



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

T E S I S

ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN
MDM2 Y P53 CON EL RIESGO DE SEGUNDAS
NEOPLASIAS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS
SOBREVIVIENTES DE CÁNCER

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN :

ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA

P R E S E N T A:

Dra. Pamela Dennis Montenegro Chahar

TUTOR:

Dra. Gabriela Hernández Pliego



CIUDAD DE MÉXICO

FEBRERO 2020



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.

HOJA DE FIRMAS

Dr. Sarbelio Moreno Espinosa

Director de Enseñanza y Desarrollo Académico


Tutora de tesis: Dra. Gabriela Hernández Pliego

Medico Adscrito al Departamento de Oncología Pediátrica

Hospital Infantil de México Federico Gómez


Tutor Metodológico Dr. Miguel Angel Palomo Colli

Medico Adscrito al Departamento de Oncología Pediátrica

Hospital Infantil de México Federico Gómez

DEDICATORIA:

A mi viejito, por ser el angel que Dios me regalo....

A mi familia, por el apoyo, paciencia y confianza brindada

Que vencio distancias.....

Dra. Gaby y Dr. Palomo, por toda la enseñanza desinteresada.....

Gracias Totales.

La presente tesis fue desarrollada con financiamiento de proyectos de investigación con Fondos Federales con numero de Registro: HIM/2017/127.

INDICE

a. Resumen	6
b. Antecedentes	7
c. Marco Teorico	8
d. Planteamiento del Problema	12
e. Justificación	13
f. Hipótesis	13
g. Objetivo General	13
h. Objetivos específicos	13
i. Metodología	14
j. Plan de analisis estadístico	14
k. Descripción de variables	18
l. Resultados del estudio	21
m. Discusión	27
n. Conclusión	28
o. Cronograma de actividades	29
p. Refererencias	30
q. Limitación del estudio	33
r. Anexo 1. Cartas de Consentimiento informado y Asentimiento Informado	34

Asociación de los polimorfismos del gen MDM2 y P53 con el riesgo de segundas neoplasias en pacientes pediátricos sobrevivientes de cáncer.

Resumen:

Antecedentes: Recientes estudios han mostrado que los polimorfismos del gen MDM2 T309G y del gen P53 Arg72Pro pueden estar asociados con la susceptibilidad a diversos tipos de cáncer. El P53 es una molécula que previene el desarrollo de cáncer vía apoptosis siendo MDM2 su principal regulador negativo. Es por esto que variantes genéticas en ambas moléculas pueden afectar las vías de señalización contribuyendo al inicio y progresión de un tumor. El polimorfismo Arg72Pro del gen P53 presenta una variante Pro72 que produce una disminución en la función de la proteína P53 como inductor de apoptosis en comparación con el alelo silvestre Arg72, asociándose con un mal pronóstico. Por otra parte el polimorfismo T309G, en la región promotora de MDM2 puede elevar la expresión de la proteína debido a que el genotipo variable 309GG incrementa la transcripción del gen asociándose con el desarrollo y mal pronóstico en diversos tipos de cáncer. **Planteamiento del problema:** En México, el cáncer es la segunda causa de muerte en población pediátrica. En la actualidad la tasa de supervivencia en los niños es del 80-85%. Se estima que aproximadamente el 30% de los supervivientes de cáncer tendrán una condición de salud deficiente desarrollando patologías crónicas diversas además el riesgo de segunda neoplasia (SN) de un paciente sobreviviente de cáncer, aumenta 10 veces más que en la población en general. Aunque se sabe que la exposición a quimioterapia y radioterapia previa son los principales factores descritos para presentar una SN, se debe considerar que pudieran coexistir otros factores que hacen al paciente susceptible a presentar dicha patología, entre los factores que se han descrito pueden ser las variantes genéticas en genes clave como el P53 y MDM2. **Justificación:** Es importante realizar investigaciones que nos permitan identificar, biomarcadores genéticos de riesgo a desarrollar segundas neoplasias que contribuyan a identificar una población de niños susceptible al desarrollo de una SN, lo cual permitiría al oncólogo pediatra realizar una vigilancia estrecha de dichos pacientes, encaminada a detecciones tempranas, que permitan brindar tratamiento oportuno, consejo genético y medidas para evitar conductas de riesgo, mejorando la supervivencia y calidad de vida de dichos pacientes. El análisis de polimorfismos en los genes P53 y MDM2 de dos proteínas clave involucradas en la génesis del cáncer es importante ya que se ha sugerido que dichas variaciones pueden producir desregulaciones en vías de señalización de P53 trascendentales en el desarrollo de neoplasias. **Objetivo:** Evaluar la asociación de los polimorfismos T309G del gen MDM2 y el Arg72Pro del gen P53 con el riesgo de desarrollar segundas neoplasias en pacientes pediátricos sobrevivientes de cáncer. **Hipótesis:** Los pacientes sobrevivientes de cáncer con genotipo homocigoto variable del gen MDM2 y P53 presentarán mayor riesgo de desarrollar segundas neoplasias, en comparación con aquellos pacientes con alelos silvestres. **Metodología:** El presente, es un estudio observacional analítico de casos y controles. Se buscará la asociación entre genotipo identificado en cada caso y el riesgo de desarrollo de segundas neoplasias en pacientes pediátricos sobrevivientes de cáncer. El grupo de casos incluirá sobrevivientes de cáncer que desarrollaron segundas neoplasias y el grupo control sobrevivientes de cáncer sin desarrollo de segundas neoplasia. Se determinarán los polimorfismos genéticos por medio de la técnica de PCR-RFLP. **Plan de Análisis:** Se realizará estadística descriptiva e inferencial de los datos obtenidos, utilizando

frecuencias y proporciones. Se establecerá el riesgo de desarrollar segundas neoplasias, con la comparación entre el grupo de casos y el grupo control, estableciendo riesgos relativos (RR). Las probabilidades de supervivencia, de acuerdo al genotipo identificado serán estimadas utilizando el método de Kaplan-Meier y comparadas con la prueba "log-rank". Utilizando el programas estadísticos SPSS. La diferencia significativa se considerará con una $P < 0.05$.

Antecedentes

El cáncer es la segunda causa de mortalidad infantil en niños mayores de 4 años de edad, solo superada por los accidentes. En México, el cáncer en niños pasó del decimotercer lugar como causa de muerte en 1971, al segundo lugar entre la población de 1 a 14 años a partir del año 2000^{1,2}. En México, el cáncer infantil tiene una incidencia de 122 casos nuevos por cada millón de habitantes al año en niños menores de 15 años de edad, representando el 5% de todos los padecimientos malignos de la población en general, situándonos a nivel mundial en el tercer lugar de incidencia, solo superados por Estados Unidos de América y Canadá.¹⁻⁵

De todos los tipos de cáncer, las leucemias son las más comunes con 50.6% de prevalencia, seguidos por los linfomas con 10%, tumores del sistema nervioso central 8.9%, retinoblastoma 3.7% osteosarcoma 4.9%, y tumor de Wilms 3.5%, y otros tipos de cáncer en 19.4%.^{1,4,6,7} Sin embargo, la tasa de supervivencia global a 5 años ha mejorado en las últimas 3 décadas, de 58.1% de casos entre 1975 a 1977, a 82.5% para los diagnosticados de 2001 a 2007.⁸⁻⁹ Esta mejoría se refleja en el aumento de la población superviviente de cáncer. En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Pediatría se reportó que en el año de 1997 había 681 supervivientes de cáncer, mientras que en el año de 2003 aumento a 1194, con una media anual de 83 supervivientes por año.¹⁰

Los niños supervivientes de cáncer pueden volver a ser saludables y tener un crecimiento y desarrollo normales, pero también pueden experimentar efectos tardíos del cáncer o del tratamiento que les permitió sobrevivir, estando en riesgo de sufrir anomalías funcionales y psicosociales.¹¹

Los supervivientes de cáncer tienen un riesgo 10 veces mayor que la población general de volver a presentar cáncer. Entre las segundas neoplasias más comunes se encuentran el cáncer de mama, de sistema nervioso central, hueso, tiroides, tejidos blandos, melanoma y leucemia mieloide aguda.^{12,13,14}

Marco Teorico

Segundas Neoplasias Malignas (SNM)

Las segundas neoplasias malignas (SNM) se definen como neoplasias histológicamente distintas, desarrollándose al menos 2 meses después de completar el tratamiento para la neoplasia maligna primaria. La incidencia acumulada de SNMs supera el 20% a los 30 años después del diagnóstico del cáncer primario¹⁵. La incidencia acumulada es del 9% para el cáncer de piel no melanoma (CPNM) y del 3% para el meningioma. La incidencia acumulada es del 8% para las SNM excluyendo CPNM; esto representa un riesgo seis veces mayor de SMN entre los sobrevivientes de cáncer, en comparación con la población general. El riesgo es evidente en todos los diagnósticos primarios, siendo el más alto para el Linfoma de Hodgkin y Sarcoma de Ewing (8.7 veces y 8.5 veces en comparación con la población general, respectivamente). El tratamiento con radioterapia y agentes quimioterapéuticos específicos se asocia con un mayor riesgo de SNMs. El cáncer de mama es la SNM más común, seguido por el cáncer de tiroides¹⁵. Las SNMs son la principal causa de mortalidad tardía que no son originadas por la recurrencia de la neoplasia primaria¹⁶. El riesgo de SNMs se mantiene elevado durante más de 20 años a partir del diagnóstico del cáncer primario. Múltiples SNM subsecuentes son comunes entre los supervivientes de cáncer infantil debido al envejecimiento. La incidencia acumulada de una segunda neoplasia (SNM2) fue reportada como 47% a los 20 años después de la primera SMN (SNM1). Una SN1 de Cáncer de piel no melanoma (CPNM) identifica una población de alto riesgo para una posterior SNM invasiva¹⁷.

La incidencia y tipo de SNMs difieren con el diagnóstico de la neoplasia primaria, el tipo de tratamiento recibido y la presencia de condiciones genéticas¹⁸⁻²¹. Asociaciones con exposiciones terapéuticas específicas han dado lugar a la clasificación de SNMs en dos grupos: (a) mielodisplasia relacionada con quimioterapia y leucemia mieloide aguda (t SMD/LMA); y (b) SNM sólidas relacionadas con radiación. Las características de tSMD / LMA incluyen una latencia corta (<3 años desde el diagnóstico primario de cáncer) y la asociación con agentes alquilantes y/o inhibidores de la topoisomerasa II. Las SNM sólidas tienen una fuerte asociación, bien definida con la radiación y se caracterizan por una latencia que excede 10 años²².

