



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL



“Asociación de los polimorfismos de la TPMT*1,*2,*3A,*3B,*3C y la MTHFR (677C>T y 1298A>C) con la Farmacocinética de la 6-Mercaptopurina, las reacciones adversas y la susceptibilidad a Leucemia Linfoblástica Aguda en pacientes pediátricos”

TESIS QUE PRESENTA:

Ossyneidee Gutiérrez Álvarez

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

DIRECTOR DE TESIS

Dr. en C. Ismael Lares Asef

CO-DIRECTOR

Dr. Francisco Flores Murrieta

ASESORES:

Dr. Carlos Galaviz Hernandez

Dra. en C. Martha Sosa Macías

Dr. Isaias Chairez Hernández



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE
INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL**



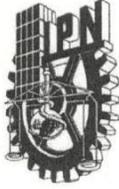
**“Asociación de los polimorfismos de la TPMT*1,*2,*3A,*3B,*3C y la
MTHFR (677C>T y 1298A>C) con la Farmacocinética de
la 6-Mercaptopurina, las reacciones adversas y la susceptibilidad a
Leucemia Linfoblástica Aguda en pacientes pediátricos”**

POR:

OSSYNEIDEE GUTIÉRREZ ÁLVAREZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

DURANGO, DGO. JUNIO 2016



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 13:00 horas del día 28 del mes de marzo del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada

por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del: CIIDIR-IPN Unidad Durango para examinar la tesis titulada:

Asociación de los polimorfismos de la TPMT *1, *2, *3A, *3B, *3C y la MTHFR (677C>T y 1298 A>C) con la farmacocinética de la 6-Mercaptopurina, las reacciones adversas y la susceptibilidad a leucemia linfoblástica aguda en pacientes pediátricos

Presentada por la alumna:

GUTIÉRREZ

ÁLVAREZ

OSSYNEIDEE

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

B	1	2	0	5	1	9
---	---	---	---	---	---	---

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

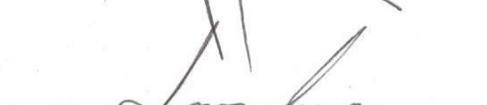
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


DR. JOSÉ ISMAEL ANTONIO LARES ASEF


DR. FRANCISCO JAVIER FLORES MURRIETA


DR. ISMAEL CHAIREZ HERNÁNDEZ

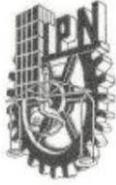

DR. CARLOS GALAVIZ HERNÁNDEZ


DRA. MARTHA GUADALUPE SOSA MACÍAS

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


DR. JOSÉ ANTONIO ÁVILA REYES


CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



SIP-13-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 19 de Febrero del 2016

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Durango en su sesión Ordinaria No. 2 celebrada el día 03 del mes de febrero conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

GUTIÉRREZ

ÁLVAREZ

OSSYNEIDEE

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre (s)

Con registro:

B	1	2	0	5	1	9
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Asociación de los polimorfismos de la TPMT *1, *2, *3A, *3B, *3C y la MTHFR (677C>T y 1298 A>C) con la farmacocinética de 6-Mercaptopurina, las reacciones adversas y las susceptibilidad a leucemia linfoblástica aguda en pacientes pediátricos.

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

Dr. José Ismael Antonio Lares Asef y Dr. Francisco Flores Murrieta

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en: CIIDIR-IPN Unidad Durango

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dr. José Ismael Antonio Lares Asef

Aspirante

M. en C. Ossyneidee Gutiérrez Álvarez

Dr. Francisco Flores Murrieta

Presidente del Colegio

Dr. José Antonio Avila Reyes



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día **28** del mes de **marzo** del año **2016** el que suscribe **Ossyneidee Gutiérrez Álvarez** alumna del Programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**, con número de registro **B120519**, adscrita al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. CIIDIR-IPN Unidad Durango**, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. José Ismael Antonio Lares Asef y del Dr. Francisco Javier Flores Murrieta y cede los derechos del trabajo titulado **“Asociación de los polimorfismos de la TPMT *1, *2, *3A, *3B, *3C y la MTHFR (677C>T y 1298 A>C) con la farmacocinética de la 6-Mercaptopurina, las reacciones adversas y la susceptibilidad a leucemia linfoblástica aguda en pacientes pediátricos”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones ossyneidee@hotmail.com, ismaelares@yahoo.com y fjfloresmurrieta@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

OSSYNEIDEE GUTIÉRREZ ÁLVAREZ

El presente Trabajo se realizó en los Laboratorios de Biología molecular de la Central de Instrumentación y en el de Cromatografía Líquida de la Academia de Genómica del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Durango.

DEDICATORIA

A Dios

“Dios, tu amor y tu bondad no tienen fin, me permites sonreír ante todos mis logros que son resultado de tu ayuda, y cuando caigo y me pones a prueba, aprendo de mis errores y me doy cuenta que lo permites para que llegue a ser mejor para ti, es cuando mi vida está en tus manos, como barro en manos del alfarero. Este trabajo de tesis ha sido una gran bendición en todo sentido y te lo agradezco Padre Celestial, y no cesa mi vida misma en decir que es gracias a ti que esta meta está cumplida.

Gracias por estar presente no sólo en esta etapa, sino en todo momento, ayudándome, dándome valentía y fortaleza para continuar. No lo hubiera logrado sin ti...porque reconozco que sin ti nada soy Jesucristo”.

A mi Esposo

“La vida es hermosa y una de las principales características de esta hermosura es que puedo compartirla contigo, tu sabes que el desarrollo de esta tesis no ha sido fácil, pero lo que puedo afirmar es que durante todo este tiempo me ofreciste lo mejor de ti, tu vida me dió alegría y fuerza en los momentos de agotamiento, este logro es de ambos porque ante Dios somos uno, Te amo “.

A mis Padres

“Por su amor, trabajo y sacrificios en todos estos años, gracias a Dios y a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy, ha sido una bendición ser su hija, son los mejores padres. Los amo con todo mi corazón”

A mi Director de Tesis y Comité Tutorial

“No ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a sus aportes y apoyo, lo complicado de lograr esta meta se ha notado menos. Gracias por la paciencia y dedicación en el avance y desarrollo de esta tesis, se refleja en mi vida cada uno de sus comentarios y aportes valiosos, gracias por permitirme conocerles como personas y como investigadores, un placer habernos cruzado en este breve tiempo de aprendizaje y crecimiento”.

Al CIIDIR-IPN Unidad Durango

“Por haberme permitido formarme en esta Institución durante el periodo de Maestría y ahora en el Doctorado, a todas las personas que fueron participes de este proceso ya sea de manera directa o indirecta, gracias a todos ustedes, fueron los responsables de realizar su pequeño aporte, que el día de hoy se ve reflejado en la culminación de este posgrado”.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt)

“Por el apoyo económico brindado durante la realización de este Posgrado. Muchas gracias (No. Registro Becario 276448, No. Apoyo 341014)”.

INDICE

	Pág.
GLOSARIO	I
ACRÓNIMOS, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	II
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	5
2.1 Leucemia Linfoblastica Aguda (LLA)	5
2.1.1 Generalidades	5
2.1.2 Diagnóstico	7
2.1.3 Etiología	9
2.1.4 Tratamiento	11
2.2 6-Mercaptopurina	15
2.2.1 Generalidades	15
2.2.2 Farmacocinética	15
2.2.3 Efectos adversos	16
2.2.4 Metabolismo	17
2.2.5 Farmacogenética	18
2.3 EL Gen <i>TPMT</i>	19
2.3.1 Generalidades	19
2.3.2 Efectos adversos	22
2.4 Otros polimorfismos que causan efectos adversos	23
2.5 EL Gen <i>MTHFR</i>	26
2.5.1 Generalidades	26
2.3 Polimorfismos en los genes <i>TPMT</i> y <i>MTHFR</i> y el riesgo a LLA	28
III. JUSTIFICACIÓN	29
IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	30
V. HIPÓTESIS	30
VI. OBJETIVOS	31
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	33
7.1 Diseño del estudio	33
7.2 Universo de estudio	33
7.3 Universo muestral	33
7.4 Criterios de selección	33
7.4.1 Inclusión	33
7.4.2 Exclusión	33
7.4.3 Eliminación	33
7.5 Tamaño de muestra	34
7.6.1 Objetivos 1-7	34
7.6.2 Objetivos 8-9	34
7.6 Variables en estudio	34
7.6.1 Independientes	34
7.6.2 Dependientes	35
7.6.3 Intervenientes	36
VIII. PROCEDIMIENTOS	37
8.1 Modificación y Validación de un método HPLC para cuantificar 6-MP	37

8.1.1	Reactivos	37
8.1.2	Solución Madre	37
8.1.3	Preparación de soluciones estándar y calibradores	37
8.1.4	Preparación de la muestra y extracción	37
8.1.5	Cromatografía	38
8.1.6	Validación del método analítico	38
8.2	Farmacocinética de 6-Mercaptopurina	39
8.2.1	Pacientes y colección de datos	39
8.3	Reacciones Adversas	41
8.3.1	Cuestionario	41
8.4	Susceptibilidad a Leucemia	43
8.4.1	Pacientes	43
8.5	Extracción de ADN	43
8.5.1	Protocolo	44
8.6	Electroforesis	45
8.6.1	Protocolo	45
8.7	Espectrofotometría	47
8.7.1	Protocolo	47
8.8	PCR en Tiempo Real	49
8.8.1	Sondas Taqman	50
8.8.2	Condiciones PCR utilizadas	50
8.8.3	Interpretación de los resultados	51
IX.	ASPECTOS ÉTICOS	55
X.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	55
10.1	Determinación de la asociación de los polimorfismos de TPMT y MTHFR con la farmacocinética de 6-MP	55
10.2	Determinación de la asociación de los polimorfismos de TPMT y MTHFR con las reacciones adversas	58
10.3	Determinación de la asociación de los polimorfismos de TPMT y MTHFR con La susceptibilidad a LLA.	58
XI.	RESULTADOS	60
11.1	Farmacocinética de 6-Mercaptopurina	60
11.1.1	Validación del método analítico HPLC	60
11.1.2	Datos generales de los pacientes	60
11.1.3	Modelo farmacocinético estructural	63
11.1.4	Modelo farmacocinético intermedio	63
11.1.5	Modelo farmacocinético final	64
11.2	Reacciones Adversas	67
11.2.1	Características clínicas de los pacientes	67
11.2.2	Parámetros clínicos asociados a toxicidad	67
11.2.3	Frecuencias alélicas y genotípicas de TPMT y MTHFR	68
11.2.4	Asociación de los efectos adversos y los polimorfismos de TPMT y MTHFR	69
11.3	Susceptibilidad a Leucemia	71
11.3.1	Frecuencias alélicas y genotípicas de MTHFR	71
11.3.2	Análisis combinado de MTHFR C677T y A1298C	72
11.3.3	Frecuencias alélicas y genotípicas de TPMT	72
XII.	DISCUSIÓN	74
12.1	Farmacocinética de 6-Mercaptopurina	74

12.2 Reacciones Adversas	77
12.3 Susceptibilidad a Leucemia	79
XIII. CONCLUSIONES	83
XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
XV. ANEXOS	105

GLOSARIO

Leucemia: Enfermedad de los órganos productores de la sangre que se caracteriza por la proliferación excesiva de leucocitos o glóbulos blancos en la sangre y en la médula ósea.

Monolix: Software estadístico para el análisis no lineal de efectos mixtos.

Tumorigenesis: Proceso de iniciar y promover el desarrollo de un tumor.

Carcinogenesis: Conjunto de fenómenos que determinan la aparición y desarrollo de un cáncer.

Polimorfismo: variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población, con una frecuencia mayor al 1%.

Farmacocinética: rama de la farmacología que estudia los procesos cinéticos a los que un fármaco es sometido a través de su paso por el organismo. Trata de dilucidar qué sucede con un fármaco desde el momento en el que es administrado hasta su total eliminación del cuerpo.

Efecto Sinérgico: forma de interacción que da como resultado efectos combinados o aditivos.

Método Bayesiano: tipo de inferencia estadística en la que las evidencias u observaciones se emplean para actualizar o inferir la probabilidad de que una hipótesis pueda ser cierta. El nombre «bayesiano» proviene del uso frecuente que se hace del teorema de Bayes durante el proceso de inferencia.

Criterio Akaike (AIC): medida de la calidad relativa de un modelo estadístico, para un conjunto dado de datos. Como tal, el AIC proporciona un medio para la selección del modelo farmacocinético.

ACRÓNIMOS, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

‰: Por ciento.

ml: mililitro.

µL: microlitro.

Ka: Constante de absorción.

V: Volumen de distribución.

K: Constante de eliminación.

TPMT: Tiopurina Metil Transferasa.

MTHFR: Metilen Tetrahidrofolato Reductasa.

XO: Xantina Oxidasa

HPRT: Hipoxantina Fosforribosil Transferasa

LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda.

SAM: S- Adenosil Metionina.

NCI: Instituto Nacional del Cáncer del inglés *National Cancer Institute*.

ADN: Acido Desoxirribonucleico.

EDTA: anticoagulante ácido etilendiaminotetrácetico.

PRC: Reacción en cadena de la polimerasa del inglés *polimerase chain reaction*.

6-MP: 6-Mercaptopurina

6-TG: 6-Tioguanina

6-mMP: 6-metil Mercaptopurina

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Molécula de 6-MP	15
Figura 2	Metabolismo de 6- MP	18
Figura 3	Posición del Gen TPMT (6p22.3)	19
Figura 4	Variantes alélicas de la TPMT	20
Figura 5	Variantes alélicas de TPMT en poblaciones caucásicas	21
Figura 6	Función de la <i>MTHFR</i>	24
Figura 7	Efectos adversos debidos a TPMT	25
Figura 8	Posición del Gen <i>MTHFR</i> (6p22.3)	26
Figura 9	Equipo de Cromatografía Líquida Agilent 1100	37
Figura 10	Software Monolix v4.20	39
Figura 11	Efectos adversos – criterios del NCI	41
Figura 12	Kit de extracción de ADN Macherey-Nagel	43
Figura 13	Preparación de muestras para electroforesis.	45
Figura 14	Muestras cargadas en el gel de agarosa.	46
Figura 15	Cámara de Electroforesis, C.B.S. Scientific Co. Modelo MGU-502 made in USA, 25 ^o Volts DC.	46
Figura 16	Placa del Transiluminador UV para visualización de muestras de ADN en gel de Agarosa.	46
Figura 17	Equipo Nanodrop 2000 (Marca ThermoScientific)	47
Figura 18	Placa del Nanodrop para agregar 1 µL de ADN en la ranura del Pozo del Equipo.	48
Figura 19	Placa del Nanodrop para agregar 1 µL de ADN en la ranura del Pozo del Equipo.	48
Figura 20	Equipo Applied Biosystems Modelo Step One™	49
Figura 21	Cocktail para la reacción de PCR	50
Figura 22	Amplificación de PCR-Rt sonda C_25625805_10, Homocigoto silvestre	51
Figura 23	Análisis de Multicomponentes sonda C_12091552_30, Homocigoto silvestre	51
Figura 24	Amplificación de PCR-Rt sonda C_12091552_30, Heterocigoto	52
Figura 25	Análisis de Multicomponentes sonda C_25625805_10, Heterocigoto	52
Figura 26	Grafica de Discriminación alélica	54
Figura 27	Cromatogramas característicos de 6-MP	60
Figura 28	Concentraciones individuales de 6-MP (ng/ml)	61

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Principales causas de mortalidad en edad preescolar Nacional (de 1 a 4 años), 2008.	5
Tabla 2	Principales causas de mortalidad en edad escolar Nacional (de 5 a 14 años), 2008.	6
Tabla 3	Clasificación Morfológica de las Leucemias	7
Tabla 4	Fármacos empleados en el tratamiento de LLA	13
Tabla 5	Parámetros farmacocinéticos de 6-MP	16
Tabla 6	Evaluación de toxicidad debido a 6-MP de acuerdo a los efectos adversos en los pacientes (Adaptado de NCI 2006, NCI 2009)	42
Tabla 7	Sondas utilizadas para la determinación del genotipo de TPMT y MTHFR	50
Tabla 8	Cocktail para la reacción de PCR	50
Tabla 9	Tipos de fluorescencia y genotipos correspondientes obtenidos mediante PCR en tiempo Real	53
Tabla 10	Características generales de los pacientes	62
Tabla 11	Modelo estructural básico con cálculo de la función objetivo y error inter-individual.	63
Tabla 12	Modelo intermedio (con covariables)	64
Tabla 13	Modelo estructural final	64
Tabla 14	Farmacocinética Poblacional de 6-MP	66
Tabla 15	Características clínicas de los pacientes	67
Tabla 16	Reacciones adversas en la población estudiada	68
Tabla 17	Frecuencias alélicas y genotípicas de TPMT *2 y *3A	68
Tabla 18	Frecuencias alélicas y genotípicas de MTHFR C677T y A1298C	69
Tabla 19	Toxicidad (Grado 0 vs. Grado 1-4 y Grado 0-1 vs. Grado 2-4) asociado a los genotipos de TPMT	69
Tabla 20	Toxicidad (Grado 0 vs. Grado 1-4 y Grado 0-1 vs. Grado 2-4) asociado a los genotipos de MTHFR C677T.	70
Tabla 21	Toxicidad (Grado 0 vs. Grado 1-4 y Grado 0-1 vs. Grado 2-4) asociado a los genotipos de MTHFR A1298C.	70
Tabla 22	Frecuencias de los polimorfismos MTHFR C677T y A1298C	71
Tabla 23	Frecuencias de los genotipos combinados de MTHFR C677T y A1298C	72
Tabla 24	Frecuencias de los polimorfismos TPMT *2 y *3A en los individuos estudiados.	73

RESUMEN

Objetivo. Determinar la asociación de los polimorfismos de la TPMT *1,*2,*3A,*3B,*3C y la MTHFR (677C>T y 1298A>C) con la farmacocinética de 6-Mercaptopurina, las reacciones adversas y la susceptibilidad a Leucemia Linfoblástica Aguda en pacientes pediátricos.

Material y métodos. 1. Para el análisis farmacocinético, los datos fueron colectados prospectivamente en 10 pacientes con LLA (periodo de selección Marzo 2013- Julio 2014), siendo el escrutinio exclusivamente durante la etapa de mantenimiento y bajo tratamiento con 6-MP (dosis estándar 75 mg/m²/día) del Centro Estatal de Cancerología de Durango (CECAN). Las concentraciones plasmáticas de 6-MP ($n=56$), fueron cuantificadas usando un método HPLC (modificado y validado). El modelo de un compartimento con absorción oral y de primer orden fue usado para el modelaje de la farmacocinética poblacional de 6-MP, así mismo se implementó un análisis de efectos mixtos para definir las covariables biológicas (edad, sexo) y genéticas (TPMT *1,*2,*3A,*3B,*3C y MTHFR (677C>T y 1298A>C) asociadas a la variabilidad en la farmacocinética de 6-MP, los análisis fueron desarrollados en el software Monolix v4.2.0 2. Para el análisis de las reacciones adversas, se colectaron datos prospectivamente de 39 pacientes con diagnóstico de LLA (Marzo 2013- Julio 2014) y bajo tratamiento con 6-MP (dosis estándar), en cualquiera de las etapas de tratamiento de la enfermedad, las reacciones adversas fueron definidas según criterios del NCI mediante parámetros hematológicos y/o bioquímicos en cada paciente.). Todos los pacientes fueron genotipados para TPMT *1,*2,*3A,*3B,*3C y MTHFR (677C>T y 1298A>C), realizando el consecuente análisis de asociación con los datos obtenidos. 3. En el caso de susceptibilidad a LLA se realizó un estudio de casos y controles, el grupo de casos conformado por 70 niños con diagnóstico de LLA y edad ≤ 15 años, comparados con el grupo control (152 individuos sin LLA). Los grupos se parearon por edad y género. Los pacientes fueron reclutados del CECAN, Durango y del Centro Oncológico Pediátrico de Baja California. Todos los pacientes fueron genotipados para TPMT *1,*2,*3A,*3B,*3C y MTHFR (677C>T y 1298A>C) mediante PCR en tiempo real (PCRrT) **Resultados.** Los parámetros farmacocinéticos poblacionales para 6-MP oral fueron K_a 0.0624 h⁻¹, V 0.0290 L/Kg y K 3.03 h⁻¹. La única covariable influyente en la variabilidad farmacocinética de 6-MP fue la edad ($p < 0.001$) para el caso de los parámetros K_a y V ($p < 0.001$) no así para la K ($p=0.47$). El sexo, y los polimorfismos de TPMT y MTHFR no presentaron asociación significativa con la farmacocinética de 6-MP; No se encontró asociación de los polimorfismos de TPMT y MTHFR con las reacciones adversas de 6-MP; El genotipo MTHFR 1298CC está asociado a susceptibilidad a LLA (OR = 6.48; IC del 95%, 1.26-33.2, $p=0.025$). El haplotipo de MTHFR 677CC+1298AC (OR=0.23; 95% CI, 0.06–0.82, $p=0.023$) ejerce un efecto protector a LLA. No existió significancia estadística para los genotipos MTHFR 677CT, MTHFR 677TT, TPMT*2 y *3A. **Conclusión.** La edad provoca una variabilidad inter-individual en los pacientes bajo tratamiento con 6-MP. Los genotipos MTHFR 1298CC y MTHFR 677CC+1298AC se asocian a riesgo y efecto protector a LLA sucesivamente en población mexicana.

Palabras clave. TPMT, MTHFR, 6-MP, Farmacocinética, Reacciones adversas.

ABSTRACT

Objective. To determine the association of the *TPMT* *1,*2,*3A,*3B,*3C and the *MTHFR* (677C>T and 1298A>C) genetic polymorphisms with the 6-Mercaptopurine pharmacokinetics, possible adverse reactions and susceptibility to acute lymphoblastic Leukemia in Mexican paediatric patients.

Material and Methods. 1. Data from ten ALL patients were collected prospectively (selection period, March 2013 - July 2014). The scrutiny was realized during the maintenance phase of the treatment with 6-mercaptopurine (standard dose 75mg/m²/day) from Centro Estatal de Cancerología de Durango (CECAN). The 6-MP plasmatic concentrations (n=56) were quantified using a HPLC method (modified and validated). A one compartment model with first order oral absorption was used for the population pharmacokinetics modeling of 6-MP. Also, a mixed-effect analysis was implemented to define the covariates involved, as biological (age, sex), and genetic (*TPMT* *1,*2,*3A,*3B,*3C and *MTHFR* (677C>T and 1298A>C) associated to variability of 6-MP population pharmacokinetics. Software Monolix v4.2.0 was employed for these analyses. 2. For the adverse reaction analysis, data from 39 diagnosed ALL patients were collected prospectively (March 2013 – July 2014) with 6-MP treatment (standard dose) at any treatment stage of the disease. The adverse reactions were defined according to the NCI criteria by the hematological and/or biochemical parameters in each patient. After genotyping of ALL patients for *TPMT* *1,*2,*3A,*3B,*3C and *MTHFR* (677C>T and 1298A>C), the association study was realized with the data obtained. 3. To test ALL susceptibility, a case- control study was undertaken. The case group included 70 children with ALL diagnosis and age ≤ 15 years compared to the control group of 152 individuals without ALL. Groups were paired by age and gender. ALL patients were recruited from CECAN Durango and Centro Oncológico Pediátrico de Baja California. They were genotyped for the aforementioned polymorphisms by Real Time PCR. **Results.** Population pharmacokinetics parameters for oral 6-MP were K_a 0.0624 h⁻¹, V 0.0290 L/Kg and K 3.03 h⁻¹. The solely influential covariate in the pharmacokinetics variability of 6-MP was age ($p < 0.001$) for parameters K_a and V ($p < 0.001$) without influencing K ($p=0.47$). Gender, *TPMT* and *MTHFR* genetic polymorphisms showed no significant association to 6-MP pharmacokinetics, nor 6-MP adverse reactions. However, *MTHFR* 1298CC genotype showed a significant association to ALL susceptibility (OR = 6.48; IC del 95%, 1.26-33.2, $p=0.025$). More importantly, the *MTHFR* 677CC+1298AC (OR=0.23; 95% CI, 0.06–0.82, $p=0.023$) haplotype promotes a protective effect to ALL. No significant statistical difference for the *MTHFR* 677CT, *MTHFR* 677TT, *TPMT**2 and *3A genotypes was found. **Conclusion.** Age is a causing factor of inter-individual variability in ALL patients with 6-MP treatment. In Mexican population *MTHFR* 1298CC genotype is associated to ALL susceptibility while the *MTHFR* 677CC+1298AC genotype is related to a protective effect to ALL.

Key words. *TPMT*, *MTHFR*, 6-MP, pharmacokinetics, adverse reactions.

I. INTRODUCCIÓN

El fármaco 6-Mercaptopurina (6-MP) es uno de los agentes anticancerígenos usados desde hace más de medio siglo cuando investigadores como Farber et al. (1948) y Burchenal et al. (1953) demostraron que dicho medicamento podría inducir remisiones temporales en la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) infantil. Los protocolos para LLA al día de hoy (Schmiegelow et al, 2010; Gaynon et al, 2010; Salzer et al, 2010; Moricke et al, 2010; Schrappe et al, 2010) incluyen un régimen de inducción con 3 o 4 fármacos antineoplásicos, seguido por varios meses de terapia de consolidación, para luego continuar con la terapia de mantenimiento con 6-Mercaptopurina/Metotrexate durante 2-3 años desde el diagnóstico del paciente, la terapia es en forma oral y diariamente para en el caso de 6-MP (Rivera et al, 1993; Rocha JC *et al*, 2005), siendo hasta nuestros días un pilar en el tratamiento ya que contribuye al 90% de la tasa de supervivencia en los pacientes pediátricos con LLA (Zerra et al, 2016; Thipaine et al, 2016). Tomando en cuenta que la absorción de 6-MP es rápida, la vida media de eliminación es corta (1-2 h) y la alta variabilidad inter-individual de este fármaco, diferentes estudios han realizado análisis farmacocinéticos de 6-MP llegando a diferentes conclusiones, 1) la monitorización terapéutica es esencial para la dosificación racional de 6-MP (Derijks et al, 2004), 2) la administración intravenosa del ribósido de 6-MP alcanza niveles sanguíneos estables del fármaco activo en niños con LLA en comparación con 6-MP por vía oral (Mawatari et al, 2001), 3) para el ajuste correcto de las dosis de 6-MP resulta necesario definir modelos farmacocinéticos poblacionales y matemáticos (Hayder et al, 1989; Ogugbenro et al, 2015; Jayachandran et al, 2014; Noble et al, 2010), 4) deben de considerarse la mayor cantidad de covariables que podrían afectar la farmacocinética de este fármaco (Nguyen et al, 2013), y por ende su dosificación (Fakhoury et al, 2007; Farfan et al, 2013).

Cabe señalar que la variabilidad inter-individual alta de este fármaco se debe en gran parte a los polimorfismos genéticos de complejos enzimáticos involucrados en la biotransformación y eliminación del medicamento (Lennard, 1999), de entre los cuales se encuentran la Tiopurina Metil Transferasa (*TPMT*) y la 5-10 Metilen Tetrahidrofolato Reductasa (*MTHFR*), la actividad enzimática concerniente a *TPMT* se reduce debido a polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) (Armstrong VW et al, 2004), los alelos que representan del 80 al 95% de variantes que contribuyen en la disminución de la actividad enzimática son *TPMT*2* (238 G>C) y *TPMT*3A* (460 G>A y 719 A>G), las mutaciones 460G>A (**3B*) y 719A>G (**3C*) son usualmente heredadas juntas como el alelo **3A* (Milek et al, 2006; Tai et al, 1997), la

actividad enzimática reducida es debido al aumento en la tasa de proteólisis de las proteínas mutantes, el mecanismo post-transcripcional de la pérdida de la función de TPMT no ha sido aclarado ya sea para *2 y *3A (Tai et al, 1999). Para en el caso de MTHFR, existen más de 20 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), los más importantes son el 677 C>T (Ala22Val) y el 1298 A>G (Glu429Ala) (Wall M et al, 2003; van der Put et al, 1998). Su importancia radica en la disminución enzimática severa a la proteína, para el polimorfismo C677T (Ala22Val) genotipo homocigoto, la disminución es del 70%, en comparación con sujetos homocigotos silvestres (Guéant et al, 2006; Frosst et al, 1995). Y para la transición A1298C generada en el aminoácido 429, dentro del dominio regulador de la MTHFR, la disminución en la actividad enzimática es del 60- 70 %. (Van der Put et al, 1998; Weisberg et al, 1998; Scriver et al, 2001).

Arenas et al (2005) sugiere por primera vez, que el cofactor de TPMT, S-Adenosil Metionina (SAM) sintetizado en el ciclo del folato por MTHFR, podría influenciar la actividad de TPMT. Ha sido propuesto que el sitio de unión de SAM estabiliza la estructura tridimensional de TPMT afectando la terapia (Scheuermann et al, 2004), por lo que resulta necesario una correcta función de ambas enzimas con el fin del proceso de eliminación de 6-MP. Estas enzimas en conjunto, podrían ser marcadores de toxicidad al estar involucrados en el proceso de biotransformación del medicamento. En adición a esto, al ser MTHFR uno de los principales elementos en la vía del folato, desempeña un papel importante en la metilación del ADN y la síntesis de nucleótidos, sugiriendo (Silva et al, 2013) que la deficiencia enzimática de MTHFR y la leucemogénesis podrían estar asociadas (Lamm et al, 2015) esto debido a una escasa cantidad de folato intracelular y por ende el daño al ADN, por otra parte los individuos con genotipo heterocigoto y homocigoto para TPMT, podrían ser excepcionalmente sensibles al efecto mielosupresor del medicamento, y consecuentemente el posible riesgo de cáncer asociado a esto (Rocha et al, 2005).

A la fecha, no existen reportes del análisis conjunto de ambas enzimas (TPMT y MTHFR) como covariables involucradas en la variabilidad inter-individual del fármaco 6-MP, además de su asociación conjunta a las reacciones adversas y a la susceptibilidad a LLA en pacientes pediátricos.

Por lo que el objetivo de este estudio es:

Determinar la asociación de los Polimorfismos de la *TPMT* *1,*2,*3A,*3B,*3C y la *MTHFR* (677C>T y 1298A>C) con la Farmacocinética de 6-Mercaptopurina, las reacciones adversas y la susceptibilidad a Leucemia Linfoblástica Aguda en pacientes pediátricos.

