



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

“Determinación de frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos genéticos de *MTHFR* 677C>T (rs1801133) y *MTHFR* 1298A>C (rs1801131) en niños con leucemia linfoblástica aguda de SOLCA - Loja y SOLCA - Cuenca”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímica Farmacéutica

Autora:

Johanna Andrea Murillo Guamán

CI: 0105053821

Directora:

BQF. Maritza Raphaela Ochoa Castro, Mgt.

CI: 0301843090

Asesor:

Dr. Fausto Leonardo Zaruma Torres, PhD

CI: 1102127980

Cuenca – Ecuador

08/11/2019

RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una de las oncopatologías más frecuentes a nivel infantil, ocupando el primer lugar de los cinco tipos de cáncer con mayor incidencia en Ecuador. **Objetivo:** Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos genéticos de *MTHFR* 677C>T (rs1801133) y *MTHFR* 1298A>C (rs1801131) en niños con leucemia linfoblástica aguda de SOLCA – Loja y SOLCA – Cuenca. **Metodología:** Se llevó a cabo el análisis de dos polimorfismos, esto mediante un estudio de tipo transversal descriptivo; donde se evaluó a 160 pacientes pediátricos entre hombres y mujeres diagnosticados con LLA provenientes de SOLCA - Cuenca y SOLCA – Loja. Los mismos participaron de manera voluntaria y firmaron su aceptación mediante el consentimiento y asentimiento informado. La detección de los polimorfismos *MTHFR* 677C>T y 1298A>C se realizó mediante la técnica PCR en tiempo real. El análisis estadístico descriptivo se desarrolló a través del software IBM SPSS (versión 22) y el programa bioinformático SNPStats. **Resultados:** Se determinó que las frecuencias genotípicas para el SNP *MTHFR* 677C>T fueron 25% C/C y 75% C/T con una frecuencia alélica del 38% para el alelo mutado (T). Para el SNP *MTHFR* 1298 A>C se encontró una frecuencia genotípica de 2% A/A, 16% A/C y 82% C/C, en tanto que su frecuencia alélica fue del 90% para el alelo mutado (C). No se encontró asociación genotípica ni alélica con ninguna de las variables intervinientes ($p>0.05$), así como tampoco se manifestó una correlación estadísticamente significativa de los polimorfismos en mención y el tipo de riesgo de LLA.

Palabras clave: Leucemia. Polimorfismo (SNP). *MTHFR* 677C>T. *MTHFR* 1298A>C.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is one of the most frequent oncopathologies in children, occupying the first place among the five types of cancer with the highest incidence in Ecuador. **Objective:** To determine the genotypic and allelic frequencies of the genetic polymorphisms of MTHFR 677C> T (rs1801133) and MTHFR 1298A> C (rs1801131) in children with acute lymphoblastic leukemia from SOLCA - Loja and SOLCA – Cuenca. **Methodology:** The analysis of two polymorphisms was carried out, this by means of a cross-sectional descriptive study; where 160 pediatric patients were evaluated between men and women diagnosed with ALL from SOLCA - Cuenca and SOLCA - Loja. They participated voluntarily and signed their acceptance through informed consent and consent. The detection of MTHFR 677C> T and 1298A> C polymorphisms was carried out using the real-time PCR technique. The descriptive statistical analysis was developed through the software IBM SPSS (version 22) and the bioinformatic program SNPStats. **Results:** It was determined that the genotypic frequencies for the SNP MTHFR 677C>T were 25% C/C and 75% C/T with an allelic frequency of 38% for the mutated allele (T). For the SNP MTHFR 1298 A>C a genotypic frequency of 2% A/A, 16% A/C and 82% C/C was found, while its allelic frequency was 90% for the mutated allele (C). No genotypic or allelic association was found with any of the intervening variables ($p > 0.05$), nor was there a statistically significant correlation of the polymorphisms mentioned and the type of ALL risk.

Key words: Leukemia. Polymorphism (SNP). *MTHFR 677C>T*. *MTHFR 1298A>C*.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ÍNDICE DE CONTENIDOS	4
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	13
DEDICATORIA.....	11
AGRADECIMIENTO.....	12
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	16
Objetivo general:.....	16
Objetivos específicos:.....	16
CAPITULO 1	17
2. Marco Teórico.....	17
2.1 Leucemia linfoblástica aguda.....	17
2.1.1 Epidemiología.....	17
2.1.2 Subtipos de Leucemia linfoblástica aguda.....	18
2.1.3 Factores de riesgo.....	20
2.1.4 Fisiopatología	21
2.1.5 Manifestaciones clínicas.....	22
2.1.6 Diagnóstico.....	22
2.1.7 Tratamiento	23
2.2 Influencia de la farmacogenética en el tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda.....	23
2.3 Polimorfismos genéticos.....	24
2.3.1 Polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP).....	25
2.4 Vía del folato y la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).....	26
2.5 Polimorfismos en el gen de la enzima MTHFR	28



2.5.1	Polimorfismo <i>MTHFR</i> 677C>T (rs1801133).....	29
2.5.2	Polimorfismo <i>MTHFR</i> 1298A>C (rs1801131).....	30
CAPÍTULO 2		32
3.	Materiales y Métodos.....	32
3.1.1	Tipo de Estudio.....	32
3.1.2	Universo de estudio.....	32
3.1.3	Área de estudio	32
3.2	Muestreo	33
3.2.1	Criterios de selección	33
3.3	Procedimientos.....	34
3.3.1	Toma de muestra	34
3.3.2	Extracción de ADN	34
3.3.3	Cuantificación y electroforesis del ADN	38
3.3.4	Amplificación de ADN mediante la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).....	40
3.3.5	Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real.....	42
3.3.6	Determinación de los Polimorfismos C677T (rs1801133) y A1298C (rs1801131)	43
3.3.7	Interpretación de los resultados.....	45
3.3.8	Análisis estadístico	46
CAPÍTULO 3		47
4.	Resultados y Discusión	47
4.1	Descripción de las características de la población de estudio.....	47
4.2	Frecuencia genotípica de los polimorfismos 677C>T (rs1801133) y 1298A>C (rs1801131) del gen <i>MTHFR</i>	48
4.3	Frecuencia alélica de los polimorfismos 677C>T (rs1801133) y 1298A>C (rs1801131) del gen <i>MTHFR</i>	49
4.4	Asociación genotípica de <i>MTHFR</i> 677C>T y <i>MTHFR</i> 1298A>C de acuerdo a variables categóricas de la población.	49



4.4.1	Asociación genotípica de 677C>T y 1298A>C y el sexo.....	50
4.4.2	Asociación genotípica de 677C>T y 1298A>C y el grupo etario.	50
4.4.3	Asociación genotípica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al IMC.....	52
4.4.4	Asociación genotípica de 677C>T y 1298A>C y el inmunofenotipo.....	53
4.4.5	Asociación genotípica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo a la hemoglobina.....	54
4.4.6	Asociación genotípica de 677C>T y 1298A>C y el hematocrito.....	54
4.4.7	Distribución de los genotipos más predominantes de 677C>T y 1298A>C de acuerdo a su procedencia.....	55
4.5	Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al sexo, IMC, hemoglobina y hematocrito.	56
4.5.1	Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al sexo.	57
4.5.2	Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C y el IMC.	57
4.5.3	Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C y la hemoglobina.	58
4.5.4	Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C y el hematocrito.....	58
4.6	Asociación genotípica y alélica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo a la variable de respuesta de tipo de riesgo de LLA según el inmunofenotipo	59
4.6.1	Influencia genotípica de 677C>T y 1298A>C frente al tipo de riesgo de LLA.....	59
4.6.2	Influencia alélica de 677C>T y 1298A>C frente al tipo de riesgo de LLA.....	60
4.7	Discusión.....	60
CAPÍTULO 4	66
5. Conclusiones y recomendaciones		66
Conclusiones.....		66
Recomendaciones		67
BIBLIOGRAFÍA		68
ANEXOS		76

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Traslocaciones cromosómicas más frecuentes en la LLA.	20
Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión para los participantes del proyecto.	33
Tabla 3. Componentes del PureLink™ Genomic DNA Mini Kit de Invitrogen para 250 extracciones.	34
Tabla 4. Materiales y equipos para la extracción de ADN.	38
Tabla 5. Condiciones para la reacción de amplificación de estandarización.	43
Tabla 6. Condiciones de la reacción de amplificación para los polimorfismos rs1801133 y rs1801131.	44
Tabla 7. Materiales, reactivos y equipos para el desarrollo de la qPCR.	44
Tabla 8. Datos generales de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda.	47
Tabla 9. Frecuencia genotípica del polimorfismo MTHFR 677C>T.	48
Tabla 10. Frecuencia genotípica del polimorfismo MTHFR 1298A>C.	49
Tabla 11. Frecuencia alélica de los polimorfismos 677C>T y 1298A>C.	49
Tabla 12. Asociación de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al sexo.	50
Tabla 13. Asociación de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al IMC.	53
Tabla 14. Asociación de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al inmunofenotipo.	53
Tabla 15. Asociación de 677C>T y 1298A>C de acuerdo a la hemoglobina.	54
Tabla 16. Asociación de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al hematocrito.	55
Tabla 17. Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al sexo.	57
Tabla 18. Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al estado del IMC.	57
Tabla 19. Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo a la hemoglobina.	58
Tabla 20. Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al hematocrito.	58
Tabla 21. Asociación genotípica del SNP 677C>T con el tipo de riesgo de LLA según el inmunofenotipo.	59
Tabla 22. Asociación genotípica del SNP 1298A>C con el tipo de riesgo de LLA según el inmunofenotipo.	60
Tabla 23. Asociación alélica del SNP 677C>T con el tipo de riesgo de LLA según el inmunofenotipo.	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de diferenciación para la clasificación inmunológica de las leucemias linfoblásticas.....	19
Figura 2. Esquema del ciclo del folato.....	27
Figura 3. Ubicación citogenética del gen MTHFR.....	28
Figura 4. Síntesis del proceso de extracción de ADN.....	36
Figura 5. Procedimiento para el lisado de células en la extracción de ADN.....	36
Figura 6. Procedimiento para la purificación y lavado de células en la extracción de ADN.....	37
Figura 7. Procedimiento de elución de ADN y su almacenamiento.....	37
Figura 8. Asociación de MTHFR 677C>T de acuerdo al grupo etario.....	51
Figura 9. Asociación de MTHFR 1298A>C de acuerdo al grupo etario.....	52
Figura 10. Distribución de los genotipos más predominantes de MTHFR 677C>T y MTHFR 1298A>C de acuerdo a su procedencia.....	56
Figura 11. Amplificación de qPCR para sonda C__1202883_20 (rs1801133), Homocigoto Wild Type.....	89
Figura 12. Amplificación de qPCR para sonda C__1202883_20 (rs1801133), Heterocigoto.....	89
Figura 13. Amplificación de qPCR para sonda C__850486_20 (rs1801131), Homocigoto Wild Type.....	90
Figura 14. Amplificación de qPCR para sonda C__850486_20 (rs1801131), Heterocigoto.....	90
Figura 15. Amplificación de qPCR para sonda C__850486_20 (rs1801131), Homocigoto mutado.....	91



Cláusula de Propiedad Intelectual

Johanna Andrea Murillo Guamán, autora del trabajo de titulación “Determinación de frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos genéticos de *MTHFR* 677C>T (rs1801133) Y *MTHFR* 1298A>C (rs1801131) en niños con leucemia linfoblástica aguda de SOLCA - Loja y SOLCA - Cuenca”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 08 de noviembre de 2019.

Johanna Andrea Murillo Guamán

C.I: 0105053821

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Johanna Andrea Murillo Guamán, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Determinación de frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos genéticos de *MTHFR* 677C>T (rs1801133) Y *MTHFR* 1298A>C (rs1801131) en niños con leucemia linfoblástica aguda de SOLCA - Loja y SOLCA - Cuenca”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 08 de noviembre de 2019.



Johanna Andrea Murillo Guamán

C.I: 0105053821



DEDICATORIA

A Dios, por haberme acompañado con su presencia paso a paso desde el inicio de mi carrera hasta el día de hoy con este logro, gracias Señor por no abandonarme y quedarte conmigo, por demostrarme que aun cuando se puede experimentar toda clase de adversidades, jamás perdí la fe porque encomendé mi espíritu en ti y aunque admito a veces quise rendirme; la fortaleza que me daba el creer en su presencia incluso cuando ya no tenía más que dar, hizo posible que siempre quisiera ver un mejor mañana.

A mis padres Carmita Guamán y Rene Murillo por haberme dado la vida, quizá hace algún tiempo no entendía el valor de las responsabilidades, pero hoy les dedico esta parte de mí porque gracias a ustedes soy la persona que soy, fuerte, llena de sueños, quizá con muchos miedos también, pero de eso se trata la vida; gracias mami y papi por regalarme el valor de la felicidad en las cosas más pequeñas de la vida y por enseñarme que la mejor riqueza que se puede poseer es estar junto a nuestra familia por pequeña que fuera.

A mis hermanas Estefanía y Marcela, por ser mi alegría, ustedes son el motivo para seguir adelante cada día. La mayor me regaló las dos personitas que me robaron el corazón, mis sobrinos; y la menor me regala a diario la satisfacción de alegría que siento cada vez que la hago sonreír, no te voy a fallar hermanita, sé que a tu edad imitas todo lo que hago y por eso quiero que continúes viendo en mí un buen ejemplo a seguir, jamás estarás sola.

A mi familia, en especial a mi abuelita y tíos que aunque se encuentran distantes, con sus oraciones y palabras de aliento me empujaron siempre a no rendirme, este logro es también para ustedes. Finalmente **a mis amigas**, quienes a pesar de verlas con poca frecuencia siempre fueron genuinas con su afecto y amistad. Con cariño:

Andrea



AGRADECIMIENTO

Nuevamente a Dios, por ser mi guía a lo largo de toda la carrera, le doy las gracias por cuidarme paso a paso, por haber hecho que las cosas sucedan en el tiempo preciso, y por haberme permitido comprender que absolutamente todo en la vida tiene una solución si tan sólo le entregas tu corazón a Él sin medida.