Bathia y col. describieron el patrón y la incidencia de SNM en una cohorte de 1,136 pacientes pediátricos con diagnóstico de Linfoma de Hodgkin con una media de edad de 11 años, seguidos durante una mediana de 26.8 años, mostrando claramente que el riesgo de tumores sólidos continúa aumentando con los años del seguimiento, mientras que los tSMD/LMA presentan una meseta después de los 10 a 15 años del seguimiento²³.

Los supervivientes de cáncer tienen un riesgo mayor que la población general de volver a presentar cáncer. Neglia y cols. reportaron 314 pacientes de 13,581 sobrevivientes de cáncer diagnosticados antes de los 21 años de edad, a los 5 años de seguimiento, tratados 25 instituciones de E.U.A y Canadá, desarrollaron SNMs²⁴. En un análisis, Friedman y cols. estimaron una incidencia acumulada de 5,2% de desarrollar cáncer después de un diagnóstico de cáncer primario a 20 años de seguimiento, también reporta

que a medida que los sobrevivientes de cáncer infantil progresan a la edad adulta, aumenta el riesgo de neoplasias posteriores y no encontró evidencia de reducción del riesgo con el aumento de la duración del seguimiento¹⁵. Por su parte Mertens y cols. analizaron la mortalidad de una cohorte de 1,727 sobrevivientes a cinco años de seguimiento, en la cual la principal causa de muerte fue en el 67.4%. la recurrencia de la enfermedad primaria, el 21.3% muerte atribuible a causas relacionadas con el tratamiento y el 12.7%. muerte relacionada a SNM. Además reporto la exposición a la radioterapia como el factor de predisposición más frecuente a SNM, seguido de casos atribuibles a quimioterapia o predisposición genética²⁵.

Con la finalidad de dar seguimiento médico a la creciente población de supervivientes, es importante entender las relaciones entre el huésped, el tratamiento antineoplásico y el posterior desarrollo de SNM. Existen hallazgos sobre la influencia de las características individuales del paciente, el diagnóstico específico y el tratamiento inicial en el desarrollo de SNM, sin embargo, el conocimiento está limitado, por el corto período de seguimiento de los supervivientes. Por lo que son necesarios estudios con supervivientes de cáncer con seguimiento largo, que permita estudiar y comprender cómo los procesos normales de envejecimiento, afectan el desarrollo de SNM tras el cáncer infantil ^{24,25}.

Patogénesis de las segundas neoplasias malignas.

Se ha establecido el papel de la quimioterapia y la radiación en el desarrollo de las segundas neoplasias, la variabilidad interindividual observada en el riesgo sugiere un papel importante de la variación genética en la susceptibilidad a exposiciones genotóxicas. La susceptibilidad genética que confiere un aumento del riesgo de cáncer como el síndrome de LiFraumeni y la anemia de Fanconi, podrían ser un factor de riesgo para el desarrollo de SNM²⁶⁻²⁸. Estudios en sobrevivientes de cáncer infantil con antecedentes familiares de cáncer, y con la presencia de síndrome de LiFraumeni, reportan un mayor riesgo de desarrollar SNM en estos pacientes^{29,30}.

La variabilidad interindividual en el riesgo de SNMs esta probablemente relacionada con polimorfismos en genes que regulan apoptosis, proliferación celular, reparación del ADN, metabolismo de fármacos citotóxicos y agentes genotóxicos²⁹⁻³¹. Además polimorfismos en genes implicados en el metabolismo y transporte de fármacos son relevantes para determinar la supervivencia libre de enfermedad y la toxicidad de diversos fármacos ³². La variación en la reparación del ADN, apoptosis y proliferación celular desempeña un papel importante en la susceptibilidad de cáncer de novo, también modifica probablemente el riesgo de SNM después de exposición a agentes dañinos del ADN, como la radiación y la quimioterapia ^{22,29,32}. La predisposición genética y su interacción con exposiciones terapéuticas con fármacos antineoplásicos pueden potencialmente exacerbar el efecto tóxico del tratamiento en tejidos normales.

La comprensión de las vías etiopatogénicas que conducen a SNM es fundamental en el desarrollo de estrategias de prevención e intervención específicas, para la

optimización de la atención médica basada en el riesgo de los sobrevivientes de cáncer, con el fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Funciones de p53.

El supresor tumoral p53 es un factor clave en las respuestas al estrés que preservan la estabilidad genómica, respondiendo a una variedad de agresiones, incluyendo daño al DNA, hipoxia, estrés metabólico, y activación de oncogenes³³. El mecanismo más documentado por el cual p53 ejerce sus funciones protectoras es como un factor de transcripción, mediante la unión a elementos de respuesta específicos en el DNA, p53 modula las transcripciones de genes que gobiernan las principales defensas contra el crecimiento tumoral, que incluyen la detención del ciclo celular, la apoptosis, el mantenimiento de la integridad genética, la inhibición de la angiogénesis y la senescencia celular. p53 también interactúa con numerosas proteínas celulares, incluyendo varias que controlan la muerte celular programada, y estas interacciones moleculares pueden contribuir al papel inhibitorio de p53 en la tumorigénesis³³⁻³⁴.

El mal funcionamiento de la vía de señalización de p53 es una característica frecuente en los tumores humanos. Las mutaciones somáticas y los polimorfismos genéticos de p53 que dan como resultado la ausencia o alteración en la función de p53, es uno de los mecanismos más comunes por el cual la vía de p53 se encuentra dañada durante la tumorigénesis. La alteración en las funciones de p53 también se asocia con un pronóstico desfavorable en algunos tipos de cáncer³³⁻³⁴.

Polimorfismos genéticos en TP53

TP53 es un gene supresor de tumor que inicia apoptosis en respuesta a daño severo del ADN localizado en el cromosoma 17 posición 17p13 y codifica para una fosfoproteína nuclear de 53 kDa. P53 es un regulador negativo de la proliferación celular. En el gen TP53 presentan dos SNP (Polimorfismo de un solo nucleótido) en el codón 47, Pro47Ser y en el codón 72, Arg72Pro, los cuales han sido asociados con la susceptibilidad a varios tipos de cáncer³⁴.

En el caso del polimorfismo Arg72Pro que se encuentra en el codón 72 del exón 4 en el segmento de TP53, surge del cambio de la secuencia CGC que codifica para arginina por CCC que codifica para prolina. La variante Arg72 es la que se presenta en mayor frecuencia en algunas poblaciones (>50%), siendo más eficaz en la inducción de apoptosis y protección de células alteradas en el desarrollo neoplásico, que la variante 72Pro³⁴. Dumont y cols. analizaron el SNP Arg72Pro y reportaron que el alelo Arg72, en forma homocigoto tiene una capacidad de inducción de la apoptosis 15 veces mayor en comparación con el alelo Pro72³⁵. Según Leu y cols. esta alta capacidad de inducir apoptosis del alelo Arg72 se debe en parte a su localización mitocondrial, lo que hace posible que TP53 tenga una interacción directa con la proteína BAK pro-apoptótica³⁶.

Otros reportes han establecido también que el polimorfismo Arg72Pro del gen P53 presenta una variante Pro72 que produce una disminución en la función de la proteína P53 como inductor de apoptosis en comparación con el alelo silvestre Arg72,

asociándose con un mal pronóstico. Así mismo se ha reportado que el genotipo Pro/Pro se presenta con mayor frecuencia en pacientes con varios tipos de cáncer comparado con los controles. Otros estudios han asociado la variante Pro72 con mal pronóstico en cáncer de mama y pulmón ³⁷⁻³⁸. Por su parte Sameer AS y cols, encontraron al SNP Arg72Pro asociado con susceptibilidad a desarrollar cáncer colorectal, reportando el genotipo Pro/Pro asociado significativamente con la localización del tumor, estadios avanzados del tumor y sangrado rectal ³⁹. Toffoli y cols, identificaron al SNP Arg72Pro tiene un valor pronostico, debido a que los pacientes con genotipo Pro/Pro presentaron baja supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad después de quimioterapia adyuvante en pacientes con osteosarcoma ⁴⁰. Sin embargo Dybbes-Orsted y cols mostraron un aumento en la supervivencia después del desarrollo de cáncer, o incluso después del desarrollo de otras enfermedades, para pacientes homocigotos Pro/Pro en comparación con los pacientes homocigotos Arg/Arg ⁴¹. Por su parte Ji-Young y cols. encontraron al genotipo Pro/Pro de p53 como un factor predictor de resistencia primaria a quimioterapia, progresión de la enfermedad y disminución en la supervivencia libre de enfermedad ⁴². Ellis y cols. reportaron que el alelo 72Pro del gen Tp53 asociado significativamente con un incremento en el riesgo de desarrollar Leucemia Mieloide Aguda relacionada a la terapia. Sugiriendo que el Arg72Pro puede ser un marcador de alto riesgo a desarrollar segundas neoplasias a consecuencia del tratamiento de quimioterapia en pacientes sobrevivientes de cáncer⁴³. Do TN y cols. mostraron también al SNP Arg72Pro asociado significativamente con el incremento del riesgo de susceptibilidad a leucemia linfoblástica aguda infantil⁴⁴.

Por otra parte el SNP Pro47Ser de TP53 resulta de la substitución de C>T en la posición 1 del codón 47, se presenta en baja frecuencia y se ha descrito tiene también implicaciones funcionales importantes. La variante serina47 en p53 reemplaza el residuo de prolina el cual es necesario para la fosforilación de la serina 46 por quinasas dirigidas por prolina tales como p38 Mapk. Esto indica que la variante S47 disminuye la fosforilación en la serina 46, disminuyendo la transcripción de genes pro-apoptóticos y por lo tanto aumentando potencialmente el riesgo de cáncer⁴⁵. Li X. y cols. reportaron que al igual que el polimorfismo del codón 72, el polimorfismo del codón 47 de p53 es funcionalmente significativo y puede desempeñar un papel en el riesgo de cáncer, la progresión y la eficacia de la terapia⁴⁶.

Funciones de MDM2

El MDM2 es una oncoproteína que se une a p53 inactivando la función supresora de tumor de p53. MDM2 puede inhibir la actividad transcripcional de p53 uniéndose directamente al dominio N-terminal de transcripción. Además MDM2 también funciona como una ligasa E3, uniendo covalentemente moléculas de ubiquitina a p53, lo que conduce a la exportación de p53 al citoplasma y la degradación proteosomal. Muchas células malignas tienen altos niveles de la proteína MDM2 debido al incremento en la expresión o amplificación del gen mdm2. Además la sobreexpresión de MDM2 se ha asociado con rápida progresión de cáncer y la falta de respuesta a la terapia en algunos grupos de cáncer humano^{33,47,48}.