II. ANTECEDENTES

2. 1 Leucemia

2.1.1 Generalidades

La Leucemia es una neoplasia maligna caracterizada por una alteración citogenética que ocasiona la proliferación anormal monoclonal de células precursoras de la serie linfoide y que infiltra más de 25% de la médula ósea (Pizzo PA & Poplack DG, 2006), es la neoplasia maligna más frecuente en los niños y representa 25% de todos los tipos de cáncer en éstos. Los datos más recientes en México reportados en 2008, mencionan que la Leucemia ocupa el séptimo lugar en cuanto a mortalidad en niños de uno a cuatro años de edad (Tabla 1), con una tasa de 2.4/100 000 habitantes, y en los niños de 5 a 14 años es la segunda causa de muerte, sólo después de los accidentes de tránsito de vehículo de motor, con una tasa de 2.7/ 100 000 habitantes (Tabla 2) (SINAIS 2008).

Tabla 1. Principales causas de mortalidad en edad preescolar Nacional (de 1 a 4 años), 2008.

Orden	Clave CIE 10a. Rev.	Descripción	Defunciones	Tasa ^{1/}	%
	A00-Y98	Total	5 720	73.6	100.0
1	A00-A09	Enfermedades infecciosas intestinales	460	5.9	8.0
2	J10-J18, J20-J22	Infecciones respiratorias agudas bajas	448	5.8	7.8
3	^{2/}	Accidentes de vehículo de motor	425	5.5	7.4
4	Q20-Q24	Malformaciones congénitas del corazón	391	5.0	6.8
5	W65-W74	Ahogamiento y sumersión accidentales	291	3.7	5.1
6	E40-E46	Desnutrición calórico protéica	234	3.0	4.1
7	C91-C95	Leucemia	189	2.4	3.3
8	G40-G41	Epilepsia	102	1.3	1.8
9	X85-Y09, Y87.1	Agresiones (homicidios)	84	1.1	1.5
10	W00-W19	Caídas accidentales	60	0.8	1.0
11	N00-N19	Nefritis y nefrosis	54	0.7	0.9
12	F01, F03, G30-G31.1, G31.8-G31.9, G91	Demencia y otros trastornos degenerativos y hereditarios del Sist. Nervioso Cent	53	0.7	0.9
13	J45-J46	Asma	50	0.6	0.9
14	D50-D64	Anemia	49	0.6	0.9
15	I60-I69	Enfermedad cerebrovascular	48	0.6	0.8
16	X00-X09	Exposición al fuego, humo y llamas	47	0.6	0.8
17	X40-X49	Envenenamiento accidental	43	0.6	0.8
18	I30-I33, I38, I40, I42	Enfermedades inflamatorias del corazón (excluye Fiebre reumática)	35	0.5	0.6
19	J00-J06	Infecciones respiratorias agudas altas	33	0.4	0.6
20	Q90	Síndrome de Dow n	27	0.3	0.5
	R00-R99	Causas mal definidas	97	1.2	1.7
		Las demás	2 500	32.2	43.7

^{1/} Tasa por 100,000 habitantes

No se incluyen defunciones de residentes en el extranjero

^{2/} V02-V04 (.1, .9), V09.2-V09.3, V09.9, V12-V14 (.3-.9), V19.4-V19.6, V20-V28 (.3-.9), V29-V79 (.4-.9), V80.3-V80.5, V81.1, V82.1, V83-V86(.0-.3), V87.0-V87.8, V89.2, V89.9, Y85.0

Las principales causas de mortalidad están basadas en la lista GBD de 165

Fuente: Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS y de las Proyecciones de la Población de México 2005 - 2050, y proyección retrospectiva 1990-2004. CONAPO 2006.

Tabla 2. Principales causas de mortalidad en edad escolar Nacional (de 5 a 14 años), 2008.

Orden	Clave CIE 10a. Rev.	Descripción	Defunciones	Tasa ^{1/}	%
	A00-Y98	Total	6,565	30.4	100.0
1	^{2/}	Accidentes de vehículo de motor	878	4.1	13.4
2	C91-C95	Leucemia	574	2.7	8.7
3	W65-W74	Ahogamiento y sumersión accidentales	317	1.5	4.8
4	X60-X84, Y87.0	Lesiones autoinfligidas intencionalmente (suicidios)	191	0.9	2.9
5	X85-Y09, Y87.1	Agresiones (homicidios)	189	0.9	2.9
6	Q20-Q24	Malformaciones congénitas del corazón	184	0.9	2.8
7	N00-N19	Nefritis y nefrosis	170	0.8	2.6
8	J10-J18, J20-J22	Infecciones respiratorias agudas bajas	145	0.7	2.2
9	E40-E46	Desnutrición calórico protéica	112	0.5	1.7
10	G40-G41	Epilepsia	111	0.5	1.7
11	A00-A09	Enfermedades infecciosas intestinales	101	0.5	1.5
12	I60-I69	Enfermedad cerebrovascular	93	0.4	1.4
13	C81-C90	Linfomas y mieloma múltiple	92	0.4	1.4
14	W00-W19	Caidas accidentales	78	0.4	1.2
15	D50-D64	Anemia	70	0.3	1.1
16	J45-J46	Asma	52	0.2	0.8
17	I30-I33, I38, I40, I42	Enfermedades inflamatorias del corazón (excluye Fiebre reumática)	43	0.2	0.7
18	X40-X49	Envenenamiento accidental	36	0.2	0.5
19	Q05, Q07.0	Espina bífida	34	0.2	0.5
20	X00-X09	Exposición al fuego, humo y llamas	31	0.1	0.5
	R00-R99	Causas mal definidas	81	0.4	1.2
		Las demás	2,983	13.8	45.4

^{1/} Tasa por 100,000 habitantes

No se incluyen defunciones de residentes en el extranjero

^{2/} V02-V04 (.1, .9), V09.2-V09.3, V09.9, V12-V14 (.3-.9), V19.4-V19.6, V20-V28 (.3-.9), V29-V79 (.4-.9), V80.3-V80.5, V81.1, V82.1, V83-V86(.0-.3), V87.0-V87.8, V89.2, V89.9, Y85.0

Las principales causas de mortalidad están basadas en la lista GBD de 165

Fuente: Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS y de las Proyecciones de la Población de México 2005 - 2050, y proyección retrospectiva 1990-2004. CONAPO 2006.

Existe según la Asociación FAB (Franco Americana Británica) una clasificación morfológica de las Leucemias la cual se presenta en la **Tabla 3**. Para en el caso de las leucemias agudas, en especial la LLA al ser una neoplasia de células precursoras (linfoblastos) comprometidas a un linaje, ya sea B o T, con afección a médula ósea y/o a sangre periférica, es clasificada en base a las características morfológicas de los linfoblastos en tres grupos, L1, L2 y L3 (Bennett *et al*, 1981). La LLA es la neoplasia más común diagnosticada en pacientes menores de 15 años, constituye la cuarta parte de las neoplasias diagnosticadas en este grupo de edad y 76% de todas las leucemias. (Bennett *et al*, 1981).

Tabla 3. Clasificación morfológica de las Leucemias (11 tipos según la Asociación de la FAB- Franco Americana Britanica)

Leucecias mieloblásticas agudas (LMA)	
M0	Leucemia aguda Mieloblastica con diferenciación mínima
M1	Leucemia aguda mieloblástica sin maduración
M2	Leucemia aguda mieloblastica con maduración
M3	Leucemia aguda promielocitica
M4	Leucemia aguda mielomonoblastica
M4Eo	Leucemia aguda mielomonoblastica con eosinófilos anormales
M5	Leucemia aguda monoblástica pura
M6	Eritroleucemia
M7	Leucemia aguda megacarioblástica
Leucecias Linfoblásticas agudas (LLA)	
L1	Leucemia linfoblástica típica
L2	Leucemia linfoblástica atípica
L3	Leucemia similar al linfoma de Burkit

Tomado de Benett et al, 1981.

2.1.2 Diagnóstico de la LLA

La LLA es una enfermedad aguda caracterizada por dolor óseo, síndrome anémico (palidez, taquicardia, astenia, fatiga), trombocitopenia (petequias, hemorragia), neutropenia (infecciones) y organomegalia (hepato-esplenomegalia), con la presencia de pancitopenia, bicitopenia o leucocitosis y blastos en la médula ósea o sangre periférica. El diagnóstico inicial se realiza por la sospecha clínica y se confirma con el análisis morfológico de la medula ósea.

La sospecha clínica debe ser complementada con pruebas hematológicas y metabólicas. El estándar de oro para el diagnóstico es el aspirado de médula ósea, de donde se obtiene muestra para realizar estudios de morfología, citoquímica, fenotipo, cariotipo y de biología molecular. Además, deben realizarse la punción lumbar para análisis de líquido cefalorraquídeo y la radiografía de tórax para la búsqueda de masas mediastinales (Tefferi & Killmann, 2008).

A continuación se detallan más claramente cada uno de los procedimientos para el paciente que ingresa por primera vez con sospecha de LLA:

- **Examen físico y antecedentes:** examen del cuerpo para verificar los signos generales de salud, como la revisión de signos de enfermedad. Se toman

también los antecedentes patológicos de las enfermedades y los tratamientos previos del paciente.

- **Recuento sanguíneo completo (RSC) con diferencial:** procedimiento mediante el cual se toma una muestra de sangre y se analiza lo siguiente: Biometría hemática, química sanguínea, electrolitos completos, pruebas de función hepática, perfil de hierro, ácido fólico, vitamina B12, ferritina, hepatitis virales, HIV (con hoja de consentimiento informado), fracción de expulsión del ventrículo izquierdo por gammagrafía (MUGA), punción lumbar (se realiza con menos de 20,000 leucocitos y más de 50,000 plaquetas).
- **Aspiración de la médula ósea y biopsia:** extracción de una muestra de médula ósea, sangre, y un trozo pequeño de hueso mediante la inserción de una aguja en el hueso de la cadera o el esternón. El patólogo observa las muestras de médula ósea, sangre y hueso bajo un microscopio para verificar si hay signos de cáncer (Tefferi A & Killmann NM, 2008).
- **Clasificación de la LLA por morfología según la FAB (Bennett *et al*, 1981).**
en:
 - 1) L1: Células pequeñas con cromatina homogénea, escaso citoplasma.
 - 2) L2: Células grandes y heterogéneas, con núcleo irregular y citoplasma variable.
 - 3) L3: Células grandes y homogéneas, con más de 5% de mitosis y por lo menos 25% de células vacuoladas.

Inmunofenotipificación: prueba en la que se observan bajo un microscopio las células de una muestra de sangre o de médula ósea para verificar si los linfocitos malignos (cancerosos) son de estirpe B ó T (Shuster *et al*, 1998). El fenotipo más común en pacientes con LLA corresponde al de células precursoras B y representa el 80-85% de los casos de LLA infantil. El inmunofenotipo T se asocia con características clínicas de mal pronóstico (Shuster *et al*, 1998).

- *Marcadores de células tempranas:*

CD 34, CD 117, HLA, TdT

- *Marcadores de células B:*

CD19, CD79a, CD22, CD10, cIgM, mIgM.

• *Marcadores de células T:*

CD3, CD5, CD2, CD1a, CD7.

- **Análisis citogenético:** prueba de laboratorio en la que se observan bajo un microscopio las células de una muestra de sangre o de médula ósea para verificar si hay alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales en los linfocitos. También se pueden realizar otras pruebas, como la hibridación fluorescente in situ (FISH), para determinar si hay ciertos cambios en los cromosomas.

FISH para el paciente de primera vez con leucemia de origen B

- t(4;11) AL1-AF4 MLL
- t(9;22) BCR/ABL
- T(1;19) PBX-E2A
- t(12;21) TEL/AML1 (raro adulto)
- 11q23

FISH y biología molecular de paciente con leucemia T

- Notch 1
 - t(10;14)
 - HIX11-TCR
 - t(11;14)
 - LMO/TCR
 - SIL-TAL1
 - NUP213-ABL1
 - HOX11
 - HOX 11L2
- **Radiografía del tórax:** rayos X de los órganos y huesos del interior del tórax, La radiografía del tórax se realiza para ver si las células leucémicas están formando una masa a nivel mediastínico provocando agrandamiento de los nódulos linfáticos.

2.1.3 Etiología de la LLA

No hay una única causa conocida sin embargo hay una serie de factores asociados a la presencia de la enfermedad (Ross *et al*, 2002): La leucemia, al igual que otros tipos de neoplasias, es el resultado de mutaciones del ADN. Ciertas mutaciones producen la activación de oncogenes o la desactivación de los genes supresores de

tumores (Redaelli *et al*, 2005) y con ello alteran la regulación de la muerte celular, la diferenciación o la mitosis. Estas mutaciones ocurren espontáneamente o como resultado de la exposición a la radiación o a sustancias cancerígenas, además de la probable influencia de factores genéticos.

Aparentemente, la leucemia se inicia con un evento *in-utero*, el cual se ha demostrado por análisis molecular en células mononucleares de muestras de sangre de cordón al nacimiento. Dichas alteraciones, son expresadas de igual modo en el fenotipo neoplásico (Ziegler *et al*, 2005, Rubnitz JE Pui Ch 2003, Ravindranath 2003).

Se ha establecido que el uso por la gestante de ciertas sustancias como marihuana, antihistamínicos, anfetaminas, entre otras, pueden incrementar el riesgo en el hijo de presentar leucemia en la niñez, mientras que el uso sistemático de folato durante el embarazo ha reducido hasta en 60% los casos de neoplasia (Ziegler *et al*, 2005). No se ha podido establecer el papel de factores medioambientales tales como campos electromagnéticos, exposición a radón y tabaquismo materno en el desarrollo de la enfermedad (Chan KW 2002). Otros factores posiblemente implicados incluyen exposición nuclear residencial u ocupacional en los niños o los padres, radiaciones no ionizantes, pesticidas, benceno, vitamina K, aceite de hígado de bacalao, inhibidores de la topoisomerasa II naturales y manufacturados, nitratos de la dieta (carnes frías procesadas) y el consumo de agua contaminada con tricloroetileno (Redaelli *et al*, 2005). Además de incluir factores biológicos como infecciones víricas que se han vinculado a leucemia. Experimentos en ratones y otros mamíferos han demostrado la relación entre los retrovirus y la leucemia, esta relación se ha identificado en retrovirus humanos. El primer retrovirus humano identificado fue el virus linfotrópico T humano o HTLV-1, el cual causa la leucemia de células T (Barry L, 1998). Además de estas cuestiones, las personas con anomalías cromosómicas o ciertas enfermedades genéticas (Síndrome de Down, Síndrome de Li-Fraumeni, Neurofibromatosis, Anemia de Fanconi), tienen un mayor riesgo de padecer leucemia (Brunning 2001; Stass *et al*, 2000; Ziegler *et al*, 2005; Chan 2002).

Por último, otra teoría que ha tomado importancia a raíz de la demostración del potencial oncogénico de ciertas infecciones, corresponde a la infección tardía.

Contrario a lo que ocurre en la mayoría de secuencias infección-oncogénesis, en el caso de la leucemia linfoblástica, la carencia de una infección temprana en la infancia retrasaría la maduración del sistema inmune que se da con el cambio de fenotipo Th2 a Th1, el cual es esencial en la respuesta mediada por interferón gamma, con lo que se desarrollaría la neoplasia. Esta apreciación se respalda con el hallazgo de susceptibilidad a citotoxicidad y heterofagia por células NK y T que se presenta en casos de leucemia linfoblástica TEL-AML1 (Ravindranath 2003).

2.1.4 Tratamiento de la Leucemia

El tratamiento inmediato de la LLA requiere manejo efectivo de los efectos colaterales de la enfermedad, destrucción de las células tumorales, y manejo apropiado de los efectos adversos del tratamiento (Redaelli *et al*, 2005). El tratamiento de la LLA infantil se realiza en 3 etapas:

- **Terapia de inducción.** Es la primera etapa del tratamiento. El objetivo de la quimioterapia de inducción es una remisión. Esto significa que ya no se encuentren células leucémicas en las muestras de médula ósea, que regresen las células normales de la médula y que las cuentas de sangre sean normales. Sin embargo, una remisión no es necesariamente una cura, ya que las células leucémicas aún pudieran estar escondidas en algún lugar del cuerpo. También se llama fase de inducción de la remisión (Redaelli *et al*, 2005). Ésta es una fase de quimioterapia intensiva que usualmente dura un mes más o menos. Puede que se usen diferentes combinaciones de medicamentos de quimioterapia, aunque típicamente incluye: Vincristina, Dexametasona o prednisona, Doxorubicina (Adriamycin) o daunorrubicina o un medicamento similar de antraciclina. Con base en los factores pronósticos del paciente, algunos regímenes también pueden incluir ciclofosfamida (Cytosan), L-asparaginasa, etopósido (VP-16), 6-mercaptopurina y/o altas dosis de metotrexato o citarabina (ara-C) como parte de la fase de inducción. Para aquellos pacientes con ALL cuyas células leucémicas tienen un cromosoma

Filadelfia, con frecuencia también se incluye un medicamento dirigido tal como imatinib (Gleevec). (Redaelli *et al*, 2005).

- **Terapia de consolidación e intensificación:** es la segunda etapa de la terapia. Si la leucemia entra en remisión, la siguiente fase con frecuencia consiste en otro curso bastante corto de quimioterapia, usando muchos de los mismos medicamentos que se utilizaron en la terapia de inducción. Esto usualmente dura varios meses. Usualmente los medicamentos se administran en dosis altas, por lo que el tratamiento es bastante intenso. Durante el tratamiento de mantenimiento, se puede continuar la profilaxis del sistema nervioso central. También se continúa con un medicamento dirigido, como el imatinib, para pacientes cuyas células leucémicas tienen el cromosoma Filadelfia. Algunos pacientes que están en remisión, como aquellos que tienen ciertos subtipos de ALL u otros factores pronósticos desfavorables, aún corren un alto riesgo de recurrencia (regreso de la leucemia).
- **Terapia de mantenimiento:** es la tercera etapa del tratamiento. Después de la consolidación, generalmente se pone al paciente en un programa de mantenimiento con quimioterapia que consiste en metotrexato y 6-mercaptopurina (6-MP). En algunos casos esto se puede combinar con otros medicamentos como vincristina y prednisona. Para aquellos pacientes con LLA, cuyas células leucémicas tienen el cromosoma Filadelfia, con frecuencia también se incluye algún medicamento dirigido como el imatinib. Usualmente el mantenimiento dura aproximadamente dos años. Durante el tratamiento de mantenimiento, se puede continuar la profilaxis del CNS. Algunos médicos consideran que la terapia de mantenimiento puede no ser necesaria para algunas leucemias como la LLA de células T y la ALL de células B maduras (leucemia de Burkitt).

La biopsia de la médula ósea y los aspirados se realizan a lo largo de todas las fases para observar si la leucemia está respondiendo bien al tratamiento.

El tratamiento llamado terapia santuario del sistema nervioso central (SNC) se administra generalmente durante cada fase de la terapia. Debido a que la

quimioterapia que se administra oralmente o por vía intravenosa, puede no llegar a las células leucémicas en el SNC (cerebro y espina dorsal), las células pueden encontrar un “santuario” (se esconden) en el SNC. La quimioterapia intratecal y la radioterapia pueden llegar a las células leucémicas del SNC y se administran para destruir las células leucémicas y evitar que el cáncer recidive (vuelva). La terapia santuario del SNC también se llama profilaxis del SNC. Por último, es válido anotar que las recaídas de la enfermedad se correlacionan con dosis inadecuadas más que resistencia tumoral, por lo que la individualización de la terapia ha generado mejores resultados (Redaelli *et al*, 2005). Un resumen de los fármacos empleados en el tratamiento de leucemia junto con sus efectos adversos se presenta en la **tabla 4**.

Tabla 4. Fármacos empleados en el tratamiento de la LLA

Tratamiento	Tipo	Función	Efectos adversos
Prednisona Dexametasona	Glucocorticoides sintéticos	Interacciona con receptores citoplasmáticos intracelulares específicos, formando el complejo receptor-glucocorticoide, éste penetra en el núcleo, donde interactúa con secuencias específicas de ADN, que estimulan o reprimen la transcripción génica de ARNm específicos que codifican la síntesis de determinadas proteínas en los órganos diana.	Hiperglicemia, cambios del ánimo, acné, ganancia de peso, hepatomegalia, necrosis a vascular del hueso, osteoporosis.
Metotrexate	Análogo del folato, antimetabolito	Inhibe la acción de las enzimas relacionadas con la síntesis de purinas y pirimidinas, lo que resulta en la depleción celular de éstas y en la alteración de la síntesis de los ácidos nucleicos.	Nausea/vómito (NV), disfunción hepática, mielosupresión, fotosensibilidad, leucoencefalopatía, osteoporosis. Administración intratecal: cefalea, fiebre, convulsiones.
Vincristina	Alcaloide	Inhibe la división celular durante la mitosis temprana. La vincristina se une a los monómeros de tubulina previniendo la formación de los microtúbulos del huso. Al unirse a los componentes básicos de los microtúbulos, la vincristina incapacita el mecanismo celular del alineamiento y el movimiento de las cromosomas.	Neuropatía periférica, constipación, convulsiones, pérdida de peso, celulitis química.
Doxorrubicina Daunorrubicina	Antraciclina	Las topoisomerasas son enzimas que desempeñan un papel fundamental en los procesos de replicación, transcripción y reparación del ADN. Modifican la estructura terciaria de doble hélice del ADN sin alterar la secuencia de nucleótidos. En humanos se han identificado tres tipos de topoisomerasas (I, II y III).	NV, pérdida de peso, mucositis, mielosupresión, celulitis química, cardiomiopatía.

L- asparaginasa	Enzima	Es una enzima natural presente en muchas plantas y microorganismos. Su acción antitumoral se debe a que reduce los niveles plasmáticos de L-asparagina, que es un aminoácido esencial para la síntesis de proteínas y la viabilidad celular. Se emplea para el tratamiento de leucemia linfática aguda en niños.	NV, reacciones alérgicas, hiperglicemia, pancreatitis, disfunción hepática, trombosis y encefalopatía.
6-Mercaptopurina	Análogo de purinas	Este fármaco tiene una estructura similar a la de los componentes del metabolismo intermediario celular, de modo que interfiere en su metabolismo y en concreto en la síntesis de ácidos nucleicos.	NV, mucositis, mielosupresión, fotosensibilidad, disfunción hepática, osteoporosis.
Etopósido	Epipodofilotoxina	Daña el ADN al inhibir la topoisomerasa II, una enzima que normalmente desenrolla el ADN durante la replicación para aliviar la tensión en las estrandas de ADN. El etopósido para la acción de la topoisomerasa II después de que crea un fragmento en una estranda del ADN. El ADN fragmentado es incapaz de desenrollarse y se rompe eventualmente.	NV, pérdida de peso, mucositis, mielosupresión, reacciones alérgicas.
Citarabina	Antimetabolito	Afecta sólo a las células durante la fase S de la división celular. En el interior de la célula, citarabina es convertida en citarabina-5-trifosfato (ara-CTP), que es el metabolito activo. El mecanismo de acción no está comprendido totalmente, pero parece ser que el ara-CTP actúa fundamentalmente a través de la inhibición de la síntesis de ADN.	NV, fiebre, rash, mucositis, mielosupresión, disfunción hepática, conjuntivitis, infertilidad.
Ciclofosfamida	Agente alquilante	Lesiona el ADN e interfiere en la replicación celular. Provocan su acción citotóxica mediante la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y di-versas moléculas nucleófilas presentes en las células, especialmente las bases nitrogenadas del ADN.	NV, cistitis hemorrágica, mielosupresión, pérdida de peso, cáncer de vejiga, infertilidad.
			Tomado de Redaelli 2005

Uno de los fármacos utilizados en la etapa de mantenimiento (durante 2-3 años) es la 6-Mercaptopurina (6-MP) el cuál es el principal análogo de las purinas, y ampliamente utilizado en la clínica. En este estudio es el fármaco se eligió este fármaco debido al tiempo que el paciente debe tomarlo, los efectos adversos que causa en el individuo y los factores genéticos involucrados en su metabolismo.

2.2 FARMACO 6-MERCAPTOPURINA

2.2.1 Generalidades

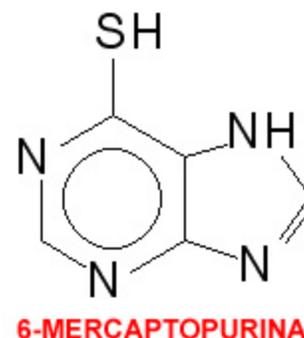
Es un anti metabolito 6-tiol-hidratopurina, análogo estructural de la Hipoxantina (**Figura 1**). Mecanismo de acción: se transforma de manera intracelular en su forma activa a través de la fosforilación de la hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (HGPRT) y luego metabolizado a la forma trifosfato, estado en el que se incorpora a los ácidos nucleicos. Inhibe la síntesis de purinas y actúa sobre la reacción catalizada por la 5-fosforribosil-1-pirofosfato-amidotransferasa. La incorporación de nucleótidos tiopurina trifosfato al ADN inhibe su síntesis y función, así como del ARN, donde altera su procesamiento y traducción. Interfieren con la función de las ADN polimerasas, ligasas, endonucleasas, así como IMP deshidrogenasa o ribonucleótido reductasa. Es un fármaco fase-específico (fase S) del ciclo celular.

La 6-mercaptopurina (6-MP) es un pro fármaco, activo por vía oral y parenteral, es utilizado en el tratamiento de varias y diferentes entidades clínicas, como coadyuvante para la protección contra el rechazo en pacientes trasplantados de órganos y en diversas enfermedades inflamatorias y del sistema inmune (enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide severa, psoriasis artrítica y lupus nefrítico) (Sahasranaman *et al*, 2008; Von Ahsen *et al*, 2005), además es utilizado durante la terapia de leucemia aguda infantil, como resultado de sus propiedades inmunosupresoras (Murray *et al*, 1963; Elion GB. 1993).

2.2.2 Farmacocinética de 6-MP

La 6-mercaptopurina muestra variación diurna en su farmacocinética y eficacia. La administración nocturna, en comparación con la administración matutina, puede reducir el riesgo de recidiva. Por consiguiente, la dosis diaria se debe tomar por la noche. Posterior a la administración, la absorción es variable e incompleta (16-50 %) (Loftus, 2004). Tiene un importante efecto de primer paso hepático. Es ampliamente distribuido. Apenas atraviesa la barrera hematoencefálica. Su unión a proteínas

Figura 1. Molécula de 6-MP



plasmáticas es del 20 %. El metabolismo es principalmente hepático a través de la oxidación por la xantina oxidasa a metabolitos inactivos como el ácido 6-tiúrico o por la metilación, a través de la tiopurina metiltransferasa, dando lugar a la formación de la 6-metilmercaptipurina, que puede ser fosforilada y originar nucleótidos activos. La eliminación es más o menos 50 % del fármaco y sus metabolitos se excretan a través de la orina en las primeras 24 h. La vida media de eliminación tras la administración oral es entre 1 y 3 h (Barabino *et al*, 2002, Lennard 1992).

Una característica de la acción farmacológica de la 6-MP es su retraso en la aparición de su efecto, que puede tomar 8-12 semanas, posiblemente debido a la lenta acumulación de nucleótidos 6 Tioguanina (6-TGN) dentro de las células. Esto se relaciona con los efectos tóxicos de la 6-MP, algunos de los cuales pueden ocurrir en cualquier momento durante el tratamiento (por ejemplo, la pancreatitis que suele aparecer a los pocos días de iniciada la terapia) (Wright *et al*, 2004; Cuffari *et al*, 1996).

Otros parámetros farmacocinéticos de 6-MP son descritos en la siguiente tabla:

Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos de 6-MP

Biodisponibilidad (F):	60% ± 31%
Volumen de Distribución (Vd):	0.85 ± 0.65 L/Kg – Niños
Concentración terapéutica en plasma y suero.	No reportada, sólo monitoreo plasmático en el paciente, vigilando la presencia de efectos adversos.
Tiempo en llegar al estado estable (steady state)	2- 3 meses

Guía para la prescripción segura y efectiva de la Azatioprina. The British Journal of Dermatology 2011; 165(4): 711-734.

2.2.3 Efectos adversos (EA) al tratamiento con 6-MP

La 6-MP es generalmente bien tolerada sin Efectos Adversos (EA) serios. Sin embargo, algunos EA son muy importantes y necesitan una rápida atención; otros pueden suceder mientras el organismo se acostumbra al fármaco. Durante el tratamiento, entre un 15 y un 30% de los pacientes que reciben 6-MP llegan a desarrollar algún tipo de EA (Fraser *et al*, 2002; Barabino *et al*, 2002; Lamers *et al*, 1999; George *et al*, 1996; Kirschner *et al*, 1998). Estos se han clasificado en relación a la dosis, como dosis independientes y dosis dependientes. Los del primer grupo suelen ser de rápida aparición y se incluyen la hepatitis, pancreatitis, erupciones de la piel, fiebre, diarrea, artralgias y náuseas. El segundo grupo son dosis

dependientes y entre ellos destacan la mielosupresión y la hepatotoxicidad (Al Hadithy *et al*, 2005)

2.2.4 Metabolismo de 6-MP

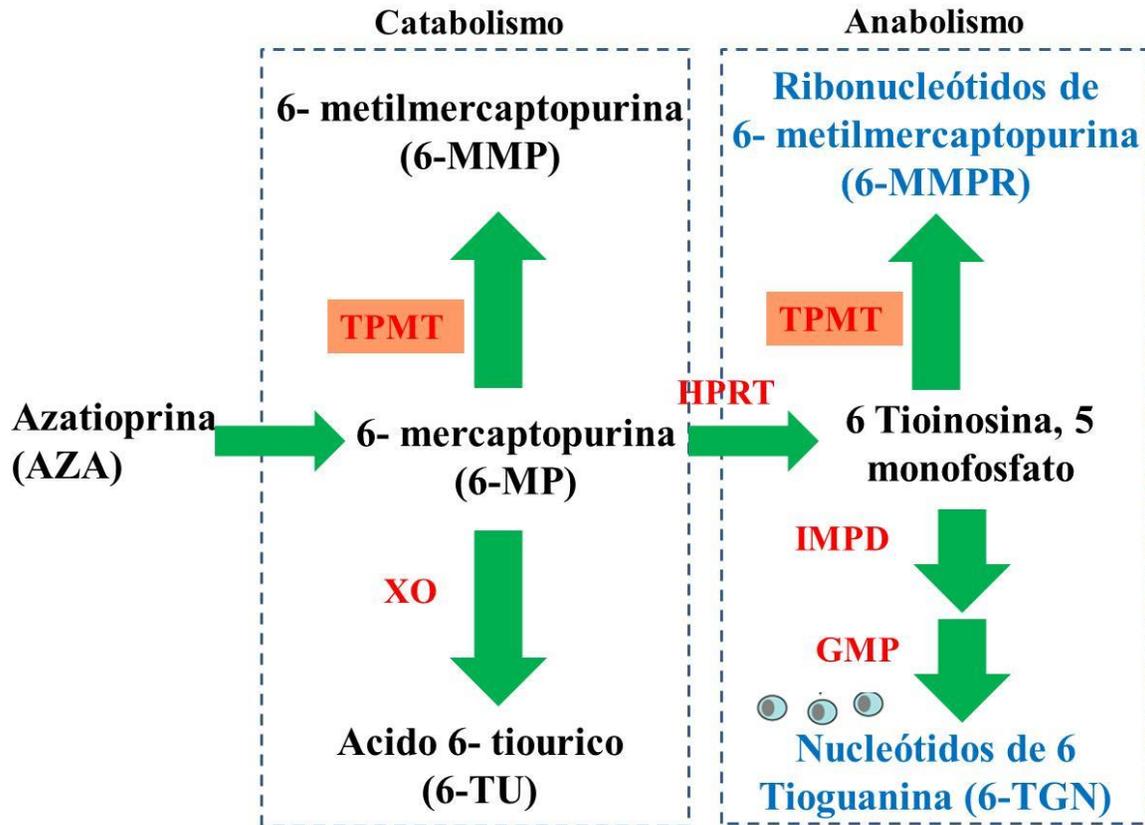
La 6-MP no posee actividad metabólica intrínseca, por lo que, antes de ejercer su efecto debe sufrir un proceso de transformación metabólico bastante complejo.