Quiero agradecer infinitamente al Dr. Fausto Zaruma, PhD., por haberme permitido ser parte del proyecto que está dirigiendo para poder realizar mi trabajo de titulación, y de igual manera a la Dra. Maritza Ochoa, Mgt., por aceptar ser mi tutora de tesis. Ciertamente tuve la suerte de tener dos de los más grandes ejemplos a seguir que conocí en la carrera, ahora guiándome para lograr obtener mi título académico, gracias infinitas por haber influenciado en mí la motivación para apreciar aún más ésta que será mi profesión.

Durante el trayecto de este tiempo, también tuve la oportunidad de conocer a grandes personas, quienes nunca fueron ajenos a responder cualquier inquietud que se presentará en el desarrollo del presente proyecto. Por ello, y por recibirme siempre con amabilidad y afecto en su lugar de trabajo, agradezco al Dr. Rodrigo Caroca Cáceres, PhD. y al Ing. Diego Montero, docentes de la Universidad del Azuay.

Por último quiero darle las gracias a la Ing. Ruth Álvarez, que aunque ya no está con nosotros, quisiera expresar mi eterno agradecimiento por no dejar que me rindiera frente a las adversidades, regalándome un abrazo cada vez que sentía desfallecer ante ellas. Jamás olvidaré sus palabras: “Yo voy a estar al frente de ti, cuando vayas a graduarte, no te rindas”; sé y estoy segura que lo estará con su esencia y esperó que desde la eternidad se sienta orgullosa de mí por haberlo logrado.

LISTA DE ABREVIATURAS

- aa:** Aminoácido
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- bp:** Pares de bases
- CpG:** Histonas precedidas de guanina
- dbSNP:** Base de Datos de Polimorfismo de Nucleótido Único
- DHF:** Dihidrofolato
- dTMP:** Monofostato de desoxitimidina
- DUMP:** Monofosfato de desoxiuridina
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- Hcy:** Homocisteína
- IMC:** Índice de masa corporal
- LLA:** Leucemia linfoblástica aguda
- LNH:** Linfoma no Hodking
- MIC:** Diferenciación morfológica, inmunológica y citogenética
- MTR:** Metionina sintasa
- MTHFR:** Enzima metilentetrahidrofolato reductasa
- ng/ul:** Nanogramos por microlitro
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
- RNA:** Ácido ribonucleico
- SAM:** S-adenosil-L-metionina
- SNPs:** Polimorfismo de un solo nucleótido
- THF:** Tetrahidrofolato
- TS:** Timidilato sintasa

1. INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer que se presenta con mayor frecuencia en la edad pediátrica, generalmente en menores de 15 años. En el mundo se estima que aproximadamente del 30% del total de neoplasias malignas en pacientes pediátricos, el 75% son por leucemia linfoblástica aguda, la misma que es más común en varones (Vizcaíno, Lopera, Martínez, Reyes, & Linares, 2016). Según el Instituto Nacional de Estadística y Censos en Ecuador en el año 2016, se reportó que las principales provincias con registro de leucemia aguda fueron Guayas, seguido por Azuay; encontrándose Loja en sexto lugar (Reina, 2018). SOLCA en el 2018, ubicó ésta neoplasia como el cáncer infantil con mayor incidencia en niños y niñas con el 43% y 48% respectivamente (SOLCA, 2018).

Se ha demostrado que existe gran variabilidad entre los pacientes, con respecto tanto al efecto terapéutico, como a la toxicidad del tratamiento inducida por fármacos antifolatos utilizados en la LLA. Estos fármacos emplean la vía del folato, la cual está regulada por la función coordinada de varias enzimas como la metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (Zaruma et al., 2015), actuando así sobre el ciclo celular inhibiendo la MTHFR. El fallo terapéutico por tanto, puede ser ocasionado por la propia resistencia de las células oncógenas o en su defecto, a una disminución en la exposición al fármaco a causa de una posible biotransformación apresurada dentro de los sistemas enzimáticos del individuo (Vizcaíno, Núñez, Londian, García, & Guerra, 2011). Es por ello, que los pacientes con una actividad endógena baja de la enzima tienen mayor riesgo de padecer principalmente toxicidad mucosa y hematológica inducida por los fármacos en mención (Prado Vizcaíno et al., 2011).

El gen de la enzima MTHFR manifiesta 2 alelos considerados como polimórficos, el primero y el más frecuente, presenta una mutación situada en la posición C677T y el segundo la presenta en A1298C, por lo que esto desencadena la derivación de proteínas cuya actividad enzimática se encuentra disminuída. En cuanto al alelo C677T que genera la sustitución de alanina a valina, da como resultado una variante que demostró ser termolábil *in vitro*; lo que ocasiona una brusca disminución de alrededor del 70% de la actividad de la enzima en comparación con el alelo de tipo salvaje por lo que se verá afectada la distribución intracelular de folatos, dando paso a la retención del mismo que iría dirigido a la síntesis de novo (Prado Vizcaíno et al., 2011) (Wall & Rubnitz, 2003).



Respecto al alelo A1298C que origina la sustitución de un residuo de alanina por glutamato, la actividad de la enzima se reduce mostrando un 60% de actividad frente a los individuos que poseen el alelo salvaje. Además de ello, aquellos individuos que sean heterocigotos tanto en C677T como en A1298C pueden presentar incluso una disminución de actividad enzimática incluso del 50% aproximadamente. Al disminuir la actividad de la enzima MTHFR, esto conduce al aumento de la concentración de homocisteína a nivel plasmático y a una ineficiente metilación del ADN en pacientes oncológicos. Por ello entre otras causas los polimorfismos de la MTHFR se involucran relativamente de manera directa en la farmacoterapia de la LLA, particularmente con los fármacos antifolatos; y en constancia de ello ya se publican reportes en donde se muestra que los individuos que padecen LLA, quienes manifiestan uno o dos alelos mutados; claramente presentan pobre supervivencia libre de eventos (Prado Vizcaíno et al., 2011) (Costea, Moghrabi, Laverdiere, Graziani, & Krajinovic, 2006).

Hasta el momento no se dispone de estudios semejantes que se hayan llevado a cabo dentro del país, cuyos resultados contribuyan de cierta forma a la medicina de precisión o translacional para este tipo de oncopatología de gran impacto en el medio. Por lo expuesto, la determinación de la frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos C677T y A1298C en el gen de la enzima MTHFR en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda de SOLCA – Loja y SOLCA – Cuenca, aportará al conocimiento aplicado mediante la determinación del impacto clínico que tienen las alteraciones polimórficas en la farmacoterapia, para que de esta manera se brinde un soporte en la decisión del médico tratante en el abordaje adecuado a la población; siendo éste uno de los alcances propuestos por el proyecto de investigación ganador en el XV concurso de la Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca (DIUC) denominado *“Translocaciones cromosómicas y polimorfismos genéticos de enzimas de la vía del folato y de transportadores de metotrexato como posibles marcadores predictores de la toxicidad en niños con Leucemia Linfoblástica Aguda”*, del que forma parte.

1.1 OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Objetivo general:

- Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos correspondientes al gen de *MTHFR* 677C>T (rs1801133) y *MTHFR* 1298A>C (rs1801131) en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda de SOLCA – Loja y SOLCA – Cuenca.

Objetivos específicos:

- Establecer la frecuencia genotípica de *MTHFR* 677C>T (rs1801133) y *MTHFR* 1298A>C (rs1801131) en niños \leq de 18 años que fueron diagnosticados con Leucemia Linfoblástica Aguda.
- Identificar la frecuencia alélica de los polimorfismos mencionados en niños \leq de 18 años diagnosticados con Leucemia Linfoblástica Aguda.
- Correlacionar la frecuencia genotípica y alélica con distintas variables biológicas y clínicas.
- Comparar los resultados obtenidos, entre ambos polimorfismos con los descritos en otras poblaciones.

CAPITULO 1

2. Marco Teórico

2.1 Leucemia linfoblástica aguda

La leucemia linfoblástica aguda conocida también como leucemia linfocítica aguda (LLA) se desencadena a partir de los glóbulos blancos en la médula ósea, al denominarla con el término agudo se hace referencia a que la enfermedad puede avanzar rápidamente; pues de no ser tratada a tiempo el resultado podría ser fatal en tan solo meses. El término linfocítico manifiesta que se produce en las etapas inmaduras de los linfocitos, ocasionando que su crecimiento desordenado en la médula ósea bloquee el normal desarrollo de las células rojas y plaquetas. Es considerada como la neoplasia más frecuente en pacientes menores de 15 años, repercutiendo su mayor incidencia entre las edades de dos a cinco años (Fuentes et al., 2018).

2.1.1 Epidemiología

La LLA es la neoplasia más frecuente en la infancia, constituyendo el 80% de todas las leucemias agudas de la edad pediátrica. El 25% y el 19% de todos los tumores en menores de 15 y 19 años, respectivamente, son LLA. La supervivencia de los pacientes con LLA se ha incrementado notablemente en las últimas décadas, pasando de una supervivencia de menos del 10% en los años sesenta, a presentar con los tratamientos actuales, una supervivencia libre de enfermedad que actualmente se aproxima e incluso supera al 90% en los países más desarrollados. A pesar de estos excelentes resultados, todavía un pequeño grupo de pacientes, en torno al 10-20%, fracasan en el tratamiento (Ceppi, Cazzaniga, Colombini, Biondi, & Conter, 2015).

Para el 2017, la Sociedad Americana Contra el Cáncer calculó que en los Estados Unidos aproximadamente habría 5,970 nuevos casos de LLA diagnosticados y aproximadamente 1,440 personas morirían por su causa. (Lainez, 2017) El Instituto Nacional de Estadística y Censos en Ecuador en el año 2016, reportó que las principales provincias con registro de leucemia aguda fueron Guayas, seguido por Azuay; encontrándose Loja en sexto lugar (Reina, 2018). SOLCA, en su última revista publicó que entre el año 2013 hasta el 2017, de los cinco cánceres con mayor

incidencia por sexo; la leucemia aguda se ubicó como el cáncer infantil con mayor incidencia en niños y niñas con el 43% y 48% respectivamente (SOLCA, 2018).

2.1.2 Subtipos de Leucemia linfoblástica aguda

Existen varios subtipos de LLA los cuales se pueden clasificar mediante pruebas inmunológicas, citogenéticas y de genética molecular. Además de ello, ciertas pruebas pueden ser repetidas durante y claro después del tratamiento con el objetivo de medir los efectos del mismo. (DeGennaro, 2014).

La clasificación más conocida es la denominada MIC, que por su significado se basa en una diferenciación morfológica, inmunológica y citogenética (Lassaletta, 2016).

2.1.2.1 Clasificación morfológica

Establecida por la asociación FAB (Franco-Américo-Británica), misma que define a la LLA como tipo 1, 2 y 3 de acuerdo a una caracterización de la morfología celular después de haber efectuado una tinción Wright. Aunque su aceptación es universal, actualmente ésta clasificación casi ya no se utiliza (Lassaletta, 2016) (Castañeda, 2009).

2.1.2.2 Clasificación inmunológica

Mediante inmunofluorescencia para identificar los antígenos de superficie, los tipos de leucemias se subclasifican a su vez basándose en tres clases de linfocitos, ya sean de linfocitos T o linfocitos B maduros o precursores de los linfocitos B (Figura 1). Ésta clasificación inmunológica ha reflejado particular utilidad en especial pronóstica, debido a que las derivadas de precursores de linfocitos B muestran un mejor pronóstico frente a las derivadas de células T y B maduras. (Castañeda, 2009).

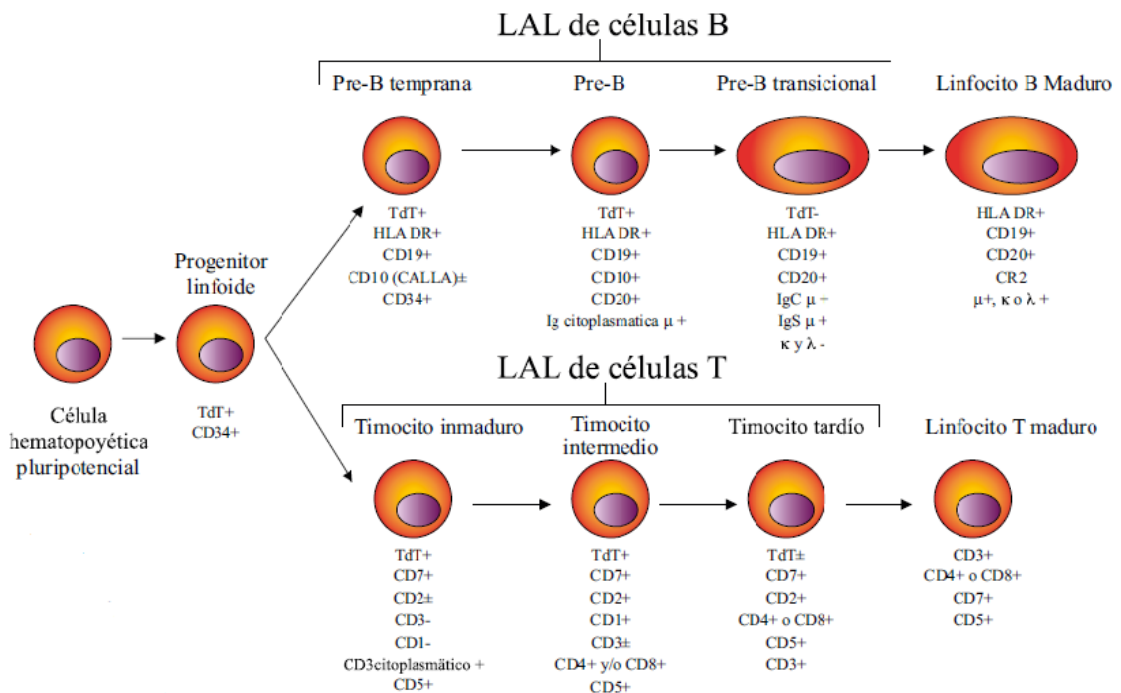


Figura 1. Esquema de diferenciación para la clasificación inmunológica de las leucemias linfoblásticas en base a los estados madurativos y de desarrollo, antígenos presentes en la superficie celular, reconocidos por anticuerpos monoclonales y mediante expresión de inmunoglobulinas en citoplasma y/o en la superficie. Fuente: (Lassaletta, 2016).