Polimorfismos genéticos en MDM2

MDM2 actúa como el principal regulador negativo de p53. Es por esto que variantes genéticas en ambas moléculas pueden afectar las vías de señalización contribuyendo al inicio y progresión de un tumor³³.

El polimorfismo T309G, en la región promotora de MDM2 puede elevar la expresión de la proteína debido a que el genotipo variable 309GG incrementa la transcripción del gen incrementando los niveles basales de la proteína MDM2 la cual a su vez atenúa los efectos del incremento de la proteína p53 y en consecuencia disminuyendo la respuesta apoptótica de TP53, permitiendo la formación tumoral, asociándose con el desarrollo y mal pronóstico en diversos tipos de cáncer^{33,49}.

El alelo G del SNP T309G de MDM2 ha sido asociado con el desarrollo de tumores a edad temprana y con un incremento en la aparición de múltiples tumores primarios en pacientes con síndrome de Li-Fraumeni⁵⁰. Bougeard y cols confirmaron estos resultados y además sugieren que el efecto desarrollo temprano de tumores puede ser incrementado por la presencia del SNP T309G de MDM2 y el SNP Arg72Pro en el gen p53⁵¹.

Hirata y cols. analizaron el SNP T309G de MDM2 encontraron asociado significativamente el genotipo GG con mal pronóstico y baja supervivencia; además también determinaron que el SNP309 incrementa el riesgo de desarrollar cáncer renal⁵². Por el contrario Talseth y cols. reportaron que el alelo G de SNP T309G de MDM2 puede tener un efecto protector del desarrollo de enfermedad en pacientes con cáncer colorectal⁵³. Sin embargo Toffoli y cols, asociaron el T309G de MDM2 con el riesgo de desarrollar osteosarcoma de alto grado⁴⁰. Por su parte Eliis y cols, asociaron el alelo G del polimorfismo T309G con un incremento en el riesgo de desarrollar Leucemia Mieloide Aguda secundaria a quimioterapia⁴³. Ji-Young y cols. reportaron que el SNP T309G de MDM2 se asocio significativamente con la disminución en la sobre-expresión de p53 y como un factor pronóstico de disminución en la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón⁴². Así mismo Jing y cols. asociaron los genotipos GT y TT con un incremento en el riesgo de muerte de pacientes con cáncer de pulmón comparado con el genotipo GG. Postularon que el SNP T309G puede ser usado como candidato a biomarcador para predecir supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas⁵⁴. El polimorfismo T309G de MDM2 también se ha relacionado con el desarrollo de toxicidad en pacientes que han recibido tratamiento con quimioterapia a base de platinos⁵⁵.

Planteamiento del problema

En México, el cáncer es la segunda causa de muerte en población pediátrica. En la actualidad la tasa de supervivencia en los niños es del 80-85%. Se estima que aproximadamente el 30% de los supervivientes de cáncer tendrán una condición de salud deficiente desarrollando patologías crónicas diversas además el riesgo de segunda neoplasia (SN) de un paciente sobreviviente de cáncer, aumenta 10 veces más que en la población en general. Aunque se sabe que la exposición a quimioterapia y radioterapia

previa son los principales factores descritos para presentar una SN, se debe considerar que pudieran coexistir otros factores que hacen al paciente susceptible a presentar dicha patología, entre los factores que se han descrito pueden ser las variantes genéticas en genes clave como el P53 y MDM2.

Pregunta de Investigación

¿Cuál es la asociación de los Polimorfismos del gen MDM2 y P53 con el riesgo de segundas neoplasias en pacientes pediátricos supervivientes de cáncer en el Hospital Infantil de México Federico Gómez?

Justificación

Es importante realizar investigaciones que nos permitan identificar, biomarcadores genéticos de riesgo a desarrollar segundas neoplasias que contribuyan a identificar una población de niños susceptible al desarrollo de una SN, lo cual permitiría al oncólogo pediatra realizar una vigilancia estrecha de dichos pacientes, encaminada a detecciones tempranas, que permitan brindar tratamiento oportuno, consejo genético y medidas para evitar conductas de riesgo, mejorando la supervivencia y calidad de vida de dichos pacientes. El análisis de polimorfismos en los genes P53 y MDM2 de dos proteínas clave involucradas en la génesis del cáncer es importante ya que se ha sugerido que dichas variaciones pueden producir desregulaciones en vías de señalización de P53 trascendentales en el desarrollo de neoplasias.

Hipótesis

Los pacientes sobrevivientes de cáncer con genotipo homocigoto variable del gen MDM2 y P53 presentarán mayor riesgo de desarrollar segundas neoplasias, en comparación con aquellos pacientes con alelos silvestres.

Objetivo general:

Evaluar la asociación de los polimorfismos T309G del gen MDM2 y el Arg72Pro del gen P53 con el riesgo de desarrollar segundas neoplasias en pacientes pediátricos sobrevivientes de cáncer.

Objetivos específicos:

- 1) Determinar las frecuencias de las variantes genéticas en T309G del gen MDM2 y el Arg72Pro del gen P53 en población pediátrica mexicana sobrevivientes de cáncer del HIMFG.
- 2) Identificar si existe asociación entre los genotipos de T309G del gen MDM2 y el Arg72Pro del gen P53 con el riesgo de desarrollar segundas neoplasias en pacientes pediátricos sobrevivientes de cáncer.

3) Determinar la asociación entre los genotipos de T309G del gen MDM2 y el Arg72Pro del gen P53 con la sobrevida global y libre de enfermedad de los pacientes sobrevivientes de cáncer.

4) Identificar si existe asociación entre los genotipos de MDM2 y P53 con la respuesta al tratamiento.

Metodología

Diseño de estudio:

El presente, es un estudio observacional analítico de casos y controles. Se buscará la asociación entre genotipo identificado en cada caso y el riesgo de desarrollo de segundas neoplasias en pacientes pediátricos sobrevivientes de cáncer. El grupo de casos incluirá sobrevivientes de cáncer que desarrollaron segundas neoplasias y el grupo control sobrevivientes de cáncer sin desarrollo de segundas neoplasia.

Universo de Estudio:

Se incluirán todos los pacientes pediátricos de 0 a 40 años de edad, de ambos sexos, sobrevivientes de cáncer en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

En México no existe una frecuencia reportada del genotipo de T309G del gen MDM2 y el Arg72Pro del gen P53, por lo tanto el cálculo de tamaño muestra se realizó utilizando las frecuencias reportadas por Ellis NA y cols.⁴³ para el genotipo de riesgo GG para el gen MDM2 en pacientes que presentaron t-LMA (leucemia mieloide asociada a tratamiento antineoplásico) que es la segunda neoplasia mas común. Considerando una estudio pareado por edad que incluya dos controles por caso, con esta información se obtuvo un tamaño de muestra mínimo con base en la fórmula para el cálculo de tamaño de muestra para la estimación de un riesgo en estudios de casos y controles, la cual es la siguiente:

$$n = \frac{\left[z_{1-\alpha/2} \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

$$n = \frac{[1.96 \sqrt{(2 \times 0.5)(1-0.5)} + 0.84 \sqrt{(0.20)(1-0.20) + (0.80)(1-0.8)}]^2}{(0.2-0.8)^2} = 7$$

Donde:

$$p = \frac{p_1 + p_2}{2} = 0.5$$

$$Z_{1-\alpha/2} = 1.96$$

$$Z_{1-\beta} = 0.84$$

P_1 = frecuencia de exposición entre los casos = 0.20

P_2 = Frecuencia de exposición entre los controles = 0.80

Odds ratio previsto = 2

Nivel de confianza o seguridad = 0.95

Potencia = 0.8

De acuerdo al cálculo del tamaño de muestra en el presente estudio se analizarán un mínimo de 7 casos y 14 controles. Sin embargo se incluirán todos los pacientes sobrevivientes de cáncer en el HIMFG que cumplan los criterios de inclusión los cuales son aproximadamente 120 pacientes en vigilancia por año.

Criterios de Inclusión Casos:

- Pacientes pediátricos de 0 a 40 años de edad, ambos sexos, sobrevivientes de cáncer en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.
- Pacientes con desarrollo de una segunda neoplasia.
- Que acepten participar en el estudio, previa firma de consentimiento informado y/o asentimiento.

Criterios de Exclusión Casos:

- Pacientes pediátricos sobrevivientes de cáncer que no desarrollen una segunda neoplasia.

Criterios de Eliminación Casos:

- Abandono voluntario del seguimiento de vigilancia después de concluido el tratamiento.
- Falta de datos del expediente clínico.
- Muestra insuficiente (cuando la cantidad de DNA extraída no permita la realización de todas las pruebas necesarias para el estudio) y no sea posible obtener nueva muestra.

Criterios de Inclusión Controles:

- Pacientes pediátricos de 0 a 40 años de edad, ambos sexos, sobrevivientes de cáncer en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.
- Pacientes sin desarrollo de una segunda neoplasia.
- Que acepten participar en el estudio y firmen consentimiento informado.

Criterios de Exclusión Controles:

- Pacientes pediátricos sobrevivientes de cáncer que desarrollen una segunda neoplasia.

Criterios de eliminación Controles:

- Abandono voluntario del seguimiento de vigilancia después de concluido el tratamiento para la primera neoplasia.
- Falta de datos del expediente clínico.
- Muestra insuficiente (cuando la cantidad de DNA extraída no permita la realización de todas las pruebas necesarias para el estudio) y no sea posible obtener nueva muestra.

Procedimientos:

Diagnóstico de Segunda Neoplasia:

El diagnóstico de segunda neoplasia se hará de acuerdo con los procedimientos establecidos en el instituto para cada tipo de cáncer infantil.

Obtención de las muestras:

a) Sangre Periférica. Las muestras de sangre periférica empleadas para la genotipificación de los polimorfismos genéticos, serán obtenidas por punción venosa 2ml previo consentimiento y/o asentimiento informado (Anexo 1), como parte de las pruebas requeridas para la vigilancia de los pacientes sobrevivientes de cáncer. No se realizará una punción exclusivamente para el protocolo. Se realizará una única toma de muestra al momento toma para pruebas de vigilancia.

Seguimiento:

Se realizará el seguimiento clínico de los pacientes en vigilancia de cualquier tipo de cáncer infantil, por un mínimo de 5 años después de concluido el tratamiento para la primera neoplasia, supervivencia libre de evento y supervivencia global a 3 años, mediante la recopilación datos clínicos (tipo de neoplasia primaria, tipo de tratamiento, respuesta a tratamiento, estado actual etc.) los cuales serán obtenidos del expediente clínico de cada paciente.