Tras la captación intracelular, la 6-MP se metaboliza por tres vías enzimáticas principales (**Figura 2**), dos catabólicas mediadas por las enzimas Xantina Oxidasa (XO) y la Tiopurina S-Metiltransferasa (TPMT) y una anabólica, dirigida por la Hipoxantina Fosforibosil Transferasa (HPRT) (Figura 1) (Dubinsky *et al*, 2000, Lennard 1992; Lennard 2002; Chan *et al*, 1990).

La XO y la TPMT catalizan la conversión de 6-MP a los metabolitos inactivos Ácido 6- Tiourico (6-TU) y 6-metil-mercaptopurina (6-MMP). La Hipoxantina Fosforibosil Transferasa (HPRT) , la Inosina Monofosfato Deshidrogenasa (IMPD) y la GMP (Guanosina Monofosfato) son las responsables de la formación de los nucleótidos de 6-tioguanina (6-TGNs), metabolitos activos encargados de ejercer el efecto terapéutico del fármaco (Wright, *et al* 2004; Cuffari *et al*, 1996; Cuffari *et al*, 2001), dichos metabolitos resultado de su similitud estructural con las purinas endógenas, interfieren con la biosíntesis de nuevas purinas, así, son eventualmente incorporados en el Acido Desoxirribonucleico (ADN) como bases anormales, modificando su estructura e interfiriendo con la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Marathias *et al*, 1999; Elion GB, 1989; Krynetski *et al*, 2001). Al mismo tiempo, por su homología con el GTP (mensajero intracelular) los nucleotidos de 6-TGN pueden producir un efecto supresor de la proliferación de células involucradas en la determinación y amplificación de la respuesta inmune; como las células T y B, y, por tanto, la supresión de la sobreactividad de los mecanismos de defensa inmunológica en los pacientes con Leucemia Linfoblastica Aguda.

Alternativamente, el 6 Tiinosina-5 Monofosfato (6-TIMP) se puede convertir en ribonucleótidos de 6-metilmercaptopurina (6-MMPR), los cuales son citotóxicos y se han reportado que están relacionados con el desarrollo de hepatotoxicidad (Dubinsky *et al* 2000; Dubinsky *et al*, 2002).

Figura 2. Metabolismo de 6-MP

Modificado de Dubinsky *et al*, 2000

2.2.5 Farmacogenética de 6-MP

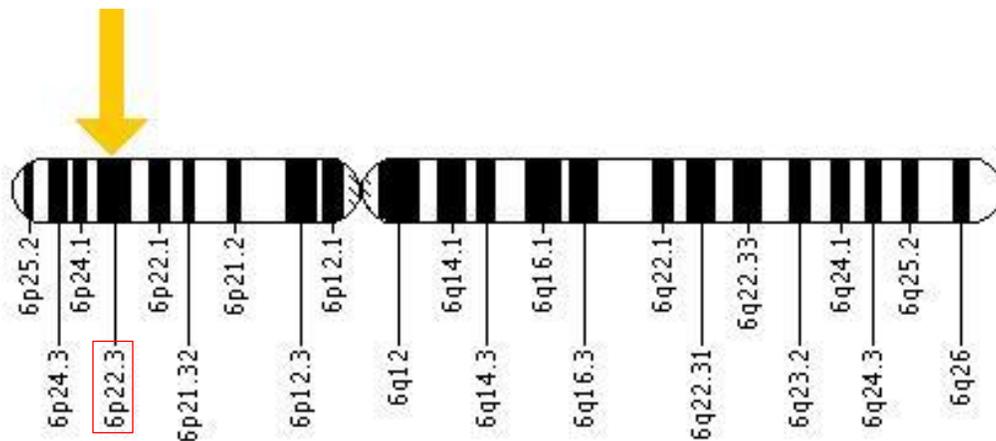
Parte de la variabilidad en la respuesta a los fármacos es consecuencia de la presencia de variantes alélicas en genes relacionados con la absorción, distribución, metabolismo, proteínas transportadoras, receptores y dianas de los fármacos. En el caso de las tiopurinas como el fármaco 6-MP, el principal enfoque de la investigación farmacogenética ha recaído sobre el estudio de la enzima TPMT, que juega un papel importante en su metabolismo catabólico y, como resultado de estas investigaciones, se ha demostrado que su actividad se encuentra regulada genéticamente (Stocco *et al*, 2005; Uchiyama *et al*, 2009; Weinshilboum RM & Sladek SL, 1980).

2.3 EL GEN *TPMT*

2.3.1 Generalidades

El gen que codifica para la enzima TPMT se encuentra en el cromosoma 6 posición 6p22.3, contiene 10 exones, Figura 3 (Lee *et al*, 1995). Hasta la fecha por lo menos 26 variantes alélicas de *TPMT* se han descrito y varios de ellas se han asociado con la modulación de la actividad enzimática (Ujii *et al*, 2008; Kham *et al*, 2009; Garat *et al*, 2008).

Figura 3. Posición del Gen *TPMT* (6p22.3)

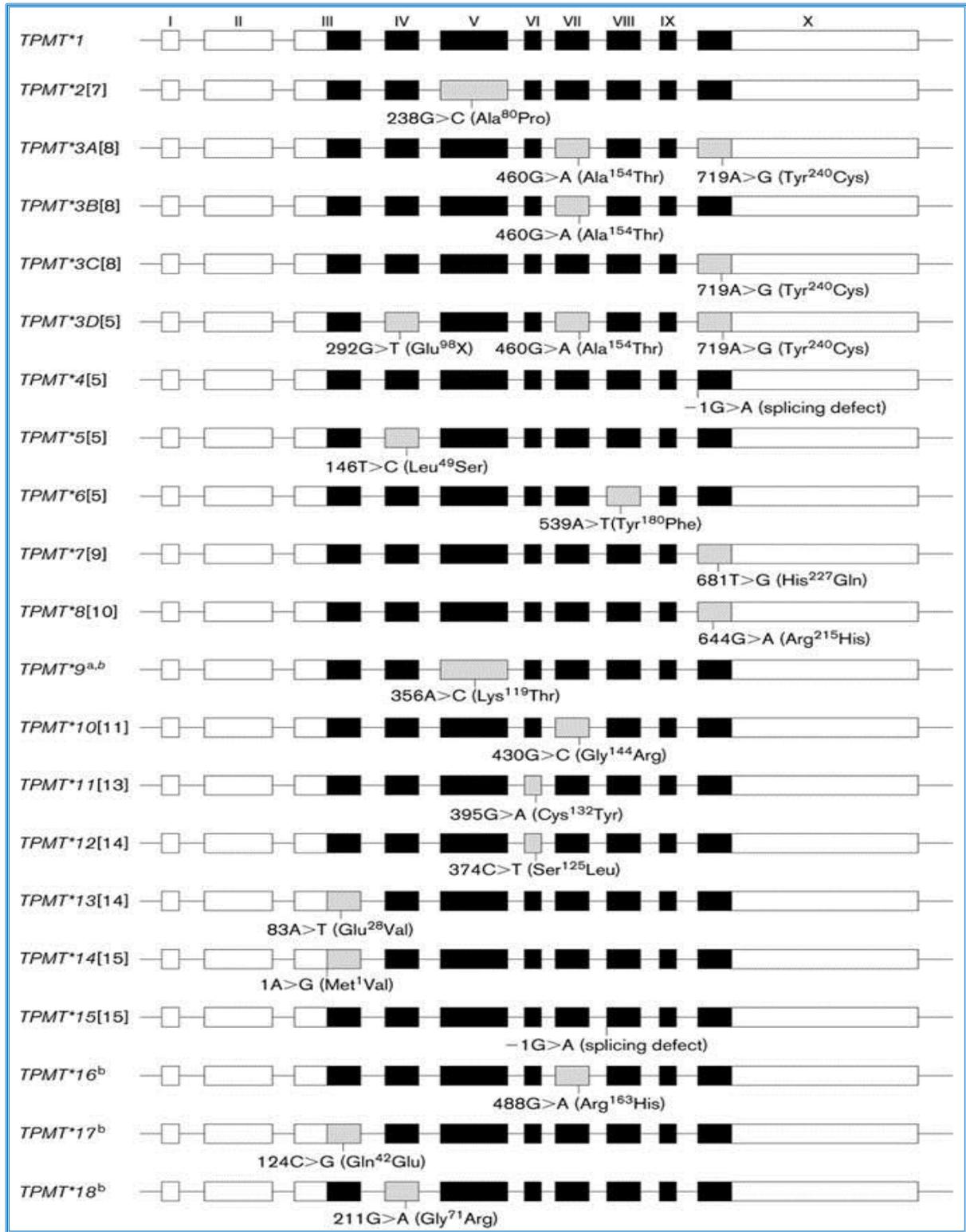


Modificado de Dubinsky *et al*, 2000

El alelo silvestre con actividad enzimática normal, se reconoce como *1 y el resto de los alelos descritos varían desde los alelos de actividad disminuida o baja (*2, *3A, *3B y *3C), hasta alelos que no afectan el fenotipo (*5, *6, *7, *8, *9, *10, *11, *12, *13, *14, *16, *17, *18, *19, *20, *21, *22, *23, *24, *25 y *26) (**Figura 4**) (Rocha *et al*, 2005).

Adicionalmente, se ha descrito un polimorfismo del tipo VNTR (variable number of tandem repeats) ubicado en la región promotora del gen y que regula la actividad de la enzima aumentándola, y ha sido asociado con un fenotipo metabolizador ultrarápido (Roberts *et al*, 2008).

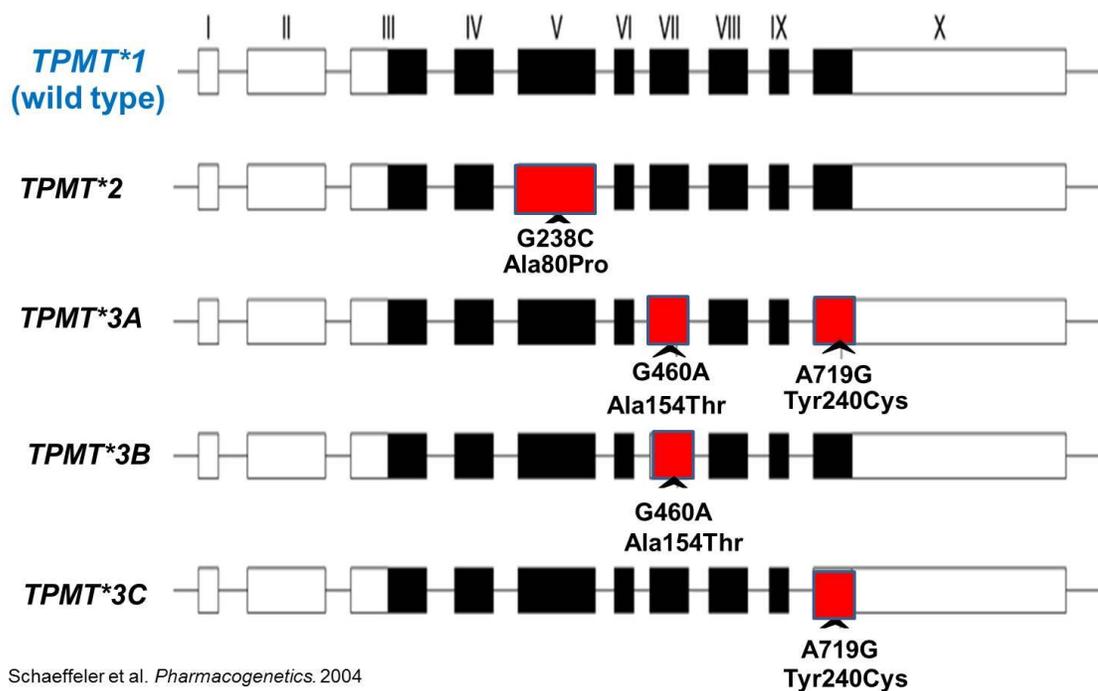
Figura 4. Variantes alélicas de la *TPMT*



Entre las variantes de baja actividad (**Figura 5**), las más comunes especialmente en poblaciones caucasoides son los alelos TPMT *2, *3A, *3B y *3C (Figura 4) (Tai *et al*, 1997; Tai *et al*, 1999; Krynetski *et al*, 2000; Otterness *et al*, 1997). El alelo TPMT *2 (rs1800462) se caracteriza por la presencia de la transversión 238G>C (Ala80Pro); el TPMT *3A (rs1800460, rs1142345) por presentar las transiciones 460G>A (Ala154Thr) y 719A>G (Tyr240Cys); el TPMT *3B (rs1800460) por solo poseer la transición 460G>A (Ala154Thr) y el TPMT *3C (rs1142345) por solo presentar la transición 719A>G (Tyr240Cys). **Las mutaciones 460G>A and 719A>G son usualmente heredadas juntas como el alelo *3A.** (Rocha & Cheng, 2005).

Estos alelos representan del 80 al 95% de variantes que contribuyen en la disminución de la actividad enzimática de TPMT debido al aumento en la tasa de proteólisis de las proteínas mutantes, el mecanismo post-transcripcional de la pérdida de la función de TPMT no ha sido aclarado ya sea para *2 y *3A (Tai *et al*, 1999), Cabe mencionar, que se ha evidenciado una importante variabilidad en la distribución de las frecuencias alélicas entre diferentes grupos étnicos estudiados.

Figura 5. Variantes alélicas de TPMT en poblaciones caucásicas



Schaeffeler *et al*. *Pharmacogenetics*. 2004

2.3.2 Efectos adversos y TPMT

La actividad de la enzima TPMT es el factor más importante en la regulación de las concentraciones de los nucleótidos de 6-TGN (Gisbert *et al*, 2002). Así, en los pacientes con baja actividad de la TPMT se observan elevadas concentraciones de estos metabolitos, mientras que en aquellos con alta actividad enzimática las concentraciones de los nucleótidos de 6-TGN son bajas (Dubinsky *et al*, 2000; Seidman EG, 2003; Anstey *et al*, 2000; Bloomfeld RS & Onken JE, 2003).

La farmacocinética de la 6-MP está sujeta a una importante variabilidad interindividual que se debe en gran parte a los polimorfismos genéticos de la *TPMT* (Lennard, 1999). De este modo, desde el punto de vista genotípico, hace ya más de dos décadas que Weinshilboum y Sladek (Weinshilboum RM & Sladek SL, 1980) estudiaron una muestra aleatoria de población de aproximadamente 300 individuos y encontraron la siguiente distribución genotípica: el 88.6% eran homocigotos para el alelo de alta actividad (*TPMT**1), el 11.1% eran heterocigotos (*TPMT* *1/*2, *1/*3A), y tan sólo el 0.3% eran homocigotos para el alelo de baja actividad (*TPMT* *2/*2, *3A/*3A).

Existen dos estrategias para identificar a los pacientes con deficiencia de *TPMT*: la medición de la actividad de esta enzima en los eritrocitos (es decir, el fenotipo) (Jacqz *et al*, 1994) y la determinación de las diversas mutaciones presentes en el DNA celular (esto es, el genotipo) (Yates *et al*, 1999; Otterness *et al*, 1999; Reuther *et al*, 2003). Múltiples estudios han demostrado que existe una elevada concordancia entre la clasificación genotípica y fenotípica de la actividad de la *TPMT*, que ha sido tan alta como del 97-98% (Yates *et al*, 1999; Otterness *et al*, 1999; Reuther *et al*, 2003; Rossi *et al*, 2001) o incluso del 100% (Relling *et al*, 1999) en algunos casos. Diversos estudios han evidenciado una correlación entre el fenotipo o el genotipo de la *TPMT* y el riesgo de mielotoxicidad (Dubinsky *et al*, 2000; Lennard *et al*, 1989; Sandborn WJ, Faubion WA, 2000; Anstey *et al*, 1992; Relling *et al*, 1999).

De este modo, los pacientes homocigotos para los alelos de baja actividad de *TPMT* tienen el riesgo de llevar a la sobreproducción de nucleótidos de 6-TGN y, así provocar citotoxicidad y supresión exagerada del sistema inmune, consecuencia de

que una cantidad mayor de 6-MP es metabolizada por la ruta enzimática de la hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (Vesell ES, 1997; Black *et al*, 1998) . El grado de déficit de actividad de la *TPMT* guarda relación con el período de tiempo transcurrido entre la administración del tratamiento con 6-MP y la aparición de los efectos adversos hematológicos.

Así, se ha descrito que este período de latencia es corto (de aproximadamente 1,5 meses) en los pacientes homocigotos para los alelos de baja actividad, mientras que sería algo más prolongado en los heterocigotos y más aún en los homocigotos para el alelo de alta actividad dado que la actividad elevada de la enzima da como resultado una eliminación rápida del fármaco, lo que corresponde con tolerancia al mismo (Anstey *et al*, 1992; Colombel *et al*, 2000). Dicho de otro modo, la determinación de la actividad de la *TPMT* es útil para predecir la aparición de mielotoxicidad precoz tras el inicio del tratamiento con 6-MP, pero el conocimiento de dicha actividad probablemente no proporcione información fiable en los pacientes que llevan muchos meses recibiendo este fármaco (Lennard 2002; Martinez *et al*, 2001), por lo que resulta útil la determinación de los polimorfismos genéticos de *TPMT* durante el tratamiento con 6-MP debido a falla en el tratamiento y/o la muerte del paciente debido a los efectos colaterales provocados por el fármaco.

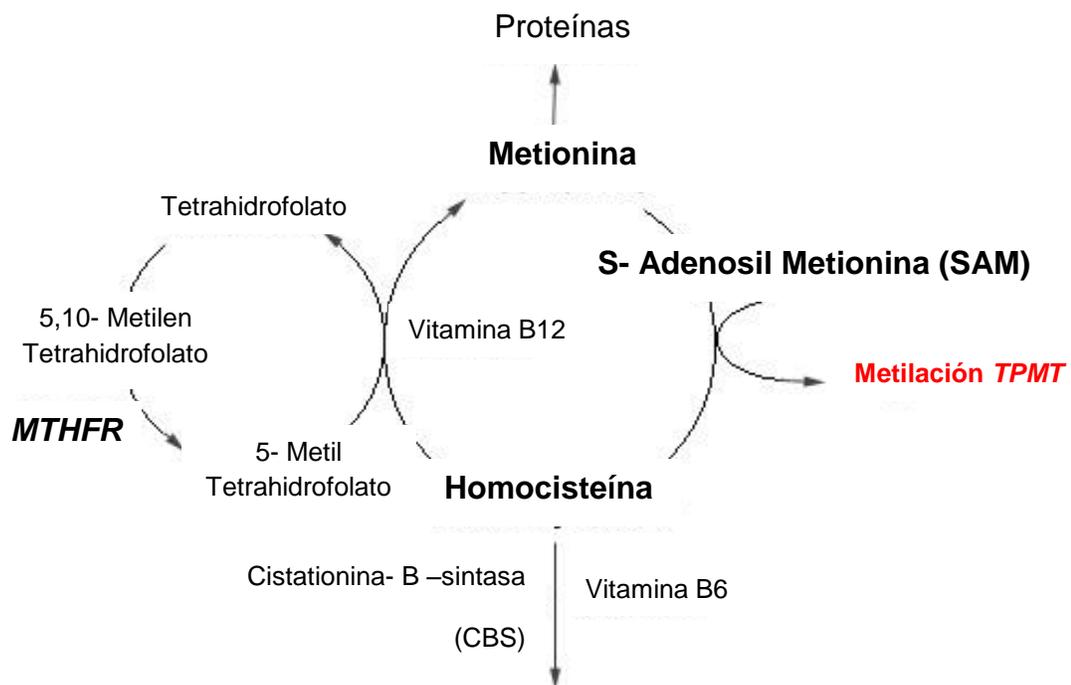
2.4 OTROS POLIMORFISMOS QUE CAUSAN REACCIONES ADVERSAS ASOCIADAS A 6-MP

Durante del tratamiento con 6-MP ha llamado la atención que los pacientes que tienen un genotipo homocigoto silvestre para la enzima *TPMT* tengan efectos adversos que aún no son entendidos (Milek *et al*, 2009; Tai *et al*, 1997). Por lo anterior se inició la valuación de otros genes implicados en el metabolismo de 6-MP como la Metilen-Tetrahidrofolato-Reductasa (*MTHFR*).

La *MTHFR* es una enzima clave en el metabolismo de la homocisteína. Cataliza la conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato en 5-metiltetrahidrofolato (5-MTF), que es la forma circulante predominante de folato. El 5-MTF participa en la remetilación de la homocisteína, proceso dependiente de vitamina B₁₂, donando un grupo metilo para la síntesis de metionina, reacción catalizada por la enzima metionina sintasa, la

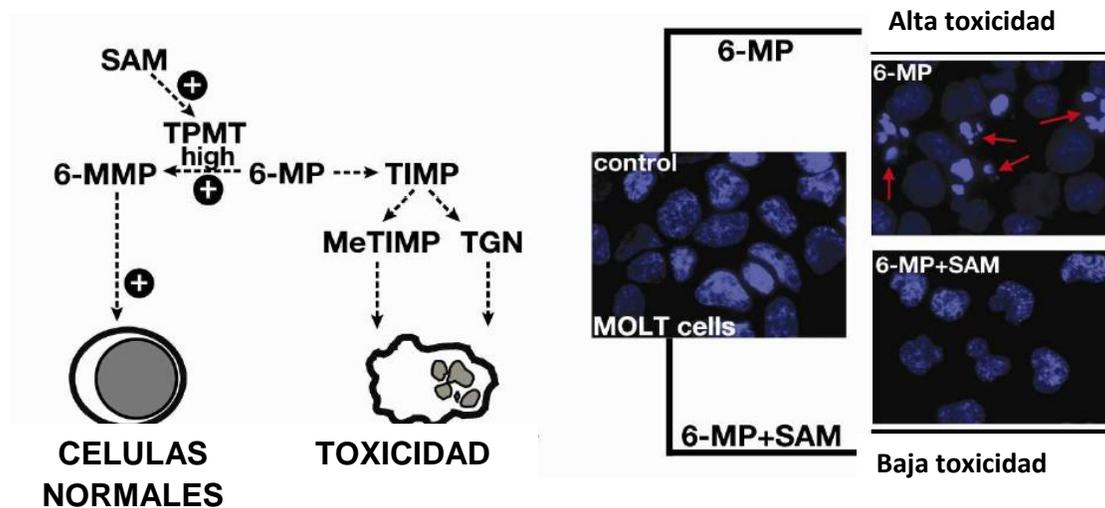
cual utiliza vitamina B₁₂ como cofactor. La metionina es metabolizada por la enzima metionina adenosil–transferasa a S–adenosil metionina (SAM), la cual actúa como donador de grupos metilo para la adecuada función de la TPMT, ya que la TPMT cataliza la metilación-S de fármacos como la 6-MP con la presencia de S-adenosilmetionina (SAM), el donante de metilos, produciendo 6mMP (Figura 6 y 7).

Figura 6. Función de la MTHFR



Diversos autores (Milek *et al*, 2009; Tai *et al*, 1997) han informado sobre la estabilización de *TPMT* por su cofactor S-adenosilmetionina (SAM), que representa un biomarcador candidato que afecta a la actividad de esta enzima y que podría explicar en cierta medida la discordancia entre el genotipo y el fenotipo de *TPMT*. Además se ha demostrado que los polimorfismos en la enzima *MTHFR*, se correlacionan con la aparición de eventos hematotóxicos durante la terapia con 6-MP en la LLA (Milek *et al*, 2009; Tai *et al*, 1997).

Figura 7. Efectos adversos debidos a TPMT (SAM como donador de metilos)



6MMP: 6 Metil Mercaptopurina , 6-MP: 6-Mercaptopurina, TPMT: Tiopurina Metiltransferasa SAM: S-Adenosil-metionina, TGN: Nucleotidos de Tioguanina, MeTIMP: Metil Tiinosina Monofosfato.

Tomado de: Karas-Kuzelicki et al, 2008

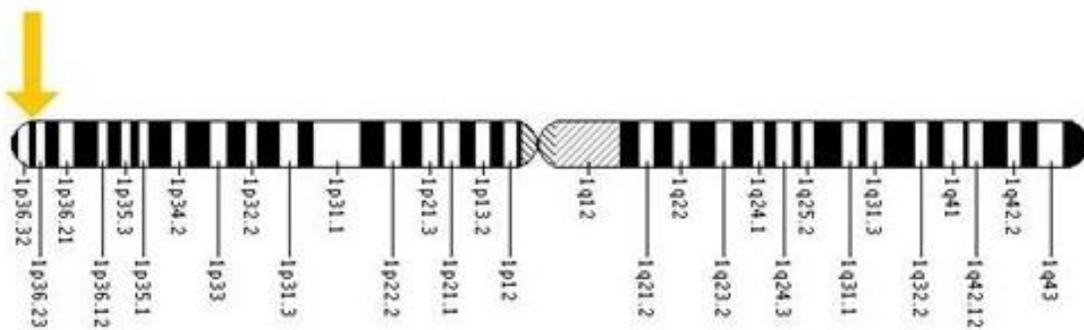
La influencia de *MTHFR* sobre la actividad de *TPMT* también se demostró en un estudio reciente llevando a toxicidad a pacientes pediátricos con LLA bajo tratamiento con 6-MP. El efecto sinérgico de las variantes alélicas de *TPMT* y *MTHFR* fue observado en los pacientes que tenían polimorfismos en ambos genes, reflejando una severa hematotoxicidad en el 82% de estos pacientes, en contraste, sólo 4% de los pacientes con genotipo silvestre en *TPMT* y *MTHFR* presentó dicho efecto. Además de que a los pacientes que tenían polimorfismos en ambos genes, se les realizó una reducción en la dosis de 6-MP ya que presentaron más efectos adversos como estomatitis y algunas infecciones (Karas-Kuzelicki *et al*, 2008).

2.5 EL GEN *MTHFR*

2.5.1 Generalidades

El gen *MTHFR* está localizado en el cromosoma 1p36.3 y consta de 11 exones, los cuales tienen una extensión variable de entre 102 a 432 pares de bases (Goyette *et al*, 1994) (Figura 8).

Figura 8. Posición del Gen *MTHFR* (6p22.3)



A la fecha, se han identificado más de 20 mutaciones en el gen *MTHFR*. De los cuales los más estudiados son el 677 C>T (Ala22Val) y el 1298 A>G (Glu429Ala) dado que en estado homocigoto causan una deficiencia enzimática severa (Wilcken *et al*, 2003; Van der Put *et al*, 1998; Weisberg *et al*, 1998).

La homocigocidad para el alelo 677 C>T (Ala22Val) mutado, resulta en una disminución de la actividad enzimática del 70%, en comparación con sujetos homocigotos silvestres para este polimorfismo (Guéant *et al*, 2006; Frosst *et al*, 1995) con un aumento de los niveles de homocisteína en el caso de ingesta baja de ácido fólico (Frosst *et al*, 1995; Botto LD, 2000)

La transición 1298 A>C, resulta en la sustitución de glutamato por alanina en el aminoácido 429, dentro del dominio regulador de la *MTHFR*. Se ha reportado que la homocigocidad del alelo 1298 A>C induce una disminución en la actividad enzimática del 70 %, y, de acuerdo con algunos estudios, los individuos heterocigotos

compuestos para los alelos 677 C>T y 1298 A>C (los cuales presentan un genotipo C677T/A1298C), tienen una reducción en la actividad de MTHFR *in vitro* de 40 a 50% y un perfil bioquímico similar al observado en individuos homocigotos para el alelo 677 C>T, con incremento en los niveles de homocisteína y disminución de los niveles de folato (Van der Put *et al*, 1998; Weisberg *et al*, 1998; Scriver *et al*, 2001).

La prevalencia del polimorfismo 677 C>T varía dependiendo de la población estudiada. Se ha encontrado una mayor frecuencia en población italiana (44 a 47%), en hispanos de Atlanta y California (41.1 y 42%), así como en población francesa y japonesa (36 y 34%, respectivamente) (Botto LD, 2000; Guéant *et al*, 2006).

En población mestiza mexicana, el polimorfismo 677 C>T se presenta entre un 44 % a 58.5%, y en población indígena tarahumara en un 34% (Guéant *et al*, 2006; Davalos *et al*, 2006; Mutchinick *et al*, 1999; González–Herrera *et al*, 2002, Wilcken *et al*, 2003).

La frecuencia del polimorfismo 1298 A>C reportada para México es de 14.7% y la frecuencia del genotipo homocigoto CC es de 2.3%, lo cual es una proporción baja, comparada con la reportada en otras poblaciones, como la francesa que es de 11.5% (Guéant *et al*, 2006).

2.6 POLIMORFISMOS EN LOS GENES *TPMT* Y *MTHFR* Y EL RIESGO A LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA

El mecanismo preciso de la tumorigenesis es poco conocido, aunque es probable que incluya las interacciones entre los factores de riesgo genéticos y ambientales (Potter, 2011). Kandy & Vadakedath describen el metabolismo del folato y la síntesis de metionina como vías implicadas en la metilación y síntesis del ADN, por lo que parece que podrían desempeñar un papel importante en la carcinogénesis. Uno de los principales componentes en la vía del folato es la enzima MTHFR ya que permite la generación de donantes de metilo para la síntesis de S-adenosil-metionina (SAM), que está implicado en las reacciones de metilación del ADN (Christensen *et al*, 2015) Algunos investigadores (Silva *et al*, 2013; Lamm *et al*, 2015) han descrito una asociación entre los polimorfismos funcionales de MTHFR (C677T y A1298C) y riesgo a LLA, y han propuesto una relación entre la concentración de folato y la susceptibilidad de daño genético en las células implicadas en la hematopoyesis.