2.1.2.3 Clasificación citogenética y molecular

Actualmente se sabe que aproximadamente del 60 al 90% de los individuos con LLA presentan alguna alteración sea en la estructura de los cromosomas o en su defecto en el número de ellos (Castañeda, 2009). En cuanto las alteraciones cromosómicas numéricas se destaca que la hiperdiploidía la cual refiere un número mayor a 50 cromosomas, se presenta con aproximadamente el 30% de los casos especialmente en niños, manifestando buen pronóstico. Referente a las anomalías estructurales, son las traslocaciones las más frecuentes y significativas clínica y biológicamente, siendo las t(9:22) y la t(4:11) quienes se asocian a pronósticos desfavorables (Tabla 1) (Ramos, Martínez, & Barreiro, 2001).

2.1.3 Factores de riesgo

Son los factores genéticos los que juegan aún más un entorno relevante en el origen de las leucemias agudas, cuyo fundamento está basado en lo siguiente:

- ✓ Se evidencia una íntima asociación de las LLA y ciertas traslocaciones cromosómicas como se indica en la Tabla 1.
- ✓ Es mayor la frecuencia de leucemia aguda en los familiares de pacientes que la padezcan.
- ✓ Existen enfermedades genéticas que expresan mayor incidencia de leucemia aguda, como: Síndrome de Down, Klinefelter, neurofibromatosis, Schwachman, Bloom, Fanconi, entre otros (Lassaletta, 2016).

Tabla 1. Traslocaciones cromosómicas más frecuentes en la LLA.

Traslocación	Frecuencia	Genes afectados	Características
t(1:19)(q23;p13)	5-6%	E2A-PBX1	Fenotipo pre-B hiperleucocitosis. Tratamiento intensivo necesario
t(9:22)(q34;p11)	3-5%	BCR-ABL	Cromosoma Philadelphia. Tratamiento imatinib. Hiperleucocitosis
t(4:11)(q21;p23)	2%	MLL-AF4	Estirpe B. Ligada a la LLA lactante. Hiperleucocitosis. Pronóstico pobre.
t(12:21)(p13;q22)	25% de las LLA B pre	TEL-AML	Fenotipo B. Buen pronóstico. Particular sensibilidad a la asparraginasa

Fuente: (Lassaletta, 2016)

En cuanto a los factores medioambientales que podrían dar paso al desarrollo de la leucemia, destaca en particular la exposición a las radiaciones ionizantes; pues brevemente, se dice que el incremento de la incidencia de leucemia de los individuos que sobrevivieron a Hiroshima y Nagasaki se relacionó estrechamente con la



proximidad a la explosión. Aún existe controversia de que los campos electromagnéticos aumentan o no el riesgo de padecer leucemia.

Se ha asociado de cierta manera la exposición a distintos productos químicos, como por ejemplo el benceno, a la leucemia mieloide aguda más que a la LLA. Además, la quimioterapia que se utiliza para tratar diferentes tumores, podría de igual forma manifestar un efecto leucemógeno; tal es el caso de los agentes alquilantes o los inhibidores de la topoisomerasa II. (Lassaletta, 2016).

2.1.4 Fisiopatología

Al igual que en la mayoría de enfermedades neoplásicas, la sucesión de acontecimientos los cuales provienen de la transformación maligna de una célula, es complejamente multifactorial. Para el caso de la LLA, la secuencia de hechos se genera durante el pleno desarrollo de la estirpe linfoide. Tales precursores linfoides muestran un elevado índice de proliferación y por supuesto de reordenamientos genéticos, siendo éstas particularidades las que facilitan la aparición de mutaciones espontáneas y demás modificaciones citogenéticas las cuales dan paso a la transformación letal (Lassaletta, 2016).

Como ya se mencionó, se sabe que la leucemia llega a ser un padecimiento clonal iniciado desde un tipo de precursor celular que en este tipo de neoplasia es la linfopoyesis. Es en este compartimiento celular que las alteraciones ocurren por un tipo de mutación que se manifiesta en uno de los protooncógenos, quienes son los responsables de mantener la correcta regulación tanto de la proliferación, supervivencia así como una adecuada diferenciación de las células sanguíneas. De esta forma, que tales mutaciones dan como consecuencia la denominada alteración o transformación maligna de las células normales, ocasionando la subsiguiente ausencia de los mecanismos controladores de la replicación celular, pues se obtendrá una interrupción en la maduración celular y como se dijo ya, una expansión clonal (Castañeda, 2009).

2.1.5 Manifestaciones clínicas

Aproximadamente la mitad de los pacientes manifiesta fiebre, de los cuales un tercio de ellos tienen un foco infeccioso originado por ella. Partiendo del síndrome anémico que cursan este tipo de pacientes debido al quiebre en la hematopoyesis, se muestran manifestaciones clínicas frecuentes como palidez, astenia y adinamia debidas a la anemia. El 38% presenta sangrado debido a la trombocitopenia y un 40% refiere dolor articular por la infiltración leucémica del periostio o articulación (Sánchez, Ortega, & Barrientos, 2007).

Respecto a los signos que se manifiestan en la piel y las mucosas generalmente son petequias y equimosis. En particular, el hígado, bazo y los ganglios linfáticos son los lugares extramedulares más afectados, siendo el grado de organomegalia más perjudicial en niños que en adultos; pues se reporta que en un 60% se manifiesta hepatomegalia; en 50%, esplenomegalia, y en 45%, linfadenopatía (Sánchez, Ortega, & Barrientos, 2007) (Castañeda, 2009).

2.1.6 Diagnóstico

En el momento del diagnóstico, la anemia, los recuentos de leucocitos y diferenciales anormales, así como la trombocitopenia suelen estar presentes en el momento del diagnóstico, lo que indica el grado en que la médula ósea ha sido reemplazada por linfoblastos leucémicos. El grado de elevación del recuento de leucocitos en el momento del diagnóstico es un predictor potencial del pronóstico en la LLA (Conter et al., 2004).

La neutropenia es un fenómeno común y se asocia con un mayor riesgo de infección grave. La coagulopatía, generalmente leve, puede ocurrir en la LLA de células T y muy poco se asocia con sangrado grave. Más del 75% de los pacientes presentan anemia, que suele ser normocrómica y normocítica y está asociada con un recuento de reticulocitos de normal a bajo. La anemia o la trombocitopenia suelen ser leves o incluso ausentes en pacientes con LLA de células T. Para establecer el diagnóstico de leucemia en definitiva, la evaluación de los frotis de aspirados de médula ósea es esencial. Mientras que la médula ósea normal tiene menos de 5% de blastos, en el caso de la leucemia en general está casi completamente infiltrada por ellos (Conter et al., 2004).

2.1.7 Tratamiento

El protocolo Total XV del St. Jude Children's Research Hospital modificado para su adaptación a países en vías de desarrollo, es uno de los más empleados en la actualidad, con el cual se ha alcanzado índices de sobrevida libre de enfermedad (SLE) del 85% en LLA (Sonoma, 2018).

El mismo, clasifica a los pacientes en base al riesgo el cual incluye: edad, recuento de glóbulos blancos, enfermedad del SNC, índice de ADN (estudio de la ploidía por citometría de flujo) y cariotipo en el diagnóstico. Consta de tres fases: Inducción, consolidación y mantenimiento. La inducción que tiene como fin erradicar más del 99% de la masa de células leucémicas, restablecer la hematopoyesis normal y condición física del paciente; conlleva una duración de 5 semanas en donde se administra prednisona, daunoblastina, vincristina, L-asparaginasa, ciclofosfamida, citarabina, 6-mercaptopurina, y quimioterapia (QT) intratecal (IT) triple profiláctica o terapéutica según la edad. La fase de consolidación la cual mejora la remisión alcanzada por la inducción dura 14 días, en donde caracteriza el empleo de altas dosis de metotrexate tanto el día 1 como el 8. Se administran $2\text{gr}/\text{m}^2/\text{dosis}$ para el grupo de bajo riesgo y $3\text{gr}/\text{m}^2/\text{dosis}$ para el de alto riesgo, esto asociado de 6-mercaptopurina por 14 días y QT IT triple los días 1 y 8 en ambos grupos. La tercera fase es la de mantenimiento, contempla 120 semanas en niñas y 146 para niños, caracterizada por administrar 6-mercaptopurina diaria y metotrexate intramuscular semanal, pulsos de vincristina y dexametasona cada 4 semanas, fase de reinducción en la séptima semana y altas dosis de metotrexate cada 8 semanas en el primer año, además de QT IT triple cada 8 semanas hasta la semana 56 también del primer año. Al grupo de alto riesgo se le adiciona además ciclofosfamida y citarabina. La duración total del tratamiento debe ser de 2 años o de 2 años y seis meses (Chona, Montero, & Inaty, 2010) (Sonoma, 2018).

2.2 Influencia de la farmacogenética en el tratamiento de la Leucemia

Linfoblástica Aguda

Los avances en la farmacogenética desde hace 20 años han permitido identificar los factores genéticos que probablemente podrían ser los causantes de la aparición de toxicidad provocada por determinados fármacos o el fracaso de la eficacia de los mismos. Se sabe que la toxicidad de la quimioterapia es una causa común de

morbilidad y mortalidad en niños con LLA, así como es origen frecuente de secuelas en mediano a largo plazo. Estos denominados efectos adversos son la consecuencia de la toxicidad directa en el tejido sano, que se obtiene como resultado de la pobre especificidad mostrada por éstos fármacos, mismos que se vuelven más frecuentes a medida que el tratamiento se intensifica. Particularmente, la neurotoxicidad central es una de las preocupaciones clínicas más importantes en pacientes pediátricos. (Gervasini & Vagace, 2012).

En este punto, es evidente que cualquier factor capaz de modificar tanto la farmacocinética como la farmacodinamia de los distintos fármacos de la quimioterapia, posee el potencial de convertirse en crítico para la aparición de efectos adversos letales en la mayoría de pacientes. Unos de estos factores es la presencia de polimorfismos genéticos en los genes de codifican enzimas metabolizantes de fármacos, transportadores o dianas farmacológicas. Los estudios de esta asociación genética en este campo se han enfocado en los parámetros de eficacia en general y particularmente en la supervivencia, siendo la asociación con la toxicidad aún escasa (Gervasini & Vagace, 2012).

2.3 Polimorfismos genéticos

El genoma humano comparte una semejanza del 99,9% entre los individuos de una misma especie, y en él, se presencian variaciones individuales en la secuencia del ADN; aunque muchas de ellas no tienen efecto sobre la información genética, pues afectan a secuencias no codificantes ni funcionales del ADN. Es entonces, ese 0,1% de variaciones en las secuencias de ADN lo que da lugar a los que se denominan como polimorfismos genéticos (Alcoceba, 2010).

El impacto que presenta progresivamente el estudio a profundidad de los polimorfismos de un solo nucleótido dentro de la secuencia del genoma humano han recopilado una serie de datos que demuestran el fundamento genético de la asociación genética de muchas enfermedades así como también la presencia de toxicidad y eficacia de los diferentes protocolos farmacoterapéuticos empleados. Es la farmacogenética adicionalmente, quien se encarga de explicar las diferencias de individuo a individuo frente al tratamiento alopático, la cual podría también establecer un fuerte valor predictivo de la respuesta del paciente al fármaco (C. Sánchez, Gutierrez, Gómez, Gómez, & Briceño, 2015).

Los polimorfismos pueden abarcar desde la modificación de una sola base hasta cambios en el número y/o tamaño en la unidad de repetición.

Pueden clasificarse en función del tipo de cambio que se genera:

- Polimorfismos de secuencia: producidos por el cambio de uno o más nucleótidos en una secuencia del ADN pero sin modificación de tamaño.
- Polimorfismos de longitud: producidos por la inserción de uno o más nucleótidos.

Se los puede denominar además en base al número de alelos presentes:

- Polimorfismos bialélicos: únicamente se pueden presentar con dos variantes posibles, perteneciendo en este grupo los polimorfismos de nucleótido simple (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) de los que se hablará en detalle, pues son los de mayor relevancia y aplicabilidad clínica hasta el momento.
- Polimorfismos multialélicos: manifiestan más de dos variantes para el mismo locus (Alcoceba, 2010).

2.3.1 Polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP)

Un polimorfismo se lo considera como tal cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es superior al 1%, razón por la cual se distinguen de las mutaciones y pueden localizarse por todo el genoma. La mayoría de los SNP's poseen dos alelos, mismos que se encuentran representados por una sustitución de base por otra. Con enfoque en las poblaciones, este tipo de alelos se catalogan en alelo principal o "silvestre" y alelo raro o mutante, categorización con base en la frecuencia observada en las diferentes poblaciones y en vista a que los humanos son diploides, una persona puede poseer uno de tres genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto, u homocigoto para el alelo menos frecuente.

En la actualidad, en el "dbSNP" (base pública de datos de PNS, dbSNP's por sus siglas en inglés), se relata que los SNP's existen uno cada 200 pares de bases en el genoma humano, y en base a ello se interpretaría que existen alrededor de 6 millones de SNP's en el genoma; muchos de ellos ya descritos en el dbSNP (Caratechea, 2007).

Los SNP's pueden manifestarse en zonas codificantes y generar un cambio en un aminoácido, conocidos como "no sinónimos"; y puesto a que los mismos alteran

directamente la función de la proteína, los estudios se enfocan mayoritariamente en la asociación genética de esta clase de variaciones. A diferencia de estos, existe otro tipo de SNP's conocidos como "sinónimos", mismos que no generan alteración en la conformación del gen como tal (Caratechea, 2007).

2.4 Vía del folato y la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

Es necesario describir de antemano el ciclo del folato para así comprender cuan involucrada está la enzima MTHFR en el mismo, ya que es ésta una de las principales enzimas polimórficas involucrada en el metabolismo de la quimioterapia de la LLA (Prado Vizcaíno et al., 2011). Se sabe que en el ciclo del folato, el mismo transfiere y recibe diferentes componentes de un carbono, de donde son obtenidas varias coenzimas necesarias para la posterior producción de sustratos utilizados para posteriores reacciones de tipo enzimático potenciales a nivel biológico (Herrera, Muñoz, & Parra, 2016).