Metodología Experimental

Análisis de los polimorfismos genéticos de MDM2 y P53

Extracción de ADN:

El ADN se obtendrá por el método de columna de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial (Qiagen, QIAamp DNA blood, midi kit), el DNA obtenido será almacenado a -20°C hasta ser utilizado para la genotipificación.

Genotipificación:

La detección de los SNP's se hará para gen MDM2 y P53 por medio de PCR-RFLP (del inglés Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism). Estos análisis utilizan pares de iniciadores específicos para cada gen. Se estandarizarán las condiciones óptimas de cada PCR realizando curvas de concentración de MgCl₂, dNTP's y temperatura de alineación.

El DNA genómico se amplificará con los oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes, dNTP's, regulador 1X (20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄) y Taq ADN polimerasa. El producto de PCR será visualizado en un gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio. Después de la amplificación se realizara una restricción enzimática del producto de PCR mediante una endonucleasa de restricción específica para cada polimorfismo a estudiar. Durante la estandarización de las técnicas de PCR se identificaran muestras positivas para cada uno de los polimorfismos y estos serán utilizados como controles en la genotipificación. En cada uno de estos controles se confirmara la presencia del polimorfismo mediante secuenciación automática.

Plan de análisis de datos.

Se determinará el genotipo para MDM2 y P53 se buscará la asociación entre genotipo identificado en cada caso y el desarrollo de segundas neoplasias. Se determinará el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada polimorfismo por medio de la prueba de chi-cuadrada. Se analizara la asociación de las variantes genéticas con los datos clínicos de los pacientes y grupo de riesgo mediante análisis multivariado, considerando un nivel de significancia ≤ 0.05 .

Se realizará estadística descriptiva e inferencial de los datos obtenidos. Para definir la respuesta al tratamiento, se investigarán condiciones que se asocien con un resultado determinado (remisión, falta de remisión, recaída o muerte). El tiempo cero se considerará como el día del diagnóstico; la remisión o falta de remisión se determinarán por medio de aspirado de médula ósea los días 16 y 29 (ver anexo 1). Ante la sospecha clínica o por laboratorio de recaída se tomará aspirado de médula ósea en todos los casos. Se seguirá a los pacientes por 2 años y el desenlace se medirá de la misma forma en todos los casos.

Se buscará la asociación entre el genotipo identificado en cada paciente y los indicadores de respuesta o falla a tratamiento (remisión, falta de remisión, recaída o muerte). Para evaluar la asociación entre el genotipo específico de cada paciente (para cada enzima), se empleará ANOVA como prueba paramétrica o la prueba del Kruskal-Wallis si la distribución no es normal.

Calcularemos la supervivencia libre de evento (SLE) del día del diagnóstico al tiempo del evento. El evento se definirá como falla para alcanzar la remisión, leucemia refractaria, recaída, segunda neoplasia o muerte por causas relacionadas con la enfermedad o su tratamiento, al último día del seguimiento. La supervivencia global será calculada a partir del día del diagnóstico a la fecha de la muerte por causas relacionadas con la enfermedad o su tratamiento, o hasta el último día del seguimiento.

Las probabilidades de supervivencia, de acuerdo al genotipo identificado serán estimadas utilizando el método de Kaplan-Meier y comparadas con la prueba "log-rank". Para evaluar el efecto independiente de las diferentes variables en la duración de la supervivencia global o la supervivencia libre de evento, se realizará un análisis multivariado, utilizando el modelo de riesgos proporcionales de Cox con variables que muestren significancia en un análisis bivariado.

Utilizando el programas estadísticos STATA 13 y Graphprism 5.
La diferencia significativa se considerará con una $P < 0.05$

Variables

Variables Dependientes:

- Desarrollo de una segunda neoplasia.
- Supervivencia libre de evento
- Supervivencia libre global

Variables Independientes:

- Genotipo de los SNP analizados para gen MDM2 y P53.
- Edad del paciente.
- Sexo.

Variable	Tipo de Variable	Definición conceptual	Definición opcional	Escala de medición
<i>Segunda neoplasia</i>	Cualitativa nominal dicotómica	Es aquella neoplasia histológicamente distinta, que se desarrolla después de completar el tratamiento para la neoplasia maligna primaria.	Se determinará por criterios clínicos e histológicos establecidos para cada tipo de neoplasia.	Categoría dicotómica: 1) Desarrollo de segunda neoplasia 2) Sin segunda neoplasia
<i>Supervivencia libre de evento</i>	Cuantitativa	Tiempo del día del diagnóstico del evento. El evento se definirá como la falta para alcanzar la remisión, leucemia refractaria, recaída, segunda neoplasia o muerte por causas relacionadas con la enfermedad o su tratamiento, al último día del seguimiento.	Se determinará por medio de curvas de supervivencia por el método de Kaplan-Meier.	Variable continua de razón.
<i>Supervivencia global</i>	Cuantitativa	Periodo que transcurre desde la administración del tratamiento hasta el último control realizado o el fallecimiento del paciente.	Se determinará por medio de curvas de supervivencia por el método de Kaplan-Meier	Variable continua de razón.
<i>Genotipo</i>	Cualitativa nominal policotómica	Información de características genéticas que tenemos los seres humanos. Formado para cada gen por dos alelos (silvestre o variante)	Dato obtenido por medio de un análisis de laboratorio. El genotipo será determinado mediante una prueba de laboratorio (técnica de PCR-RFLP).	Categoría: 1) Homocigoto silvestre 2) Heterocigoto 3) Homocigoto variante
<i>Edad</i>	Cuantitativa discreta	Término que se utiliza para hacer mención al tiempo que ha vivido un ser vivo desde su nacimiento.	Número de meses cumplidos.	Númerica.
<i>Sexo</i>	Cualitativa dicotómica	Características fenotípicas de los individuos que los agrupan en hombre o mujer.	Identificación en el expediente clínico del dato de género registrado.	Nominal dicotómica: 1) Mujer 2) Hombre

Consideraciones éticas

Este estudio será realizado de conformidad con los principios que establece la 18a Asamblea Médica Mundial (Helsinki, 1964) y todas las modificaciones aplicables establecidas por las Asambleas Médicas Mundiales y los lineamientos ICH para la Buena Práctica Clínica (GCP), así como al reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud.

Es un estudio con riesgo mínimo debido a que en una sola ocasión se tomarán 2 ml de sangre periférica de pacientes pediátricos supervivientes de cáncer. Esta toma no altera el tratamiento. Además dichas muestras serán obtenidas de los sobrantes de las muestras utilizadas para las pruebas rutinarias como parte del diagnóstico y seguimiento de la enfermedad del paciente, es decir no se realizara una toma de muestra exclusivamente para el desarrollo del protocolo. Además tomando en cuenta que la

cantidad requerida de muestra para este proyecto no rebasa el volumen máximo permitido para la extracción de sangre para proyectos clínicos y de investigación considerados de riesgo mínimo de acuerdo al CWREB Pediatric Blood Draw Guidance Document Page, Children's & Women's Health, Centre of British Columbia.

La participación en este protocolo es voluntaria, por lo que se entregará a los padres la carta de consentimiento informado en donde estarán contenidos de manera explícita y en lenguaje sencillo el objetivo del estudio, la metodología de la investigación y la confidencialidad de los resultados. Cada uno de los pacientes que se incluyan en el estudio deberá contar con la carta de consentimiento informado, firmado previamente por padre o tutor, y además la carta de asentimiento en aquellos pacientes mayores de 8 años. (Ver anexo 1).

Consideraciones de bioseguridad:

Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI)

Se manejarán muestras de sangre, que serán procesadas en el Laboratorio de Oncología. Este tipo de muestra se clasifica como agente biológico-infeccioso. Los desechos originados, se manejarán y tratarán con base en la Norma Oficial Mexicana NOM-087- SEMARNAT-SSA1-2002.

Los restos de sangre se desechan en contenedores rígidos de polipropileno color rojo, los desechos sólidos como tubos, torundas, gasas y guantes empapados con cualquier fluido biológico infeccioso serán colocadas en bolsa roja y el material desechable utilizado para su manejo (jeringas, agujas, etc.) será colocado en contenedores punzocortantes. Todo este material permanecerá en el laboratorio de oncología, hasta ser recolectado por el personal de control de medio ambiente destinado para el transporte del RPBI en cada semana o cada tres días, en caso de que los contenedores estuvieran llenos a 2/3 partes de su capacidad dependiendo de la cantidad generada..

Las muestras tomadas en el HIMFG se harán por personal capacitado en la sala de Hemato-Oncología. El procesamiento de las muestras se realizarán en el laboratorio de Oncología por personal capacitado, con el uso de equipo de protección como guantes, cubrebocas y utilizando campana de flujo laminar.

Residuos Especiales.

El material utilizado que no corresponda a material biológico infeccioso o no este empapado de algún fluido infeccioso como hisopos, guantes, cubrebocas y gasas se desechará en los botes de basura para residuos especiales dentro de bolsas de plástico transparente. El Departamento de Control del Medio Ambiente recolectará las bolsas de plástico y las llevará a un almacén provisional, en donde permanecerán hasta que sean recogidos por la compañía contratada por nuestro hospital, misma que se encarga de su disposición final.

Residuos Químico Peligrosos con clasificación CRETI

Los desechos químicos peligrosos generados se manejan con base en las normas, NOM-052-SEMARNAT-2005, NOM-053-SEMARNAT-1993, NOM-118-STPS-2000. En el proyecto se utilizarán materiales como Etanol (Inflamable), residuos productos de extracción de ADN por medio del QIAamp DNA blood, midi kit de Qiagen y Bromuro de Etidio (Tóxico). Estos se desechan de acuerdo al manual, de procedimientos del laboratorio, por separado en un contenedor rígido sin color específico resistente a la sustancia que contendrá, hasta ser llenado a un 75% de su capacidad, estos son recolectados cada 15 días o cada semana por el personal especial del departamento de control de medio ambiente encargado de recolectar residuos CRETI, para su inactivación y disposición final. El contenedor debe ser rotulado con el nombre y tipo de desecho, características del desecho, nombre del área generadora, fecha de inicio y término de almacenamiento, nombre de la persona que entrega al almacén temporal y nombre de la persona responsable de la recepción al almacén temporal.