Por otra parte, SAM participa en numerosos procesos de metilación (Arenas *et al*, 2005; Scheuermann *et al*, 2004) , entre los cuales proporciona donación de grupos metilo a la enzima TPMT, regulando la eliminación de medicamentos antineoplásicos, tales como: Azatioprina (AZA), 6-Mercaptopurina (6-MP) y 6-Tioguanina (6-TG) (Rocha *et al*, 2005). Los individuos portadores de las variantes alélicas más comunes en el gen *TPMT* (*2 y *3A), podrían ser excepcionalmente sensibles al efecto mielosupresor del fármaco y a un riesgo carcinogénico asociado a éste.

Actualmente, sólo el estudio de Ouerhani *et al*, (2013), ha informado que no existe asociación de las mutaciones *2 y *3C con el riesgo a LLA.

A la fecha, no existen estudios que evalúen un análisis del efecto sinérgico de ambos genes con la susceptibilidad a LLA.

III. JUSTIFICACIÓN

El tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es uno de los focos de atención de la población mundial debido a la estrecha ventana terapéutica de los quimioterápicos, uno de los cuales, el fármaco 6-Mercaptopurina es utilizado para reducir el riesgo de recurrencia de la enfermedad. La respuesta al tratamiento depende del perfil genético de las enzimas metabolizadoras de este fármaco (TPMT y MTHFR), y predispone a reacciones adversas, así como a la susceptibilidad a la enfermedad. Por lo tanto, la monitorización de los niveles del fármaco así como un análisis farmacocinético y farmacogenético del individuo/población, podría potenciar el efecto antitumoral sin aumentar el riesgo de los pacientes.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Existe asociación de los polimorfismos de la TPMT *1,*2,*3A,*3B,*3C y la MTHFR (677C>T y 1298A>C) con la Farmacocinética de 6-Mercaptopurina, las reacciones adversas y la susceptibilidad a Leucemia Linfoblástica Aguda en pacientes pediátricos?

V. HIPÓTESIS

1. Los polimorfismos de la TPMT *1,*2,*3A,*3B,*3C y la MTHFR (677C>T y 1298A>C) están asociados con la Farmacocinética de 6-Mercaptopurina, las reacciones adversas y la susceptibilidad a Leucemia Linfoblástica Aguda en pacientes pediátricos

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

1. Determinar la asociación de los Polimorfismos de la *TPMT* *1,*2,*3A,*3B,*3C y la *MTHFR* (677C>T y 1298A>C) con la Farmacocinética de 6-Mercaptopurina, las reacciones adversas y la susceptibilidad a Leucemia Linfoblástica Aguda en pacientes pediátricos.

6.2 Objetivos Específicos

1. Modificar y validar un método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la cuantificación de 6-MP en plasma.
2. Cuantificar los niveles plasmáticos de 6-MP en pacientes pediátricos con LLA (Centro Estatal de Cancerología del Estado de Durango).
3. Determinar los parámetros farmacocinéticos poblacionales de 6-MP (K_a , V y K) mediante el diseño de un modelo farmacocinético de un compartimento, de absorción oral y de primer orden mediante el uso del software Monolix v4.2.0.
4. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de la *TPMT* *1,*2,*3A,*3B,*3C y la *MTHFR* (677C>T y 1298A>C) en niños con leucemia linfoblástica aguda del Centro Estatal de Cancerología del Estado de Durango.
5. Determinar la asociación de los polimorfismos de la *TPMT* *1,*2,*3A,*3B,*3C y la *MTHFR* (677C>T y 1298A>C) con la farmacocinética de 6-MP utilizando un modelo de efectos mixtos y modelo de covariables (Software Monolix).
6. Realizar un análisis de las reacciones adversas presentadas en los pacientes del Centro Estatal de Cancerología del Estado de Durango de acuerdo a los criterios del National Cancer Institute (NCI).

7. Determinar la asociación de los polimorfismos de la *TPMT* *1,*2,*3A,*3B,*3C y la *MTHFR* (677C>T y 1298A>C) con las reacciones adversas presentadas en los pacientes.
8. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de la *TPMT* *1,*2,*3A,*3B,*3C y la *MTHFR* (677C>T y 1298A>C) en niños con leucemia linfoblástica aguda del Centro Oncológico Pediátrico de Baja California y del Centro Estatal de Cancerología del Estado de Durango.
9. Determinar la asociación de los polimorfismos de la *TPMT* *1,*2,*3A,*3B,*3C y la *MTHFR* (677C>T y 1298A>C) con el riesgo a LLA en niños mexicanos (Centro Estatal de Cancerología del Estado de Durango y Centro Oncológico Pediátrico de Tijuana, B.C. México).

VII. MATERIALES Y METODOS

7.1 Diseño del estudio

Objetivo 1-7: Estudio observacional, prospectivo, longitudinal y de asociación.

Objetivo 8-9: Estudio de casos y controles (niños mexicanos)

7.2 Universo de estudio

Pacientes pediátricos con diagnóstico de Leucemia Linfoblastica Aguda (LLA) con edad \leq 15 años.

7.3 Universo muestral

Individuos con diagnóstico de LLA del Centro Estatal de Cancerología del Estado de Durango y del Centro Oncológico Pediátrico de Tijuana, Baja California, México.

7.4 Criterios de Selección

7.4.1 Criterios de Inclusión

- Pacientes de ambos géneros con diagnóstico de LLA.
- Con cualquiera de las variedades de LLA (L1, L2, L3)
- Edad \leq 15 años
- Bajo tratamiento con 6 MP (al menos 2 meses)
- Firma de carta de consentimiento informado.

7.4.2 Criterios de exclusión

- Niños con diagnóstico de VIH y LLA.
- Niños con síndrome de Down y LLA

7.4.3 Criterios de eliminación

- Muestras degradadas y/o insuficientes
- Abandono del estudio y/o retiro de la carta de consentimiento informado.

7.5 Tamaño de muestra

7.5.1 Para el cumplimiento de los objetivos del 1 al 7

Los pacientes del Centro Estatal de Cancerología del Estado de Durango fueron reclutados desde el mes de Marzo del 2013, hasta el mes de Julio del año 2014. Según la frecuencia obtenida en este periodo y realizado el escrutinio con base en los criterios de selección, la muestra total fue de 39 pacientes pediátricos con LLA, el tamaño muestral cumple con el requerimiento estadístico del teorema del límite central. La regla general de este teorema establece que un tamaño de muestra de al menos 30 sujetos será suficiente si la distribución básica se aproxima a una distribución normal con el fin de asegurar una verdadera significancia estadística.

7.5.2 Para el cumplimiento de los objetivos 8-9

La muestra fue determinada con base en la frecuencia de exposición entre casos y controles con $\alpha=95\%$ y $\beta=0.80$, con dos controles por cada caso, de acuerdo a la fórmula de Pértiga Díaz (2002). El número de casos fue de 70 pacientes con LLA y en el de controles de 152 niños seleccionados al azar y con pareamiento por edad.

7.6 Variables en estudio

7.6.1 Variables independientes

Polimorfismos de TPMT (*1,*2,*3A, 3B, 3C)

Variable cualitativa

Para fines de este estudio se realizó la determinación de los polimorfismos del gen TPMT por PCR en tiempo Real mediante sondas Taqman específicas para cada polimorfismo genético; TPMT*2 (C_12091552_30), TPMT*3A (C__19567_20, C_30634116_20), TPMT *3B (C_30634116_20) y TPMT*3C (C__19567_20) detectando tres posibles genotipos para cada forma alélica: homocigoto mutado, homocigoto silvestre y heterocigoto.

Indicador: Presencia de polimorfismos de TPMT

Homocigoto Wild Type, Heterocigoto, Homocigoto mutado.

Polimorfismos de MTHFR (677C>T y 1298A>C)

Variable cualitativa

Para fines de este estudio se realizó la determinación de los polimorfismos del gen MTHFR por PCR en tiempo Real mediante sondas Taqman específicas según cada polimorfismo genético; MTHFR 677 C>T (C_1202883_20), MTHFR 1298 A>C (C_850486_20), detectando tres posibles genotipos para cada forma alélica: homocigoto mutado, homocigoto silvestre y heterocigoto.

Indicador: Presencia de polimorfismos de TPMT

Homocigoto Wild Type, Heterocigoto, Homocigoto mutado.

7.6.2 Variables dependientes

Farmacocinética de 6-MP

Variable cuantitativa continua

Para efectos del presente estudio se cuantificaron las concentraciones plasmáticas de 6- mercaptopurina por el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en los pacientes del CECAN Durango, dichas concentraciones fueron evaluadas a diferentes tiempos después de ingerir el medicamento (0.5, 1, 2, 2.5 3 y 3.5 horas); se consideró ese intervalo por el tiempo de vida media de 6-MP.

Posterior a esto, se analizaron los datos en el programa Monolix Software v4.20 para determinar los parámetros farmacocinéticos (K_a , V y K) tanto del individuo como de la población.

Indicador: Valores de la constante de absorción de 6-MP (K_a), Volumen de distribución (V) y constante de eliminación (K).

Reacciones adversas

Para fines de este estudio se monitorearon durante 24 semanas los efectos adversos asociados a 6-MP en cada paciente del Centro Estatal de Cancerología del Estado de Durango, de acuerdo a la Guía del “National Cancer Institute Common Terminology Criteria for adverse events v3.0 y v4.0”

(NCI 2006, NCI 2009 respectivamente). Se definió toxicidad hematológica como baja en el recuento de leucocitos y/o baja en cuenta de plaquetas. Toxicidad Hepática: aumento de bilirrubinas, TGP o TGO. Toxicidad Renal: aumento de creatinina sérica. Toxicidad Gastrointestinal: diarreas, náuseas y/o vómitos. Toxicidad cutánea: hiperpigmentación y/o hipopigmentación. Dicha guía establece una escala de severidad por efecto adverso tomando en cuenta las cifras obtenidas en los parámetros hematológicos y/o bioquímicos y se reporta el resultado según el grado correspondiente; Grado 1= Efecto Adverso Leve, Grado 2= Efecto Adverso Moderado, Grado 3= Efecto Adverso Grave, Grado 4= Potencialmente mortal o efecto adverso incapacitante y Grado 5= Muerte relacionada con efecto adverso. Para el análisis, se evaluó el grado de toxicidad en cada efecto tóxico observado, calculando la moda estadística aritmética de estas 24 observaciones en cada clasificación.

Indicador: Grado 1, 2, 3 4 ó 5

Para evaluar la seguridad de cada paciente se integró en el expediente de cada individuo un cuestionario de Farmacovigilancia (basado en el formato de COFEPRIS), añadiendo a su vez las interacciones que tiene la 6-MP con alimentos y otros fármacos.

7.6.3 Variables Intervinientes

Género

Variable nominal dicotómica.

De acuerdo a su fenotipo, se consignó el género de los participantes.

Indicador: masculino, femenino.

Edad

Variable cuantitativa continua.

Para fines de este estudio, se consideró como edad a los años cumplidos por el individuo al momento del estudio.

Indicador: edad en años.

VIII. PROCEDIMIENTOS

8.1 MODIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE 6-MP.

Figura 9. Equipo de Cromatografía Líquida Agilent 1100



8.1.1 Reactivos:

6-Mercaptopurina grado analítico (6-MP), Ditioneitol (DTT) y Acido Perclórico (HClO_4) adquiridos de Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA); Hidróxido de Sodio (NaOH) y Ácido Clorhídrico (HCl), marca Merck (Darmstadt, Germany); Metanol (CH_3OH) y Ácido acético glacial ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) grado HPLC de marca J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). El agua fue purificada usando un equipo Millipore Milli-Q plus Water System (Millipore, Watford, UK).

8.1.2 Solución Madre

La solución de 6-MP (0.1 M) fue preparada disolviendo el compuesto con 1 ml de NaOH (0.1 M) y ajustando el volumen en 50 ml de agua y fue almacenada a 4°C.

8.1.3 Preparación de las soluciones estándar y calibradores

Las soluciones de trabajo fueron preparadas a 7 concentraciones de 6-MP, diluyendo la solución madre con fase móvil en lugar de agua. Las soluciones de trabajo fueron usadas para preparar los calibradores en plasma. La curva de calibración fue diseñada con concentraciones de 6-mercaptopurina en el rango de 25-800 ng/ml plasma (25, 50, 100, 200, 400, 600 and 800 ng/ml).

8.1.4 Preparación de la muestra y extracción

La extracción de 6-Mercaptopurina proveniente de la muestral biológica (plasma) fue desarrollada según Dervieux and Bolieu (1998) con algunas modificaciones: 200 μl de plasma fueron mezclados con 100 μl de DTT (75mg/ml), 50 μl de fase móvil y 50

µl de ácido perclórico (700 ml/L) por 30 segundos en vortex en un tubo eppendorf de 1.5 ml (Sarstedt, Germany). El tubo fue después centrifugado por 10 minutos a 10,000 × g a temperatura ambiente. El sobrenadante (300 µl) fue transferido a otro tubo eppendorf y una alícuota de 50 µl fue inyectada posteriormente a la columna.

8.1.5 Cromatografía

El equipo HPLC usado para la validación consistió en un sistema Agilent 1100 (**Figura 9**) con bomba binaria, degasificador incluido, detector UV, y automuestreador. La columna analítica fue una Zorbax Extend C18, 4.6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula (Agilent PN: 770450-902). La fase móvil contenía ácido acético glacial 0.01 M y Metanol 15% v/v ajustado a un pH de 2.2 con ácido clorhídrico (HCl). Después fue degasificado con un filtro de 0.45 µm y bombeado a un flujo de 1ml/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C. La detección de 6-mercaptopurina fue desarrollada a 322 nm. El pico de identidad fue confirmado comparándolo con el espectro del calibrador.

8.1.6 Validación del método analítico

El método analítico fue validado en adherencia a la guía FDA para la validación de métodos bio-analíticos y la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 en los siguientes parámetros: linealidad, especificidad, precisión, exactitud, recuperación, límite de cuantificación, límite de detección y estabilidad.

La linealidad fue evaluada en el rango de 25-800 ng/ml en solución y en plasma y fue calculada por un análisis de regresión lineal. La curva estándar del análisis fue realizado por el software HPLC Chemstation™ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). La especificidad del método fue establecida analizando 6 muestras plasmáticas de niños con diagnóstico médico de LLA, los cuales fueron dosificados oralmente con 50 mg de 6-MP durante la terapia de mantenimiento; fue verificada la ausencia de alguna interferencia o señal en el tiempo de retención del analito de interés debido a productos endógenos de la matriz biológica. La validación intra-día fue llevada a cabo usando las corridas de un día (n=5), mientras que la validación inter-día fue realizada usando los datos colectados en tres días (n=3). Tres diferentes

concentraciones (75, 150 y 300 ng/ml) fueron analizadas dentro del intervalo de linealidad para 6-MP en plasma. Estas concentraciones fueron diferentes de las presentadas en la curva de calibración, aunque estas fueron representativas dentro del intervalo lineal como lo establece la NOM-177-SSA1-1998. La precisión fue caracterizada por los valores con un error relativo estándar (RSD %) menor a 15%. Mientras que la exactitud fue expresada en un porcentaje de error (PE%) de la concentración nominal medida. La recuperación fue calculada al determinar tres concentraciones en plasma y en solución (75,150 y 300 ng/ml). La respuesta de las muestras plasmáticas, fue comparada con la respuesta de las soluciones estándar a las mismas concentraciones.

El límite de cuantificación (LOQ) fue determinado por quintuplicado con un coeficiente de variación menor al 20%. El límite de detección (LOD) fue considerado en la concentración a la cual la señal de 6-MP podía discernirse del ruido de fondo (relación señal/ruido ≥ 3.0). La estabilidad de 6-MP fue probada en plasma, diferentes concentraciones fueron guardadas a -70°C por 0,6, 24 horas y 7,14, 30 y 60 días para luego ser medidas en el equipo de HPLC.

8.2 FARMACOCINETICA DE 6-MERCAPTOPURINA

8.2.1. Pacientes y colección de datos

De los 39 pacientes del Centro Estatal de Cancerología, las muestras de sangre fueron colectadas sólo de aquellos niños quiénes: (1) se encontraban en la etapa de mantenimiento con el fármaco 6-MP durante al menos 1 mes, (2) no recibieron terapia de intensificación durante el periodo del estudio, (3) no presentaron falta de adherencia al tratamiento según lo dicho por el médico tratante. De estos

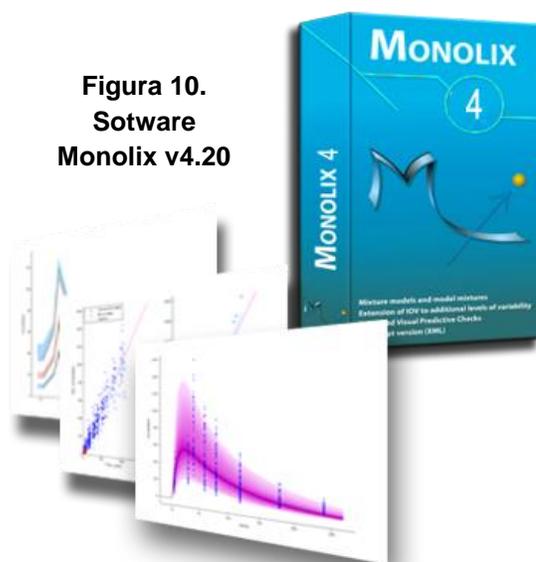


Figura 10.
Software
Monolix v4.20

pacientes (10 niños) fueron colectados; la edad (años), sexo y dosis (mg).

La quimioterapia de mantenimiento para los pacientes consistió en una dosis oral diaria de 6-MP y metotrexato semanalmente. . La quimioterapia de mantenimiento se administra generalmente por 2 o 3 años. La dosis de 6-MP estándar (75 mg/m²/día) es en base al protocolo St Jude XV implementado en el Centro Estatal de Cancerología de Durango, la dosis es ajustada para cada niño de acuerdo con el recuento de leucocitos y la presencia de infecciones clínicamente relevantes.

En adición a esto, se les dio una dosis mensual de vincristina por vía intravenosa a todos los niños independientemente de su recuento sanguíneo. Los niños tenían sus recuentos sanguíneos completos evaluados en cada visita clínica (cada 2-3 semanas). Las muestras de sangre (n = 56) fueron extraídas en la fase del tratamiento en la que los niños tenían una cánula intravenosa permanente para la terapia de vincristina, dichas muestras fueron extraídas antes de la administración de vincristina y al menos 12 h después de la dosis anterior de 6-MP. Fueron colectadas por lo menos cinco muestras en cada paciente a diferentes tiempos: 0,5, 1, 2, 2,5, 3 y 3,5 h (teniendo en cuenta la vida media de 6 -MP), Nota: (El Niño con ID 8, Tiene 2 Muestras únicamente debido a complicaciones de salud en el tiempo de muestreo). Las concentraciones del fármaco se analizaron mediante el método HPLC modificado y validado (anteriormente descrito en la sección 8.2).

Las muestras de sangre (1.5 ml) fueron colectadas en tubos con EDTA y se mantuvieron en hielo hasta que se centrifugaron a 1000 g durante 10 min para separar el plasma de los glóbulos rojos (RBC). El plasma se congeló a -20 °C en tubos Eppendorf para su posterior procesamiento.

Las concentraciones plasmáticas fueron analizadas posteriormente en el programa farmacocinético Monolix v4.2.0. (**Figura 10**), con el fin del modelaje farmacocinético adecuado para el fármaco 6-MP. (Sección Análisis estadístico).

8.3 REACCIONES ADVERSAS

8.3.1 Cuestionario. Se realizó un breve cuestionario (validado por contenido, de acuerdo a opinión del médico tratante y del investigador) en los 39 pacientes del Centro Estatal de Cancerología del Estado de Durango, el cual incluyó las siguientes

variables: Nombre del paciente, No. de expediente clínico, Edad, Sexo, Fecha de inicio del estudio. Este cuestionario incluyó a su vez un formato de Farmacovigilancia basado en el de COFEPRIS para la correcta monitorización de efectos adversos por 6-Mercaptopurina (NCI), además de interacciones del medicamento con alimentos, bebidas, otros fármacos, entre ellos algunos antineoplásicos usados en la quimioterapia durante el tratamiento de la LLA. **Anexo 1**

Para investigar la asociación de los genotipos de TPMT y MTHFR con los efectos tóxicos debidos a 6-MP y excluir la interacción de otros fármacos usados en la terapia de LLA, este estudio se centró en la etapa de mantenimiento únicamente durante 45 semanas (desde la semana 25-120). Esta etapa consiste exclusivamente de una dosis oral de 6-MP (75 mg/m^2) y una dosis oral baja de Metotrexate semanalmente (MTX) (20 mg/m^2). Las muestras sanguíneas (2 ml tubo EDTA) fueron tomadas 3 días antes de la administración oral de MTX llevando a cabo el análisis sanguíneo correspondiente para cada paciente (biometría hemática, química sanguínea). Escogimos 24 de las 45 semanas en este periodo (teniendo entonces 24 determinaciones hematológicas y clínicas en cada paciente), dependiendo la semana de tratamiento en la cual se encontraba cada individuo al momento del estudio.

Todos los pacientes fueron clasificados en dos grupos de toxicidad (según resultados de cada paciente). En el primero se agrupó a los pacientes con grados de toxicidad 1-4 y a aquellos con grado de toxicidad 0; (según criterios de corte del NCI **Tabla 6**). En el segundo grupo, se integró a los pacientes con grados 2-4 y aquellos con grados 0-1 con el fin de analizar si los genotipos se encontraban asociados con algún grado de toxicidad en nuestra población.



Figura 11. Efectos adversos criterios del NCI

Tabla 6. Evaluación de toxicidad debido a 6-MP de acuerdo a los efectos adversos en los pacientes (Adaptado de NCI 2006, NCI 2009)

Toxicidad	Efecto adverso	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Hematológica	Disminución en Globulos Blancos Referencia (4500-11000 mm ³)	= 3000 mm ³ 3.0 x 10 ³ u/L	2000 mm ³ - 2999 mm ³ 2.0 – 2.99 x 10 ³ u/L	1000 mm ³ - 1999 mm ³ 1.0 – 2.0 x 10 ³ u/L	<1000 mm ³ 1.0 x 10 ³ u /L
	Plaquetas Referencia (150000-450000 mm ³)	= 75 000 mm ³ 75.0 x 10 ³ u /L	50,000 – 74,999/mm ³ 50.0 – 75.0 x 10 ³ u/L	<50,000 – 25,000/mm ³ <50.0 – 25.0 x 10 ³ u /L	<25,000/mm ³ <25.0 x 10 ³ u /L
Hepática	Incremento en ALAT/GPT Referencia (Hasta to 41 U/L)	= 2.5 veces SLN	2.-5.0 SLN	5.0-10.0 OLN	10.0-20.0 SLN
	Increased AST/GOT Baseline (Hasta to 42 U/L)	= 2.5 veces SLN	2.-5.0 SLN	5.0-10.0 OLN	10.0-20.0 SLN
Renal	Creatinina Referencia (0.1-1.5 mg / dL)	1.5- 1.99 mg/dL	2.0- 2.99 mg/dL	3.0- 4.0 mg/dL	dialisis
Gastrointestinal	Diarrea	≤ 4 evacuaciones por día	---	---	---
	Náuseas	Pérdida del apetito sin alteración en los hábitos alimenticios	Disminución en la ingesta oral, pérdida de peso no significativa, malnutrición.	Ingesta inadecuada de comida mayor a 24 horas..	Amenaza a la vida
	Vómitos	1-2 episodios en 24 horas	3-5 episodios en 24 horas	≤ 6 episodios en 24 horas	serias consecuencias
Cutánea	Prurito	Leve o localizado	Intenso / General	Intenso / General molestias al bañar o comer.	---
	Hipopigmentación	Leve o localizado	Marcado o generalizado	---	---
	Hiperpigmentación	Leve o localizado	Marcado o generalizado	---	---

SLN: Sobre el Limite Normal, g: gramos, mg: miligramos, dL: decilitro, u: unidades, L: Litros, mm³ milímetros cúbicos.

ALAT/GPT (alanina aminotransferasa) , AST/GOT (aspartato aminotransferasa)

--- Not Specified by NCI 2006,2009

8.4 SUSCEPTIBILIDAD A LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA

8.4.1 Pacientes

Los pacientes pediátricos fueron reclutados de dos hospitales en Mexico — “El Centro de Oncología Pediátrica de Baja California” y “El Centro Estatal de Cancerología de Durango” — estos dos centros están localizados en las ciudades de la región norte del país. El grupo caso incluyó 70 niños con diagnóstico médico de LLA (41 niños, y 29 niñas) con una edad media de 6.9 años (rango, 1 a 15 años)

El grupo control con pareamiento por edad, incluyó 152 individuos (82 niños, 58 niñas) con una edad media de 6.7 años, los cuales fueron seleccionados al azar. Los individuos con historia clínica de neoplasias malignas fueron excluidos. Ambos grupos fueron reclutados desde Marzo del 2013 a Julio del 2014.

8.5 EXTRACCIÓN DE ADN

Al inicio del estudio se obtuvieron 3 ml de sangre de todos los pacientes (de ambos centros oncológicos) mediante el sistema vacutainer en un tubo de tapón lila con EDTA como anticoagulante. Las muestras sanguíneas se homogeneizaron suavemente para asegurar que la relación anticoagulante/sangre fuera la correcta. Se procedió a rotular los tubos con nombre y fecha de extracción.

El ADN genómico se aisló a partir de 2 ml de sangre total mediante el Kit Macherey-Nagel® (Figura 12)

Este Kit consta de los siguientes reactivos:

- Proteinasa K
- Solución amortiguadora (SA) B3
- SA B5
- SA BW
- SA BE

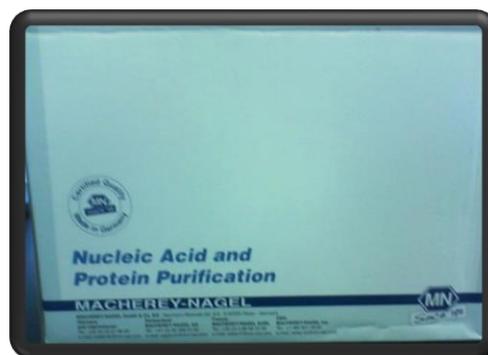


Figura 12.

Kit de extracción de ADN Macherey-Nagel

- Columnas de Silica NucleoSpin®
- Antes de Iniciar la extracción:
- Preparación de las SA B3, B5 y Proteinasa K de acuerdo a las indicaciones del manual.
- Se colocará la SA BE en la estufa de incubación a una temperatura de 70°C.

8.5.1 Protocolo de extracción

1. Adicionar 200 μ L de sangre total en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
2. Pipetear 25 μ L de proteinasa K, añadirla en el tubo que contiene la sangre total.
3. Añadir 200 μ L de SA B3 a la muestra. Agitar con vórtex 15 segundos.
4. Incubar la(s) muestra(s) a 70°C por 10-15 minutos.
5. Agitar las muestras vigorosamente con vórtex durante la incubación una o dos veces durante 15-20 segundos.
6. Añadir 210 μ L de Etanol (96-100%) a la muestra y agitar con vórtex por 15 segundos.
7. Transferir la muestra del paso 6 a una columna de Silica NucleoSpin® colocada en un tubo de 2ml. Centrifugar a 11 000 rpm durante 1 minuto. Colocar la columna antes mencionada en un nuevo tubo de 2ml y desechar el tubo con el filtrado.
8. Añadir 500 μ L de SA BW. Centrifugar a 11 000 rpm durante 1 minuto, pasar la columna a un nuevo tubo de 2ml y desechar el tubo con el filtrado.
9. Añadir 600 μ L de SA B5. Centrifugar a durante 1 minuto, volver a centrifugar mismo tiempo-mismas rpm.
10. Colocar la columna en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml y añadir 100 μ L de Buffer BE. Mantener a temperatura ambiente durante 1 minuto y centrifugar a 11000 rpm durante 1 minuto.

11. Desechar columna, cerrar tubo eppendorf y guardar a temperatura de 4°C.

8.6 ELECTROFORESIS

La integridad del ADN genómico se evaluó a través de electroforesis horizontal usando gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

8.6.1 Protocolo

1. Pesar 1 g de Agarosa y colocarla en un matraz.
2. Agregar 100 mL de Solución amortiguadora TAE (Tris acetato EDTA) 1x
3. Calentar en un horno de microondas por 1 ½ minutos para deshacer los grumos de agarosa y dejar completamente disuelto, con apariencia transparente.
4. Enfriar a temperatura ambiente y agregar 8 µL de colorante de bromuro de etidio grado biología molecular a una concentración de 10 mg/mL (Marca Promega®).
6. Vaciar la agarosa en el contenedor de gel de la cámara de electroforesis e insertar un peine. Cuando solidifique el gel se retira el peine y los pozos quedan formados, en los que se deposita cada muestra durante la electroforesis.
7. Preparar muestras con: 3 µL de muestra problema+ 5 µL de buffer de carga + 2 µL de colorante azul (que contiene azul de bromofenol, azul xilencialol y glicerol) (**Figura 13**).

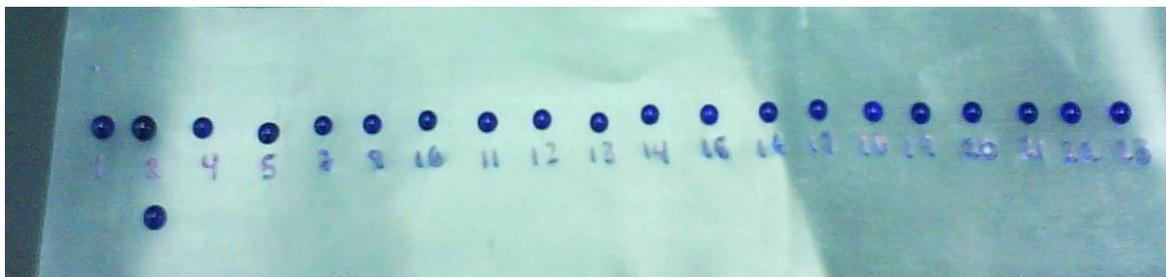


Figura 13. Preparación de muestras para electroforesis.

8. Cargar una muestra en cada pozo del gel (**Figura 14**).



Figura 14. Muestras cargadas en el gel de agarosa.

9. Conectar la cámara a la fuente de alimentación con las siguientes condiciones: 95 Volts, 2 Amperes, y 45 minutos (**Figura 15**).



Figura 15.

Cámara de Electroforesis, C.B.S. Scientific Co. Modelo MGU-502 made in USA, 25^o Volts DC.

10. Visualizar el gel en un transiluminador con luz UV para observar los resultados (**Figura 14**)

11. Tomar la fotografía del gel de agarosa.



**Figura 16.
Placa del Transiluminador UV para
visualización de muestras
de ADN en gel de Agarosa.**

8.7 ESPECTROFOTOMETRÍA

La concentración del ADN, así como la relación 260/280 y 260/230 se determinó en un espectrofotómetro Nanodrop (Marca THERMOSCIENTIFIC; **Figura 17**).