A partir del folato obtenido a nivel dietario, se consigue el tetrahidrofolato tanto dentro del hepatocito como en células de origen extrahepático. Convertido luego de varias transformaciones enzimáticas en 5,10 metilentetrahidrofolato; este compuesto se convierte en 5-metiltetrahidrofolato debido a la actividad de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y cabe denotar que ésta, es la única vía posible dentro del ciclo en donde se puede conseguir la coenzima (Herrera et al., 2016).

En una siguiente reacción, el 5-metiltetrahidrofolato se desmetila y se convierte otra vez en THF, donde la metionina sintasa es quien cataliza la reacción. En esta instancia, es el 5m-THF considerado como sustrato clave, quien es el responsable de proveer de THF a nivel celular para dar paso al inicio de un ciclo nuevamente. Lo anterior permite que el folato sea reutilizado y optimizado correctamente por parte de las células. Consecuente en adición con el ciclo de la metionina, a la cobalamina se le otorga el grupo metilo por parte de la 5m-THF. Para luego de ello participar como cofactor de la metionina sintasa para así dar paso a la remetilación de la homocisteína a metionina, utilizado en forma de sustrato para formar S-adenosín metionina (SAM); un componente considerado como metilador del ADN por excelencia ya que éste transfiere grupos metilo a las citocinas precedidas de guanina o "CpG" e histonas para de esta manera regular la expresión génica (Figura 2). (Herrera et al., 2016).

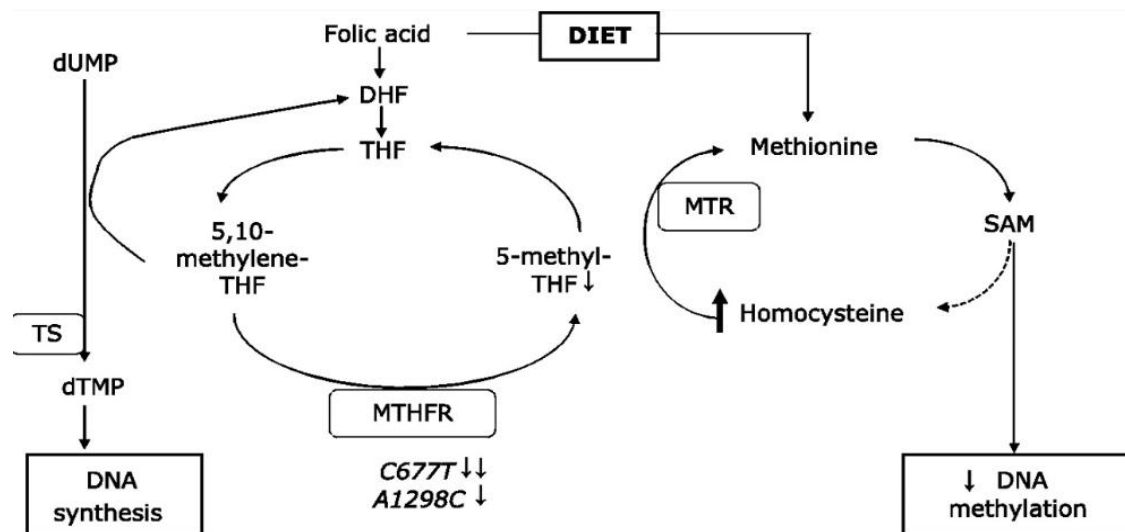


Figura 2. Esquema del ciclo del folato. DUMP, monofosfato de desoxiuridina; DHF, dihidrofolato; THF, tetrahidrofolato; MTR, metionina sintasa; SAM, S-adenosil-L-metionina; TS, timidilato sintasa; dTMP, monofosfato de desoxitimidina; MTHFR, metilentratridrofolato reductasa. Fuente: (Hung et al., 2007)

Se conoce que la enzima MTHFR participa en las reacciones de metabolización o de biotransformación de fase II, las cuales son conocidas como reacciones de conjugación en donde el fármaco en forma de metabolito derivado de la fase I aumenta su volumen ya que logra adherirse a un sustrato de tipo endógeno, por lo que el fármaco queda inactivo y posteriormente se facilita su eliminación. A través de estas reacciones son la mayoría de fármacos quimioterápicos especialmente antimetabolitos quienes son inactivados. Dentro de este grupo se encuentra el metotrexate, quien actúa sobre el ciclo celular inhibiendo la MTHFR; es por eso que aquellos pacientes con LLA que presenten una baja actividad endógena, poseen un mayor riesgo de padecer toxicidad gastrointestinal así como hematológica inducida por el fármaco. (Prado Vizcaíno et al., 2011).

En cuanto a la participación de MTHFR en la susceptibilidad al cáncer, ésta puede surgir mediante su participación en distintas vías del metabolismo del folato. Por un lado, mediante varios procesos de metilación dependientes de S-adenosilmetionina (SAM), y por el otro, a través de la síntesis de timidilato que contribuye a la replicación del ADN y la división celular. Al encontrarse la actividad de MTHFR reducida, la metilación de la homocisteína a metionina también disminuirá, al igual que lo hará el nivel de SAM; provocando una hipometilación del ADN. En tanto que el bajo nivel de sustrato para MTHFR que se requiere para la síntesis de timidilato, conduciría a la

incorporación incorrecta de uracilo en el ADN, y por consiguiente el aumento de roturas y daños cromosómicos. Las variantes polimórficas en el gen *MTHFR* parecen asociarse con menor riesgo a la leucemia entre otros tipos de cáncer, y ésta asociación parece derivarse del metabolismo del folato con respecto a la síntesis de timidina y purina; dando lugar a que la incorporación de uracilo en el ADN se retarde generando de esa forma protección contra el desarrollo de cáncer (Krajinovic et al., 2004) (Wiemels et al., 2001).

2.5 Polimorfismos en el gen de la enzima MTHFR

El gen de la enzima MTHFR, codifica una proteína con una extensión de 656 aminoácidos y masa molecular alrededor de los 74.5 kDa, se ubica en la banda 36.3 del cromosoma número 1 en donde su secuencia complementaria mide 22 kb y tiene 11 exones; ésta como ya se expuso, constituye una enzima clave en el ciclo del folato y también de la homocisteína (Herrera et al., 2016).

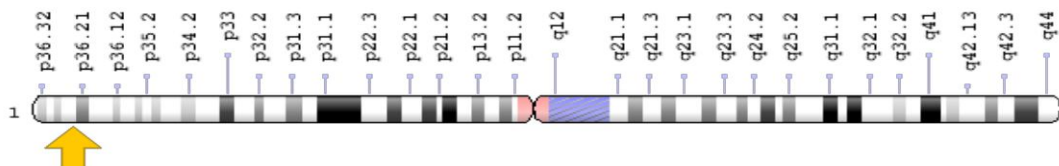


Figura 3. Ubicación citogenética del gen MTHFR. Fuente: (GRH, 2009)

Las variantes más estudiadas de los genes que participan en las rutas metabólicas de ciertos fármacos antifolatos utilizados en la terapia de la LLA como por ejemplo el metotrexato, corresponden a las del gen de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Como se mencionó, la enzima MTHFR es fundamental para la homeostasis y metabolismo de los folatos partícipes de la remetilación de la homocisteína, lo cual a su vez es clave para la remetilación del ADN. Entonces, si la actividad de la enzima se encuentra disminuida, esto podría dar paso a alteraciones en la reducción de folatos e hiperhomocisteinemia, y es ahí donde logra verse afectada la actividad y por ende la toxicidad de los distintos fármacos implicados (Godoy, 2018).

Se han descrito por lo menos 15 polimorfismos para este gen, sin embargo en su mayoría, los estudios apuntan a dos particulares y frecuentes polimorfismos: 677C>T y 1298A>C (Godoy, 2018). Estas dos variantes son las que conducen a una marcada

disminución en cuanto a la actividad enzimática como se verá con más detalle para cada polimorfismo. La variabilidad de los niveles de actividad enzimática es la que modifica la posible susceptibilidad a ciertas enfermedades como por ejemplo: cierre de tubo neural, trombosis y varios tipos de cáncer como lo es la LLA, y dentro de ésta se ha hecho hincapié en los últimos años en como la variación de actividad enzimática puede modular la respuesta a drogas como el MTX (Dres, D´Aloi, Chertkoff, & Felice, 2007).

Es conocido que la incidencia de reacciones adversas en la farmacoterapia de LLA manifiesta dependencia con el estado nutricional del paciente, según lo afirmó Marqués et al. Entonces, al influir estas variantes polimórficas con el estado del folato mediante la disminución de la actividad enzimática de MTHFR que en ella se generan, es posible relacionar el estado nutricional de los individuos, así como algunos indicadores bioquímicos dependientes del estado de folato. Esto con el fin de encontrar asociaciones que se sustenten en base a la presencia de estos polimorfismos (Herrera et al., 2016) (Marqués, Pérez, Romero, Espinosa, & Ruiz, 2016).

2.5.1 Polimorfismo *MTHFR* 677C>T (rs1801133)

El polimorfismo 677C>T o C677T provoca la sustitución de una citosina por una timina en el nucleótido posicionado en 677 del gen *MTHFR*, lo cual muestra una sustitución del aa alanina por una valina perteneciente al dominio catalítico de la enzima (Urbina, Hernández, Ramírez, Barroso, & Cavazos, 2006). La combinación alélica homocigota C/C manifiesta el genotipo silvestre con función enzimática normal, mientras que al combinar el alelo genotipo C/T con el homocigoto T/T, lo que resulta es la expresión de un genotipo que codifica enzimas deficientes en cuanto a su principal función de reductasa alrededor del 30 y 60% según corresponde (Herrera et al., 2016).

La prevalencia de éste polimorfismo varía de población a población, se ha registrado una frecuencia proporcional de 0.45 en hispanos de Atlanta y California, incrementándose en la población francesa y japonesa con el 0.36 y 0.34 respectivamente (Gutiérrez, 2016).

Las alteraciones en la función enzimática que se conducen por la forma mutada son reflejadas en una disminución de la estabilidad de la proteína durante la incubación *in vitro* de los linfocitos de sujetos afectados mientras son expuestos a una temperatura de 46°. Puesto a que la mutación es autosómica recesiva, y la enzima MTHFR en

individuos homocigotos T/T muestra una baja actividad específica y una estabilidad reducida *in vitro*, se la denomina termolábil (Salas, Martínez, Castañón, & Martínez, 2001).

Al hablar de las condiciones de deterioro del estado de folato, el genotipo mutado T/T se considera como perjudicial y dañino puesto a que está estrechamente asociado con una elevada concentración de Hcy total plasmática, alto riesgo de presentar defectos del tubo neural y neoplasias colorrectales, así como también predisponer a los individuos a efectos adversos de derivados de fármacos antifolatos (Ueland, Hustad, Schneede, Refsum, & Vollset, 2001).

Sin embargo hasta hoy, los estudios que reflejen lo anterior aún son contradictorios. Argüelles et al., al analizar un grupo de pacientes con LLA, concluyeron que la mucositis inducida por metotrexato en pacientes con leucemia aguda escasamente está relacionada en portar el alelo T de este polimorfismo (Argüelles, Linares, Garcés, & Núñez, 2007).

Otros estudios clínicos declararon que existe una correlación relevante entre el genotipo de la variante C677T y un mayor riesgo de manifestar eventos adversos después del tratamiento con metotrexato, sólo o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos, esto; en pacientes que fueron sometidos a trasplante de células hematopoyéticas, pacientes con leucemia aguda, con linfoma no Hodgkin, cáncer de ovario y de mama y en pacientes con artritis reumatoide. Se sugiere que la base bioquímica de la mayor toxicidad relacionada con el de la MTHFR se ha asociado con la elevación del nivel de homocisteína en plasma debido a esta variante. Lo expuesto, refleja una deficiente conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato en 5-metiltetrahidrofolato, y la modificación en el conjunto de folatos intracelulares que revocaría en el aumento del efecto tóxico de MTX (De Mattia & Toffoli, 2009).

2.5.2 Polimorfismo *MTHFR* 1298A>C (rs1801131)

El segundo polimorfismo presente en el gen *MTHFR* se refiere a la transición A1298C, donde se presenta un cambio de (A) a (C) en la posición 1298 del exón 7, pues en la enzima presenta la sustitución de alanina por glutamato en el aminoácido 429 que forma parte del dominio regulador de la enzima S-adenosilmetionina (SAM). La unión de SAM es lo que da como resultado a cambios conformacionales dentro de la enzima MTHFR. Se ha demostrado que los linfocitos de individuos con genotipo mutado (C/C),

muestran una disminución de la enzima al 60% respecto al alelo salvaje (Y. P. Vizcaíno et al., 2011) (Urbina et al., 2006) (Robien & Ulrich, 2003).

La frecuencia de la población referente a este polimorfismo es aún incierta, sin embargo algunos estudios poblacionales manifiestan que el alelo C mutado en la población asiática, varía del 0.17 al 0.19, mientras que en Europa Occidental su frecuencia se incrementa con una variación del 0.27 al 0.36. Muy poco se conoce de la frecuencia alélica en poblaciones de Sudamérica (Robien & Ulrich, 2003).

Con respecto al papel del polimorfismo A1298C en la modulación del desarrollo de eventos adversos graves después de la terapia con MTX, hasta la fecha se dispone de datos escasos y poco concluyentes. En entornos tumorales, solo existe una investigación clínica publicada, realizada en pacientes con linfoma no Hodgkin de alto grado que reciben quimioterapia con antifolatos como el metotrexate, el cual ha demostrado una correlación significativa entre el genotipo 1298CC y un mayor riesgo de desarrollar mucositis grave (De Mattia & Toffoli, 2009).

Es evidente que se ha investigado menos el efecto de 1298A>C en la modulación de la eficacia de la terapia en pacientes con leucemia. Un análisis preliminar ex vivo de linfoblastos de pacientes pediátricos con LLA puso de manifiesto que el genotipo 1298AC predispone a una disminución de la sensibilidad de metrotexato en comparación con los genotipos CC y AA. Sin embargo, este papel significativo descrito para el genotipo heterocigótico es difícil de explicar y debe considerarse como sólo exploratorio (De Mattia & Toffoli, 2009).