Las puntas, pipetas y/o jeringas impregnadas de sustancias con clasificación CRETI se desechan como material punzante o punzocortante según sea el caso, en un contenedor rígido y rotulado como material contaminado con sustancias CRETI, especificando el nombre y tipo de desecho, características del desecho, nombre del área generadora, fecha de inicio y término de almacenamiento, nombre de la persona que entrega al almacén temporal y nombre de la persona responsable de la recepción al almacén temporal.

Los residuos sólidos químicos peligrosos (geles de agarosa, guantes y gasas con Bromuro de Etidio) se colocan en contenedores o bolsas rotuladas como material contaminado con Bromuro de Etidio, especificando el nombre y tipo de desecho, características del desecho, precauciones de manejo, nombre del área generadora, fecha de inicio y término de almacenamiento, nombre de la persona que entrega al almacén temporal y nombre de la persona responsable de la recepción al almacén temporal.

Resultados:

Total de la muestra

Se realizó un estudio con un N total de 27 supervivientes de cáncer, donde 9 se consideran casos (segundas neoplasias) que fueron representando el 33.33% de los pacientes, los controles son total 18 pacientes (66.67%). El análisis estadístico que utilizamos, por contar con una muestra tan pequeña es T student (menor de 30 pacientes).

Los pacientes estudiados fueron; 19 paciente femeninos (66.67%) y masculinos 8 pacientes (33.33%). Encontramos, el rango de edad fue de 93 meses (7 años 7 meses) y 312 meses (26 años), con una media de 180.5 meses (15 años). Encontrando una predisposición en sexo, siendo más frecuente identificado en nuestro grupo de estudio al sexo femenino con mayor porcentaje representando (36.84%) en relación al sexo masculino (25%). No encontrando significancia estadística.

Primera neoplasia:

Los diagnósticos de la primera neoplasia los pacientes supervivientes de cancer corresponden a un total de 13 neoplasias , según el orden de frecuencia fueron la Leucemias Linfoblásticas que representa el 18.52% en pacientes con riesgo habitual (5 pacientes) en segundo lugar, representado por la leucemia Linfoblástica aguda de alto riesgo que corresponde a 14.81% (4 pacientes) seguido por el Retinoblastoma con 14.81% (4 pacientes).

No se encontro significancia estadística entre los generos y la incidencia de la primera neoplasia ($p=0.732$)

Segunda neoplasia:

Las segundas neoplasias mas frecuentes encontradas fueron 6, las mas frecuentes fueron la leucemias tanto linfoide como mieloide. Representando un total de 9 pacientes con segundas neoplasias. De estos pacientes que se encuentran con diagnostico de una segunda neoplasia dos fallecieron por progresión de la enfermedad (22.22%), 4 pacientes se encuentran en tratamiento (14.81%) y 3 pacientes en vigilancia (33.33%). De toda la muestra tenemos 92.8% pacientes vivos(25 totales).

No se encontro significancia estadística entre los generos y la incidencia de la segunda neoplasia ($p=1$). Ni en pacientes que recibieron radioterapia ($p=0.25$) de los pacientes con SNM 42.86% (3 pacientes) recibieron RT.

Se encontro significancia en pacientes con diagnostico de segunda neoplasias y uso de etoposido ($p=0.039$), con dosis de 1800 mgm²dosis, utilizada hasta en un 75% de los pacientes.

De las causas de la defunción, se identifico en nuestro estudio como causa principal progresion de la enfermedad (7.41%), sin encontrar significancia en el uso de quimioterapia o radioterapia como tratamiento base de las diferentes patologías. El resto de los pacientes (25 total) estan vivos en vigilancia 21 pacientes (77.78%), recibiendo actualmente tratamiento 4 pacientes (14.81%).

Polimorfismos:

Se obtuvo muestras de sangre periferica del total de los pacientes incluidos en el estudio, analizando por metodo PCR-RFLP (del inglés Polymerase chain reaction-restriction fragment lenght polymorphism).

Tabla 1: Frecuencias por genotipo del SNP Arg72Pro del gen p53.

Frecuencias por genotipo del SNP Arg72Pro del gen p53.				
Genotipo	Casos n=9	Frecuencia %	Controles n=18	Frecuencia %
Arg/Arg	4	44.4 %	4	22.2 %
Arg/Pro	4	44.4 %	12	66.6 %
Pro/Pro	1	11.2	2	11.2 %

Tabla 2: Frecuencias por alelo del SNP Arg72Pro del gen p53.

Frecuencias alélicas para el SNP Arg72Pro del gen p53.				
Alelo	Casos n=18	Frecuencia %	Controles n=36	Frecuencia %
Arg	12	66.6 %	20	55.6 %
Pro	6	33.4 %	16	44.4%

Tabla 3: Frecuencias por genotipo del SNP 309 (T>G) del gen MDM2.

Frecuencias por genotipo para el SNP 309 (T>G) del gen MDM2.				
Genotipo	Casos n=9	Frecuencia %	Controles n=18	Frecuencia %
TT	4	44.4	3	16.7 %
TG	3	33.3	6	33.3 %
GG	2	22.3	9	50 %

Tabla4: Frecuencias por alelo del SNP 309 (T>G) del gen MDM2.

Frecuencias alélicas para el SNP 309 (T>G) del gen MDM2.				
Alelo	Casos n=18	Frecuencia %	Controles n=36	Frecuencia %
T	11	61.1	12	33.3
G	7	38.9	24	66.7

El SNP Arg72Pro del gen P53, el genotipo Pro/Pro se ve asociado a progresión, quimioresistencia en una serie de estudios, en nuestra población no es frecuente en el grupo de segundas neoplasias. Sugiriendo que el Arg72Pro no es un marcador de alto riesgo a desarrollar segundas neoplasia en nuestra población.

En relación al gen MDM2 y la frecuencia para SNP 309, se encontro homogeneidad en nuestra población.

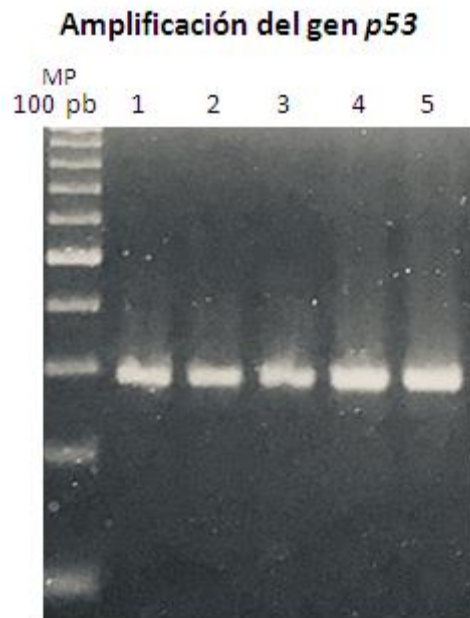


Figura 1 : Se muestran productos de PCR para el gen *p53* de 296 pares de bases (carril 1 al 5)

Restricción enzimática del gen *p53* para el SNP Arg72Pro con la enzima *BstU1*

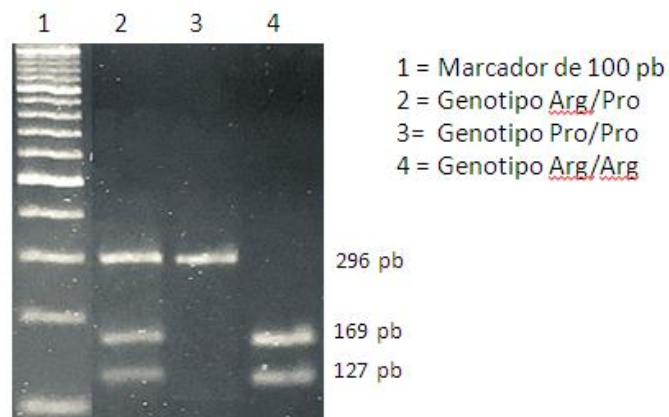


Figura 2: Se muestran la digestión del gen *p53* con la enzima *BstU1* para la determinación del SNP Arg72Pro, se observa el marcador de peso molecular de 100 pb en carril 1, genotipo Arg/Pro en carril 2 (296 pb, 169 pb y 127 pb), genotipo Pro/Pro en carril 3 (296 pb) y el genotipo Arg/Arg en carril 4 (169 pb y 127 pb).

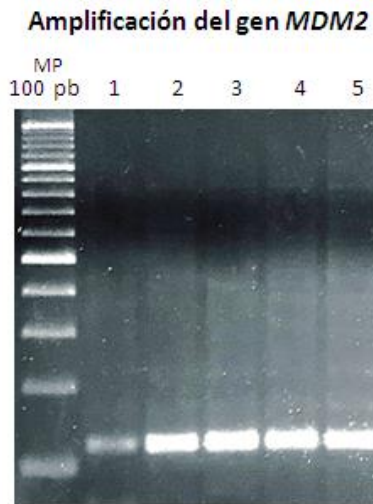


Figura 3: Se muestran productos de PCR para el gen *MDM2* de 121 pares de bases (carril 1 al 5)

Restricción enzimática del gen *MDM2* para el SNP 309 (T>G) con la enzima *Pst*1

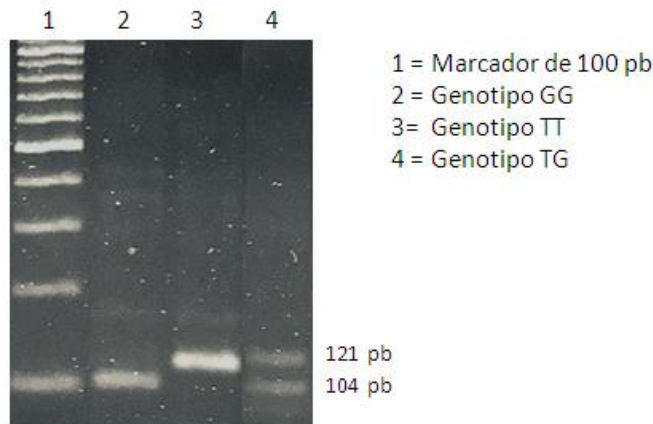


Figura 4: Se muestran la digestión del gen *MDM2* con la enzima *Pst*1 para la determinación del SNP 309 (T>G), se observa el marcador de 100 pb en carril 1, genotipo GG en carril 2 (104 pb), genotipo TT en carril 3 (121 pb) y el genotipo TG en carril 4 (121 pb y 104 pb).