260/280

La relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm se utiliza para evaluar la pureza del ADN y ARN. Una proporción ~ 1.8 está generalmente aceptada como "ADN puro"; una proporción de ~ 2.0 está generalmente aceptada como "ARN puro". Si la relación es apreciablemente menor en cualquiera de los casos, esto puede indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente cerca de los 280 nm.

260/230

Esta relación se utiliza como una medida secundaria de la pureza de los ácidos nucleicos. Los valores de 260/230 para ácidos nucleicos "puros" son a menudo superiores a los respectivos valores de 260/280. Los valores esperados para la relación 260/230 son comúnmente en un intervalo de 2.0 a 2.2. Si la proporción es sensiblemente inferior, esto puede indicar la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm.

Figura 17.Equipo Nanodrop 2000 (Marca ThermoScientific)

8.7.1 Protocolo de uso

1. Prender la computadora
2. Icono Nanodrop – doble click
3. Dar un clic Nucleic Acid
4. Levantar tapa del equipo Nanodrop
5. Limpiar con papel arroz suavemente
6. Cargar 1 μL de agua en el pozo del equipo, cerrar tapa.
7. Dar clic en blank
8. Dar nombre a la muestra



9. Cargar 1 μL de ADN en el pozo del equipo, cerrar tapa. (**Figuras 18 y 19**),
10. Dar clic en Run
11. Finalmente los resultados son exportados a una hoja de cálculo en Microsoft Excel.



Figuras 18 y 19. Placa del Nanodrop para agregar 1 μL de ADN en la ranura del Pozo del Equipo.

8.8 PCR EN TIEMPO REAL

Para la determinación de las variantes alélicas de *TPMT* *1,*2,*3A,*3B,*3C y la *MTHFR* (677C>T y 1298A>C), se utilizó la Técnica de PCR en Tiempo Real mediante el equipo Applied Biosystems modelo Step One™ (Figura 20), el cual cuenta con las siguientes características (Applied Biosystems 2006, 2010) :

- Placa de 48 pocillos
- Sistema Óptico LED con 3 filtros:
(FAM™/SYBR Green ®; VIC ® /JOE™;ROX™)
- Velocidad normal y rápida
- Volumen de Trabajo mínimo 10 µL
- Notebook con el Software express v2.1 ó v3.0

Figura 20. Equipo Applied Biosystems Modelo Step One™



8.8.1 Sondas Taqman

Las sondas Taqman utilizadas en este estudio fueron:

Tabla 7. Sondas utilizadas para la determinación del genotipo de *TPMT* y *MTHFR* (Applied Biosystems Taqman® Drug Metabolism Genotyping Assay)

TPMT *2	C_12091552_30
TPMT *3A	C__19567_20, C_30634116_20
TPMT *3B	C_30634116_20
TPMT *3C	C__19567_20
MTHFR C677T	C_1202883_20
MTFHR A1298C	C_850486_20

8.8.2 Condiciones para PCR utilizadas en este Trabajo

En la tabla 8 se muestra el cocktail de la reacción con un volumen total de 15 μL , utilizado para las muestras de los individuos con diagnóstico de LLA desarrollado en este trabajo.

Tabla 8, figura 21. Cocktail para la reacción de PCR

Componente	Volumen (μL) por reacción
Master Mix (2X)	5
Sonda Taqman (20X)	0.5
Agua Grado Biología Molecular	7.0
Muestra (50 ng/μL)	2.5
Volumen Total	15



8.8.3 Interpretación de los Resultados de PCR en Tiempo Real

8.8.3.1 Discriminación alélica: Una vez concluida la reacción se observaron las curvas de amplificación de los alelos. En la figura 22 se observa mayor fluorescencia emitida por el fluoróforo VIC (línea verde) para la sonda C_12091552_30, dicho fluoróforo indica el genotipo *1/*1 (Homocigoto Wild Type). Mientras que en la figura 23 se observa el análisis de multicomponentes observándose la amplificación del fluoróforo VIC indicando el mismo genotipo silvestre.

Figura 22. Amplificación de PCR-Rt sonda C_25625805_10, Homocigoto Wild Type

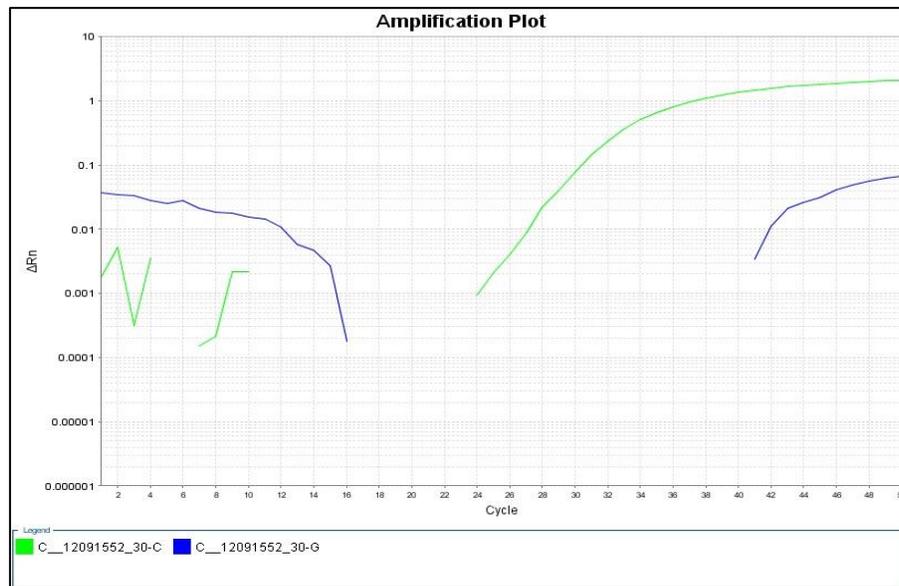
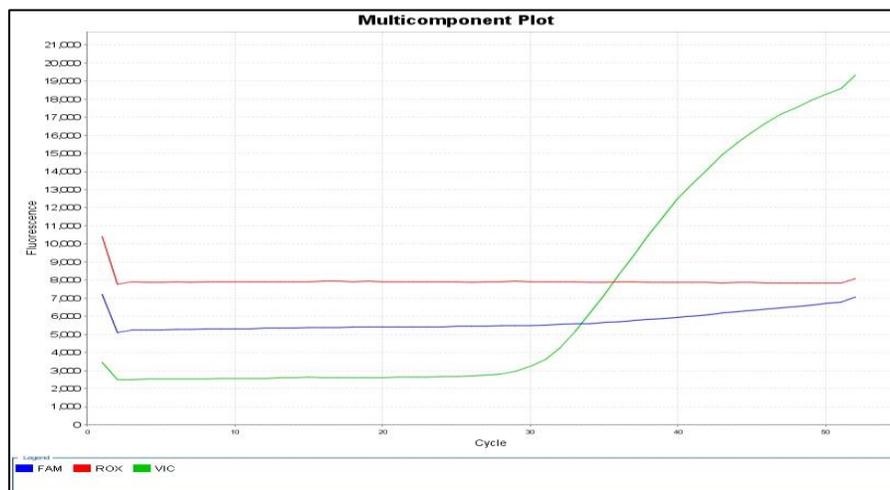


Figura 23. Análisis de Multicomponentes sonda C_12091552_30, Homocigoto Wild Type



Mientras que en la figura 24 se muestra la presencia de ambos fluoróforos con la misma intensidad y magnitud debido a que representa un heterocigoto *1/*2. También se muestra (Figura 25) el análisis de multicomponentes observándose la amplificación de ambos fluoróforos lo cual demuestra el genotipo heterocigoto.

Figura 24. Amplificación de PCR-Rt sonda C_12091552_30, Heterocigoto

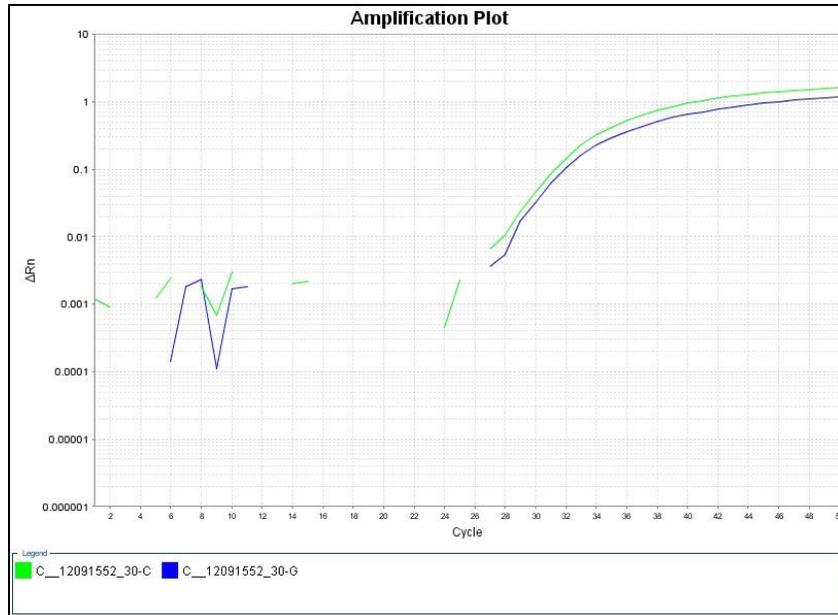
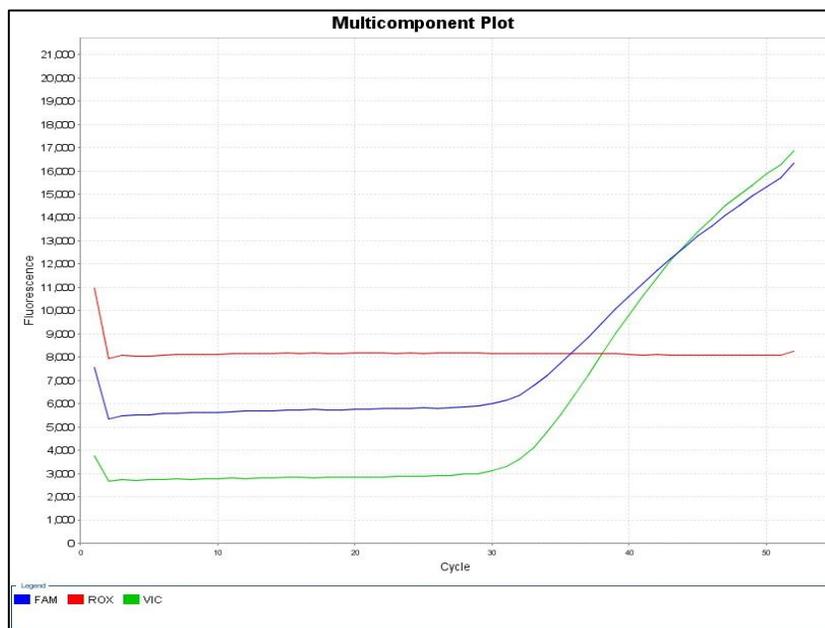


Figura 25. Análisis de Multicomponentes sonda C_25625805_10, Heterocigoto



Para el genotipo mutado (*2/*2) el análisis de multicomponentes mostraría amplificación del fluoróforo FAM (línea azul).

En la tabla 9 se indica la interpretación de las fluorescencias obtenidas y el genotipo correspondiente de acuerdo a como fue marcada cada sonda.

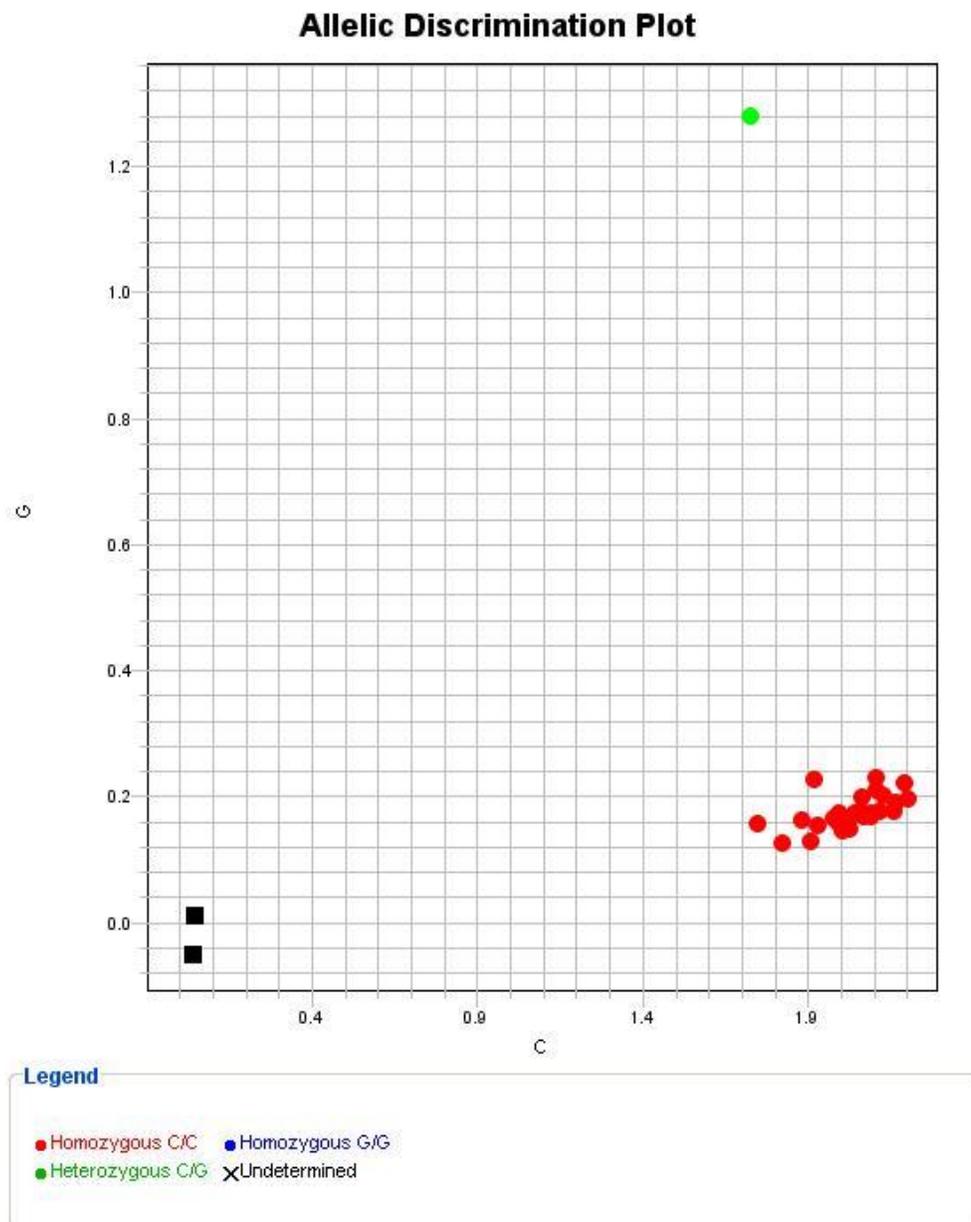
Tabla 9. Tipos de fluorescencia y genotipos correspondientes obtenidos mediante PCR en tiempo Real

Fluorescencia Registrada	Genotipo
<i>TPMT*2 (C>G)</i>	
Solo fluorescencia de VIC	Homocigoto para el alelo silvestre, (*1/*2)
Solo Fluorescencia de FAM	Homocigoto para el alelo mutante, (*2/*2)
Ambas Fluorescencias	Heterocigoto, (*1/*2)
<i>TPMT*3B (C>T)</i>	
Solo fluorescencia de FAM	Homocigoto para el alelo silvestre, (*1/*1)
Solo Fluorescencia de VIC	Homocigoto para el alelo mutante, (*3B/*3B)
Ambas Fluorescencias	Heterocigoto, (*1/*3B)
<i>TPMT *3C (T>C)</i>	
Solo fluorescencia de FAM	Homocigoto para el alelo silvestre (*1/*1)
Solo Fluorescencia de VIC	Homocigoto para el alelo mutante (*3C/*3C)
Ambas Fluorescencias	Heterocigoto, (*1/*3C)
<i>MTHFR C677T</i>	
Solo fluorescencia de VIC	Homocigoto para el alelo silvestre (C/C)
Solo Fluorescencia de FAM	Homocigoto para el alelo mutante (T/T)
Ambas Fluorescencias	Heterocigoto, (C/T)
<i>MTHFR A1298C</i>	
Solo fluorescencia de FAM	Homocigoto para el alelo silvestre (A/A)
Solo Fluorescencia de VIC	Homocigoto para el alelo mutante (C/C)
Ambas Fluorescencias	Heterocigoto, (A/C)

Finalmente, se hizo la discriminación alélica, la cual nos permite agrupar a los individuos de acuerdo a su genotipo. En el caso de la sonda C_1209155230_30 se distribuyen en genotipos silvestres C/C (puntos rojos), heterocigotos C/G (puntos verdes) y genotipos homocigoto mutado G/G (puntos azules).

La distribución de los puntos en el plano cartesiano está en función de la cantidad de fluorescencia emitida por cada fluoróforo (FAM/VIC) y la concentración de ADN de cada muestra. (Figura 26).

Figura 26. Grafica de Discriminación alélica



IX. ASPECTOS ÉTICOS

De acuerdo al diseño del estudio y variables involucradas se considera que no existen riesgos mayores para los individuos participantes. El Protocolo fue aprobado por el Comité Local de Investigación y Ética del Hospital General del Estado de Durango. El estudio cumple con los criterios de la Declaración de Helsinki (2013), código de Nüremberg y el Reglamento de la Ley General de Salud para el estudio en seres humanos. La integración del(los) grupo (s) de estudio se realizó a través de invitación directa a los pacientes del Área de Cancerología (Durango) que coordina el Dr. Hematólogo. Aarón Díaz. Y en el caso del Centro de Oncología Pediátrica (Tijuana, B.C.) por parte del Dr. Horacio Almanza Reyes. Los padres o tutores legales de los pacientes fueron informados previamente sobre los objetivos del estudio y proporcionaron su consentimiento informado, así mismo los pacientes brindaron su asentimiento informado.

X. ANALISIS ESTADISTICO

10.1 Determinación de la asociación de los polimorfismos de TPMT y MTHFR con la Farmacocinética de 6-MP.

No existe un consenso real sobre la manera de realizar la construcción de un modelo farmacocinético poblacional (Jonsson, 1998). Hemos utilizado un enfoque basado en un análisis poblacional total. El análisis univariado de asociación se desarrolló mediante el uso de SAEM (Aproximación Estocástica del Algoritmo Esperanza-Maximización) (Delyon et al, 1999; Kuhn et al, 2005) en el software Monolix v.4.2.0. El mejor modelo farmacocinético poblacional se eligió de acuerdo con el Criterio de Información Bayesiano (BIC) y el Criterio de Información de Akaike (AIC) (Kuhn et al, 2005). Para probar la importancia de una covariable en el modelo acentuando el cambio en el coeficiente de variación (CV %) en la variabilidad interindividual además de la posterior significancia estadística ($p \leq 0.05$) fueron usadas las pruebas de Wald y la LRT (Razón de Verosimilitud -2LogLikelihood). El abordaje poblacional de este estudio estuvo constituido por un modelo farmacocinético de efectos mixtos y un modelo de univariado de asociación; para establecer un modelo de univariado es

necesario tener definidas las variables que se correlacionan en un intervalo amplio (variables continuas) o en una proporción suficiente (variables categóricas).

Este análisis tiene como objetivo identificar las covariables que son capaces de explicar parte de la variabilidad de un parámetro farmacocinético dado. La variabilidad interindividual (parámetros farmacocinéticos) y la residual (concentraciones) disminuirán (CV %), siempre que una covariable tenga un efecto importante en el comportamiento farmacocinético global

El modelo de efectos mixtos fue definido como:

$$y_{ij} = f(x_{ij}, \psi_i) + g(x_{ij}, \psi_i, \xi) \varepsilon_{ij}, \quad 1 \leq i \leq N, \quad 1 \leq j \leq n_i$$

Aquí:

f es la función paramétrica del modelo estructural

g es la función paramétrica para el modelo del error

$y_{ij} \in \mathbb{R}$ es la observación j th del sujeto i ,

N es el número de individuos,

n_i es el número de observaciones para el individuo i ,

Las variables de regresión (covariables), o variables del diseño (x_{ij}) se asume son conocidas $x_{ij} \in \mathbb{R}^{n_x}$

Para el sujeto i , el vector $\psi_i = (\psi_{i,\ell}; 1 \leq \ell \leq n_\psi) \in \mathbb{R}^{n_\psi}$ es un vector de n_ψ parámetros individuales:

$$\psi_i = H(\mu, c_i \eta_i)$$

Donde:

$c_i = (c_{im}; 1 \leq m \leq M)$ es un vector conocido de M covariables

μ es un vector conocido de efectos fijos de tamaño n_μ

η_i es un vector conocido de efectos aleatorios distribuidos normalmente en un tamaño n_η :

$$n_i \sim_{i.i.d.} \mathcal{N}(0, \Omega)$$

Los errores residuales (ε_{ij}) son variables con media cero y varianza uno. El modelo de error residual se define por la función g y algunos parámetros ξ

Aquí, los parámetros del modelo son $\theta = (\mu, \Omega, \xi)$. Denotaremos $\ell(y; \theta)$ la probabilidad de las observaciones $y = (y_{ij}; 1 \leq i \leq n, 1 \leq j \leq n_i)$ y $p(y, \psi; \theta)$ la probabilidad de los datos completos $(y, \psi) = (y_{ij}; \psi_i; 1 \leq i \leq n, 1 \leq j \leq n_i)$.

Así,

$$\ell(y; \theta) = \int p(y, \psi; \theta) d\psi.$$

Para los parámetros individuales en Monolix se asume que ψ_i es una transformación de un vector aleatorio gaussiano φ :

$$\psi_i = h(\varphi_i)$$

La reordenación de las covariables c_{im} en una matriz C_i ; φ_i puede escribirse como:

$$\psi_i = C_i \mu + \eta_i$$

Un modelo de un compartimento con absorción oral y primer orden fue usado para modelar la farmacocinética de 6-MP:

$$y_{ij} = \frac{D}{V} \frac{k_a}{k_a - k} \left(\frac{e^{-k(t-t_D)}}{1 - e^{-kT}} - \frac{e^{-k_a(t-t_D)}}{1 - e^{-k_aT}} \right)$$

$y_{ij} \in \mathbb{R}$ es la observación j th del individuos i ,

V = volumen de distribución,

k = constante de velocidad de eliminación,

k_a = constante de velocidad de absorción,

Estado estable: en un tiempo t después de la dosis D , tomada en un tiempo t_D después de repetidas administraciones de la dosis D recibida en un intervalo $T(t \geq t_D)$.

10.2 Determinación de la asociación de los polimorfismos de TPMT y MTHFR con las reacciones adversas.

Los resultados en la población estudiada (39 pacientes – CECAN Durango) fueron expresados con media o mediana \pm desviación estándar o rango para las variables numéricas y en porcentajes para las variables cualitativas.

Los grados de toxicidad (hematológica y no-hematológica) observados en cada niño durante las 24 semanas fueron evaluados calculando la moda aritmética en cada clasificación de toxicidad (hematológica, hepática, renal, gastrointestinal y cutánea)

La asociación de los polimorfismos genéticos de TPMT (*2,*3A), MTHFR (C677T y A1298C) y las reacciones adversas se realizó mediante el test χ^2 en los grupos analizados (grupo de pacientes con grado de toxicidad 1-4 vs 0, y grupo de individuos con grado de toxicidad 2-4 vs 0-1). Los valores de Odds Ratio (OR) y los intervalos de confianza fueron calculados tomando como referencia al genotipo wild type en cada una de las variantes alélicas.

Todos los análisis fueron desarrollados usando el software Statistical Analysis System v.8.2 (SAS Institute, Inc., NC, USA). y MedCalc Software versión 13.3.. La significancia estadística fue aceptada con una $p \leq 0.05$.

10.3 Determinación de la asociación de los polimorfismos de TPMT y MTHFR con el riesgo a LLA

Se determinó el Equilibrio de Hardy Weinberg (HWE) para la distribución de genotipos, además se estimó la prueba χ^2 de Pearson para evaluar las diferencias entre las frecuencias alélicas y genotípicas entre los grupos caso y control. Los odds ratios (ORs) de los genotipos de MTHFR y TPMT se emplearon para establecer asociaciones estadísticamente significativas entre las mutaciones en *TPMT* y *MTHFR* y el riesgo a LLA.

Todos los análisis fueron llevados a cabo usando el software Statistical Analysis System v.8.2 (SAS Institute, Inc., NC, USA). y MedCalc Software versión 13.3.1.

La significancia estadística fue aceptada con una $p \leq 0.05$. El tamaño muestral se calculó en función de la frecuencia de exposición entre casos y controles con un

intervalo de confianza del 95% y $\beta=0.80$, además de dos controles por cada caso; estas estimaciones fueron basadas en la fórmula de Pértega Díaz (2002).

Los grupos fueron pareados por edad. De acuerdo al tamaño muestral calculado, se seleccionaron al azar 70 casos y 152 controles en dos centros oncológicos del norte del Estado: El Centro de Oncología Pediátrica de Baja California” y “El Centro Estatal de Cancerología de Durango”.

XI. RESULTADOS

11.1 FARMACOCINETICA DE 6-MERCAPTOPURINA

11.1.1 Validación del Método Analítico HPLC

El método de análisis modificado y validado para la cuantificación de 6-MP en plasma demostró ser preciso y sensible. La ecuación de regresión fue descrita como: $A = 0.5308 + 19.0630 \cdot C$ ($r=0.999$, $n=3$) (A: Área bajo el pico de 6-MP), usando (1/c) regresión por mínimos cuadrados ponderados, el límite inferior de cuantificación (LOQ) en plasma fue de 25 ng/ml (definido como 3 veces el ruido de fondo (LOD)). La curva de calibración mostró una buena linealidad en el rango de 25-800 ng/ml, y el coeficiente de variación intra-día e inter-día fue $<4\%$. La recuperación absoluta fue del 95.6%, mientras que la recuperación relativa varió de 95.6% a 96.9%. Este estudio mostró que el fármaco 6-MP fue estable en plasma a -70°C por al menos 60 días, teniendo desviaciones menores que $\pm 8\%$ (>90 de la concentración inicial). El tiempo de retención fue de 3.48 min. Los Cromatogramas HPLC de 6-MP en plasma se muestran en la **Figura 27** (Ninguna interferencia endógena se observó en el tiempo de retención para el analito de interés).

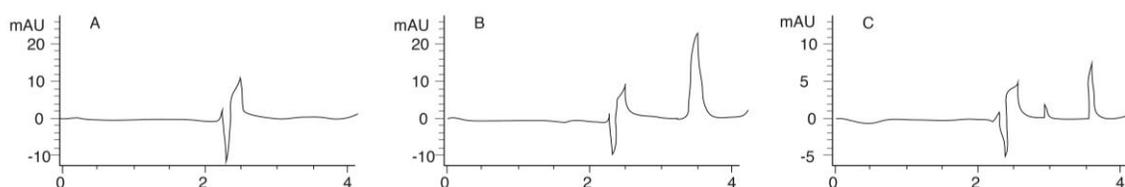


Figura 27. Cromatogramas característicos: (A) Blanco- plasma humano, (B) Blanco en plasma con 6-Mercaptopurina (C) Muestra plasmática de un paciente con LLA (administrado con una dosis oral única de 6-MP (50 mg) y monitoreada para la detección de 6-MP).

11.1.2 Datos generales de los pacientes (n=10)

Los datos biológicos, clínicos y genéticos de los pacientes fueron capturados en una base de datos (integrada por covariables nominales y continuas) en formato .csv para su posterior análisis en el software Monolix v4.2.0., estos datos son mostrados

en la **Tabla 10** y las concentraciones plasmáticas de 6-MP de los pacientes (n=56) se muestran en la Figura 28.

Figura 28. Concentraciones individuales de 6-MP (en ng/ml) en los pacientes.