Un estudio reciente realizado a un grupo de pacientes quienes presentaban toxicidad hematopoyética, hepática además de mucositis, evidenció que el polimorfismo 1298A>C no se asoció con ninguna de las toxicidades mencionadas, atribuyendo su relación con el genotipo mutado de 677C>T (Suthandiram et al., 2014).

En general, la contrariedad de los resultados manifestados en las mayoría de estudios para ambos polimorfismos probablemente pueden deberse a la utilización de distintos protocolos de tratamiento, así como la inclusión de más de una etnia en los estudios y particularmente a la heterogenicidad de los parámetros de eficacia (Godoy, 2018).

CAPÍTULO 2

3. Materiales y Métodos

3.1.1 Tipo de Estudio

Es un estudio de tipo transversal descriptivo.

3.1.2 Universo de estudio

El universo de estudio estuvo conformado por pacientes en edad pediátrica que fueron diagnosticados de Leucemia Linfoblástica Aguda, quienes al momento del estudio comprendían edades iguales o inferiores a 18 años; los cuales fueron provenientes tanto de SOLCA - Cuenca como de SOLCA – Loja y que además cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión del estudio (Tabla 7) . El protocolo llevado a cabo cumplió tácitamente con los criterios bioéticos de la Declaración de Helsinki; y además, al ser el presente trabajo de titulación parte del proyecto **“Translocaciones cromosómicas y polimorfismos genéticos de enzimas de la vía del folato y de transportadores de metotrexate como posibles marcadores predictores de la toxicidad en niños con Leucemia Linfoblástica Aguda”**, cuenta con la aprobación del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito (Aprobación MSP, Oficio No MSP-VGVS-2016-0244-O) (Anexo 4).

3.1.3 Área de estudio

El desarrollo del estudio se llevó a cabo en la provincia del Azuay, cantón Cuenca. El mantenimiento de las muestras, la extracción del ADN, así como la determinación de los polimorfismos mediante la técnica PCR en tiempo real, tuvo lugar en el laboratorio de biotecnología perteneciente a la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay.

3.2 Muestreo

El muestreo realizado fue de tipo aleatorio simple, lo cual refiere que todos los participantes que forman el universo de estudio, tienen igual probabilidad de ser seleccionados.

El tamaño de la muestra se determinó en función de un estudio piloto, mismo que se realizó con todos los pacientes con Leucemia linfoblástica aguda que se dispusieron tanto en SOLCA-Cuenca como en SOLCA-Loja y que se encontraban en fase de consolidación; realizándose así el estudio en 160 pacientes entre ambas localidades.

A cada uno de los pacientes o tutores de los mismos en su defecto, se les informó acerca del propósito del estudio, quienes habiendo cumplido con los criterios de inclusión del mismo (Tabla 2), de manera voluntaria dieron su aceptación a través del consentimiento (Anexo 2) y asentimiento informado (Anexo 3). La recolección de datos tanto sociodemográficos como antropométricos, se obtuvo mediante el acceso a las historias clínicas de los pacientes en estudio, entregados como base de datos de Microsoft Excel por parte del personal de salud de ambas instituciones.

3.2.1 Criterios de selección

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión para los participantes del proyecto.

Criterio de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none">✓ Pacientes de sexo masculino y femenino en edad pediátrica con tratamiento de MTX✓ Pacientes de cualquier procedencia geográfica y etnia.✓ Diagnóstico de cualquiera de las variedades de LLA (L1, y L2), procedentes de SOLCA Loja y Cuenca y que se encuentren en tratamiento.✓ Consentimiento y asentimiento informado con firma respectiva	<ul style="list-style-type: none">✓ Niños o niñas con diagnóstico concomitante de LLA portadores de VIH, síndrome de Down u otro tipo de enfermedad oncológica.

3.3 Procedimientos

3.3.1 Toma de muestra

El proceso de toma de muestras fue realizada por el personal de salud correspondiente, en SOLCA-Cuenca y SOLCA-Loja, esto mediante su respectivo procedimiento normalizado de trabajo que implica estricta asepsia. La totalidad de las muestras tomadas se mantuvieron en cadena de frío entre 4 y 8° C hasta que fueron transportadas hasta el laboratorio de biotecnología perteneciente a la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay.

3.3.2 Extracción de ADN

Para la extracción del ADN, se trabajó con PureLink™ Genomic DNA Mini Kit de Invitrogen para un total de 250 extracciones con serie de catálogo correspondiente a K1820-02, con el cual se logró la extracción del material genómico de alto rendimiento y pureza, en este caso a partir de cada una de las muestras de sangre total, cuya tecnología de aislamiento radica en una columna de sílice. A continuación se muestran los componentes con su respectivo contenido que se incluyen en el Mini Kit PureLink™ Genomic DNA de Invitrogen (Tabla 3), mismos que pueden ser almacenados a temperatura ambiente libre de humedad.

Tabla 3. Componentes del PureLink™ Genomic DNA Mini Kit de Invitrogen para 250 extracciones.

Componente	K1820-02 250 Preparaciones
PureLink™ Genomic Buffer de Lisis	50 ml
PureLink™ Genomic Buffer de digestión	45 ml
PureLink™ Genomic Buffer de lavado 1	50 ml
PureLink™ Genomic Buffer de lavado 2	37.5 ml

Tabla 3. (Continuación)

PureLink™ Genomic Buffer de elución (10mM Tris-HCl, pH 9.0 + 0,1mM EDTA)	50 ml
RNasa A (20 mg / ml) en 50 mM tris-HCl pH 8.0 10mM EDTA)	5 ml
Proteinasa K (20 mg / ml) en buffer de almacenamiento	5 ml
Columnas giratorias PureLink™ con tubos de recolección	5 x 50 cada una
Tubos PureCink™ de colección (2,0 ml)	5 x 100

Fuente: (Autora, 2019)

Es necesario mencionar que el desarrollo del proceso incluye además el uso de etanol absoluto preferiblemente entre el 96% y el 100%, mismo que no se incluye en el Kit en mención (Thermo Fisher, 2016).

3.3.2.1 Fundamento y procedimiento

El protocolo utilizado en base al prospecto del proveedor consta de cuatro etapas bien diferenciadas: Lisis celular, purificación, lavado y elución, como se indica en la Figura 4. El proceso se basa en la unión selectiva del ADN a la membrana a base de sílice en presencia de sales caotrópicas. Las células se digieren con proteinasa K a 55 °C mediante una formulación de tampón de digestión optimizada que ayuda tanto a la desnaturalización de proteínas como a la actividad de la Proteinasa K. Cualquier ARN residual es eliminado por digestión con RNasa A antes de unir las muestras a la membrana de sílice.

El lisado combinado con etanol absoluto y PureLink® Genomic Buffer de lisis lo que provoca es una unión lo suficientemente alta a la columna giratoria PureLink®. El ADN como tal logra unirse a la membrana de sílice en la columna y los residuos o impurezas sobrantes son finalmente eliminadas mediante un lavado completo con tampones de lavado. El ADN como paso final se eluye sobre un tampón de elución con mínimo contenido de sales (Thermo Fisher, 2016).

El proceso en su totalidad fue desarrollado paso a paso dentro de la Cabina de Flujo CSB C4.

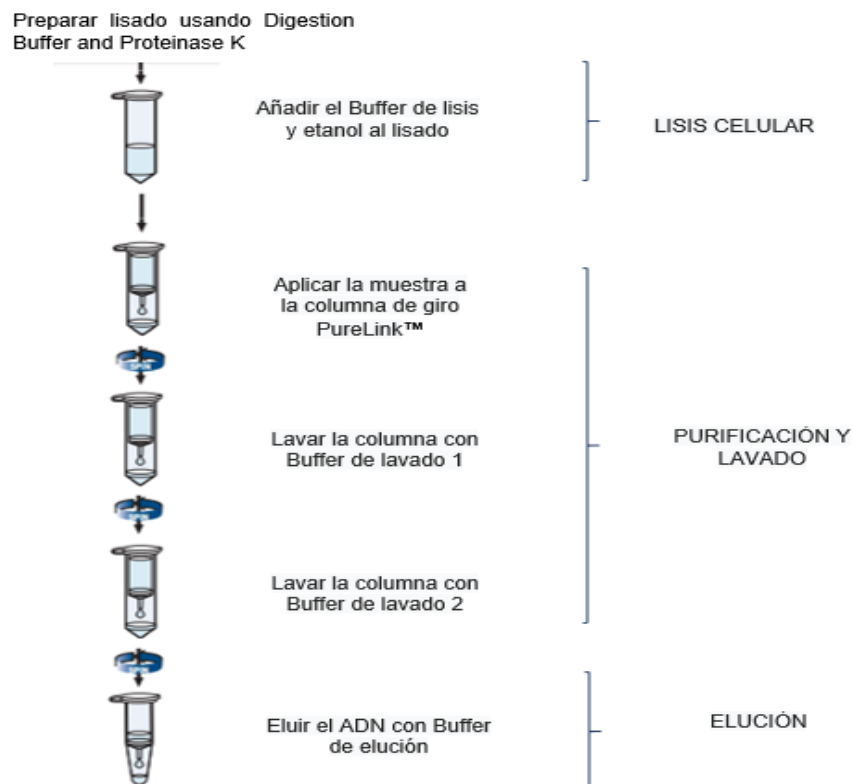


Figura 4. Síntesis del proceso de extracción de ADN. Fuente: (Thermo Fisher, 2016)

Preparación del Lisado

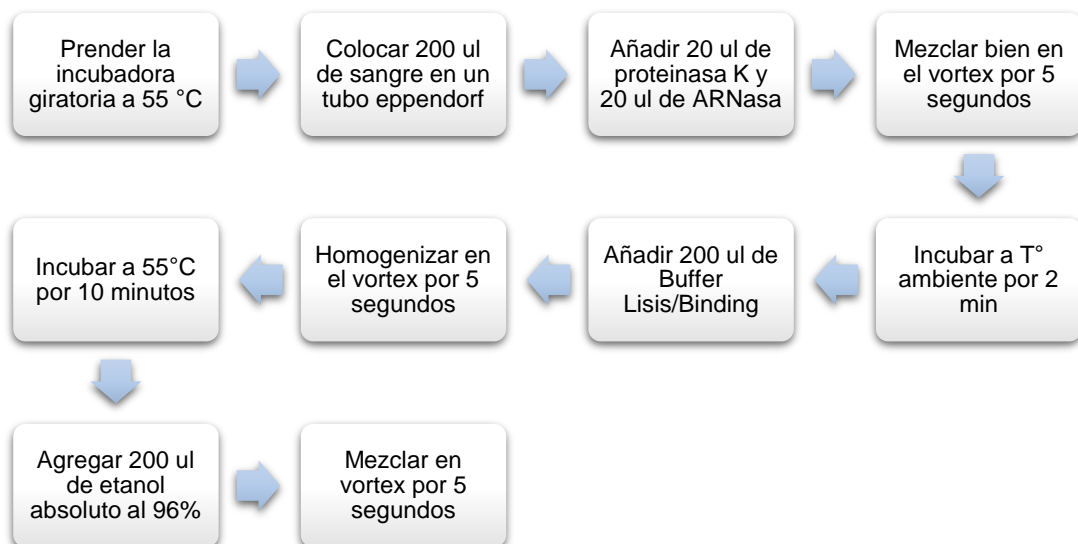


Figura 5. Procedimiento para el lisado de células en la extracción de ADN.

Purificación y lavado del ADN

Se prepararon previamente los buffer de lavado 1 y 2, a los cuales se le agregó 15 ml y 17,5 ml de etanol al 96% según corresponde.

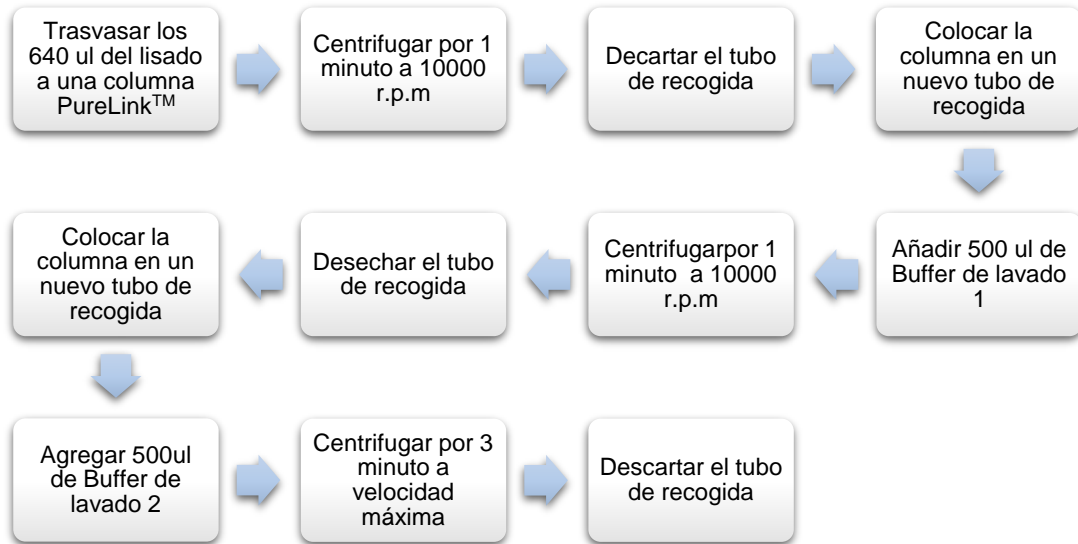


Figura 6. Procedimiento para la purificación y lavado de células en la extracción de ADN.

