG
LAL-10M	TT	GG

Tabla 8. Distribución por genotipo de y frecuencia génica del alelos del polimorfismo rs3758149

GENOTIPO	CC	CT	TT
PACIENTES	8	13	4
FRECUENCIA			
ALELICA	0.58		0.42

*Calculada con 25 pacientes dado que en 2 de los analizados el ensayo de discriminación de alelos no arrojó resultados.

Tabla 9. Distribución por genotipo de y frecuencia génica del alelos del polimorfismo rs1544105

GENOTIPO	GG	AG	AA
PACIENTES	17	6	2
FRECUENCIA			
ALELICA	0.8		0.2

*Calculada con 25 pacientes dado que en 2 de los analizados el ensayo de discriminación de alelos no arrojó resultados.

Gráficos

Gráfico 1. Distribución por rangos etáreos de los pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA.

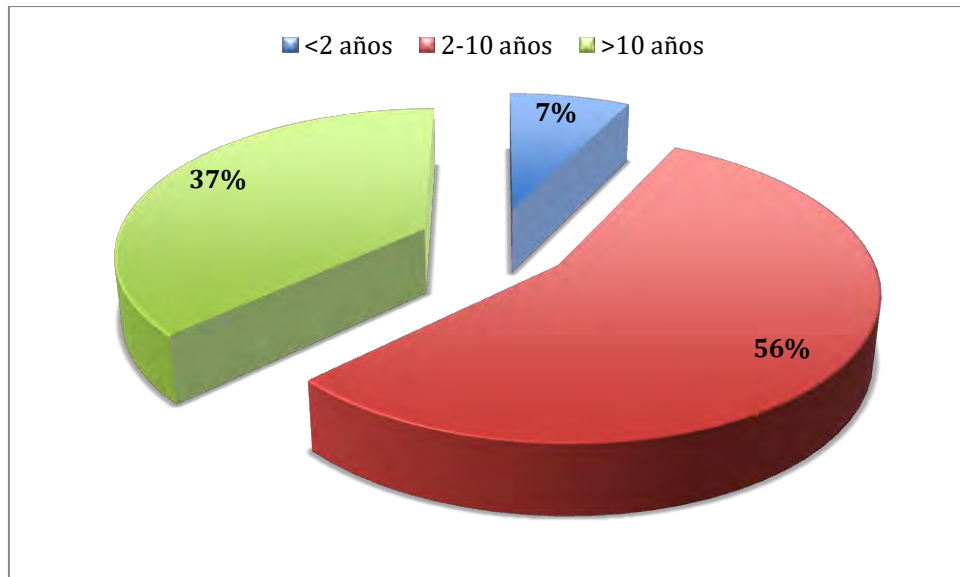


Gráfico 2. Distribución por sexo de los pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA.

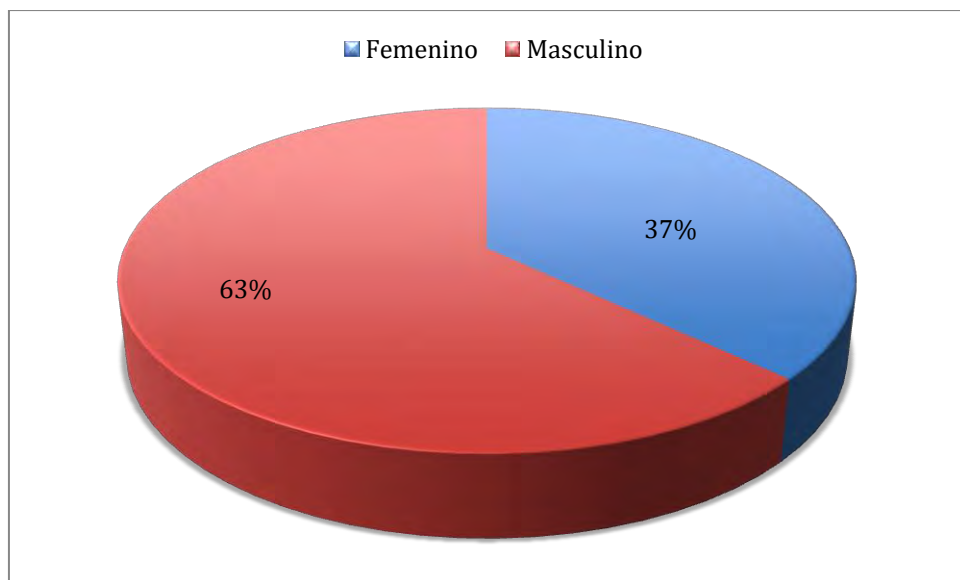


Gráfico 3. Distribución por lugar de procedencia de los pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA.