La curva de supervivencia de los pacientes con SNMs se realizó por el método de Kaplan- Meier, Long-rank, Wilcoxon-Gehan con los siguientes resultados: como puede observarse 27 sujetos aportaron información al análisis de supervivencia, 9 de ellos presentan el evento de interés y el sujeto con mayor tiempo de seguimiento ha sido de 153 meses. Se observa con el aumento del tiempo de observación existe un aumento de aparición de las segundas neoplasias. (Ver Fig.5)

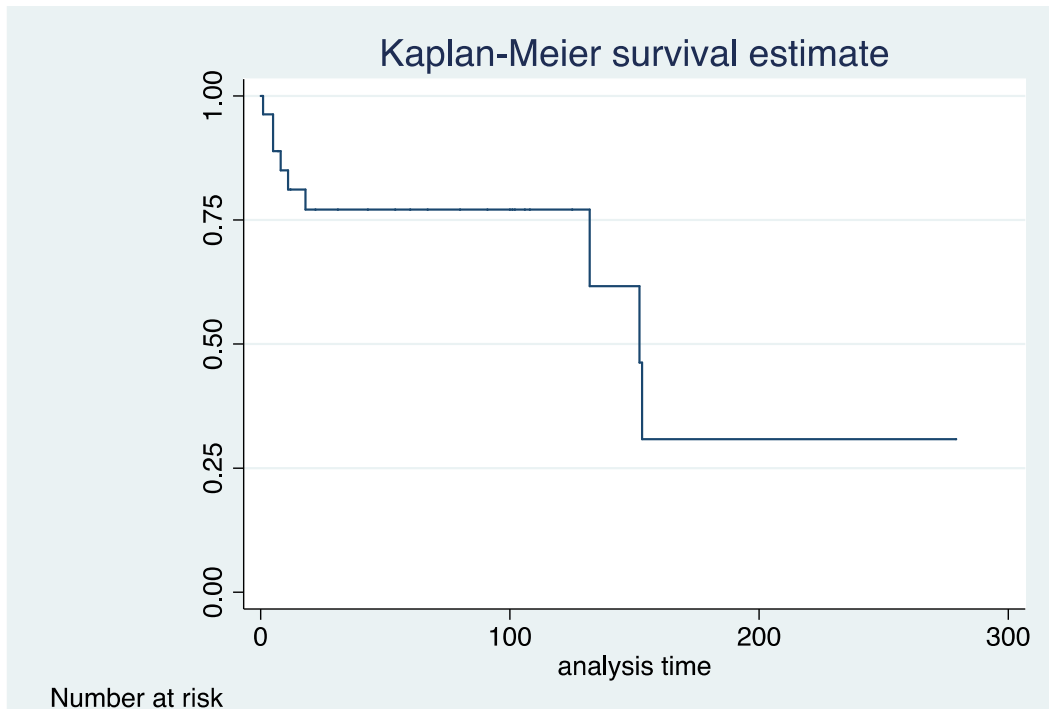


Figura 5: Curva de Supervivencia Kaplan-Meier

```
. stset TIEMPOSN, failure(SNE0==1) scale(1)

      failure event:  SNE0 == 1
obs. time interval:  (0, TIEMPOSN]
exit on or before:  failure
```

```
> _____
      27 total observations
      0 exclusions
```

```
> _____
      27 observations remaining, representing
      9 failures in single-record/single-failure data
      2026 total analysis time at risk and under observation
                                     at risk from t =          0
                                     earliest observed entry t =      0
                                     last observed exit t =         279
```

```
. sts graph, risktable risktable(0(1)153)

      failure _d:  SNE0 == 1
analysis time _t:  TIEMPOSN
```

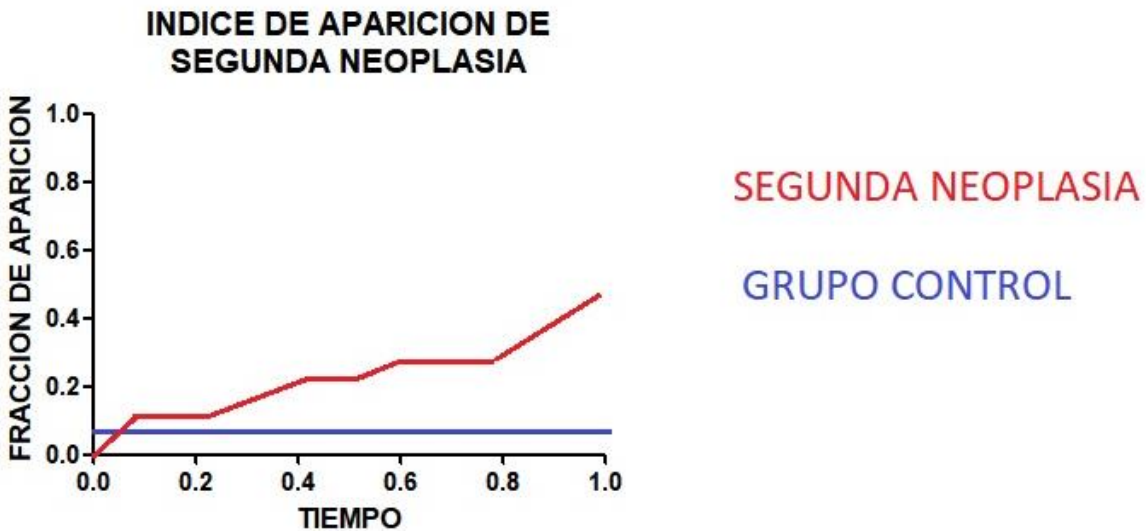


Figura 6: Índice de Aparición de Segunda Neoplasia Maligna

Discusión:

Las SNMs son secundaria a diversas causas, en una serie realizada en el servicios de Hemato-Oncología del Hospital Infantil de México Federico Gomez por Rocio Ramos y cols., encontraron una incidencia acumulada de 0.53% que es baja comparada con otras series internacionales. La incidencia acumulada de SNMs supera el 20% a los 30 años después del diagnóstico del cáncer primario (Friedman DL W. J., 2010). De Vathaire, et al y Kony han reportado en estudios de cohorte que 5-10% de los niños tratados para una primera neoplasia desarrollan SNM. Las SNMs son la principal causa de mortalidad tardía que no fueron causadas por la recurrencia (Mertens AC L. Q., 2008). El riesgo de SNMs se mantiene elevado durante más de 20 años a partir del diagnóstico del cáncer primario. Múltiples SNM subsecuentes son comunes entre los supervivientes de cáncer infantil debido al envejecimiento. La incidencia acumulada de una segunda neoplasia (SNM2) fue reportada como 47% a los 20 años después de la primera SMN (SNM1). (Armstrong GT, 2011).

Se identificaron en nuestro estudio que las SNM mas comunes son: LMA (7.41%), LLA (7.41%) y Osteosarcoma (7.41%).

La leucemia secundaria después de la exposición a las epipodofilotoxinas (Pui CH R. R., 1991), se ha relacionado con el calendario de administración, con el riesgo de ser mucho mayor en los pacientes que reciben este fármaco una vez por semana, en comparación con los que reciben los programas más frecuentemente usados de 3-5 dosis por semana, Intervalos de 3-5 semanas (Smith MA, 1999). Es posible que la frecuencia de la

administración determine la capacidad de cualquier célula dada para reparar el daño del ADN antes de que se someta a daño adicional de otra dosis. Aunque todavía existe controversia sobre el horario y la dosis.

La variabilidad interindividual en el riesgo de SNM es más probable que se relaciona con polimorfismos comunes en los genes de baja penetración que regulan la disponibilidad de metabolito del fármaco activo, o los responsables de la reparación del ADN. Las interacciones entre los genes pueden aumentar las sutiles diferencias funcionales resultantes de las variaciones genéticas.

Conclusión:

Los supervivientes de cáncer infantil tienen un riesgo 3-6 veces mayor de desarrollar una segunda neoplasia malignas (SNM), en comparación con la población general. Las SNM son una complicación relativamente rara en los sobrevivientes de cáncer, sin embargo están asociadas con una morbilidad y mortalidad significativas.

Para la mayoría de las SNM, el riesgo disminuye con el aumento de la edad de diagnóstico del primer cáncer; el género femenino también se asocia con un mayor riesgo de SNM. Los agentes alquilantes e inhibidores de la topoisomerasa II, aumentan el riesgo de desarrollar una SNM.

Los factores de riesgo para una SNM incluyen síndromes de cáncer familiar, interacciones gen-medio ambiente, opciones de estilo de vida y otras complicaciones médicas asociadas con el tratamiento del cáncer primario.

Al entender los factores que aumentan el riesgo de una SNM, podríamos ser capaces de implementar estrategias para prevenirlos. Nuestro conocimiento es limitado por el período de seguimiento menor a 3 décadas de las cohortes de supervivientes existentes. Hasta que haya un número suficiente de supervivientes en su cuarta y quinta década de la vida vamos a aprender cómo los procesos de envejecimiento normales y el aumento natural del cáncer en la población general influye en el desarrollo de SNM en los sobrevivientes de cáncer infantil.

La mayoría de los supervivientes adultos de cáncer infantil recibirán atención médica de proveedores de la salud que no tienen el conocimiento o la comprensión de los riesgos impuestos por el tratamiento del cáncer infantil. Los sobrevivientes podrían convertirse en sus mejores defensores, capaces de transmitir estos riesgos a los médicos después de haber sido capacitados adecuadamente por el equipo médico conocedores de los efectos a largo plazo del tratamiento del cáncer.

Debemos realizar más investigaciones para comprender la patogénesis de las neoplasias secundarias al tratamiento y para caracterizar a los individuos de mayor riesgo. Esta información debe usarse para desarrollar modelos de predicción del riesgo de cáncer, para estimar el riesgo individual y ayudar a acciones encaminadas a una vigilancia efectiva de las SNM.