Elución y mantenimiento del ADN

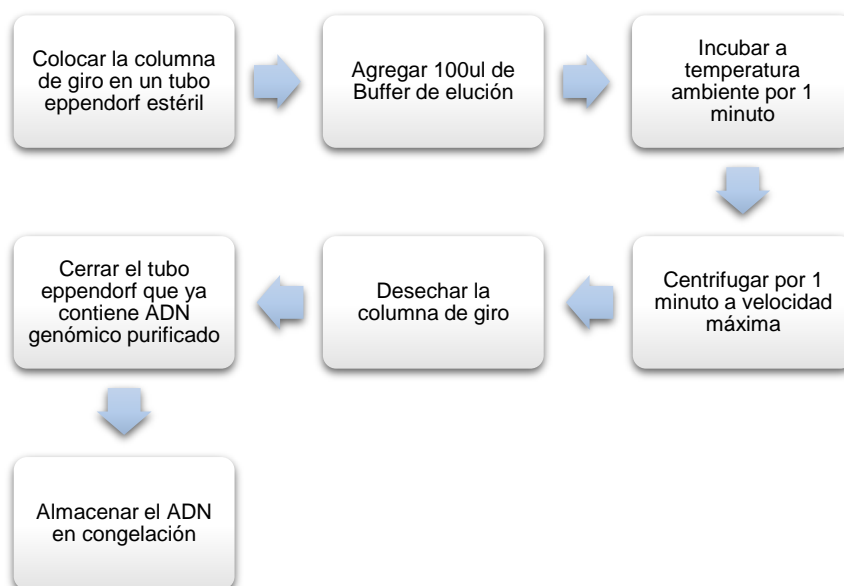


Figura 7. Procedimiento de elución de ADN y su almacenamiento.

Tabla 4. Materiales y equipos para la extracción de ADN.

Materiales	Equipos
Pipetas automáticas FINNIPIPETTE®F2 10ul	Agitador vortex DAIGGER
Pipetas automáticas FINNIPIPETTE®F2 100ul	Centrifuga Eppendorf centrífuge
Pipetas automáticas FINNIPIPETTE® 1000ul	Cabina de Seguridad Biológica CSB C4
Puntas estériles QPS 10 ul	Estufa eléctrica
Puntas estériles QPS 100 ul	Refrigerador Kelvinator®
Puntas estériles QPS 1000 ul	
Tubos eppendorf de 1,5 ml estérile libres de DNasa	
Papel de aluminio	

Fuente: (Autora, 2019)

3.3.3 Cuantificación y electroforesis del ADN

Posterior a la extracción y purificación del material genómico, se procedió a realizar una elecctroforesis y cuantificación del mismo, cuyo propósito fue comprobar la pureza del ADN, así como evidenciar el rendimiento del protocolo utilizado en la extracción.

La espectrofotometría UV/Visible permite la confirmación de que se cuente con suficiente cantidad de ADN de calidad antes de llevar a cabo ensayos de PCR en tiempo real, análisis de polimorfismos de nucleótido simple entre otros (Rodríguez, 2014). Por otro lado, la integridad del ADN se puede sustentar mediante electroforesis en gel de agarosa, el cual si se encuentra integro, se manifiesta como una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó la mezcla de ADN (Velázquez, Martínez, & Romero, 2012).

3.3.3.1 Cuantificación de ADN por espectrofotometría

Fundamento

Como ya se conoce, ambas cadenas de ADN presentan bases aromáticas nitrogenadas, y es a causa de su existencia que los los ácidos nucleicos absorben

eficazmente la luz ultravioleta; pues es ésta particularidad la que se utiliza para obtener su concentración (UNAM, n.d.).

La espectrofotometría reporta la concentración de una muestra como un resultado bastante simple y a la vez preciso, sin embargo para que ello suceda, el material sujeto a lectura debe encontrarse en estado puro; esto es con la mínima o nula contaminación de proteínas o materiales orgánicos, ya que los mismos podrían absorber longitudes de onda muy cercanas (Quilmes, 2010). Para la estimación de la pureza del ADN se considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas (Velázquez et al., 2012).

Procedimiento para la cuantificación de ADN por espectrofotometría

Para determinar la concentración de las muestras de ADN se empleó el espectrofotómetro de Microplacas Epoch, el cual permitió trabajar con volúmenes de muestras pequeñas de 2ul para su cuantificación directa mediante el protocolo de la placa Take3 y a través del Software Gen5, y que con una longitud de onda entre 260 y 280nm, reportó resultados obteniéndose un promedio de dos lecturas; siendo tales valores finales los que se utilizaron para realizar cálculos próximos.

El proceso se considera fácil y bastante rápido, pues luego de ajustar el equipo con 2ul de Buffer de elución, se colocaron 2ul de las muestras sin diluir en la placa por duplicado y se procedió a obtener la concentración de las mismas.

3.3.3.2 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Fundamento

La electroforesis en gel de agarosa es utilizada generalmente para separar moléculas en función de su carga, tamaño y forma, pues se trata de un medio de separación particularmente eficaz para las biomoléculas cargadas como el ADN, el ARN y las proteínas (EDVOTEK, 2016).

Entonces, para proceder a separar el ADN en base a la electroforesis en gel de agarosa, el ADN se deposita en micro pozos definidos previamente, adicionándose a

esto la aplicación de una corriente determinada. Partiendo de que la molécula de ADN está cargada negativamente debido a su citoesqueleto de fosfato, al colocarse sobre un campo eléctrico, los fragmentos de ADN lo que hará es migrar a la carga positiva del ánodo. Puesto a que el ADN tiene una uniforme relación masa / carga, las moléculas de ADN se separan por tamaño en el gel de agarosa en un patrón tal que la distancia recorrida es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular (Lee, Costumbrado, Hsu, & Kim, 2012) (Quilmes, 2010).

La utilización de marcadores de tamaño conocido permite calcular los pesos moleculares de las muestras de DNA problema. Estos pueden ser el bromuro de etidio o SYBER-Safe en este caso, sustancias, que se intercalan entre las bases del DNA y son fluorescentes cuando se ilumina con luz ultravioleta. Posterior a la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de DNA aplicado y los marcadores de peso molecular (Peña, Dapena, Galisteo, Ruiz, & Alfonso, 2006).

Procedimiento:

1. Preparar el gel de agarosa en un matraz disolviendo en calor 0,96 gramos de agarosa en 80ml de TAE (Tris, Acetato, EDTA) por un minuto y medio
2. Agregar 8ul de SYBR Safe y mezclar uniformemente, para después colocar la mezcla en la bandeja la cual ya fue asegurada sus lados con cinta adhesiva y colocado el peine previamente.
3. Esperar que solidifique y retirar el peine con cuidado
4. Preparar las muestras agregando sobre papel parafilm 2ul de Loading DNA Buffer más 5ul de muestra de ADN y homogenizar.
5. Colocar en los pocillos cuidadosamente las muestras en la cámara de electroforesis la cual ya contiene el gel de agarosa y alrededor de 700ml de TAE.
6. Agregar a los costados 5ul del marcador de peso molecular LADDER DNA.
7. Prender el equipo a la fuente de 100V durante 35 minutos.

3.3.4 Amplificación de ADN mediante la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)

Fundamento y procedimiento

Para desarrollar la amplificación de ADN y lograr determinar la ausencia o en su defecto la presencia de los polimorfismos C677T y A1298C de la enzima MTHFR, se basó en la Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR), reacción de tipo enzimático efectuada in vitro, la cual amplifica repetidas veces una secuencia específica de ADN a lo largo de varios ciclos definidos que se ejercen una y otra vez, y donde tal secuencia blanco es fielmente copiada. Para lograrlo, la reacción ocupa la actividad de la enzima ADN polimerasa ya que la misma tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. El término en tiempo real se enfoca a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción pues su objetivo sigue siendo el de detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácido nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

Con base de la premisa de que partiendo de un ADN molde la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir de la zona de doble cadena originada por la unión de los cebadores al molde, el proceso consta de tres fases: desnaturalización, hibridación y elongación.

La primera fase es la desnaturalización: En donde las dos cadenas de ADN se separan, llevándose a cabo elevando la temperatura generalmente a 94°C para así romper los puentes de hidrógeno que las unían y que de ésta manera cada cadena quede como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN.

La segunda fase es la hibridación: Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los primers al extremo 3' a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar y para ello la temperatura se descende entre 40 y 60°C.

La tercera fase es la elongación: En ésta etapa final, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y comienza su acción catalítica a una rápida velocidad agregada de dNTP's complementarios para originar las cadenas completas de ADN. La elongación de las cadenas es en dirección de las síntesis del ADN, de 5' a 3' y su temperatura considerada como óptima es de 72 °C (Tamay de Dios et al., 2013) (Díaz, Rentería, Cortez, & Palacios, 2014).

Para ejecutar la amplificación del ADN mediante la PCR en tiempo real se utiliza un sistema de detección que utiliza sondas de hibridación específicas, las cuales vienen marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El sistema se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos

moléculas. Para ellos, se utilizaron en el estudio las sondas de hidrólisis TaqMan®, que son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5´ que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3´ que absorbe por parte del donador fluorescencia liberada. Durante la amplificación de ADN diana, la sonda es hibridada a su cadena complementaria, y mientras se desplaza a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa *Thermus aquaticus* con actividad de 5´ exonucleasa, lo que hace es hidrolizar el extremo libre 5´ de la sonda empleada, liberándose finalmente el fluorocromo donador. Así entonces, como donador y aceptor se encuentran especialmente alejados, la fluorescencia emitida por el donador es captada por el lector (Costa, 2004).

Para el desarrollo de la técnica se trabajó con el termociclador IANLONG Real Time PCR System TL, siendo compatible con las siguientes sondas empleadas:

- a) La sonda Taqman® del polimorfismo rs1801133 con serie de ensayo: C__1202883_20, permitió identificar en las muestras de ADN el siguiente cambio: presencia del alelo A y ausencia del alelo G, en la secuencia: GAAAAGCTGCGTGATGATGAAATCG[G/A]CTCCCGCAGACACCTTCTCCTTCAA.
- b) La sonda Taqman® del polimorfismo rs1801131 con serie de ensayo: C__850486_20, que permitió identificar en las muestras de ADN el siguiente cambio: presencia del alelo T y ausencia del alelo G, en la secuencia: AAGAACGAAGACTTCAAAGACACTT[G/T]CTTCACTGGTCAGCTCCTCCCCCA.

Las sondas vienen marcadas con los fluorocromos VIC y el FAM; el primero para detectar la secuencia de alelo 1 o silvestre y el segundo para detectar el alelo 2 o alelo mutado. Para las respectivas determinaciones, además se utilizará la Taqman® Genotyping Master Mix de Applied Biosystem®, correspondiente al número de ensayo 4351379 (Thermo Fisher, 2016).

3.3.5 Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real

Para la estandarización de la técnica de ambos polimorfismos, se desarrollaron varios ensayos, los cuales constaron de los siguientes pasos:

1. Partir con tres muestras de ADN de concentración ya conocida, mismas que contengan no menos de 20ng/uL, para luego ser diluídas a una concentración

de 15 ng/ul de las mismas, pues se sostuvo en consideración que para su uso, las sondas TaqMan® especifican que se debe trabajar con una concentración igual o mayor a 2ng de material genómico.

2. Realizar los cálculos de los componentes para 10, 15 y 20ul de volumen de reacción.
3. Medir los volúmenes para los tres tipos de reacción siguiendo el orden que indica la Tabla 5.
4. Programar los ciclos, tiempo y temperatura para la qPCR que indica el proveedor (Tabla 5) y poner en marcha la reacción de amplificación.
5. Elegir la condición de reacción en la que mejor se haya ejemplificado la curva de amplificación, misma que fue la de 15ul por reacción.

Tabla 5. Condiciones para la reacción de amplificación de estandarización.

Componentes	Reacción/10ul	Reacción/15ul	Reacción/20ul
Sonda 20x TaqMan®	0,5ul	0,75ul	1ul
Mater Mix 2x TaqMan®	5ul	7,5ul	10ul
H ₂ O Ultra pura tipo II	1,8ul	2,75ul	3,7ul
ADN	2,7ul	4ul	5,3ul
Volumen final por reacción	10ul	15ul	20ul

La programación para la reacción de amplificación será estandarizada con un Hold de 600 segundos a una temperatura de 95°C, 50 ciclos efectuados a temperatura de 95°C por 15 segundos y finalmente 60°C por 60 segundos.

Fuente: (Autora, 2019)

3.3.6 Determinación de los Polimorfismos C677T (rs1801133) y A1298C (rs1801131)

1. Dependiendo del número de reacciones a realizar se efectuaron previamente los cálculos de los componentes para la reacción, adicionando una reacción extra por cada diez muestras del número total de reacciones.
2. Se procedió a diluir la sonda TaqMan® de concentración 40x en partes iguales con Buffer Tris EDTA 10:1 para así llegar a una concentración 20x como especifica el protocolo.
3. Se midió en un tubo eppendorf el volumen de cada componente como indica la Tabla 6 en el orden: sonda TaqMan®, Mater Mix 2x TaqMan®, y agua ultra

pura tipo 2.

4. Se homogenizó muy bien la mezcla asegurando con papel aluminio que no ingrese en lo posible luz a la misma y manteniéndola en frío antes de usarla.
5. Se agregó 11ul de la mezcla a cada pocillo de las placas para PCR, verificando que no exista la formación de burbujas.
6. Se añadió 4ul de cada una de las muestras a excepción del pocillo correspondiente al blanco de la reacción.
7. Se llevó a cabo la amplificación una vez programado el equipo acorde a las condiciones que indica la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de la reacción de amplificación para los polimorfismos rs1801133 y rs1801131.

Componente de la reacción	Volumen por reacción
Master Mix 2X (dinucleótidos)	7.5ul
Sonda C__1202883_20/ C__850486_20	0.75ul
Agua Ultra pura tipo II	2.75ul
Muestra de ADN	4ul
Volumen Total	15ul

Las condiciones para la reacción de amplificación utilizan un Hold de 600 segundos a 95°C, 50 ciclos efectuados a 95°C por 15 segundos y 60°C por 60 segundos.

Fuente: (Autora, 2019)

El proceso de preparación de las muestras tuvo lugar en su totalidad antes de ser procesadas en el equipo IANLONG Real Time PCR System TL, dentro de la cabina de seguridad biológica CSB C4 esterilizada previamente durante 30 minutos con luz UV.

Tabla 7. Materiales, reactivos y equipos para el desarrollo de la qPCR.