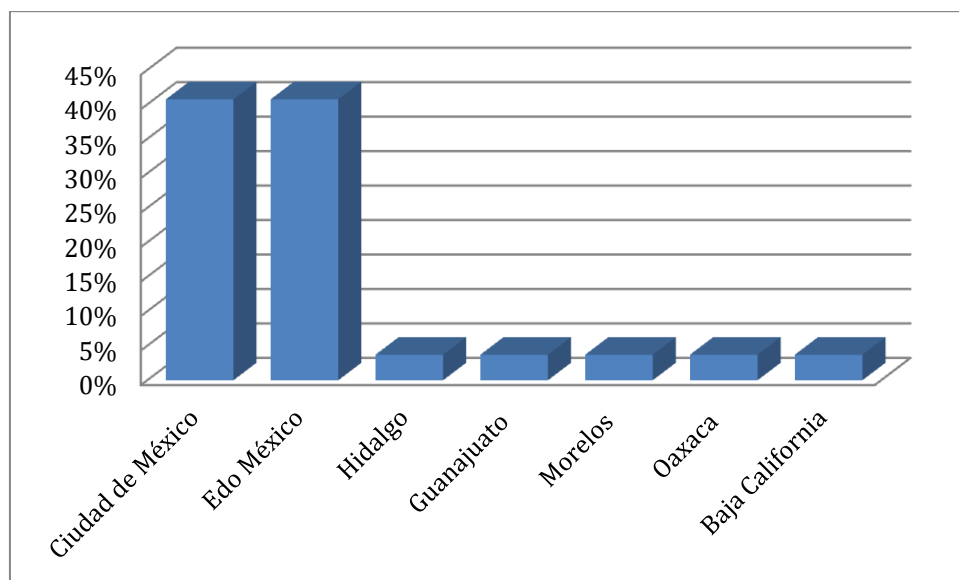


Gráfico 4. Distribución de los pacientes pediátricos según riesgo al diagnóstico de LLA

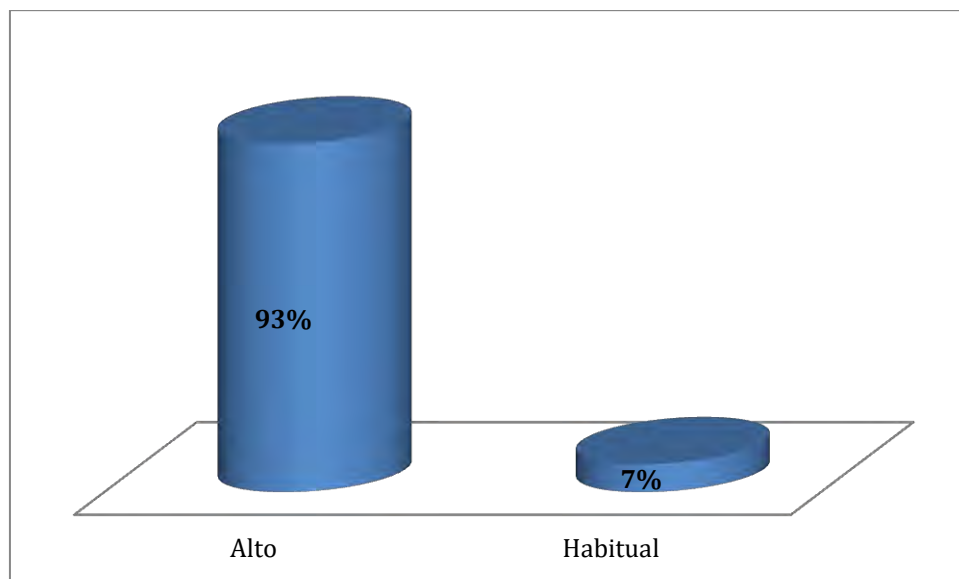


Gráfico 5. Dosis de metotrexato administrada durante la consolidación a los pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA

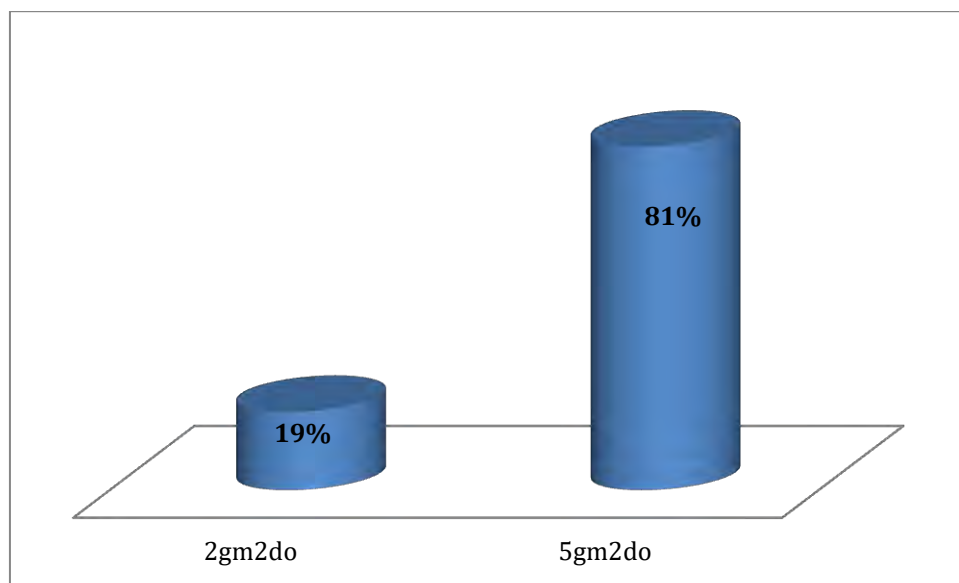


Gráfico 6. Concentración de metotrexato en plasma de pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA. Datos presentados en umol/L de fármaco.