Cronograma de actividades

	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY
Revisión bibliográfica	X	X	X	X			
Obtención muestras			X	X	X	X	X
Procesamiento muestras				X	X	X	X
Obtención resultados					X	X	X
Elaboración base de datos							X
Análisis estadístico							X
Análisis de resultados							X
Discusión y conclusiones							X

Referencias:

1. Mejía Aranguré Juan Manuel et al, Epidemiología de las leucemias en niños, Rev Med IMSS 2005; 43 (4): 323-333
2. Mejía Aranguré Juan Manuel et al, Leukemia's incidence in children below 12 years ago from El Salvador and México City during 1996 to 2000), BMC Cancer, 2006.
3. Siegel, R. et al. Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2012. *Ca cancer j clin.* 2012. 62:220-241.
4. Van der Pal. H. et al. High Risk of Symptomatic Cardiac Events in Childhood Cancer Survivors. *J Clin Oncol* 2012. 30. 1429-1437.
5. Rivera. R. Protocolos Técnicos Cáncer en Niños. 1a ed. Consejo Nacional para la Prevención y el Tratamiento del Cáncer en la Infancia y la Adolescencia. México 2010: 1-8.
6. De Santis C. et al. Cancer Treatment and Survivorship 2012-2013. American Cancer Society. 2012: 24-25.
7. Valdivieso M. et al. Cancer Survivors in the United States: A Review of the Literature and a Call to Action. *Int. J. Med. Sci.* 2012; 9: 163-173
8. Sieswerda, E. et al. The Dutch Childhood Oncology Group guideline for follow-up of asymptomatic cardiac dysfunction in childhood cancer survivors. *Ann Onc.* 2012; 23: 2191–2198.
9. Zhang, Y. et al. Late morbidity leading to hospitalization among 5-year survivors of young adult cancer: A report of the childhood, adolescent and young adult cancer survivors research program. *Int. J. Cancer.* 2014; 134: 1174–1182.
10. Rivera. R. Hematooncología Pediátrica: Principios Generales. 1a ed. Edit. Editores de Textos Mexicanos. Mexico. 2006: 5-6, 535-540.
11. Woodward E. et al. Late effects in survivors of teenage and young adult cancer: does age matter? *Annals of Oncology*, 2011; 22: 2561–2568.
12. Ward, E. et al. Childhood and Adolescent Cancer Statistics, 2014. *Ca Cancer J Clin* 2014; 64: 83-103
13. Perkins, J. et al. Infections Among Long-Term Survivors of Childhood and Adolescent Cancer. *Cancer* 2014; 120: 2514-21.
14. Ramos M. Seguimiento en Atención Primaria del niño oncológico. Cómo detectar las secuelas tardías. *Pediatr Integral*, 2012; 16:552-564.
15. Friedman DL, W. J., Subsequent neoplasms in 5-year survivors of childhood cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. *J Nat Cancer Inst*, 2010; 102: 1083-1095.
16. Mertens AC, L. Q. , Cause specific late mortality among 5year survivors of childhood cancer: the childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Instit*, 2008; 100: 1368–1379.
17. Armstrong GT, L. W. Occurrence of multiple subsequent neoplasms in long-term survivors of childhood cancer: A report from the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol*, 2011; 29: 3056–3064.
18. Mody R, L. S. Twenty five year followup among survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Blood*, 2008; 111: 5515–5523.

19. Breslow NE, L. J. Secondary malignant neoplasms after Wilms tumor: an international collaborative study. *Int J Cancer* , 2010; 127: 657–66. .
20. Bluhm EC, R. C. , Causespecific mortality and second cancer incidence after non-Hodgkin lymphoma: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Blood* 2008; 111: 4014-4021.
21. Bhatia S, Y. Y., High risk of subsequent neoplasms continues with extended follow-up of childhood Hodgkin's disease: report from the Late Effects Study Group. *J Clin Oncol*, 2003;21: 4386–94.
22. Bhatia S, S. C. Second cancers in survivors of childhood cancer. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2: 124–132.
23. Bhatia S, v. d.L. Risk of solid subsequent malignant neoplasms (smns) with extended followup of childhood hodgkin lymphoma (hl) survivors is comparable to the risk in known highrisk groups within the general population: report from the Late Effects Study Group (LESG). *Blood*, 2013; 122(21).
24. Neglia JP, F. D. Second malignant neoplasms in five-year survivors of childhood cancer: childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst*, 2001;93: 618-629.
25. Mertens AC, Y. Y. , Late mortality experience in five-year survivors of childhood and adolescent cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* , 2001; 19: 3163–3172 .
26. Limacher JM, F. T.-A. Two metachronous tumors in the radiotherapy fields of a patient with Li-Fraumeni syndrome. *Int J Cancer*, 2001; 96(4): 238-242.
27. Rosenberg, P. S. Cancer risks in Fanconi anemia: Findings from the German Fanconi Anemia Registry. *Haematologica* 2008; 93: 511–517.
28. Robison LL, G. D. Long-term outcomes of adult survivors of childhood cancer. *Cancer*,2005; 104:2557–2564.
29. Robison LL, H. M. Survivors of childhood and adolescent cancer: life-long risks and responsibilities. *Nat Rev Cancer*, 2014;14: 61-70.
30. Andersson A, E. G. Family history of cancer as a risk factor for second malignancies after Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer*,2008; 98:1001–1005.
31. Armstrong GT, L. W. Occurrence of multiple subsequent neoplasms in long-term survivors of childhood cancer: A report from the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol*,2011;29: 3056–3064.
32. Goode, E. L. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2002; 11: 1513–1530.
33. Chene P, Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy, *Nature Publishing Group*, 2003; 3:102-109
34. Whibley C, Pharoah DP, Hollstein M, p53 Polymorphisms: cáncer implications, *Nat Rev Cancer*, 2009; 9(2):95-107.
35. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, George DI. The codón 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential, *Nat Genet* ,2003; 33:357-365.
36. Leu JI, Dumont P, HafeyM, Murphy ME,, Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a BAK Mel 1 complex, *Nat Cell Biol*, 2004; 6:443-450.
37. Toyama T, Zhang Z, Nishio M, Hamaguchi M, Kondo N, Iwase H, Iwata H, Takahashi S, Yamashita H, Fujii Y, Association of TP53 Ara72Pro polymorphisms and the outcome of adjuvant therapy in breast cancer patients, *Breast Cancer Res* 2007; 9: R34

38. Schabath MB, Wu X, Wei Q, Li G, Gu J, Spitz MR, Combined effects of the p53 and p73 polymorphisms on lung cancer risk, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006;15:158-61.
39. Samerr, AS, Sha ZA, Syeed N, Banday MZ, Bashir SM, Bhat BA, Siddiqi MA, TP53 Pro47Ser and Arg72Pro polymorphisms and colorectal cancer predisposition in an ethnic Kashmiri population, *Genetics and molecular research*, 2010; 9(2):651-660.
40. Toffoli G, Biason P, Russo A, De Mattia E, Cecchin E, Hattinger CM, Pasello M, Alberghini M, Ferrari C, Scotlandi K, Picci P, Serra M, Effect of TP53 Arg72Pro and MDM2 SNP309 polymorphisms on the risk of high-grade osteosarcoma development and survival. *Clin Cancer Res*, 2009; 15(10): 3550-3556.
41. Dynnes Orsted D, Egil-Bojesen S, Tybjaerg-Hansen A, Gronne-Nordestgaard, Tumor suppressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population, *JEM*, 2007; 204(6): 1295-1301.
42. Ji-Young H, Geon Kook L, Dae Ho J, Sung Young L, Jin Soo L, Association of p53 codon 72 polymorphism and MDM2 SNP309 with clinical outcome of advanced non-small cell lung cancer, *American Cancer*, 2008; 113 (4):799-807.
43. Ellis NA, Huo D, Yildiz O, Worrlow LJ, Banerjee M, Le Beau MM, Larson RA, Allan JM, Onei K, MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro interact to alter therapy-related acute myeloid leukemia susceptibility, *Blood*, 2008; 112 (3): 741-749
44. Dop TN, Ucisik-Akkaya E, Davis CF, Morrison BA, Dorak MT, TP53 R72P and MDM2 SNP309 polymorphisms in modification of childhood acute lymphoblastic leukemia susceptibility, *Cancer Genet Cytogenet*, 2009; 195 (1): 31-36.
45. Feng L, Hollstein M, Xu Y, Ser46 phosphorylation regulates p53-dependent apoptosis and replicative senescence, *Cell Cycle*, 2006; 5:2312-2819, Kurihara A, Ser46 phosphorylation of p53 is not always sufficient to induce apoptosis: multiple mechanisms of regulation of p53-dependent apoptosis, *Genes Cells*, 2007; 12:853-861.
46. Li X, Dumont P, Della Pietra A, Shetler C, Murphy ME, The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant, *The Journal Of Biological Chemistry*, 2005; 280 (25): 24245-24251.
47. Freedman DA, Wu L, Levine AJ, Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci*, 1999; 55: 96-107.
48. Freedman DA, Levine AJ, Regulation of the p53 protein by the MDM2 oncoprotein. Thirty-eighth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res*, 1999; 59: 1-7
49. Bartel F, Taubert H, Harris LC, Alternative and aberrant splicing of MDM2 mRNA in human cancer, *Cancer cell*, 2002; 2:9-15.
50. Moll UM, Petrenko O, The MDM2-p53 interaction, *Mol Cancer Res*, 2003; 1:1001-1008.
51. Bougeard G, Baert-Desurmont S, Tournier I, Vasseur S, MARTIN c, Brugieres L, Chompret A, Bressac-de Paillerets B, Stoppa-Lyonnet D, Bonaiti-Pellie C, Frebourg T, Impact of the MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro polymorphisms on age of tumour onset in Li-fraumeni syndrome, *J Med Genet* 2005; 43: 531-3.
52. Hirata H, Hinoda Y, Kikuno N, Kawamoto K, Suehiro Y, Tanaka Y, Dahiya R, MDM2 SNP309 polymorphisms as risk factor for susceptibility and poor prognosis in renal cell carcinoma, *Clin Cancer Res*, 2007; 13(14):4123-4129.
53. Talseth BA, Meldrum C, Suchy J, Kurzawski G, Lubinski J, Scott RJ, MDM2 SNP309 T>G alone or in combination with the R72P polymorphism does not

- appear to influence disease expression and age of diagnosis of colorectal cancer in HNPCC patients. *INT j. Cancer*, 2006;120:563-565.
54. Jing D, Binhui R, Zhibin H, Jiaping C, Lingmin H, Juncheng D, Guandfu J, Lin X, Hongbing S, MDM2 SNP309 contributes to non-small cell lung cancer survival in chinese, *Molecular Carcinogenesis*, 2011; 50: 433-438.
55. Datong Z, Yanping C, Caijie G, Youngyue W, Guochun C, Nan L, Yayi H, Xiuqin J, Jianjun W, Polymorphisms of p53 and MDM2 genes are associated with severre toxicities in patients with non-small cell lung cancer, *Cancer Biology & Therapy*, 2014; 15 811): 1542-1551

Limitaciones del Estudio

Tiempo de seguimiento de 5 años para evaluar el desarrollo de segunda neoplasia.

Productos a obtener del estudio.

Los resultados de este proyecto pueden aportaran posibles biomarcadores de riesgo de segundas neoplasias pacientes con sobrevivientes de cáncer. Publicación de un artículo en revista indexada. Formación de recursos humanos (Tesis de especialidad en oncología pediátrica). Divulgación de los resultados obtenidos (congresos nacionales e internacionales).