Materiales	Reactivos	Equipos
Pipetas automáticas FINNIPIPETTE®F2 10ul	Sondas TaqMan® 40x	IANLONG Real Time PCR System TL 988
Pipetas automáticas FINNIPIPETTE®F2 100ul	TaqMan® Genotyping Master Mix 2x	Cabina de seguridad biológica CBD C4

Tabla 7 (Continuación)

Pipetas automáticas FINIPIPETTE® 1000ul	Agua ultra pura tipo II	Refrigerador Kelvinator ®
Puntas estériles QPS 10 ul	Muestra de ADN diluida a 15ng/ul	
Puntas estériles QPS 100 ul	Buffer Tris EDTA 10:1	
Puntas estériles QPS 1000 ul		
Tubos eppendorf de 1,5 ml estérile libres de DNasa		
Placas para PCR de 96 tubos		
Tapas y strips de ocho microtubos para PCR		
Gradilla de plástico para 80 microtubos eppendorf (1,5- 2,0ml)		
Papel aluminio		
Material de bioseguridad		

Fuente: (Autora, 2019)

3.3.7 Interpretación de los resultados

El equipo IALONG Real-Time PCR System en compatibilidad con el programa de lectura Real-time Fluorescence qPCR emitieron las mediciones de fluorescencia recolectadas durante la lectura de la placa posterior a la PCR; éstas se reflejaron con la proyección de las curvas de los alelos que se amplificaron en la reacción. Así entonces, se discriminaron las muestras según la curva de los canales proyectada por los fluoróforos: VIC para el alelo 1 u homocigoto silvestre mostrándose de color verde, FAM para el alelo 2 u homocigoto mutado de color azul, o en su defecto heterocigoto VIC y FAM para la presencia de ambos alelos, donde se mostró la proyección de ambas curvas tanto verde como azul (Anexo 5). No existió ninguna curva proyectada en los sitios correspondientes al blanco de la reacción, mientras que los resultados fuera de los rangos de aceptación fueron sujetos a posterior verificación.

3.3.8 Análisis estadístico

Para la determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos se empleó el programa Bioinformático SNPstas del Instituto de Oncología de la Universidad de Cataluña, disponible en línea en: http://bioinfo.iconcologia.net/SNPStats_web (D´Oncología, 2006). Para el análisis estadístico de los datos y resultados obtenidos se utilizó el paquete de software SPSS versión 21, en donde se establecieron frecuencias, porcentajes, así como la asociación y correlación entre las variables, para lo cual se trabajó con un nivel de confianza del 95% mediante Chi-cuadrada (χ^2) donde un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo, el análisis de asociación del tipo de riesgo de LLA y las frecuencias genotípicas y alélicas se efectuó mediante χ^2 y odds ratio (OR).

CAPÍTULO 3

4. Resultados y Discusión

4.1 Descripción de las características de la población de estudio.

La población de estudio conformada por 160 pacientes mostró predominio por el sexo masculino 57,5%(n=92) y en un 42,5%(n=68) por el femenino, del grupo etario que se estableció, presentó igual distribución entre las edades de 6-11 y 12-18 años con el 41,9%(n=67) para ambos grupos. En cuanto al IMC, los pacientes se encontraron en su mayoría dentro del rango categórico considerado como peso normal o normopeso 58,1%(n=93), seguido de un porcentaje considerable de pacientes con sobrepeso 23,1%(n=37) y obesidad 16,3%(n=26), dejando como restante al porcentaje de la categoría de bajo peso.

El predominio del linaje de LLA correspondió a los pacientes que expresaron el inmunofenotipo para células B con el 79,4%(n=127), encontrándose los precursores para células B con un menor porcentaje 11,9%(n=19), pero ligeramente más alto que los que presentaban el inmunofenotipo para células T 6,9%(n=11); dejando el porcentaje restante para los individuos con LLA bifenotípica. Los valores de hemoglobina (75%) y hematocrito (77,5%), predominaron como normales en ambos parámetros. De la totalidad de la población en estudio se observó que los pacientes eran en su mayoría procedentes de la región sierra 72,5%(n=116%), ocupando la costa y oriente el segundo y tercer lugar respectivamente.

Tabla 8. Datos generales de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda.

	Variable	n(160)	%
Sexo	Femenino	68	42,5
	Masculino	92	57,5
Grupo etario	1-5 años	26	16,3
	6-11 años	67	41,9
	12-18 años	67	41,9
IMC	Bajo peso	4	2,5
	Normopeso	93	58,1
	Sobrepeso	37	23,1
	Obesidad	26	16,3

Tabla 8 (Continuación)

Inmunofenotipo	Células B	127	79,4
	Células T	11	6,9
	Pre-B	19	11,9
	Bifenotípica	3	1,9
Hemoglobina	Baja	23	14,4
	Normal	120	75,0
	Alta	17	10,6
Hematocrito	Bajo	19	11,9
	Normal	124	77,5
	Alto	17	10,6
Procedencia	Costa	27	16,87
	Sierra	116	72,5
	Oriente	17	10,63

4.2 Frecuencia genotípica de los polimorfismos 677C>T (rs1801133) y 1298A>C (rs1801131) del gen *MTHFR*.

Mediante el programa Bioinformático SNPStats del Instituto de Oncología de la Universidad de Cataluña se determinó la frecuencia genotípica (Tabla 9 y 10) de los SNPs 677C>T y 1298A>C correspondientes al gen *MTHFR* en los pacientes con Leucemia linfoblástica aguda del grupo de estudio.

El procesamiento de los datos ingresados obtenidos tras la ejecución de la técnica de PCR en tiempo real identificaron que, de los grupos genotípicos posibles para el SNP 677C>T se encuentran: el wild type (C/C), heterocigoto (C/T) y homocigoto mutado (T/T); se obtuvo que el grupo heterocigoto (C/T) presenta la mayor frecuencia con el 75%, en comparación con el grupo silvestre o wild type (C/C) que presentó el 25%. No se encontró población que presente el genotipo mutado.

Tabla 9. Frecuencia genotípica del polimorfismo *MTHFR* 677C>T.

FRECUENCIA GENOTÍPICA DEL SNP rs1801133 n=160		
Genotipo	N	%
C/C	40	25
C/T	120	75

En cuanto a la frecuencia del SNP1298A>C en donde los grupos genotípicos posibles son: wild type (A/A), heterocigoto (A/C) y homocigoto mutado (C/C); se obtuvo que el grupo homocigoto mutado (C/C) manifiesta la mayor frecuencia con el 82%, seguido del grupo heterocigoto con el 16% y del grupo homocigoto wild type (A/A) con el 2%.

Tabla 10. Frecuencia genotípica del polimorfismo *MTHFR* 1298A>C

FRECUENCIA GENOTÍPICA DEL SNP rs1801131 n=160		
Genotipo	N	%
A/A	3	2
A/C	25	16
C/C	132	82

4.3 Frecuencia alélica de los polimorfismos 677C>T (rs1801133) y 1298A>C (rs1801131) del gen *MTHFR*.

La frecuencia alélica al igual que la genotípica fue obtenida por el mismo medio como se detalla anteriormente, la cual reportó que, la frecuencia alélica presentada por el SNP 677C>T reportó el 38% para el alelo mutado T. En tanto que, para el SNP 1298A>C el alelo mutado presentó una frecuencia del 90%.

Tabla 11. Frecuencia alélica de los polimorfismos 677C>T y 1298A>C.

FRECUENCIA ALÉLICA n=160		
	N	%
<i>MTHFR</i> 677C>T		
Alelo C	200	62
Alelo T	120	38
<i>MTHFR</i> 1298A>C		
Alelo A	31	10
Alelo C	289	90

4.4 Asociación genotípica de *MTHFR* 677C>T y *MTHFR* 1298A>C de acuerdo a variables categóricas de la población.

Se describe a continuación la frecuencia en la que se distribuye genóticamente la población para cada parámetro, donde al realizar el análisis de la asociación entre el genotipo y los distintos parámetros categóricos (sexo, edad, IMC, inmunofenotipo, hemoglobina, hematocrito, procedencia) de la población en su totalidad, no se detectó asociación estadísticamente significativa alguna ($p > 0,05$).

4.4.1 Asociación genotípica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al sexo.

En la Tabla 12 se observa que para 677C>T es el sexo masculino quien presenta la mayor frecuencia para los individuos heterocigotos C/T con el 41.2 % y de igual manera para el grupo homocigoto C/C con el 16.2%. En el caso de 1298A>C, el sexo masculino es también quien predomina en el grupo homocigoto mutado C/C (45.6%), al igual que lo hace pero en menor frecuencia con los genotipos heterocigoto A/C (10.6%) y homocigoto A/A (1.2%).

Tabla 12. Asociación de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al sexo.

VARIABLE			*MTHFR 677C>T ^(a)		MTHFR 1298A>C ^(b)		
			C/C	C/T	A/A	A/C	C/C
Sexo	Femenino	n	14	54	1	8	59
		%	8,8%	33,8%	0,6%	5,0%	36,9%
	Masculino	n	26	66	2	17	73
		%	16,2%	41,2%	1,2%	10,6%	45,6%

*No se obtuvieron resultados para el genotipo homocigoto mutado para MTHFR 677C>T

(a) Se obtuvo el valor $p = 0,268$ el cual indica que no existe asociación entre los genotipos wild type C/C, heterocigoto C/T y el sexo.

(b) Se obtuvo el valor $p = 0,474$ el cual indica que no existe asociación entre los genotipos wild type A/A, heterocigoto A/C, homocigoto mutado C/C y el sexo.

4.4.2 Asociación genotípica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al grupo etario.

En la Figura 8 se muestra la distribución genotípica de 677C>T de acuerdo al grupo etario, en donde la población se distribuye uniformemente con el 34.4%(12-18 años) y 30%(6-11 años) en comparación al grupo etario entre 1-5 años con el 10.6%, esto con respecto al genotipo más frecuente (C/T). Algo similar ocurre con el análisis de 1298A>C (Figura 9), ya que aquí la frecuencia genotípica más frecuente (C/C) se distribuye de manera equitativa entre los grupos de 6-11 y 12-18 años con el 34.4%.

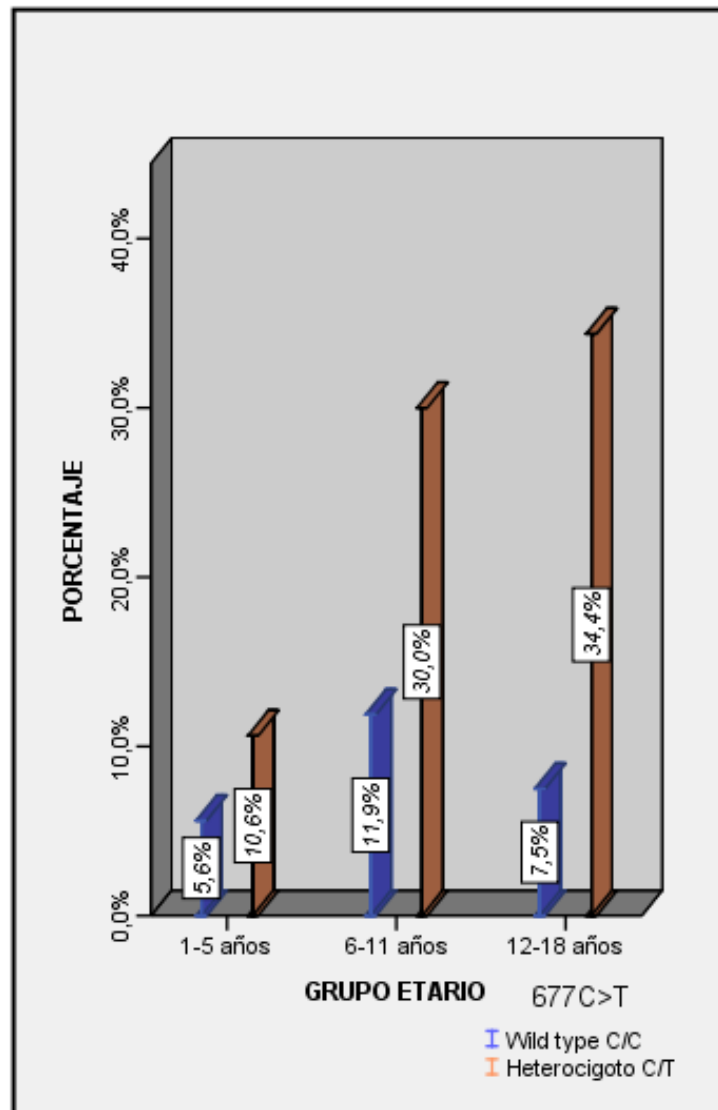


Figura 8. Asociación de **MTHFR* 677C>T de acuerdo al grupo etario

*No se obtuvieron resultados para el genotipo homocigoto mutado para *MTHFR* 677C>T. Se obtuvo el valor $p=0,175$ el cual indica que no existe asociación entre los genotipos wild type C/C, heterocigoto C/T y el grupo etario.