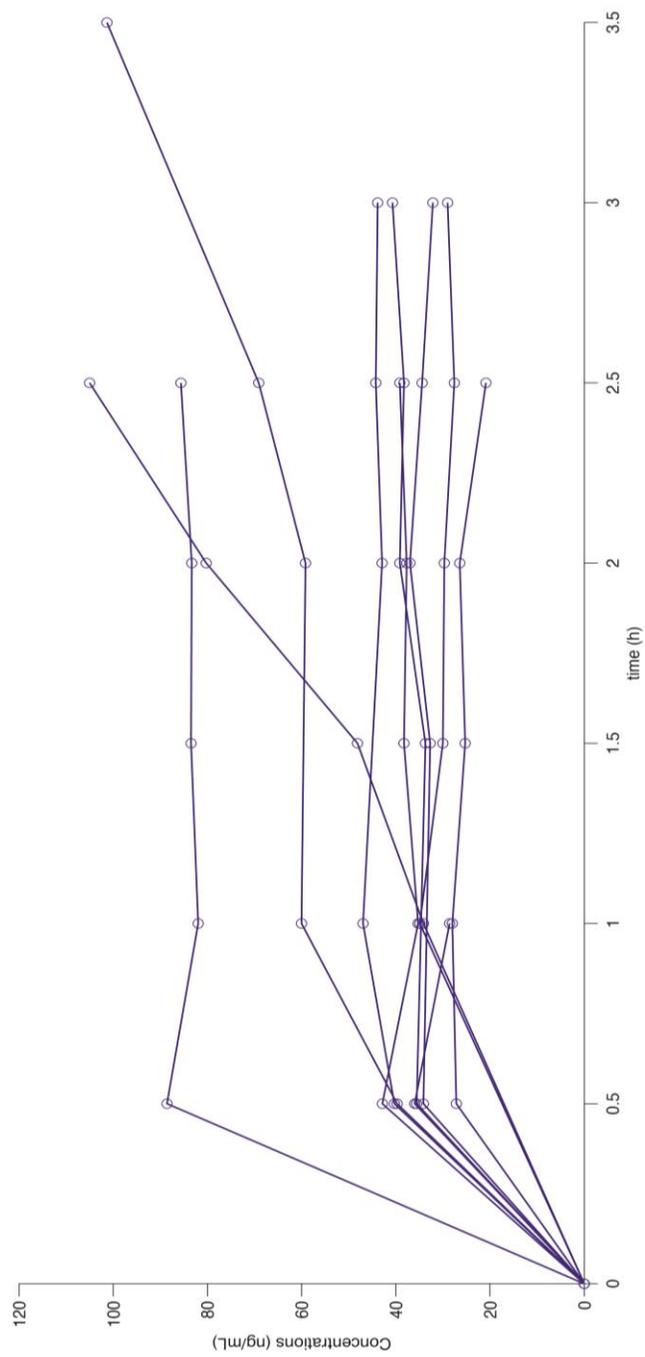


Tabla 10. Datos generales de los pacientes (variables cualitativas y cuantitativas para el análisis en el software Monolix)

ID PACIENTE	EDAD (años)	SEXO	DOSIS DE 6-MP (mg)	TIEMPO DE MUESTREO (horas)	CONCENTRACION (ng/ml)	Genotipo de los pacientes			
						TPMT*2	TPMT*3A	MTHFR C677T	MTHFR A1298C
1	6	0	25	0		0	0	1	0
				0.5	40.29				
				1	46.96				
				2	42.91				
				2.5	44.26				
2	7	0	37.5	3	43.84	0	0	0	0
				0					
				0.5	39.72				
				1	60.01				
				2	59.16				
3	13	0	25	2.5	69.09	0	1	1	0
				3	101.34				
				0					
				0.5	34.9				
				1	29.99				
4	9	1	37.5	2	29.7	0	0	1	0
				2.5	27.56				
				3	28.99				
				0					
				0.5	34.13				
5	12	1	25	1	48.15	0	0	1	1
				2	80.24				
				2.5	105				
				0					
				0.5	88.56				
6	6	0	37.5	1	81.94	0	0	1	0
				2	83.48				
				2.5	83.32				
				3	85.63				
				0					
7	16	1	100	0.5	27.13	0	1	1	0
				1	27.99				
				2	25.27				
				2.5	26.42				
				3	20.87				
8	4	1	37.5	0	42.84	0	0	0	1
				0.5	35.27				
				1	38.27				
				2	37.7				
				2.5	39.13				
9	4	1	24	3	35.98	0	0	1	0
				0	28.56				
				0.5	34.13				
				1	32.7				
				2	36.98				
10	15	0	56	2.5	34.41	0	0	2	0
				3	32.13				
				0					
				0.5	35.56				
				1	33.7				
				2	39.13				
				2.5	38.27				
				3	40.7				

Sexo, niño=0; niña=1

TPMT*2 0= Genotipo silvestre, 1= Genotipo heterocigoto 2= homocigoto mutado

TPMT*3A 0= Genotipo silvestre, 1= Genotipo heterocigoto 2= homocigoto mutado

MTHFR C677T 0= Genotipo silvestre, 1= Genotipo heterocigoto 2= homocigoto mutado

MTHFR A1298C 0= Genotipo silvestre, 1= Genotipo heterocigoto 2=homocigoto mutado

11.1.3 Modelo Farmacocinético Estructural (sin covariables)

Sin ninguna covariable en el modelo farmacocinético de un compartimento con absorción oral y primer orden, fueron probados diferentes modelos de error residual (Monolix 4.2.0), el mejor modelo fue el denominado de “error proporcional” con menor porcentaje de variación biológico inter-individual (%) en los parámetros farmacocinéticos, seleccionado a partir de los criterios BIC y AIC (**Tabla 11**) (Verbeke , 2004).

Tabla 11. Modelo estructural básico con el cálculo de la función objetivo y el error inter-individual en los parámetros farmacocinéticos.

Modelo	Función Objetivo (Δ OBJF)			Error interindividual CV (%)		
	-2 Loglikelihood	AIC	BIC	Ka	V	K
Básico	-356.46	-338.46	-335.74	47	39	78

-2 Loglikelihood Razón de Verosimilitud

AIC Criterio de Información de Akaike

BIC Criterio de Información Bayesiano

Ka Constante de Absorción, V Volumen de Distribución, K Constante de Velocidad de Eliminación

11.1.4 Modelo Farmacocinético Intermedio (con covariables)

Se ajustaron las covariables (edad, sexo, TPMT*2, *3A, MTHFR C677T y A1298C) al modelo farmacocinético y al modelo de error seleccionados. En el análisis univariado de asociación (**Tabla 12**), se encontró que dos covariables mostraron asociación significativa con los parámetros farmacocinéticos Ka/V/K, la Edad ($p = <0.001$) y Edad & Sexo ($p = <0.001$); por otra parte, los polimorfismos genéticos de TPMT *2 ($p = 0.001$, $p <0.001$) y *3A ($p = 0.032$, $p = 0.014$) estuvieron asociados a los parámetros farmacocinéticos Ka/V sucesivamente. Hubo un descenso significativo cuando la edad fue incorporada en el modelo (la variabilidad inter-individual en el parámetro V descendió de 39% a 25 % y en K de 78% to 48%). Y para el caso de los polimorfismos genéticos de TPMT *2 y *3A en los parámetros farmacocinéticos Ka/V/K de 47 a 1.8%, de 39 a 13% y de 78 a 56% sucesivamente No hubo significancia estadística para los polimorfismos de MTHFR como covariables involucradas en la variabilidad de 6-MP.

Tabla 12. Modelo intermedio (con covariables)

	Función Objetivo (Δ OBJF)			Ka	Error Interindividual		CV (%) y p		
	-2 Loglikelihood	AIC	BIC		p	V	p	K	p
Modelo Básico	-356.46	-338.46	-335.74	47		39		78	
Covariables									
Edad	-374.51	-350.51	-346.88	65	<0.001	25	<0.001	48	<0.001
Sexo	-348.87	-324.87	-321.24	28	0.49	30	0.58	64	0.69
Edad & Sexo	-371.34	-341.34	-336.80	9	<0.001	40	<0.001	11	<0.001
					0.32		0.74		0.009
TPMT *2 & *3A	-362.68	-332.68	-328.14	1.8	0.001	13	<0.001	56	1.00
					0.032		0.014		0.15
MTHFR 677,1298	-348.80	-324.50	-320.18	26	0.45	29	0.53	70	0.65
					0.41		0.48		0.63

-2 Loglikelihood Razón de Verosimilitud

AIC Criterio de Información de Akaike, BIC Criterio de Información Bayesiano

Ka Constante de Absorción, V Volumen de Distribución, K Constante de Velocidad de Eliminación

11.1.5 Modelo Farmacocinético Poblacional

El modelo poblacional final incluyó un análisis de efectos mixtos no lineales, implementando las covariables que en el modelo intermedio tuvieron significancia estadística en la variabilidad inter-individual de los parámetros farmacocinéticos (**Tabla 13**), el análisis univariado de asociación mostró que la edad es la única covariable asociada a los parámetros farmacocinéticos Ka/V ($p = <0.001$), no así la K (constante de velocidad de eliminación) ($p = 0.47$). Los polimorfismos de TPMT y MTHFR no están asociados a la farmacocinética de 6-MP.

Tabla 13. Modelo Final

Modelos farmacocinéticos	Función Objetivo (Δ OBJF)			Ka	Error Interindividual		CV (%) y p		
	-2 Loglikelihood	AIC	BIC		p	V	p	K	p
Modelo básico (sin covariables)	-356.46	-338.46	-335.74	47		39		78	
Modelo final									
Edad	-390.88	-348.88	-342.53	46	<0.001	<1	<0.001	8	0.47
Sexo					0.69		0.25		0.51
TPMT *2					0.39		0.1		0.71
TPMT *3A					0.25		0.078		0.59

-2 Loglikelihood Razón de Verosimilitud, AIC Criterio de Información de Akaike, BIC Criterio de Información Bayesiano, Ka Constante de Absorción, V Volumen de Distribución, K Constante de Velocidad de Eliminación

Los coeficientes de correlación para la edad/ K_a ($r^2=0.85$) y edad/ V ($r^2=0.93$) se muestran en las **Figuras 29 y 30**.

Figura 29. Relación entre el log individual (K_a) y la edad

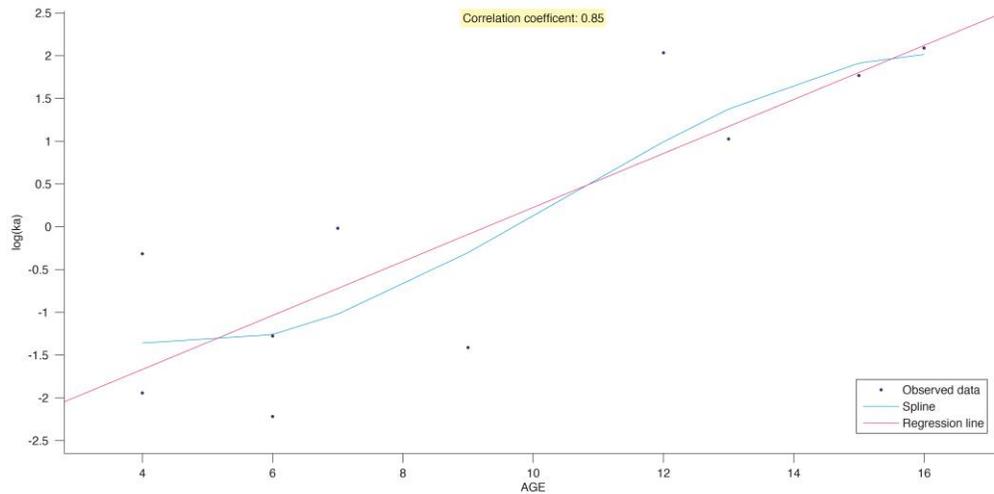
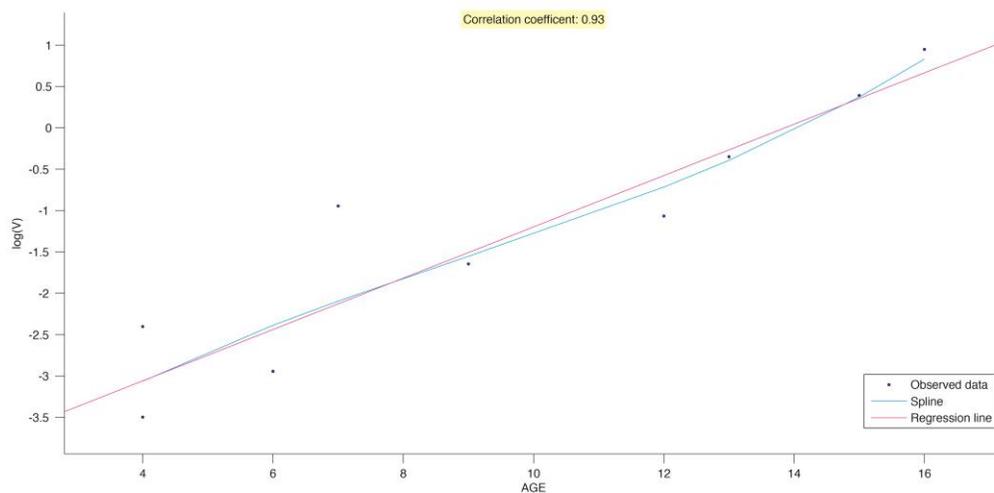


Figura 30. Relación entre el log individual (V) y la edad



En cuanto a los parámetros farmacocinéticos poblacionales, la variabilidad inter-individual y la variabilidad residual obtenidos mediante el ajuste del conjunto de datos al modelo final se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Farmacocinética Poblacional de 6-MP obtenido del ajuste del conjunto de datos (10 niños) en el modelo base y final.

Parámetro farmacocinético	Estimación de valores	Error interindividual	Estimación de valores	Error interindividual	SE (%)
	Modelo Base	CV (%)	Modelo Final	CV (%)	
Ka	0.0670	47	0.0624	46	8.4
V	0.0137	39	0.0290	<1	3.0
K	3.46	78	3.03	8	26

Ka Constante de Absorción (hr^{-1})

V Volumen de Distribución (L/Kg)

K Constante de Velocidad de eliminación (hr^{-1})

El modelo poblacional final para 6-MP en plasma fue:

$$y_{ij} = \frac{D}{0.0290} \frac{0.0624}{0.0624 - 3.03} \left(\frac{e^{-3.03(t-t_D)}}{1 - e^{-3.03T}} - \frac{e^{-0.0624(t-t_D)}}{1 - e^{-0.0624T}} \right)$$

$y_{ij} \in \mathbb{R}$ es la observación j th del individuos i ,

V = volumen de distribución,

k = constante de velocidad de eliminación,

k_a = constante de velocidad de absorción,

Estado estable: en un tiempo t después de la dosis D , tomada en un tiempo t_D después de repetidas administraciones de la dosis D recibida en un intervalo $T(t \geq t_D)$.

11.2 REACCIONES ADVERSAS

11.2.1 Características clínicas de los pacientes

Los 39 pacientes del Centro Estatal de Cancerología del Estado de Durango (CECAN) fueron clasificados según edad, sexo y tipo de toxicidad presentada; los resultados se muestran en la **tabla 15**. La población estudiada está integrada por más niñas (25) que niños (14), sin evidencia de toxicidad renal y cutánea.

Tabla 15. Características clínicas de los pacientes

	Media \pmSD
Edad	6.9 \pm 4.06
Edad Promedio	Años (Rango)
Niños	6 (2-15)
Niñas	8 (4-16)
Sexo	n (%)
Niños	14 (36)
Niñas	25 (64)
Toxicidad	n (%)
Sin ningún efecto adverso	17 (43.6)
Hematológica	^a 19 (48.7)
Hepática	^a 22 (56.4)
Renal	0
Gastrointestinal	^a 5 (12.8)
Cutánea	0

SD: Desviación estándar

n: número de individuos

^a algunos pacientes reportan uno o más efectos adversos.

11.2.2 Parámetros clínicos asociados a toxicidad

Al realizar el análisis de toxicidad se observaron efectos adversos hematológicos, hepáticos y gastrointestinales en los pacientes; cuya frecuencia fue estimada de acuerdo a la guía del NCI, la toxicidad hepática fue la más frecuente, podemos ver los resultados en la **tabla 16**.

Tabla 16. Reacciones adversas en la población estudiada (n=39), desglosadas por tipo de toxicidad.

Tipo de Toxicidad	Reacciones Adversas			
	Leucopenia 17		Trombocitopenia 2	
Hematológica				
Hepática	Incremento en los niveles de Bilirrubina 0	Incremento en ALAT/GPT 14	Incremento en AST/GOT 8	Incremento en GPT/GOT 13
Gastrointestinal	Diarreas 3	Nauseas 2	Vómitos 2	Nauseas/Vomito 2

ALAT/GPT (alanina aminotransferasa)

AST/GOT (aspartato aminotransferasa)

11.2.3 Frecuencias alélicas y genotípicas de TPMT y MTHFR

Las frecuencias alélicas y genotípicas para TPMT son mostradas en la **Tabla 17**, ambas variantes alélicas exhibieron una frecuencia <1% en la población estudiada. Para en el caso de MTHFR, la variante C677T presentó una frecuencia mayor (0.40) a la de A1298C (0.22) (**Tabla 18**).

Tabla 17. Frecuencias alélicas y genotípicas de TPMT *2 y *3A en la población estudiada

Alelo	Homocigoto silvestre	Heterocigoto	Homocigoto mutado	Frecuencia alélica	
	*1/*1	*1/*2: C/T	*2/*2: T/T	*1	*2
TPMT*2	38 (0.97)	1 (0.03)	0 (0.0)	0.99	0.01
	*1/*1	*1/*3A	*3A/*3A	*1	*3A
TPMT*3A	36 (0.92)	3 (0.08)	0 (0.0)	0.96	0.04

Datos expresados:

n (proporción de Individuos con un determinado genotipo del total de la población analizada).

Frecuencia alélica= (Alelos homocigotos x 2 + Alelos heterocigotos)/Sujetos totales x 2.

Tabla 18. Frecuencias alélicas y genotípicas de MTHFR C677T y A1298C en la población estudiada

Alelo	Homocigoto	Heterocigoto	Homocigoto	Frecuencia alélica	
	silvestre		mutado		
MTHFR	C/C	C/T	T/T	C/C	T/T
C677T	14 (0.36)	19 (0.49)	6 (0.15)	0.60	0.40
MTHFR	A/A	A/C	C/C	A/A	C/C
A1298C	26 (0.67)	9 (0.23)	4 (0.1)	0.78	0.22

Datos expresados:

n (proporción de Individuos con un determinado genotipo del total de la población analizada).

Frecuencia alélica= (Alelos homocigotos x 2 + Alelos heterocigotos)/Sujetos totales x 2.

11.2.4 Análisis de asociación de los polimorfismos de TPMT y MTHFR con las reacciones adversas

Se encontró que en ninguno de los casos, los polimorfismos genéticos de TPMT y MTHFR están asociados con el desarrollo de los diferentes tipos de toxicidad analizados en esta población (**Tablas 19, 20 y 21**).

Tabla 19. Toxicidad (Grado 0 vs. Grado 1-4 y Grado 0-1 vs. Grado 2-4) asociado a los genotipos de TPMT.

Polimorfismo (n)	Grado de toxicidad	Grado de toxicidad	OR (95 % CI)	p	Grado de toxicidad	Grado de toxicidad	OR (95 % CI)	p
	0 (n)	1-4 (n)			0-1 (n)	2-4 (n)		
TPMT *1,*2 and *3A								
Toxicidad hematológica								
TPMT*1/*1 (35)	16	19	Referencia		17	18	Referencia	
TPMT *1/*2 (1)	1	0	0.28 (0.01-7.39)	0.447	1	0	0.31 (0.01-8.26)	0.488
TPMT *1/*3A (3)	3	0	0.12 (0.005-2.5)	0.172	3	0	0.13 (0.006-2.8)	0.196
Toxicidad hepática								
TPMT*1/*1 (35)	15	20	Referencia		24	11	Referencia	
TPMT *1/*2 (1)	0	1	2.26 (0.08-59.55)	0.623	0	1	6.39 (0.24-169.2)	0.267
TPMT *1/*3A (3)	2	1	0.37 (0.03-4.53)	0.440	3	0	0.30 (0.01-6.39)	0.443
Toxicidad gastrointestinal								
TPMT*1/*1 (35)	31	4	Referencia		35	0	Referencia	
TPMT *1/*2 (1)	0	1	21.0 (0.73-598.3)	0.074	1	0	23.6 (0.33-1653)	0.144
TPMT *1/*3A (3)	3	0	1.00 (0.04-22.72)	1.000	3	0	10.14 (0.17-594)	0.264

El valor OR fue calculado al comparar la frecuencia del genotipo con el alelo mutado (heterocigotos u homocigotos) vs. los pacientes con genotipo wild-type como referencia

n: número de individuos.

Tabla 20. Toxicidad (Grado 0 vs. Grado 1-4 y Grado 0-1 vs. Grado 2-4) asociado a los genotipos de *MTHFR* C677T.

Polimorfismo (n)	Grado de toxicidad 0 (n)	Grado de toxicidad 1-4 (n)	OR (95 % CI)	p	Grado de toxicidad 0-1 (n)	Grado de toxicidad 2-4 (n)	OR (95 % CI)	p
<i>MTHFR</i> 677 C>T								
Toxicidad hematológica								
CC (14)	7	7	Referencia		8	6	Referencia	
CT (19)	7	12	1.71 (0.42-6.96)	0.451	8	11	1.83 (0.45-7.40)	0.394
TT (6)	5	1	0.20 (0.01-2.18)	0.186	5	1	0.26 (0.02-2.92)	0.279
CT+TT vs CC	12	13	1.08 (0.29-4.01)	0.904	13	12	1.23 (0.32-4.59)	0.757
Toxicidad hepática								
CC (14)	7	7	Referencia		9	5	Referencia	
CT (19)	8	11	1.37 (0.34-5.51)	0.653	13	6	0.83 (0.19-3.57)	0.803
TT (6)	2	4	2.00 (0.27-14.6)	0.495	5	1	0.36 (0.03-4.00)	0.405
CT+TT vs CC	10	15	1.50 (0.40-5.60)	0.546	18	7	0.70 (0.17-2.83)	0.617
Toxicidad gastrointestinal								
CC (14)	11	3	Referencia		14	0	Referencia	
CT (19)	18	1	0.20 (0.01-2.21)	0.190	19	0	0.74 (0.01-39.7)	0.884
TT (6)	5	1	0.73 (0.06-8.91)	0.807	6	0	2.23 (0.03-195)	0.696
CT+TT vs CC	23	2	0.31 (0.04-2.19)	0.245	25	0	0.56 (0.01-30.2)	0.780

El valor OR fue calculado al comparar la frecuencia del genotipo con el alelo mutado (heterocigotos u homocigotos) vs. los pacientes con genotipo wild-type como referencia.

n: número de individuos.

Tabla 21. Toxicidad (Grado 0 vs. Grado 1-4 y Grado 0-1 vs. Grado 2-4) asociado a los genotipos de *MTHFR* A1298C.

Polimorfismo (n)	Grado de toxicidad 0 (n)	Grado de toxicidad 1-4 (n)	OR (95 % CI)	p	Grado de toxicidad 0-1 (n)	Grado de toxicidad 2-4 (n)	OR (95 % CI)	p
<i>MTHFR</i> 1298 A>C								
Toxicidad hematológica								
AA (26)	15	11	Referencia		15	11	Referencia	
AC (9)	4	5	1.70 (0.36-7.85)	0.493	4	5	1.70 (0.36-7.85)	0.493
CC (4)	1	3	4.09 (0.37-44.7)	0.248	2	2	1.36 (0.16-11.2)	0.773
AC+CC vs AA	5	8	2.18 (0.55-8.51)	0.261	6	7	1.59 (0.41-6.07)	0.496
Toxicidad hepática								
AA (26)	10	16	Referencia		17	9	Referencia	
AC (9)	5	4	0.50 (0.10-2.31)	0.375	7	2	0.53 (0.09-3.15)	0.493
CC (4)	2	2	0.62 (0.07-5.17)	0.662	3	1	0.62 (0.05-6.96)	0.705
AC+CC vs AA	7	6	0.53 (0.13-2.05)	0.361	10	3	0.56 (0.12-2.59)	0.464
Toxicidad gastrointestinal								
AA (26)	23	3	Referencia		26	0	Referencia	
AC (9)	9	0	0.35 (0.01-7.51)	0.504	9	0	2.78 (0.05-150.7)	0.614
CC (4)	2	2	7.66 (0.76-76.4)	0.082	4	0	5.88 (0.10-336.4)	0.390
AC+CC vs AA	11	2	1.39 (0.20-9.58)	0.735	13	0	1.96 (0.03-104.4)	0.739

El valor OR fue calculado al comparar la frecuencia del genotipo con el alelo mutado (heterocigotos u homocigotos) vs. los pacientes con genotipo wild-type como referencia, n: número de individuos.

11.3 SUSCEPTIBILIDAD A LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA

11.3.1 Frecuencias Alélicas y Genotípicas de MTHFR

Las distribuciones genotípicas de los loci polimórficos de MTHFR (C677T y A1298C), y TPMT (*2 y *3A) no se desviaron del equilibrio de Hardy-Weinberg, excepto para el genotipo A1298C en el grupo con LLA. Las frecuencias genotípicas para el polimorfismo MTHFR A1298C se muestran en la **Tabla 22**, la frecuencia del genotipo CC (homocigoto mutado) fue estadísticamente significativa OR=6.48; 95% CI, 1.26–33.2; $p=0.025$), sugiriendo una asociación de esta mutación con LLA. Para el caso de MTHFR C677T las frecuencias genotípicas igualmente son mostradas en la **Tabla 22**, ninguno de los genotipos mostró diferencias significativas entre los grupos caso y control. Por lo que, esta variante de MTHFR no está asociada con efecto protector o riesgo a LLA en mexicanos.

Tabla 22. Frecuencias de los polimorfismos MTHFR C677T y A1298C en los individuos estudiados.

Genotipo	Pacientes con LLA No. (%)	Controles No. (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
<i>MTHFR C677T</i>				
CC	22 (31.4)	42 (27.6)	1.00 ^a	
CT	36 (51.4)	72 (47.4)	0.95 (0.50–1.83)	0.889
TT	12 (17.2)	38 (25.0)	0.60 (0.26–1.38)	0.231
CT+TT	48 (68.6)	110 (72.4)	0.83 (0.45–1.54)	0.561
C allele	0.57	0.51		
T allele	0.42	0.49		
<i>MTHFR A1298C</i>				
AA	50 (71.4)	108 (71.0)	1.00 ^a	
AC	14 (20.0)	42 (27.7)	0.72 (0.36–1.44)	0.351
CC	6 (8.60)	2 (1.30)	6.48 (1.26–33.2)	0.025
AC+CC	20 (28.6)	44 (29.0)	0.98 (0.53–1.84)	0.954
A allele	0.81	0.84		
C Allele	0.19	0.16		

Abreviaciones:

OR, odds ratio

CI, Intervalo de confianza

^aGrupo de referencia

Frecuencias alélicas= (Alelos homocigotos x 2 +Alelos heterocigotos)/total individuos x 2

11.3.2. Análisis combinado de MTHFR C677T y A1298C

Se desarrolló un análisis más detallado para investigar el efecto combinado de MTHFR C677T y A1298C (**Tabla 23**). Este análisis reveló que los genotipos combinados 677CC+1298AC dan como resultado un haplotipo protector a LLA (OR=0.23; 95% CI, 0.06–0.82, $p=0.023$ correspondiente a una reducción del riesgo de 4.3-veces con 95% CI, 1.2–16.7).

Tabla 23. Frecuencias de los genotipos combinados de *MTHFR C677T* y *A1298C* en los individuos estudiados.

<i>MTHFR</i> C677T/A1298C	Pacientes con LLA No. (%)	Controles No. (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
677 CC/1298 AA	70 (100.0)	152 (100.0)		
677 CC/1298 AC	13 (18.6)	17 (11.2)	1.00 ^a	
677 CC/1298 CC	4 (5.71)	23 (15.1)	0.23 (0.06–0.82)	0.023
677 CT/1298 AA	5 (7.14)	2 (1.30)	3.27 (0.54–19.6)	0.195
677 CT/1298 AC	25 (35.7)	54 (35.6)	0.61 (0.26–1.44)	0.254
677 CT/1298 CC	10 (14.3)	18 (11.8)	0.73 (0.25–2.09)	0.553
677 TT/1298 AA	1 (1.42)	[†] 0 (0.0)	3.88 (0.14–103.1)	0.416
677 TT/1298 AC	12 (17.1)	37 (24.4)	0.42 (0.16–1.12)	0.083
677 TT/1298 CC	^b 0 (0.0)	1 (0.60)	0.43 (0.01–11.4)	0.615

Abreviaciones:

OR, odds ratio

CI, Intervalo de confianza

^aGrupo de referencia

^bDonde los ceros causan problemas en el cálculo de odds ratio o su error estándar, 0.5 es añadido a todas las celdas (a, b, c, y d) [Clayton, 2001; Deeks, 2015; Pagano, 2000]

11.3.3 Frecuencias Alélicas y Genotípicas de TPMT

Nuestros datos no revelaron asociación significativa para los polimorfismos de TPMT *2 y *3A con LLA infantil en niños mexicanos (**Tabla 24**).

Tabla 24. Frecuencias de los polimorfismos TPMT *2 y *3A (460G>A y 719 A>G) en los individuos estudiados.

Genotipo	Pacientes con LLA No. (%)	Controles No. (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
TPMT				
*1/*1	69	149	1.00 ^a	
*1/*2	1	3	0.72 (0.07–7.05)	0.777
*2/*2	^b 0	^b 0	2.15 (0.04–109.5)	0.702
*1	0.99	0.99		
*2	0.01	0.01		
*1/*1	65	138	1.00 ^a	
*1/*3A	5	13	0.82 (0.28–2.39)	0.711
*3A/*3A	^b 0	1	0.70 (0.02–17.5)	0.831
*1	0.96	0.95		
*3A	0.04	0.05		

Abreviaciones:

OR, odds ratio, CI, Intervalo de confianza

^aGrupo de referencia

^bDonde los ceros causan problemas en el cálculo de odds ratio o su error estándar, 0.5 es añadido a todas las celdas (a, b, c, y d) [Clayton, 2001; Deeks, 2015; Pagano, 2000]

XII. DISCUSIÓN

12.1 FARMACOCINÉTICA DE 6-MERCAPTOPURINA

Un método preciso fue desarrollado y validado para determinar la concentración de 6-MP en plasma humano. Este fue un procedimiento específico, simple, sensible y preciso, y por lo tanto, una herramienta adecuada y valiosa en la farmacocinética clínica de 6-MP.

Por otra parte, los métodos de dosificación empíricos actuales resultan en una variabilidad inter-individual alta del fármaco 6-MP y de sus metabolitos activos (Sahasranaman *et al*, 2008; Schmiegelow *et al*, 1997). En el presente estudio farmacocinético desarrollado en niños dosificados con 6-MP en forma oral, la única covariable influyente en la variabilidad inter-individual de los pacientes fue la edad, su inclusión en el modelo resultó en una significancia estadística ($p < 0.001$); la edad, como expresión del estadio madurativo, afecta la farmacocinética de 6-Mercaptopurina y es de particular relevancia en los pacientes pediátricos debido a los cambios producidos durante esta etapa en la función de órganos y la composición corporal afectando la disposición de este medicamento (Grossman *et al*, 2008).

La edad es un factor específico influyente en la variabilidad de los parámetros farmacocinéticos constante de absorción (K_a) y volumen de distribución (V) de 6-MP, no así en la constante de eliminación del medicamento (K); Por otra parte, el sexo y los polimorfismos de *TPMT* y *MTHFR* no mostraron significancia estadística en el modelo poblacional final, reflejando una nula correlación de estas covariables con la farmacocinética de este medicamento; sin embargo es necesaria la confirmación de estos resultados con estudios prospectivos más grandes que tienen el potencial de encontrar y cuantificar más variables.

Existen pocos estudios que han realizado un análisis farmacocinético de este medicamento o estudios acerca de la disposición de 6-MP concerniente a las concentraciones plasmáticas del fármaco o de sus metabolitos activos; y que a su vez, sugieran que la edad es una covariable significativa en la variabilidad inter-individual de este fármaco, sin embargo, se ha encontrado que el sexo es un factor clave en el metabolismo de 6-MP, al obtener resultados en los que a los niños con

diagnóstico de LLA al ser prescrita una dosis del fármaco igual que a las niñas, siguiendo los criterios de dosificación del protocolo terapéutico, éstos tienden a tolerar mejor la terapia sin interrupciones, o abandono del tratamiento; por lo que, los investigadores sugieren que existe posiblemente una diferencia entre sexos en la disposición de este medicamento, sugiriendo que la farmacocinética de este fármaco está ligada por una parte al sexo, y por otro lado, como explicación posiblemente consecuente a defectos genéticos entre niños y niñas en la enzima Hipoxantina Fosforibosil Transferasa (*HPGRT*- La enzima principal de convertir el fármaco inactivo a sus metabolitos activos, quiénes tienen un efecto citotóxico) proponiendo que probablemente las mutaciones en dicha enzima se encuentren a su vez ligadas al sexo (Hale JP & Lilleyman JS, 1991).