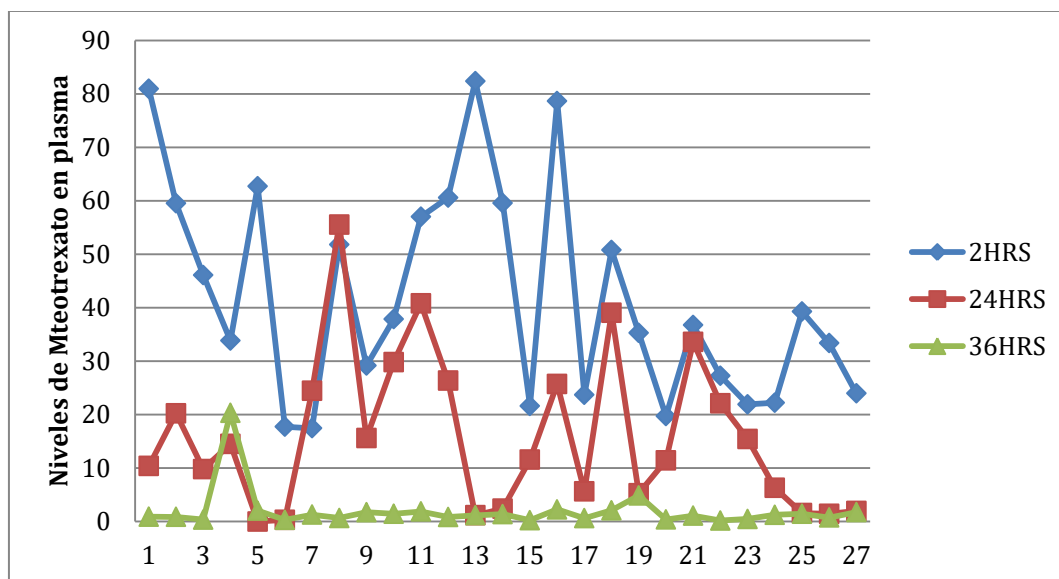
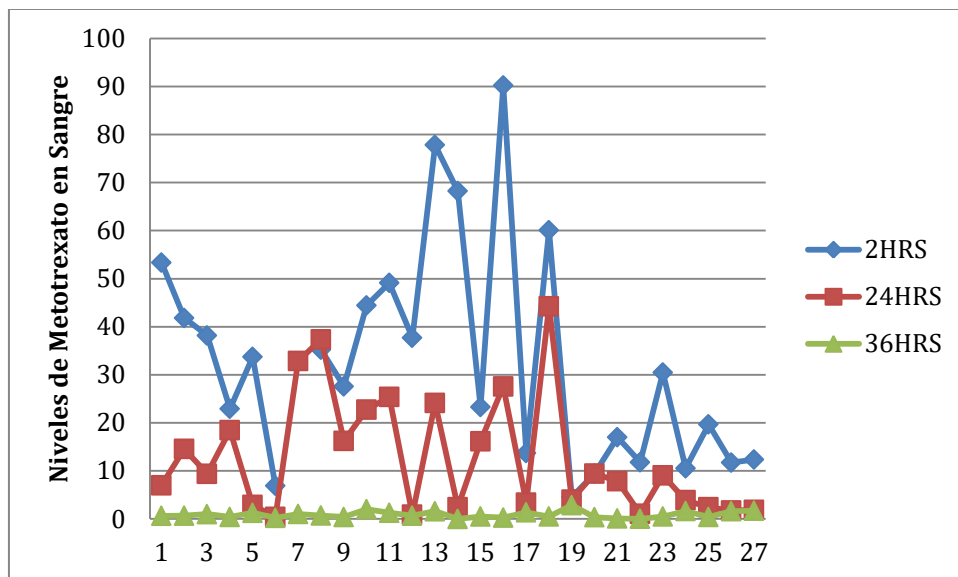
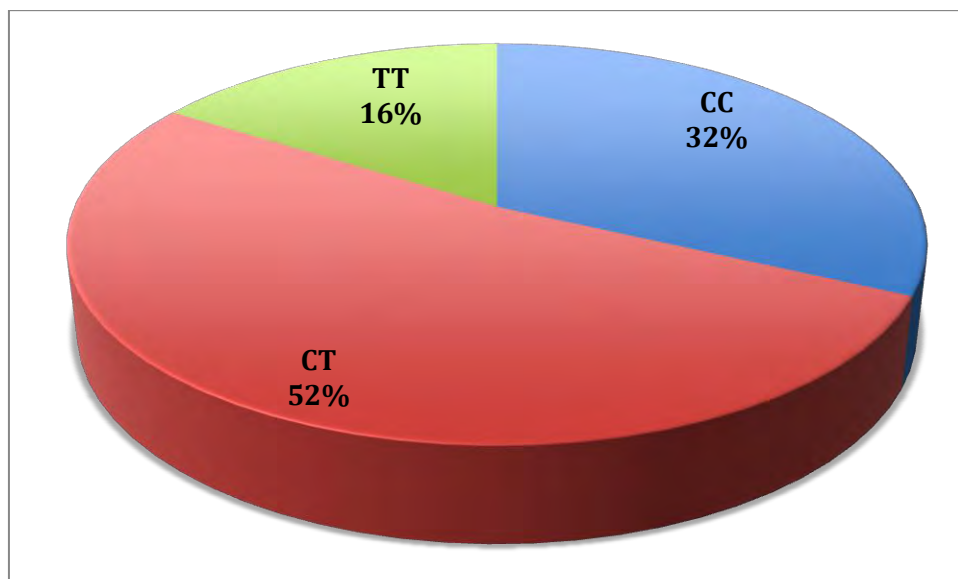


Gráfico 7. Concentración de metotrexato en plasma de pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA. Datos presentados en $\mu\text{mol/L}$ de fármaco.



Gráfica 8. Distribución por genotipo del alelos del polimorfismo rs3758149



Gráfica 9. Distribución por genotipo del alelos del polimorfismo rs1544105