Anexos:

Tabla1: Características Generales de los pacientes con segundas neoplasias.

PACIENTE	GENERO	EDAD DE DIAGNOSTICO 1	NEOPLASIA PRIMARIA	SEGUNDA NEOPLASIA	TIEMPO DESDE LA VIGILANCIA A DIAGNOSTICO SN	RADIOTERAPIA	QUIMIOTERAPIA
1	femenino	120	LLA AR	LMA	8	NO	SI
2	femenino	72	RB	SE	152	NO	SI
3	masculino	14	LLA RH	CE	5	SI	SI
4	femenino	48	NB	LLA AR	1	NO	SI
5	femenino	91	TW	OS	11	SI	SI
6	femenino	91	RB	LLA AR	5	NO	SI
7	femenino	24	RB	LL	153	SI	SI
8	masculino	108	SMD	LMA	18	NO	SI
9	masculino	16	RB	OS	132	NO	SI
10	masculino	14	TW			NO	SI
11	femenino	97	LLA RH			NO	SI
12	femenino	15	MG			SI	si
13	femenino	86	SMD			NO	NO
14	femenino	96	LLA AR			NO	SI
15	masculino	52	MB			SI	SI
16	femenino	36	LLA RH			NO	SI
17	femenino	120	TGS			SI	SI
18	masculino	46	AST			SI	NO
19	femenino	69	NB			NO	SI
20	femenino	138	TGO			NO	NO
21	masculino	67	LLA RH			NO	NO
22	femenino	168	OS			NO	SI
23	femenino	72	LMA			NO	NO
24	masculino	60	LMA			NO	SI
25	masculino	54	LLA RH			NO	SI
26	femenino	108	LLA AR			NO	NO
27	femenino	120	LLA AR			NO	SI

CARTA DE CONSENTIMIENTO VOLUNTARIO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.

“Asociación de los polimorfismos del gen MDM2 y P53 con el riesgo de segundas neoplasias en pacientes pediátricos sobrevivientes de cáncer.”

Estamos invitando a su hijo(a) a participar en este estudio de investigación médica que se lleva a cabo en el Hospital Infantil de México Federico-Gómez, en el departamento de Hemato-Oncología.

El trabajo tiene como objetivo estudiar la información de las células de su hijo (a) y asociarlo con el riesgo de desarrollar un segundo tipo de cáncer en pacientes sobrevivientes de cáncer como su hijo (a).

Justificación:

Debido a que la información de algunas células puede estar relacionada con el riesgo a desarrollar un segundo cáncer en pacientes sobrevivientes a un primer cáncer. Es por ello que la información que se obtenga como resultado de este estudio nos dará datos que podrán ayudar a identificar pacientes con riesgo, estableciendo una vigilancia estrecha con el fin de realizar detecciones

tempranas, que permitan brindar tratamiento oportuno, dar consejos y medidas para evitar conductas de riesgo, mejorando la supervivencia y calidad de vida de dichos pacientes.

Su hijo(a) es candidato a participar en este estudio, su participación es completamente voluntaria y debe ser autorizada por los padres o tutores.

Siéntase con absoluta libertad y confianza de hacer las preguntas que desee sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Derecho y respeto de los participantes: La participación de su paciente en el estudio es enteramente voluntaria y usted como su tutor es libre de rehusar tomar parte o abandonar en cualquier momento el estudio, sin afectar ni poner en peligro la atención médica futura. Además tiene usted derecho a ser tratado con respecto a conocer el propósito del estudio y retirarse de el sin ninguna presión de los investigadores.

CARTA DE CONSENTIMIENTO VOLUNTARIO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.

TITULO DEL ESTUDIO:

“Asociación de los polimorfismos del gen MDM2 y P53 con el riesgo de segundas neoplasias en pacientes pediátricos sobrevivientes de cáncer.”

Nombre del paciente _____

Nombre del tutor _____

Después de haber sido debidamente informado(a) sobre el objetivo del estudio y de haberme enterado que el estudio implica riesgo mínimo para mi hijo(a), he decidido aceptar voluntariamente la participación de mi hijo(a) en este proyecto.

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

La participación de su hijo(a) es completamente voluntaria.

No se altera en ninguna forma el tratamiento de su hijo(a).

Existe riesgo mínimo, ya que al momento de la obtención de la muestra de sangre de su hijo(a), se le realizará un piquete en el brazo de su hijo(a) y puede sentir un poco de dolor al introducir la aguja y surgir o no un moretón en el brazo de su hijo(a).

Los estudios realizados en esta investigación **NO** tendrán ningún costo para el paciente. Se realizara una sola toma de 2 ml de sangre (aproximadamente 1 cucharadita) de los tubos utilizados para sus pruebas rutinarias. Se mantendrá en secreto la información relacionada con su persona.

En cualquier momento puede retirar a su hijo(a) del estudio sin que esto lo afecte.

Su hijo (a) podrá tener o no un beneficio directo y ayudar más adelante a los niños sobrevivientes de cáncer.

Usted tendrá acceso a la información y/o resultados que se obtengan sobre su hijo (a) como parte del estudio principal y esta información será proporcionada por el investigador.

En caso de que usted tenga alguna duda relacionada al estudio, usted puede preguntarla a los investigadores.

Los resultados obtenidos de este estudio podrán ser publicados a nivel nacional e internacional, manteniendo siempre la confidencialidad del paciente.

En el caso que tuviese cualquier duda, pregunta o queja relacionada a la conducción de este estudio, puedo discutirlo con los investigadores la Dra. Gabriela Hernández Pliego y el Dr. Marco Antonio Murillo Maldonado, que se encuentran en el teléfono 52 28 9917 en la ext. 4204.

Ante dos testigos y el investigador principal, firmo o imprimo mi huella dactilar como constancia de mi aceptación voluntaria en la participación de mi hijo(a) en este estudio, el día _____ del mes de _____ del 20__ en la Ciudad de México.

Firma o huella dactilar del padre o tutor

Testigo 1

NOMBRE FIRMA

DIRECCION PARENTESCO

Testigo 2

NOMBRE FIRMA

DIRECCION PARENTESCO

Investigador Principal

Investigador Suplente

Dra. Gabriela Hernández Pliego

Dr. Miguel Palomo Colli

CARTA DE ASENTIMIENTO VOLUNTARIO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.

TITULO DEL ESTUDIO:

“Asociación de los polimorfismos del gen MDM2 y P53 con el riesgo de segundas neoplasias en pacientes pediátricos sobrevivientes de cáncer.”

Nombre del paciente: _____ Edad: _____

Te estamos invitando a participar en este estudio de investigación médica que se realiza en el Hospital Infantil de México Federico-Gómez, en el Departamento de Hemato-Oncología.

Objetivo:

El trabajo tiene como objetivo estudiar la información de tus células y asociarlo con el riesgo de desarrollar un segundo tipo de cáncer en pacientes sobrevivientes de cáncer como tú.

Justificación:

Debido a que la información de tus células puede estar relacionada con el riesgo a desarrollar un segundo cáncer en pacientes sobrevivientes a un primer cáncer. Es por esto que la información que se obtenga como resultado de este estudio nos dará datos que podrán ayudar a identificar pacientes con riesgo, estableciendo una vigilancia estrecha con el fin de realizar detecciones

tempranas, que permitan brindar tratamiento oportuno, dar consejos y medidas para evitar conductas de riesgo, mejorando la supervivencia y calidad de vida de pacientes como tú.

Eres candidato a participar en este estudio, tu participación es completamente voluntaria y debe ser autorizada por tus padres o tutores y por ti.

Siéntete con absoluta libertad y confianza de hacer las preguntas que desees para aclarar tus dudas al respecto.

Derecho y respeto de los participantes: Tu participación en este estudio es completamente voluntaria y tanto tu como tus padres o tutores son libres de negarse a tomar parte o abandonar en cualquier momento el estudio, sin afectar ni poner en peligro tu atención médica futura. Además tienes derecho a ser tratado con respecto a conocer el propósito del estudio y retirarte de el sin ninguna presión de los investigadores.

CARTA DE ASENTIMIENTO VOLUNTARIO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.

TITULO DEL ESTUDIO:

“Asociación de los polimorfismos del gen MDM2 y P53 con el riesgo de segundas neoplasias en pacientes pediátricos sobrevivientes de cáncer.”

Nombre del paciente: _____ Edad: _____

Después de haber sido debidamente informado(a) sobre el objetivo del estudio y de haberme enterado que el estudio no tiene riesgo para mí, he decidido aceptar voluntariamente participar en este proyecto.

Al aceptar por escrito tu participación, queda en el entendido que:

No se altera en ninguna forma tu tratamiento.

Existe riesgo mínimo, ya que al momento de la obtención de la muestra de sangre, se te realizará un piquete y puedes sentir un poco de dolor al introducir la aguja y puede surgir o no un moretón en tu brazo.

Los estudios realizados en esta investigación NO tendrán ningún costo. Se realizará una sola toma de 2 ml de sangre (aproximadamente 1 cucharadita) de los tubos utilizados para tus pruebas rutinarias. Se mantendrá en secreto la información relacionada con tu persona.

En cualquier momento puedes retirarte del estudio sin que esto te afecte.

Puedes tener o no un beneficio directo y ayudar más adelante a los niños sobrevivientes de cáncer.

Podrás conocer los resultados que se obtengan como parte del estudio y esta información te la dará el investigador.

En caso de que tengas alguna duda relacionada al estudio, puedes preguntarla a los investigadores.

Los resultados obtenidos de este estudio podrán ser publicados a nivel nacional e internacional, manteniendo siempre en secreto tus registros.

En caso que tengas cualquier duda, pregunta o queja relacionada con este estudio, puedes discutirlo con el investigador principal la Dra. Gabriela Hernández Pliego y el Dr.

Marco Antonio Murillo Maldonado, que se encuentran en el teléfono 52 28 9917 en la ext. 4204.

Ante dos testigos y el investigador principal, firmo o imprimo mi huella dactilar como constancia de mi aceptación para participar voluntaria en este estudio, el día _____ del mes de _____, 20____ en la Cd. de México.

Firma o huella dactilar del paciente

Firma o huella dactilar del padre o tutor

Testigo 1

NOMBRE FIRMA

DIRECCION PARENTESCO

Testigo 2

NOMBRE FIRMA

DIRECCION PARENTESCO

Investigador Principal

Investigador Suplente

Dra. Gabriela Hernández Pliego

Dr. Miguel Palomo Colli