En este mismo contexto, por otra parte, existe un reporte previo donde se estudió a las enzimas del citocromo P450, la debrisoquina-4-hidroxilasa (*CYP2D6*) más específicamente, y se concluyó que ésta no se encuentra asociada a la variabilidad interindividual en la farmacocinética de 6-MP (Lafolie P *et al*, 1989).

Otro hallazgo en población europea (Adam de Beaumais *et al*, 2011) refiere que existe una variabilidad inter-individual en las concentraciones de los metabolitos activos de 6-MP en muestras eritrocitarias de niños con LLA, atribuyen la variabilidad en las concentraciones de los metabolitos de 6-Tioguanina (6-TG) a la edad y al genotipo de *TPMT*, y en cuanto a la variabilidad de los metabolitos de 6-Metil Mercaptopurina (6-mMP) a los genotipos de *TPMT* e *ITPA* 94 C>A. Como refieren los autores antes mencionados (Adam de Beaumais *et al*, 2011), el efecto de la edad interviene en la variabilidad de las concentraciones de los metabolitos de 6-TG, este estudio por otra parte, confirma el efecto de la edad en la variabilidad de la farmacocinética del pro-fármaco 6-MP (en los parámetros K_a y V) ($p < 0.001$), esto puede explicarse primeramente en que para el caso del mecanismo de absorción del medicamento, es conocido que los fármacos suelen absorberse mucho más lentamente en los neonatos y lactantes en comparación con los niños de mayor edad y los adultos; en consecuencia, el tiempo hasta alcanzar las concentraciones plasmáticas máximas son más prolongados a menor edad.

Un estudio previo (Grossman *et al*, 2008) destacó que en niños con enfermedad inflamatoria intestinal quienes ingieren 6-MP dentro de la terapia, era notorio que en los pacientes de 6 años o menos, las dosis requeridas eran más altas que en aquellos niños con una edad mayor, por lo que fue evidente para lograr una mejoría clínica que dichos pacientes tuvieran dosis mayores. Los autores sugirieron que esto podría estar relacionado, ya sea a una absorción reducida, o bien a las diferencias características de la edad en el metabolismo de 6-MP con una disminución en la formación de los nucleótidos activos de 6-TG.

Nuestro estudio concuerda con los anteriores hallazgos, al exponer que la edad es una covariable importante dentro de la terapia de 6-MP, es entonces cuestionable de acuerdo al estudio antes referido (Grossman *et al*, 2008) y al estudio de Adam *et al* (2011) si la dosis de 6-MP debe ser aumentada en los niños más pequeños para obtener concentraciones de los metabolitos de 6-TG similares a los pacientes con mayor edad. Por lo que, al confirmarse en este estudio la importancia de la edad en la variabilidad inter-individual del fármaco se sugiere que la evaluación de la eficacia de 6-MP podría incluir medidas de la incorporación de 6-TGN en el ADN o bien, estudios farmacocinéticos específicos para cada población [Schmiegelow *et al* 1997, Hedeland *et al*, 2009).

Por otra parte, al haber encontrado que la edad influencia la variabilidad en el Vd de 6-MP, y, al tener conocimiento que este parámetro farmacocinético permite saber la cantidad total aparente del fármaco que hay en el organismo y sus compartimentos, en relación con su concentración sanguínea, es notorio que las cantidades absolutas y la distribución del agua corporal y de la grasa dependen de la edad del niño y son muy características. Estos cambios en el tamaño de los compartimentos del agua corporal y en su distribución justifican las diferencias observadas en el Vd (**Figura 31- Anexos**) en los niños de menor edad (4 años, **Tabla 14**, ID paciente 8 y 9) que en los niños de mayor edad (15 y 16 años **Tabla 14**, ID paciente 7 y 10) en nuestra población.

A nuestro conocimiento no existen reportes en seres humanos hasta el momento, que evidencien que el Vd de 6-MP se correlacione con la edad, sin embargo existe un estudio murino (Wierzba *et al*, 1984) donde se demostró que la farmacocinética

de 6-MP fue dependiente de la edad de las ratas, en quienes se observaron relaciones similares entre el aclaramiento corporal total y la edad de los animales; los autores mencionan que podría ser que los procesos de distribución de 6-MP se conectan tanto con el aumento del contenido de agua extracelular y las modificaciones en las proteínas vinculantes en las ratas jóvenes.

Debido a que la variabilidad-interindividual en los medicamentos antineoplásicos como 6-MP es claramente una de las razones por las que la quimioterapia falla en algunos pacientes y tiene éxito en otros, algunos investigadores sugieren que la administración rectal de 6-MP podría ser más efectiva que la dosificación empírica oral para el tratamiento en niños con LLA, especialmente en pacientes con náusea/vómito prolongados (Kato *et al*, 1992).

, debido esto, la evaluación cuantitativa de los parámetros farmacocinéticos de 6-MP parece ser factor potencialmente importante en el pronóstico de la terapia del cáncer (NCI v 2.0) con el fin de una dosificación segura del fármaco sin posteriores efectos colaterales o bien, la muerte del paciente.

12.2 REACCIONES ADVERSAS

Los datos en este estudio no revelaron asociación estadísticamente significativa de los polimorfismos de TPMT/MTHFR y las reacciones adversas debidas al fármaco 6-mercaptopurina. No fue posible el análisis de asociación de las mutaciones en ambos genes debido a la baja frecuencia de TPMT, sin embargo, las frecuencias alélicas y genotípicas de TPMT y MTHFR son consistentes a las reportadas para nuestro país (Ruiz Argüellez *et al*, 2007; Moreno Guerrero *et al*, 2013; Gervasini *et al* 2013; Aguirre Rodriguez *et al*, 2008).

Los estudios desarrollados en diferentes poblaciones acerca de los SNP's de TPMT y MTHFR referentes a toxicidad por diferentes fármacos antineoplásicos son escasos y altamente discordantes (Ruiz Argüelles *et al*, 2007; Shimasaki *et al*, 2008; Dorababu *et al*, 2012; Wan Rosalina *et al*, 2012; Tanaka *et al*, 2014).

Un reporte que analizó una población de 59 niños con LLA (Ma XL *et al*, 2012) concluye que las mutaciones en las regiones codificantes del gen *TPMT* no se

encuentran asociadas a la intolerancia a 6-MP, por lo que, nuestros resultados confirman y extienden estos hallazgos al integrar otras variantes alélicas de TPMT no estudiadas. Otro reporte sugiere que el polimorfismo ITPA 94C>A (y no los polimorfismos de TPMT) podría ayudar a reducir los efectos adversos de 6-MP al mínimo (Wan Rosalina et al, 2012).

Con respecto a los polimorfismos de MTHFR (C677T and A1298C), algunos estudios consideran que estas mutaciones se encuentran asociadas con toxicidad en otros fármacos antineoplásicos como el Metotrexate (Ruiz Argüelles et al, 2007; Tanaka et al, 2014), existe únicamente a nuestro conocimiento un estudio referente al fármaco 6-mercaptopurina (Shimasaki et al, 2008) donde se analizaron 20 niños con diagnóstico de LLA, destacando que el polimorfismo MTHFR 677 C>T es asociado con el riesgo a toxicidad mostrando en los pacientes pediátricos con genotipo homocigoto (T/T) un incremento en el número de interrupciones durante la quimioterapia de mantenimiento. Nuestros resultados difieren con el estudio antes referido, debido a la falta de asociación encontrada; es evidente la importancia racial en la variabilidad genética y por ende, en la respuesta a fármacos (Dorababu et al, 2012; .Yang et al, 2012).

Sin embargo, deben ser mencionadas algunas limitaciones en nuestro estudio: podemos citar que la muestra analizada es pequeña, considerando que: a) el error tipo I es producido debido a la cantidad insuficiente de individuos, es aconsejable incrementar el número de pacientes para confirmar estos resultados, b) los intervalos de confianza para analizar las combinaciones genotípicas son extensos, es de destacar que los valores marginales de OR 95% indican un incremento en el tamaño de la población estudiada, lo cual permitiría probablemente encontrar una asociación con estos genotipos estudiados.

Es importante considerar otros factores tales como: mutaciones en genes involucrados en el transporte del fármaco o en el mecanismo molecular de acción ya que podría haber una alteración en la concentración de los metabolitos activos o de la función molecular del medicamento y por ende, la eficacia y seguridad en la terapia farmacológica (Rocha et al, 2005; Paugh et al, 2011; Pinto et al, 2012). Por lo que no se descarta una asociación igualmente con los parámetros farmacocinéticos

de 6-MP y probablemente con los niveles de los metabolitos activos del fármaco. Una mejor comprensión de la disposición de este medicamento sería sumamente útil para mejorar el diseño en los regímenes de dosificación de 6-MP al reducir los efectos colaterales del medicamento.

12.3 SUSCEPTIBILIDAD A LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA

Se detectó una asociación significativa entre el genotipo MTHFR 1298CC y el riesgo a LLA (OR = 6.48; IC del 95%, 1.26-33.2, $p=0.025$). Además, la prueba de Hardy Weinberg mostró un marcado equilibrio en la muestra de los controles; sin embargo, una desviación del equilibrio genético de Hardy-Weinberg surgió del polimorfismo (MTHFR A1298C) en el grupo de casos, lo que sugiere una asociación real entre su genotipo CC y LLA (Lee, 2003; Nielsen et al, 1998).

Por otra parte, este estudio encontró un efecto protector del genotipo combinado de MTHFR 677CC+1298AC. Estos hallazgos sugieren que los niños con el genotipo silvestre para la variante C677T en combinación con el genotipo heterocigoto para el polimorfismo A1298C parecen tener una disminución en la susceptibilidad a LLA (OR=0.23; 95% CI, 0.06–0.82, $p=0.023$); mientras que los genotipos MTHFR 677CT, MTHFR 677TT y TPMT*2 y *3A no influyeron significativamente en el riesgo a LLA en pacientes mexicanos.

Concerniente a la asociación genética con LLA, nuestros resultados están en concordancia con los de Li et al. (2014) donde se llegó a la conclusión de que el polimorfismo A1298C (AC genotipo heterocigoto) representa un factor de alto riesgo a LLA en la población china (OR, 2.08; 95% CI, 1.13-3.84). Además nuestros resultados están en concordancia con los de Zanrosso et al. (2006) quienes estudiaron una población de niños brasileños, llegando a la conclusión de que el alelo 1298C (CC genotipo homocigoto) es también un factor de riesgo para LLA (OR, 2.01; 95% CI, 1.01-3.99). Con respecto a este estudio, es evidente que en la población mexicana la frecuencia de este polimorfismo es mayor que los reportados previamente en otras poblaciones (OR = 6.48; IC del 95%, 1.26-33.2, $p=0.025$). Por el contrario, otros estudios no lograron demostrar esta asociación mencionada en diferentes poblaciones de estudio (Azhar et al, 2012;.Thirumaran et al, 2005;

Schnakenberg et al, 2005; Oliveira et al, 2005). Por lo tanto consideramos varias razones para estos resultados inconsistentes, en primer lugar, la distribución genética de MTHFR en diferentes poblaciones; segundo, los niveles de folato asociados a la ingesta de alimentos y hábitos nutricionales; y en tercer lugar, la posibilidad que la susceptibilidad a LLA podría estar regulada por otros genes tales como TPMT, RFC1 y NNMT (Ouerhani et al, 2013; de Jonge et al, 2009; Robien et al, 2003).

Es notable que los niños con el genotipo homocigoto CC para el polimorfismo MTHFR A1298C tienen riesgo a leucemia, pero los niños que presentan la combinación MTHFR 677 CC (salvaje) y MTHFR 1298 CT (heterocigoto) pueden tener un efecto protector a leucemia (OR=0.23; 95% CI, 0.06–0.82, p=0.023).

Teniendo en cuenta esta notable diferencia, es posible que los individuos homocigotos para las variantes de MTHFR pudieran tener una distribución intracelular insuficiente de ácido fólico, necesario para mantener la estructura tridimensional de la proteína. Como resultado, la producción de una metilación de ADN aberrante y la síntesis de nucleótidos incrementaría el riesgo al desarrollo de LLA (Bailey et al, 2003; Guenter et al, 1999). Por lo tanto, los bajos niveles intracelulares de los productos del folato por las variantes genéticas de MTHFR representa un tema importante para la investigación futura en esta población, debido a los reportes del escaso consumo de vegetales de hoja verde ricos en ácido fólico en mexicanos (Solís et al, 2008; Suarez et al, 2000). En consecuencia, el metabolismo del folato está involucrado en la carcinogénesis debido a su implicación en la metilación de ADN por el 5-metil-tetrahidrofolato (5-metil-THF). MTHFR es responsable de la reacción de reducción de 5-10 metilen-tetrahidrofolato (5-10-metilen-THF) a 5-metil-tetrahidrofolato (5-metil-THF) [28]; la forma predominante de folato en la circulación sanguínea (Skibola et al, 1999). Así, Bagley & Selhub (1998) examinaron el efecto del genotipo MTHFR C677T sobre el contenido del folato en eritrocitos y la forma relativa de la distribución de los grupos 677TT (homocigoto) y 677CC (silvestre) en los individuos mediante el método de HPLC. Ellos encontraron que el contenido de folato en los glóbulos rojos de los sujetos con genotipo silvestre (CC) estaba constituido exclusivamente por 5-metil-poliglutamatos; pero en el caso

de los individuos homocigotos (TT) fueron poliglutamatos-THF-formilados. Por lo tanto, este genotipo se asocia con una distribución incorrecta del folato en eritrocitos y, en consecuencia, la producción de 5-metil-THF origina una variación de un carbono en las estructuras celulares del folato. En consecuencia, una explicación plausible para nuestros resultados es que los individuos con el genotipo wild-type de MTHFR 677 podrían tener un efecto preciso sobre la síntesis de nucleótidos mediante el aumento de la disponibilidad de 5-10 metilen-tetrahidrofolato necesaria para la síntesis de ADN normal y la división celular.

Además, el polimorfismo A1298C está localizado en la región que codifica el dominio catalítico N-terminal, por lo tanto los individuos con el genotipo homocigoto para esta variante, no tienen las propiedades distinguibles del genotipo silvestre (Weisberg et al, 2001).

Por otra parte, la variante de MTHFR C677T está situada en la región que codifica el dominio regulador SAM C-terminal de la enzima. Se ha sugerido que MTHFR 1298C podría actuar a través de una vía diferente a la de MTHFR C677T (Wiemels et al, 2001). Sobre la base de esta hipótesis, Krajnovic et al (2004) proponen que la variante A1298C tiende a acumular 5-10-metil-THF y C677T a acumular 5-10-metilen-THF. La acumulación de 5-10 metilen-THF podría resultar en un equilibrio de 5-10 metil-THF/5-10-metilen-THF. Respecto a esto, estamos de acuerdo y sugerimos que la cantidad de 5-10 metil-THF, 5-10-metilen-THF o 5-10 metil-THF/5-10-metilen-THF podría variar dependiendo de cada genotipo en las variantes alélicas independientes o combinadas. De acuerdo con esto, se encontró que los genotipos combinados de MTHFR 677CC+1298AC tienen un efecto protector a leucemia (OR=0.23; 95% CI, 0.06–0.82, p=0.023 correspondiente a una reducción del riesgo de 4.3-veces con 95% CI, 1.2–16.7). Nuestros resultados confirman y amplían los hallazgos previos de Krajnovic et al. (2004) quienes reportan que los genotipos combinados MTHFR 677TT+1298AA y 677CC+1298CC se asociaron con un menor riesgo de desarrollar LLA. Así, se observa en sus resultados, que el efecto protector ocurre únicamente cuando la combinación de genotipos integra el homocigoto/silvestre o silvestre/homocigoto en cada caso, siendo los valores de OR (OR=0.4; 95% CI, 0.2–0.9; and OR=0.3; 95% CI, 0.1–0.6; correspondiente a una

reducción del riesgo de 2.5- and 3.3-fold veces, respectivamente), más bajo que el reportado en este estudio (4.3 veces). Se puede decir que la combinación de genotipo silvestre/heterocigoto (MTHFR 677CC+1298AC) reportada en este estudio confiere un efecto protector mayor a LLA que en el caso de los genotipos homocigoto/silvestre (MTHFR 677TT+1298AA) o silvestre/homocigoto (MTHFR 677CC+1298CC) reportados en el estudio de Krajinovic et al. (2004). Puede haber dos razones para este resultado, en primer lugar, es posible que la cantidad de folato en esta combinación de genotipos sea variable, pero suficiente para producir una síntesis correcta de timidilato lo que disminuye la incorporación de uracilo (Blount et al, 1997; Jacob et al, 1998; Fenech et al, 1998; Pogribny et al, 1997); y en segundo lugar, la variabilidad genética en diferentes poblaciones (Bailey et al, 1999; Guenther et al, 1999).

Con respecto a las variantes de TPMT (*2 y *3A) se encontró que estas mutaciones no están implicadas en la susceptibilidad genética a leucemia; estos datos confirman y amplían los hallazgos anteriores de Ouerhani et al. (2013).

Llama la atención que se encontró un efecto nulo para el efecto sinérgico de ambos genes estudiados; sin embargo investigaciones futuras en otras poblaciones son necesarias para confirmar nuestros resultados. Más importante aún hasta la fecha no existen reportes enfocados al efecto sinérgico de ambos genes y el riesgo a LLA. Existe solamente un reporte donde el genotipo MTHFR 1298AC (heterocigoto) parece reducir el riesgo a LLA en hombres y mujeres chinos, mientras que los genotipos MTHFR 677TT y TSR2R3R/2R2R aumenta el riesgo a LLA en los individuos chinos con baja ingesta de folato (Liu et al, 2015). También hay otro estudio que muestra la falta de asociación de ambos genes y el riesgo para el síndrome de obstrucción sinusoidal (SOS) en los pacientes con LLA con terapia de exposición a Tioguanina (Wray et al, 2014). En referencia a los factores dietéticos y ambientales, la baja ingesta de folato podría modificar el riesgo a LLA (Guenther et al, 1999; Pejchal et al, 2006; Cuevas et al, 2012; Liu et al, 2015), y la coexistencia de alelos 677TT y 1298CC puede elevar el riesgo de toxicidad por el tratamiento con Metotrexate en pacientes pediátricos con LLA (Kaluzna et al, 2015). El estudio y la comprensión de la combinación de factores genéticos y ambientales involucrados en

la actividad de la enzima dependiente de folato es bastante prometedor para el tratamiento de los pacientes con LLA infantil.

XIII. CONCLUSIONES

La edad es la única covariable interviniente asociada a la variabilidad en los parámetros farmacocinéticos del fármaco 6-MP, no así los polimorfismos de TPMT y MTHFR. El estudio y comprensión del mayor número de covariables involucradas en la farmacocinética de 6-MP y el desarrollo de modelajes farmacocinéticos poblacionales, resultan prometedores para la terapia de LLA infantil.

Las variantes alélicas analizadas de ambos genes (*TPMT* y *MTHFR*) no están asociadas con las reacciones adversas en nuestra población, es importante considerar otros factores tales como: mutaciones en genes involucrados en el transporte del fármaco o en el mecanismo molecular de acción ya que podría haber una alteración en la concentración de los metabolitos activos o de la función molecular del medicamento y por ende, efectos colaterales en los pacientes que conduzcan al fracaso terapéutico.

El genotipo MTHFR 1298CC está asociado con la susceptibilidad a leucemia linfoblástica aguda infantil, y al menos en mexicanos podría representar un marcador genético en los pacientes. Por otro lado, el haplotipo MTHFR 677CC+1298AC confiere un efecto protector a LLA.

XIV. BIBLIOGRAFÍA

Adam de Beaumais T, Fakhoury M, Medard Y, Azougagh S, Zhang D, Yakouben K, Jacqz-Aigrain E. Determinants of mercaptopurine toxicity in paediatric acute lymphoblastic leukemia maintenance therapy. *Br J Clin Pharmacol*. 2011;71:575-84.

Aguirre-Rodríguez AA, Martínez-de Villarreal LE, Velazco-Campos Mdel R, Sampallo-Hernández E, Esmer-Sánchez Mdel C. Prevalence of polymorphism in the MTHFR gene in a population sample from Nuevo León, México. *Salud Pública Mex* 2008; 50(1):5-7.

Al Hadithy A, de Boer N, Derijks L, Escher J, Mulder C, Brouwers J. Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations. *Dig Liver Dis* 2005;37:282-297.

Anstey A, Lennard L, Mayou SC, Kirby JD. Pancytopenia related to azathioprine an enzyme deficiency caused by a common genetic polymorphism: a review. *J R Soc Med* 1992; 85: 752-6.

Arenas M, Simpson G, Lewis CM, Shobowale-Bakre el-M, Escuredo E, Fairbanks LD, *et al*. Genetic variation in the MTHFR gene influences thiopurine methyltransferase activity. *Clin Chem*. 2005;51:2371-4.

Armstrong VW, Shipkova M, von Ahsen N, Oellerich M. Analytic aspects of monitoring therapy with thiopurine medications. *Ther Drug Monitor* 2004; 26 (2):220-226.

Azhar MR, Rahimi Z, Vaisi-Raygani A, Akramipour R, Madani H, Rahimi Z, Parsian A. Lack of association between MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in the Kurdish population from Western Iran. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012;16:198–202.

Bagley, PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of non-methylated tetrahydrofolate in red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 95:13217–1322

Bailey LB, Gregory JF 3rd. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr* 1999;129:919-22.

Barabino A, Torrente F, Ventura A, Cucchiara S, Castro M, Barbera C. "Azathioprine in paediatric inflammatory bowel disease: an Italian multicentre survey." *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:25-30.

Barbosa Cynara Gomes, Souza Claudio Lima, Moura Neto José Pereira de, Arruda Maria da Glória Bomfim, Barreto José Henrique, Reis Mitermayer Galvão et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in myeloid leukemia patients from Northeastern Brazil. *Genet Mol Biol* 2008; 31:29-32.

Barry, Leonard (1998). *Leukemia: A Research Report*. DIANE Publishing. p.14.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol* 1981;4:553-561.

Black AJ, McLeod HL, Capell HA, Powrie RH, Matowe LK, Pritchard SC, et al. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. *Ann Intern Med* 1998;129:716-718.

Bloomfeld RS, Onken JE. Mercaptopurine metabolite results in clinical gastroenterology practice. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 69-73.

Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3290-5.

Botto LD. 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies. *AhuGE Review. Am J Epidemiol* 2000; 151: 862-77.

Brunning RD, Borowitz M, Matutes E, Head D, Flandrin G, Swerdlow SH, Bennett JM. (2001) Chapter 5: Precursor B-Cell and T-Cell Neoplasms. En: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds.): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press: Lyon. p 109-17

Burchenal JH, Murphy ML, Ellison RR, Sykes MP, Tan TC, Leone LA, et al. Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment of leukemia and allied diseases. *Blood*. 1953;8:965-987.

Chan G, Erdmann G, Gruber S, Matas A, Canafax D. Azathioprine metabolism: pharmacokinetics of 6-mercaptopurine, 6-thiouric acid and 6-thioguanine nucleotides in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol* 1990;30:358-363.

Chan KW. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Probl Pediatr; Health Care* 2002;32:40-9.

Christensen KE, Mikael LG, Leung KY, Lévesque N, Deng L, Wu Q, Malysheva OV *et al*. High folic acid consumption leads to pseudo-MTHFR deficiency, altered lipid metabolism, and liver injury in mice. *Am J Clin Nutr* 2015; 101:646-58.

Clayton D. Population association. Balding DJ, Bishop M, Cannings C, editors. *Handbook of statistical genetics*. West Sussex: Wiley 2001.

Colombel J, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre J, Bonaz B, et al. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology* 2000;118:1025-1030.

Cuffari C, Hunt S, Bayless T. Utilisation of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimise azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Br Med J* 2001;48:642-646.

Cuffari C, Theoret Y, Latour S, Seidman G. 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut* 1996 Sep;39:401-406.

Davalos RIP, Olivares P, Castillo MT, Cantú JM, Ibarra B, Moran MC, et al. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann Genet* 2002; 43: 89–92.

Deeks J, Higgins PT Statistical algorithms in Review Manager 5. (2010). Available at: <http://ims.cochrane.org/revman/documentation/Statistical-methods-in-RevMan-5.pdf>, accessed January 10, 2015.

de Jonge R, Tissing WJ, Hooijberg JH, Jansen G, Kaspers GJ, Lindemans J, Peters GJ, Pieters R. Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009; 113:2284–2289.

Delyon B, Lavielle M, Moulines E. Convergence of a stochastic approximation version of the EM procedure. *Ann Stat.* 1999; 27:94–128.

Derijks LJ, Gilissen LP, Engels LG, Bos LP, Bus PJ, Lohman JJ, et al. Pharmacokinetics of 6-mercaptopurine in patients with inflammatory bowel disease: implications for therapy. *Ther Drug Monit.* 2004;26:311-8.

Dervieux T and Boulieu R. Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC. *Clin Chem.*1998;44:551-5.

Dorababu P, Naushad SM, Linga VG, Gundeti S, Nagesh N, Kutala VK, Reddanna P, Digumarti R. Genetic variants of thiopurine and folate metabolic pathways determine 6-MP-mediated hematological toxicity in childhood ALL. *Pharmacogenomics* 2012; 13:1001-

Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, et al. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 118: 705-13.

Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, et al. 6-MP metabolite efficacy and safety in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:111-115.

Elion GB. The George Hitchings and Gertrude Elion Lecture. The pharmacology of azathioprine. *Ann N Y Acad Sci* 1993;685:400-407.

Elion GB. The purine path to chemotherapy. *Science* 1989 Apr 7;244:41-47.

Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester RF and Wolff JA. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist 4-aminopteroylglutamic acid (aminopterin). *N Engl J Med.* 1948; 238:787–793.

Fakhoury M, Andreu-Gallien J, Mahr A, Medard Y, Azougagh S, Vilmer E, et al. Should TPMT genotype and activity be used to monitor 6-mercaptopurine treatment in children with acute lymphoblastic leukaemia? *J Clin Pharm Ther.* 2007;32:633-9.

Farfan MJ, Salas C, Canales C, Silva F, Villarroel M, Kopp K, et al. Prevalence of TPMT and ITPA gene polymorphisms and effect on mercaptopurine dosage in Chilean children with acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer*. 2014;14:299.

Fenech MF, Dreosti IE, Rinaldi JR. Folate, vitamin B12, homocysteine status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men. *Carcinogenesis* 1997;18:1329-36.

Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut* 2002; 50: 485-489.

Frost P, Blom H, Milos R. Identification of a candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111–113.

Gaynon PS, Angiolillo AL, Carroll WL, Nachman JB, Trigg ME, Sather HN, et al. Long-term results of the children's cancer group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1983-2002: a Children's Oncology Group Report. *Leukemia*. 2010; 24:285–297.

Garat A, Cauffiez C, Renault N, Lo-Guidice JM, Allorge D, Chevalier D, et al. Characterisation of novel defective thiopurine S-methyltransferase allelic variants. *Biochem Pharmacol* 2008; 76 : 404-15.

George J, Present DH, Pou R, Bodian C, Rubin PH. The long-term outcome of ulcerative colitis treated with 6-mercaptopurine. *Am J Gastroenterol* 1996;91:1711-1714.

Gervasini G, Vagace JM. Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in Genetics*, 2013; 3, 249. doi:10.3389/fgene.2012.00249

Gisbert JP, Gomollon F, Mate J, Pajares JM. Terapia individualizada con azatioprina o 6-mercaptopurina mediante monitorización de la actividad de la tiopurina metiltransferasa (TPMT). *Rev Clin Esp* 2002; 202: 555-62.

González-Herrera L, García-Escalante G, Castillo-Zapata I, Canto-Herrera J, Pinto-Escalante D, Díaz-Rubio F, et al. Frequency of thermolabile variant defects in the State of Yucatan, México. *Clin Genet* 2002; 62: 394-8.

Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994;7:195-200.

Grossman AB, Noble AJ, Mamula P, Baldassano RN. Increased dosing requirements for 6-mercaptopurine and azathioprine in inflammatory bowel disease patients six years and younger. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 750-5.

Guéant-Rodriguez RM, Guéant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 6777T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 701-7.

Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol* 1999; 6:359-65.

Guidance for the Industry: Bioanalytical Method Validation. Washington, DC: US Department of health and Human Services, FDA, CDER and CVM; 2001.

Hale JP, Lilleyman JS. Importance of 6-mercaptopurine dose in lymphoblastic leukaemia. *Archives of Disease in Childhood*. 1991;66:462-466.

Hayder S, Lafolie P, Bjork O, Peterson C. 6-mercaptopurine plasma levels in children with acute lymphoblastic leukemia: relation to relapse risk and myelotoxicity. *Ther Drug Monit.* 1989;11:617–622.

Hedeland RL, Hvidt K, Nersting J, Rosthøj S, Dalhoff K, Lausen B, Schmiegelow K. DNA incorporation of 6-thioguanine nucleotides during maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukaemia and non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 66: 485–91.

Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC, James SJ, Pogribny IP, Miller BJ, Henning SM, et al. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *J Nutr* 1998;128:1204-12.

Jacqz-Aigrain E, Bessa E, Medard Y, Mircheva Y, Vilmer E. Thiopurine methyltransferase activity in a French population: h.p.l.c. assay conditions and effects of drugs and inhibitors. *Br J Clin Pharmacol* 1994; 38:1-8.

Jayachandran D, Rundell AE, Hannemann RE, Vik TA, Ramkrishna D. Optimal chemotherapy for leukemia: a model-based strategy for individualized treatment. *PLoS One.* 2014;9(10):e109623.

Jonsson EN, Karlsson MO. Automated covariate model building within NONMEM. *Pharm Res.* 1998; 15:1463–1468.

Karas-Kuzelicki, N., Jazbec, J., Milek, M., & Mlinaric-Rascan, I. Heterozygosity at the TPMT gene locus, augmented by mutated MTHFR gene, predisposes to 6-MP related toxicities in childhood ALL patients. *Leukemia* 2008:1476-5551

Kato Y, Matsushita T, Uchida H, Egi S, Yokoyama T, Mohri K. Rectal bioavailability of 6-mercaptopurine in children with acute lymphoblastic leukaemia: partial avoidance of "first-pass" metabolism. *Eur J Clin Pharmacol.* 1992;42:619-22.

Kham SK, Soh CK, Aw DC, Yeoh AE. TPMT*26 (208F-->L), a novel mutation detected in a Chinese. *Br J Clin Pharmacol* 2009;68:120-123.

Kirschner BS. Safety of azathioprine and 6-mercaptopurine in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998;115:813-821.

Krajinovic M, Lamothe S, Labuda D, Lemieux-Blanchard E, Theoret Y, Moghrabi A, Sinnott D. Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;103:252-7.

Krynetski EY, Krynetskaia NF, Gallo AE, Murti KG, Evans WE. A novel protein complex distinct from mismatch repair binds thioguanylated DNA. *Mol Pharmacol* 2001;59:367-374.

Kuhn E, Lavielle M. Maximum likelihood estimation in nonlinear mixed effects models. *Comput Statist Data Anal.* 2005; 49:1020–1038.

Lafolie P, Björk O, Hayder S, Ahström L, Peterson C. Variability of 6-mercaptopurine pharmacokinetics during oral maintenance therapy of children with acute leukemia. *Med Oncol Tumor Pharmacother.* 1989;6:259-65.

Lamers CB, Griffioen G, van Hogezaand RA, Veenendaal RA. Azathioprine: an update on clinical efficacy and safety in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1999; 230: 111-5.

Lamm N, Maoz K, Bester AC, Im MM, Shewach DS, Karni R, *et al.* Folate levels modulate oncogene-induced replication stress and tumorigenicity. *EMBO Mol Med.* 2015;7:1138-52.

Lee D, Szumlanski C, Houtman J, Honchel R, Rojas K, Overhauser J, *et al.* Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Cloning of human liver cDNA and a processed pseudogene on human chromosome 18q21. 1. *Drug Metab Disposition* 1995;23:398-405.

Lee WC. Searching for disease-susceptibility loci by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium in a gene bank of affected individuals. *Am J Epidemiol* 2003; 158:397-400.

Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol* 1992;43:329-339.

Lennard L. Therapeutic drug monitoring of antimetabolic cytotoxic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 47: 131-43.

Lennard L. TPMT in the treatment of Crohn's disease with azathioprine. *Gut* 2002; 51: 143-146.

Li X, Liao Q, Zhang S, Chen M. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms with the susceptibility of childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL) in Chinese population. *Eur J Med Res.* 2014; 29:19-5.

Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504-1517

Ma XL, Li WJ, Zheng J, Wang B, Jin M, Zhang DW, Li ZG, Zhang YX. Thiopurine S-methyltransferase gene sequence analysis of ALL children severely intolerant to 6-mercaptopurine. *Chinese* 2012; 20:876-9.

Marathias V, Sawicki M, Bolton P. 6-Thioguanine alters the structure and stability of duplex DNA and inhibits quadruplex DNA formation. *Nucleic Acid Res* 1999;27:2860-2867.

Martinez F, Nos P, Pastor M, Garrigues V, Ponce J. Adverse effects of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2001; 93: 769-78.

Mawatari H, Unei K, Nishimura S, Sakura N, Ueda K. Comparative pharmacokinetics of oral 6-mercaptopurine and intravenous 6-mercaptopurine riboside in children. *Pediatr Int*. 2001;43(6):673-7.

Milek M, Murn J, Jaksic Z, Lukac Bajalo J, Jazbec J, Mlinaric Rascan I. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: genotype to phenotype correlation in the Slovenian population. *Pharmacology* 2006;77(3): 105–114.

Milek, M., Karas Kuzelicki, N., Smid, A., & Mlinaric-Rascan, I. S-adenosylmethionine regulates thiopurine methyltransferase activity and decreases 6-mercaptopurine cytotoxicity in MOLT lymphoblasts. *Biochem Pharmacol* 2009; 77:1845-1853.

Moreno-Guerrero SS, Ramírez-Pacheco A, Dorantes-Acosta EM, Medina-Sanson A. Analysis of genetic polymorphisms of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) in Mexican pediatric patients with cancer. *Rev Invest Clin* 2013; 65(2): 156-164.

Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, Henze G, Schrauder A, Gadner H, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia*. 2010;24:265–284.

Murray JE, Merrill JP, Harrison JH, Wilson RE, Dammin GJ. Prolonged survival of humankidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *N Engl J Med* 1963; 13: 1315-1323.

Mutchinick OM, López MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE, RYVEMCE collaborative Group. High prevalence of the thermolabile methylene-tetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol Genet Metab* 1999; 68: 461–7.

National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events, version 2.0 (CTCAE). Published April 30, 1999. Available at: http://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcv20_4-30-992.pdf

National Cancer Institute. Underlying mortality data provided by National Center for Health Statistics.(n.d).Retrieved November 09, 2015, from <http://www.cdc.gov/nchs/>.

Nguyen TV, Vu DH, Nguyen TM, Lachaux A, Bouliou R. Relationship between azathioprine dosage and thiopurine metabolites in pediatric IBD patients: identification of covariables using multilevel analysis. *Ther Drug Monit*. 2013;35:251-7.

Nielsen DM, Ehm MG, Weir BS. Detecting marker-disease association by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium at a marker locus. *Am J Hum Genet*. 1998; 63:1531-40.

Noble SL, Sherer E, Hannemann RE, Ramkrishna D, Vik T, Rundell AE. Using adaptive model predictive control to customize maintenance therapy chemotherapeutic dosing for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Theor Biol*. 2010;264:990-1002.

NOM-177-SSA1-1998. Tests and Procedures to Demonstrate Interchangeability Between Pharmaceutical Formulations (In Spanish). Mexican Health Ministry. Mexico (1998). Available at: (<http://www.ssa.gob.mx/unidades/cdi/nom/177ssa18.html> or <http://www.feum.org/legisla/NOM-177PruebInter7may99.pdf>)

Ogungbenro K, Aarons L; CRESim & Epi-CRESim Project Groups. Physiologically based pharmacokinetic model for 6-mercaptopurine: exploring the role of genetic polymorphism in TPMT enzyme activity. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;80:86-100.

Oliveira E, Alves S, Quental S, Ferreira F, Norton L, Costa V, Amorim A, et al. The MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia in Portugal. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005; 27:425-9.

Otterness D, Szumlanski C, Lennard L, et al. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62: 60-73.

Ouerhani S, Cherif N, Bahri I, Safra I, Menif S, Abbes S. Genetic polymorphisms of NQO1, CYP1A1 and TPMT and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in a Tunisian population. *Mol Biol Rep* 2013;40:1307–1314.

Pagano, M, Gauvreau, K (2000) Principles of Biostatistics. In: Duxbury Press. 2nd ed. Brooks/Cole; Belmont, CA; p 342-360, 366-372.

Paugh SW, Stocco G, McCorkle JR, Diouf B, Crews KR, Evans WE. Cancer pharmacogenomics. *Clin Pharmacol Ther* 2011;90:461–466.

Pértega Díaz S, Pita Fernández S. Calculo del tamaño muestral en estudios de casos y controles. *Cad Aten Primaria* 2002 9: 148-150.

Pinto N, Cohn SL and Dolan ME .Using germline genomics to individualize pediatric cancer treatments. *Clin CancerRes* 2012; 18:2791–800.

Pizzo PA, Poplack DG. Principles and practice of pediatric oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.

Pogribny IP, Muskhelishvili L, Miller BJ, James SJ. Presence and consequence of uracil in preneoplastic DNA from folate/methyl-deficient rats. *Carcinogenesis* 1997;18:2071–2076.

Potter JD. Development and the environment: clues to carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20:574-7.

Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. *Williams Hematology*, 6ta ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1141-61.

Ravindranath Y. Recent Advances in Pediatric acute Lymphoblastic and Myeloid Leukemia. *Curr Opin Oncol* 2003; 15: 23-35

Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL. A systematic Literature Review of the Clinical and Epidemiological Burden of Acute lymphoblastic Leukaemia (ALL). *Eur J Cancer Care* 2005; 14: 53-62

Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, et al. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 2001-8.

Reuther LO, Sonne J, Larsen N, Dahlerup JF, Thomsen OO, Schmiegelow K. Thiopurine methyltransferase genotype distribution in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 65-8.

Rivera GK, Pinkel D, Simone JV, Hancock ML and Crist WM. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. 30 years' experience at St. Jude Children's Research Hospital. *N Engl J Med.* 1993;329:1289–1295.

Roberts RL, Gearry RB, Bland MV, Sies CW, George PM, Burt M, et al. Trinucleotide repeat variants in the promoter of the thiopurine S-methyltransferase gene of patients exhibiting ultrahigh enzyme activity. *Pharmacogenet Genomics* 2008;18:434-438.

Robien K, Ulrich CM. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE minireview. *Am J Epidemiol.* 2003;157:571-582.

Rocha JC, Cheng C, Liu W, Kishi S, Das S, Cook EH, Sandlund JT, Rubnitz J, Ribeiro R, Campana D, Pui CH, Evans WE, Relling MV. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005; 105(12):4752-8.

Ross JA, Kasum CM, Davies SM, Jacobs DR, Folsom AR, Potter JD . «Diet and risk of leukemia in the Iowa Women's Health Study». *Cancer Epidemiol* 2002.; 11: 777–781.

Rossi AM, Bianchi M, Guarnieri C, Barale R, Pacifici GM. Genotype-phenotype correlation for thiopurine S-methyltransferase in healthy Italian subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2001; 57: 51-4.

Rubnitz JE, Pui CH. Recent Advances in the Treatment and Understanding of Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Cancer Treat Rev* 2003.; 29: 31-44

Ruiz-Argüelles GJ, Coconi-Linares LN, Garcés-Eisele J, Reyes-Núñez V. Methotrexate-induced mucositis in acute leukemia patients is not associated with the MTHFR 677T allele in Mexico. *Hematology* 2007;12(5):387-91

Sahasranaman S, Howard D, Roy S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol* 2008;64:753-767.

Salzer WL, Devidas M, Carroll WL, Winick N, Pullen J, Hunger SP, et al. Long-term results of the pediatric oncology group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1984-2001: a report from the children's oncology group. *Leukemia*. 2010;24:355–370

Scriver CR, Beaudet AL, William SS, Valle D. *The Metabolic & Molecular Bases Inherited Disease*. 8th Ed. McGraw–Hill; 2001, p. 3897–933.

Scheuermann TH, Keeler C, Hodsdon ME. Consequences of binding an S -adenosylmethionine analogue on the structure and dynamics of the thiopurine methyltransferase protein backbone. *Biochemistry* 2004; 43: 12198–12209.

Schmiegelow K, Glomstein A, Kristinsson J, Salmi T, Schrøder H, Björk O. Impact of morning versus evening schedule for oral methotrexate and 6-mercaptopurine on relapse risk for children with acute lymphoblastic leukemia. *Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO)*. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; 19: 102–9.

Schmiegelow K, Forestier E, Hellebostad M, Heyman M, Kristinsson J, Söderhäll S, et al. Long-term results of NOPHO ALL-92 and ALL-2000 studies of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2010;24:345–354.

Schnakenberg E, Mehles A, Cario G, Rehe K, Seidemann K, Schlegelberger B, Elsner HA et al. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and susceptibility to pediatric acute lymphoblastic leukemia in a German study population. *BMC Med Genet* 2005;6:23.

Schrapppe M, Nachman J, Hunger S, Schmiegelow K, Conter V, Masera G, et al. Educational symposium on long-term results of large prospective clinical trials for childhood acute lymphoblastic leukemia (1985-2000). *Leukemia*. 2010; 24:253–254.

Seidman EG. Clinical use and practical application of TPMT enzyme and 6-mercaptopurine metabolite monitoring in IBD. *Rev Gastroenterol Disord* 2003; 3 Suppl 1: S30-8.

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; 30:347-52.

Shuster JJ, Wacker P, Pullen J, Humbert J, Land VJ, Mahoney DH Jr, et al. Prognostic significance of sex in childhood Bprecursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1998;16:2854-2863.

Silva RM, Fontes AC, Silva KA, Sant'Ana TA, Ramos FJ, Marques-Salles Tde J, et al. Polymorphisms involved in folate metabolism pathways and the risk of the development of childhood acute leukemia. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2013;17:147-52.

SINAIS. Sistema Nacional de Información en Salud. Secretaría de Salud; 2008.
<http://www.salud.gob.mx/apps/htdocs/estadisticas/mortalidad/mortalidad.htm>

Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Raymond A and Gareth M (1999) Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96: 12810-12815.

Solis C, Veenema K, Ivanov AA, Tran S, Li R, Wang W, Moriarty DJ, et al. Folate intake at RDA levels is inadequate for Mexican American men with the methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype. *J Nutr*. 2008;138:67-72.

Stass, Sanford A.; Schumacher, Harold R.; Rock, William R. (2000). *Handbook of hematologic pathology*. New York, N.Y: Marcel Dekker. pp. 193–194

Stocco G, Martelossi S, Barabino A, Fontana M, Lionetti P, Decorti G, et al. TPMT genotype and the use of thiopurines in paediatric inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2005;37:940-945.

Suarez L, Hendricks KA, Cooper SP, Sweeney AM, Hardy RJ, Larsen RD. Neural tube defects among Mexican Americans living on the US-Mexico border: effects of folic acid and dietary folate. *Am J Epidemiol*. 2000;152:1017-23.

Tai HL, Fessing MY, Bonten EJ, Yanishevsky Y, d'Azzo A, Krynetski EY, et al. Enhanced proteasomal degradation of mutant human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) in mammalian cells: mechanism for TPMT protein deficiency inherited by TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B or TPMT*3C. *Pharmacogenetics* 1999;9:641-650.

Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevski Y, Evans WE. Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (*TPMT*) encoded by mutant alleles in humans (*TPMT*3A*, *TPMT*2*): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(12): 6444–6449.

Tanaka Y, Manabe A, Nakadate H, Kondoh K, Nakamura K, Koh K, Kikuchi A, Komiyama T. Methylenetetrahydrofolate reductase gene haplotypes affect toxicity during maintenance therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia in Japanese patients. 2014 May; 55:1126-31.

Tefferi A, Killmann NM. Globalization of treatment strategies in leukemia: challenges and responsibilities. *Leukemia* 2008;22:1093-1094.

Tiphaine Ade B, Hjalgrim LL, Nersting J, Breikreutz J, Nelken B, Schrappe M, et al. Evaluation of a pediatric liquid formulation to improve 6-mercaptopurine therapy in children. *Eur J Pharm Sci*. 2016; 83:1-7.

Thirumaran RK, Gast A, Flohr T, Burwinkel B, Bartram C, Hemminki K, Kumar R. MTHFR genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005;106: 2591-2.

Uchiyama K, Nakamura M, Kubota T, Yamane T, Fujise K, Tajiri H. Thiopurine S-methyltransferase and inosine triphosphate pyrophosphohydrolase genes in Japanese patients with inflammatory bowel disease in whom adverse drug reactions were induced by azathioprine/6-mercaptopurine treatment. *J Gastroenterol* 2009;44:197-203.

Ujii S, Sasaki T, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M. Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT*2 - *24). *Pharmacogenet Genomics* 2008;18:887-893.

van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ.. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects. *Am J Hum Genet* 1998; 62(5):1044-1051.

Verbeke G, Molenberghs G. *Linear mixed effect models for longitudinal data*. New York: Springer; 2004.

Vesell ES. Therapeutic lessons from pharmacogenetics. *Ann Intern Med* 1997; 126: 653-5.

Von Ahsen N, Armstrong VW, Behrens C, von Tirpitz C, Stallmach A, Herfarth H, et al. Association of inosine triphosphatase 94C> A and thiopurine S-methyltransferase deficiency with adverse events and study drop-outs under azathioprine therapy in a prospective Crohn disease study. *Clin Chem* 2005;51:2282-2288.

Wall AM, Rubnitz G. Pharmacogenomic effects on therapy for acute lymphoblastic leukemia in children. *Pharmacogenetics J* 2003(3); 3:128-35.

Wan Rosalina WR, Teh LK, Mohamad N, Nasir A, Yusoff R, Baba AA, Salleh MZ.. Polymorphism of ITPA 94C>A and risk of adverse effects among patients with acute lymphoblastic leukaemia treated with 6-mercaptopurine. *J Clin Pharm Ther* 2012; 37:237-41

Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 1980;32:651-662.

Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R, Congenital heart defects and maternal derangement of homocysteine metabolism. *Mol Genet Metab* 1998, 64: 169–72.

Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Curtis Ellison R, Eckfeldt JH, et al. The 1298A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis*. 2001;156:409-415

Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:4004-4009.

Wierzba K, Wańkiewicz B, Piekarczyk A, Prokopczyk J. [Pharmacokinetics of 6-mercaptopurine in rats during postnatal development]. *Probl Med Wieku Rozwoj*. 1984;13:207-12.

Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, et al. Geographical and ethnic variation of the 677C > T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet* 2003; 40: 619–25.

World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310:2191-4.

Wright S, Sanders D, Lobo A, Lennard L. Clinical significance of azathioprine active metabolite concentrations in inflammatory bowel disease. *Br Med J* 2004;53:1123-1128.

Yang JJ, Cheng C, Devidas M, Cao X, Fan Y, Campana D, Yang W, Neale G, Cox NJ, Scheet P, Borowitz MJ, Winick NJ, Martin PL, Willman CL, Bowman WP, Camitta BM, Carroll A, Reaman GH, Carroll WL, Loh M, Hunger SP, Pui CH, Evans WE, Relling MV. Ancestry and pharmacogenomics of relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2011; 43:237–241.

Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, et al. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* 1997; 126: 608-14.

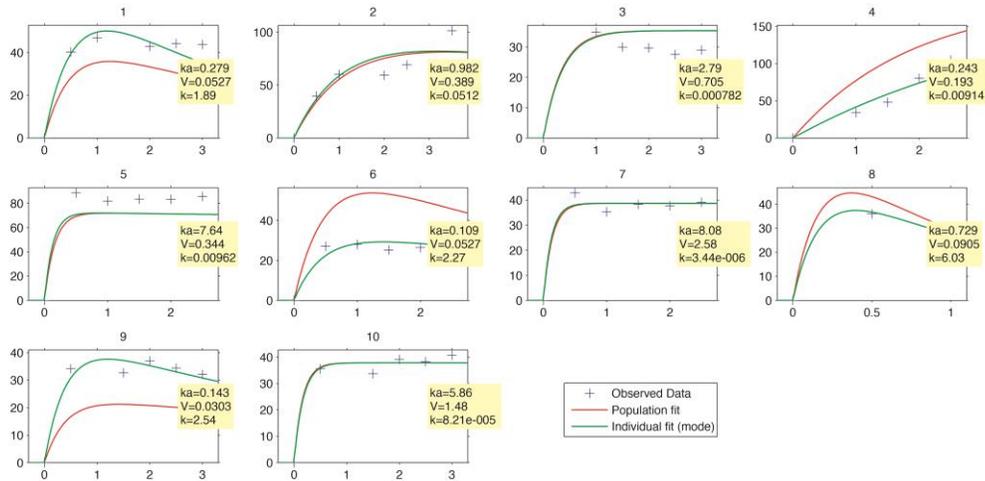
Zanrosso CW, Hatagima A, Emerenciano M, Ramos F, Figueiredo A, Félix TM, Segal SL et al. The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population. *Leuk Res* 2006;30: 477–481.

Zerra P, Bergsagel J, Keller FG, Lew G, Pauly M. Maintenance Treatment With Low-Dose Mercaptopurine in Combination With Allopurinol in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia and Mercaptopurine-Induced Pancreatitis. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63:712-5.

Ziegler DS, Dalla Pozza L, Waters KD, Marshall GM. Advances in Childhood Leukaemia: Successful Clinical-trials Research leads to individualized therapy. *Med J Aust* 2005; 182: 78-81

XVI. ANEXOS

Figura 31. Parámetros farmacocinéticos individuales Ka/V/K de los 10 pacientes estudiados.





Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

AVISO DE SOSPECHAS DE REACCIONES ADVERSAS DE MEDICAMENTOS



SALUD

No. DE INGRESO (USO EXCLUSIVO DE LA COFEPRIS)

NO. RUPA

ANTES DE LLENAR ESTE FORMATO LEA CUIDADOSAMENTE EL INSTRUCTIVO, LA GUÍA Y EL LISTADO DE DOCUMENTOS ANEXOS.
LLENAR CON LETRA DE MOLDE LEGIBLE O A MÁQUINA O A COMPUTADORA

1 AVISO DE SOSPECHAS DE REACCIONES ADVERSAS DE LOS MEDICAMENTOS:

No. DE NOTIFICACIÓN (de acuerdo a origen)

No. DE NOTIFICACIÓN (general)

No DE NOTIFICACIÓN (laboratorio)

2 DATOS DEL PACIENTE:

INICIALES DEL PACIENTE	FECHA DE NACIMIENTO			EDAD		SEXO		ESTATURA (cm)	PESO (kg)
	AÑO	MES	DÍA	AÑOS	MESES	<input type="checkbox"/> F	<input type="checkbox"/> M		

3 DATOS DE LA SOSPECHA DE REACCIÓN ADVERSA:

FECHA DE INICIO DE LA REACCIÓN	DÍA	MES	AÑO
--------------------------------	-----	-----	-----

DESCRIPCIÓN SOSPECHA DE REACCIÓN ADVERSA (INCLUYENDO LOS DATOS DE EXPLORACIÓN Y DE LABORATORIO)

CONSECUENCIAS DEL EVENTO

<input type="checkbox"/> RECUPERADO SIN SECUELA	<input type="checkbox"/> MUERTE-DEBIDO A LA REACCIÓN ADVERSA	<input type="checkbox"/> NO SE SABE
<input type="checkbox"/> RECUPERADO CON SECUELA	<input type="checkbox"/> MUERTE-EL FÁRMACO PUDO HABER CONTRIBUIDO	
<input type="checkbox"/> NO RECUPERADO	<input type="checkbox"/> MUERTE- NO RELACIONADA AL MEDICAMENTO	

4 INFORMACIÓN SOBRE EL MEDICAMENTO SOSPECHOSO:

NOMBRE GENÉRICO	DENOMINACIÓN DISTINTIVA	LABORATORIO PRODUCTOR
NÚMERO DE LOTE	FECHA DE CADUCIDAD	DOSIS
VÍA DE ADMINISTRACIÓN	FECHAS DE LA ADMINISTRACIÓN INICIO: TÉRMINO	MOTIVO DE PRESCRIPCIÓN
	DÍA MES AÑO DÍA MES AÑO	

¿SE RETIRÓ EL MEDICAMENTO SOSPECHOSO?	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> NO SABE
¿DESAPARECIÓ LA REACCIÓN AL SUSPENDER EL MEDICAMENTO?	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> NO SABE
¿SE DISMINUYÓ LA DOSIS? ¿CUÁNTO?	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	
¿SE CAMBIÓ LA FARMACOTERAPIA? ¿CUÁL?	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	
¿REAPARECIÓ LA REACCIÓN AL READMINISTRAR EL MEDICAMENTO?	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> NO SABE
SI NO SE RETIRÓ EL MEDICAMENTO. ¿PERSISTIÓ LA REACCIÓN?	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> NO SABE

5 FARMACOTERAPIA CONCOMITANTE:

MEDICAMENTO	DOSIS	VÍAS DE ADMINISTRACIÓN	FECHAS				MOTIVO DE PRESCRIPCIÓN
			INICIO		TÉRMINO		
			DÍA	MES	AÑO	DÍA	

6 DATOS IMPORTANTES DE LA HISTORIA CLINICA:

Diagnósticos, alergias, embarazo, cirugía previa, datos del laboratorio

7 PROCEDENCIA DE LA INFORMACIÓN:

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL INFORMANTE (LABORATORIO PRODUCTOR O PROFESIONAL).

TELÉFONO

Fecha de recepción en el laboratorio (a)

¿Informado en el período estipulado? (a)

¿Informó esta reacción al laboratorio productor? (b)

Día

Mes

Año

SI

NO

SI

NO

ORIGEN Y TIPO DEL INFORME**LABORATORIO PRODUCTOR****PROFESIONAL**TIPO DE INFORME:

INICIAL

SEGUIMIENTO

ESTUDIO

TIPO DE INFORME:

INICIAL

SEGUIMIENTO

ORIGEN:

PROFESIONAL DE LA SALUD

PACIENTE

ORIGEN:

HOSPITAL

ASISTENCIA EXTRAHOSPITALARIA

HOSPITAL

STENCIA EXTRAHOSPITALARIA

NOTA: EL ENVÍO DE ESTE INFORME NO CONSTITUYE NECESARIAMENTE UNA ADMISIÓN DE QUE EL MEDICAMENTO CAUSÓ LA REACCIÓN ADVERSA.

(a) EN CASO DE QUE EL INFORMANTE SEA AL LÁBORATORIO PRODUCTOR.

(b) EN CASO DE QUE EL INFORMANTE SEA UN PRÓFESIONAL.

LOS DATOS O ANEXOS PUEDEN CONTENER INFORMACION CONFIDENCIAL ¿ESTA DE ACUERDO EN HACERLOS PÚBLICOS?

SI

NO

PARA CUALQUIER ACLARACIÓN, DUDA Y/O COMENTARIO CON RESPECTO A ESTE TRÁMITE, SÍRVASE LLAMAR AL CENTRO DE CONTACTO CIUDADANO (SACTEL) A LOS TELÉFONOS 2000-2000 EN EL D.F. Y ÁREA METROPOLITANA, DEL INTERIOR DE LA REPÚBLICA SIN COSTO PARA EL USUARIO AL 01-800-386-24-66 O DESDE ESTADOS UNIDOS Y CANADÁ AL 1-800-475-2393, O A LOS TELÉFONOS DE LA COFEPRIS EN EL D.F. DE CUALQUIER PARTE DEL PAÍS MARQUE SIN COSTO EL 01-800-033-5050 Y EN CASO DE REQUERIR EL NÚMERO DE INGRESO Y/O SEGUIMIENTO DE SU TRÁMITE ENVIADO AL ÁREA DE TRAMITACIÓN FORÁNEA MARQUE SIN COSTO AL 01-800-420-4224.



Comisión Federal para la Protección
contra Riesgos Sanitarios



Comisión Federal para la Protección
contra Riesgos Sanitarios
Protección es salud

Formato de Farmacovigilancia

No. EXPEDIENTE:

NOMBRE DEL PACIENTE: _____ **EDAD:** _____ **SEXO:** _____
FECHA DE INICIO DEL ESTUDIO: _____

EFFECTOS ADVERSOS ASOCIADOS A 6-MERCAPTOPURINA

- Tomar el medicamento a la misma hora cada vez que lo ingiera para mantener la concentración en torrente sanguíneo.
- Tómelo 2 horas después de comer, o en la noche antes de acostarse.
- Beber solo agua o líquidos claros (jugo de manzana) después que se ingiera el medicamento.
- Siempre verificar la fecha de caducidad del medicamento.
- Tomar 8-12 vasos de agua al día.

SINTOMA	MES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anorexia												
Nauseas												
Vómitos												
Diarrea												
Ictericia												
Malestar gripal												
Fiebre												
Dolor abdominal												
Llagas en la boca												
Hepatotoxicidad												
Oscurecimiento de la piel												
Perdida del cabello												
Sarpullido (alergias)												
Falta de aire												
Sangrado												
Moretones inusuales												
Dolor en garganta												

INTERACCIONES DE 6-MERCAPTOPURINA CON ALIMENTOS*(INTERACCIONES FARMACO-NUTRIENTE)*

- La 6-mercaptopurina se absorbe mejor cuando el estómago está vacío
- Guardar el medicamento en lugares secos y a temperatura ambiente

ALIMENTO	EFECTO DE LOS ALIMENTOS	MARCAR CON UNA (X) SI HAY INGESTA
LACTEOS	Disminuyen su absorción	

INTERACCIONES DE 6-MERCAPTOPURINA CON BEBIDAS

BEBIDA	EFECTO DE LAS BEBIDAS	MARCAR CON UNA (X) SI HAY INGESTA
ALCOHOL	Aumenta los niveles del fármaco en sangre	
BEBIDAS GASEOSAS (Cafeína)	Puede aumentar los niveles del fármaco en sangre	

Fuente: [Guía de Prescripción Terapéutica. Información de medicamentos autorizados en México y España.](#)

INTERACCIONES DE 6- MERCAPTOPURINA CON ALGUNOS FARMACOS

MEDICAMENTOS	EFECTO	MARCAR CON UNA (X)
Alopurinol	Efectos potenciados y mayor toxicidad de la mercaptopurina si se administra junto con el alopurinol .	
Aminosalicilatos (mesalamina o mesalazina, olsalazina, y balsalazida)	Posible aumento del riesgo de leucopenia si la mercaptopurina se administra junto con aminosalicilatos, además de que inhiben a TPMT.	
Antibióticos	El riesgo de toxicidad hematológica aumenta si la mercaptopurina se administra junto con el sulfametoxazol (en forma de co-trimoxazol); el riesgo de toxicidad hematológica aumenta si la mercaptopurina se administra junto con la	

	trimetoprima (también como co-trimoxazol).	
Anticoagulantes	La mercaptopurina posiblemente reduce el efecto anticoagulante de los cumarínicos .	
Antipsicóticos	Evitar el uso concomitante de la mercaptopurina con la clozapina (mayor riesgo de agranulocitosis).	
Antiepilépticos	Los citotóxicos reducen la absorción de la fenitoína .	
Aspirina	Disminuye la actividad de 6 mercaptopurina	
Captopril	El riesgo de leucopenia aumenta si se administra la mercaptopurina con el captopril.	

Fuente: [Guía de Prescripción Terapéutica. Información de medicamentos autorizados en México y España.](#)

INTERACCIONES DE LA 6- MERCAPTOPURINA CON OTROS ANTINEOPLASICOS USADOS EN LA ETAPA DE MANTENIMIENTO

MEDICAMENTOS	EFEECTO	MARCAR CON UNA (X)
Metotrexato	El metotrexato incrementa los niveles plasmáticos de mercaptopurina.	
Ciclofosfamida	Puede aumentar el riesgo de infección y desarrollo de neoplasias.	

Fuente: [Guía de Prescripción Terapéutica. Información de medicamentos autorizados en México y España.](#)

FARMACOS QUE INHIBEN A LA TPMT	Marcar con una X	FARMACOS QUE INHIBEN A LA XANTINO OXIDASA	Marcar con una X
Mesalamina		Alopurinol	
Mesalazina		Oxipurinol	
Olsalazina		Acido pitico	
Balsalazida		Febuxostat	
Acido benzoico			
Furosemida			
Naproxeno			
Ibuprofeno			
Acido mefenamico			
Diureticos tiazidicos (Hidroclorotiazida)			
Clortalidona, Indapamida)			

- Pearson DC, May GR, Fick GH, Sutherland LR. Azathioprine and 6- mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 1995; 123: 132-42

- Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Sulphasalazine inhibition of thiopurine methyltransferase: Possible mechanism for interaction with 6-mercaptopurine and azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* 1995; 39: 456-9.
- Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, Szumlanski CL, Mays DC, Loftus EV, Tremaine WJ, Lipsky JJ, Weinshilboum RM, Sandborn WJ. Leucopenia resulting from a drug interaction between azathioprine or 6-mercaptopurine and mesalamine, sulphasalazine, or balsalazide. *Gut* 2001; 49: 656-64.

NOTAS:

INVESTIGADOR RESPONSABLE**Dr. en C. Ossyneidee Gutiérrez Álvarez**

DIRECTOR DE TESIS DE DOCTORADO**Dr. en C. Ismael Lares Asef**