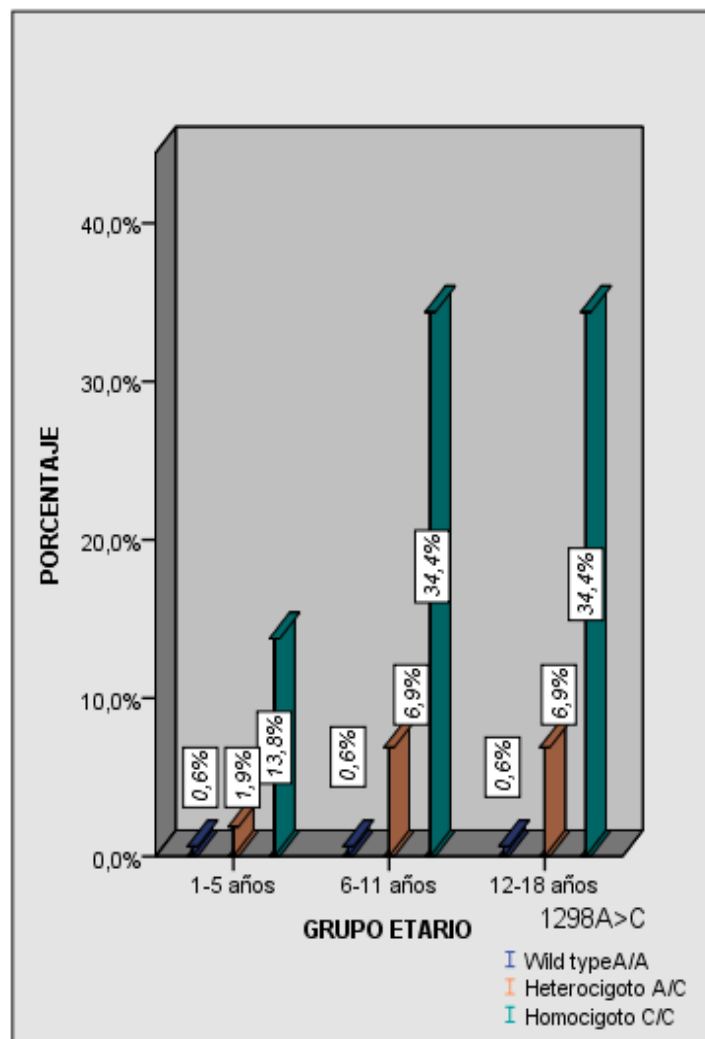


Figura 9. Asociación de *MTHFR* 1298A>C de acuerdo al grupo etario
Se obtuvo el valor $p=0,911$ el cual indica que no existe asociación entre los genotipos wild type A/A, heterocigoto A/C, homocigoto mutado C/C y el grupo etario

4.4.3 Asociación genotípica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al IMC.

La Tabla 13 indica que para 677C>T, los individuos con normopeso son quienes predominan con el 41.2% en el grupo heterocigoto C/T, seguido del 18.1% para los individuos con sobrepeso y 13.8% de individuos con obesidad. Para 1298A>C es también el normopeso quien presenta mayor frecuencia (47.5%) en el genotipo mutado C/C, quedando en segundo y tercer lugar los individuos con sobrepeso (21.2%) y obesidad (11.9%) para el mismo genotipo.

Tabla 13. Asociación de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al IMC.

VARIABLE			* <i>MTHFR</i> 677C>T ^(a)		<i>MTHFR</i> 1298A>C ^(b)		
			C/C	C/T	A/A	A/C	C/C
IMC	Bajo peso	n	1	3	0	1	3
		%	0,6%	1,9%	0,0%	0,6%	1,9%
	Normopeso	n	27	66	3	14	76
		%	16,9%	41,2%	1,9%	8,8%	47,5%
	Sobrepeso	n	8	29	0	3	34
		%	5,0%	18,1%	0,0%	1,9%	21,2%
	Obesidad	n	4	22	0	7	19
		%	2,5%	13,8%	0,0%	4,4%	11,9%

*No se obtuvieron resultados para el genotipo homocigoto mutado para *MTHFR* 677C>T.

(a) Se obtuvo el valor $p=0,510$ el cual indica que no existe asociación entre los genotipos wild type C/C, heterocigoto C/T y el IMC.

(b) Se obtuvo el valor $p=0,362$ el cual indica que no existe asociación entre los genotipos wild type A/A, heterocigoto A/C, homocigoto mutado C/C y el IMC.

4.4.4 Asociación genotípica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al inmunofenotipo de LLA.

Referente a 677C>T, el inmunofenotipo para células B, predominó en el grupo heterocigoto C/T con el 59.4%, seguido del grupo wild type C/C con el 19.4%; los de tipo T y bifenotípico fueron los de menor frecuencia. Para 1298A>C, la población también se asentó en un 65% para el inmunofenotipo de células B en el grupo homocigoto mutado C/C, seguido del 11.9% en el grupo heterocigoto A/C (Tabla 14).

Tabla 14. Asociación de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al inmunofenotipo.

VARIABLE			* <i>MTHFR</i> 677C>T ^(a)		<i>MTHFR</i> 1298A>C ^(b)		
			C/C	C/T	A/A	A/C	C/C
Inmuno- fenotipo	Células B	n	31	95	3	19	104
		%	19,4%	59,4%	1,9%	11,9%	65,0%
	Pre-B	n	5	14	0	2	17
		%	3,1%	8,8%	0,0%	1,2%	10,6%
	Células T	n	4	8	0	2	10
		%	2,5%	5,0%	0,0%	1,2%	6,2%
	Bifenotípica	n	0	3	0	2	1
		%	0,0%	1,9%	0,0%	1,2%	0,6%

*No se obtuvieron resultados para el genotipo homocigoto mutado para *MTHFR* 677C>T

(a) Se obtuvo el valor $p=0,689$ el cual indica que no existe asociación entre los genotipos wild type C/C, heterocigoto C/T y el inmunofenotipo.

(b) Se obtuvo el valor $p=0,307$ el cual indica que no existe asociación entre los genotipos wild type A/A, heterocigoto A/C, homocigoto mutado C/C y el inmunofenotipo.

4.4.5 Asociación genotípica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo a la hemoglobina

La hemoglobina predominó como normal en la población heterocigota C/T (56.9%) y el 11.9% se atribuyó a poseer hemoglobina baja, esto, para 677C>T. Para 1298A>C también predomina la hemoglobina normal en la población del genotipo mutado C/C (61.3%), y el 13.8% se asentó en presentar hemoglobina baja (Tabla 15).

Tabla 15. Asociación de 677C>T y 1298A>C de acuerdo a la hemoglobina.

VARIABLE			*MTHFR 677C>T ^(a)		MTHFR 1298A>C ^(b)		
			C/C	C/T	A/A	A/C	C/C
Hemoglobina	Baja	n	4	19	0	1	22
		%	2,5%	11,9%	0,0%	0,6%	13,8%
	Normal	n	29	91	3	19	98
		%	18,1%	56,9%	1,9%	11,9%	61,3%
	Alta	n	7	10	0	5	12
		%	4,4%	6,2%	0,0%	3,1%	7,5%

*No se obtuvieron resultados para el genotipo homocigoto mutado para MTHFR 677C>T

(a) Se obtuvo el valor $p=0,209$ el cual indica que no existe asociación entre los genotipos wild type C/C, heterocigoto C/T y la hemoglobina.

(b) Se obtuvo el valor $p=0,220$ el cual indica que no existe asociación entre los genotipos wild type A/A, heterocigoto A/C, homocigoto mutado C/C y la hemoglobina.

4.4.6 Asociación genotípica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al hematocrito

Según la Tabla 16, se puede observar que para 677C>T, la población muestra un 58,1% en presentar el hematocrito normal para el genotipo C/T y un 19,4% para el C/C. En cuanto a 1298A>C el predominio es similar mostrando un 63,1% para el hematocrito normal en el genotipo mutado C/C y un 12,5% en el genotipo A/C.

Tabla 16. Asociación de MTHFR 677C>T y MTHFR 1298A>C de acuerdo al hematocrito.

VARIABLE			*MTHFR 677C>T ^(a)		MTHFR 1298A>C ^(b)		
			C/C	C/T	A/A	A/C	C/C
Hematocrito	Bajo	n	4	15	0	1	18
		%	2,5%	9,4%	0,0%	0,6%	11,2%
	Normal	n	31	93	3	20	101
		%	19,4%	58,1%	1,9%	12,5%	63,1%
	Alto	n	5	12	0	4	13
		%	3,1%	7,5%	0,0%	2,5%	8,1%

*No se obtuvieron resultados para el genotipo homocigoto mutado para MTHFR 677C>T

(a) Se obtuvo el valor $p=0,846$ el cual indica que no existe asociación entre los genotipos wild type C/C, heterocigoto C/T y el hematocrito.

(b) Se obtuvo el valor $p=0,507$ el cual indica que no existe asociación entre los genotipos wild type A/A, heterocigoto A/C, homocigoto mutado C/C y el hematocrito.

4.4.7 Distribución de los genotipos más predominantes de 677C>T y 1298A>C de acuerdo a su procedencia.

En la figura 10, se indica la distribución en conjunto de los genotipos más frecuentes para cada polimorfismo, el genotipo heterocigoto C/T para 677C>T y el homocigoto mutado para 1298A>C de acuerdo a su lugar de procedencia. Es así, que Azuay ocupa el primer lugar con el 28.7% para el grupo C/T y el 34.4% para C/C; en segundo lugar se encuentra la provincia de Loja con el 13.8%(C/T) y el 14.4%(C/C), seguido de El Oro con el 10.6% tanto para C/T como para C/C. Cañar y Morona Santiago ocupan el cuarto y quinto lugar respectivamente.

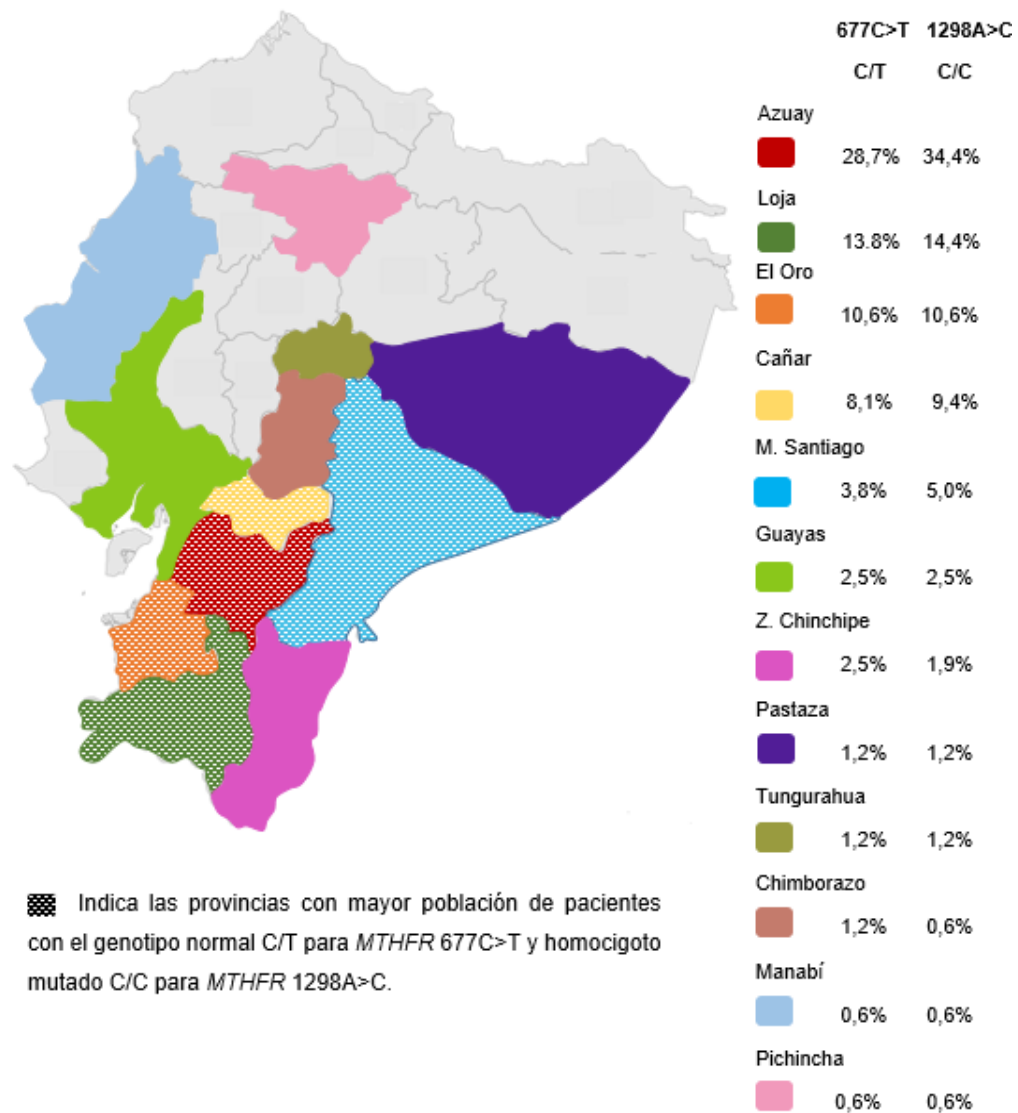


Figura 10. Distribución de los genotipos más predominantes de *MTHFR* 677C>T y *MTHFR* 1298A>C de acuerdo a su procedencia.

4.5 Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al sexo, IMC, hemoglobina y hematocrito.

Se encontró que, posterior a realizar la descripción de la frecuencia alélica de *MTHFR* 677C>T y *MTHFR* 1298A>C de acuerdo al sexo, IMC y a parámetros clínicos como hematocrito y hemoglobina; no se evidenció una asociación estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

4.5.1 Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al sexo.

Se evidenció que poseer el alelo mutado T para *MTHFR* 677C>T tiene cierto predominio en el sexo femenino con el 41.2% al igual que lo es para *MTHFR* 1298A>C en el alelo mutado C con el 56.2% (Tabla 17).

Tabla 17. Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al sexo.

VARIABLE			<i>MTHFR</i> 677C>T ^(a)		<i>MTHFR</i> 1298A>C ^(b)	
			Alelo C	Alelo T	Alelo A	Alelo C
Sexo	Femenino	n	26	66	2	90
		%	16,2%	41,2%	1,2%	56,2%
	Masculino	n	14	54	1	67
		%	8,8%	33,8%	0,6%	41,9%

(a) Se obtuvo el valor $p=0,689$ el cual indica que no existe asociación alélica de *MTHFR* 677C>T y el sexo.

(b) Se obtuvo el valor $p=0,746$ el cual indica que no existe asociación alélica de *MTHFR* 1298A>C y el sexo.

4.5.2 Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al estado del IMC.

La Tabla 18 indica que poseer el alelo mutado tanto en 677C>T como en 1298A>C, muestra mayor tendencia en individuos con peso normal con el 43.1% y el 58.8% respectivamente.

Tabla 18. Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al estado del IMC.

VARIABLE			<i>MTHFR</i> 677C>T ^(a)		<i>MTHFR</i> 1298A>C ^(b)	
			Alelo C	Alelo T	Alelo A	Alelo C
IMC	Peso normal	n	28	69	3	94
		%	17,5%	43,1%	1,9%	58,8%
	Peso alterado	n	12	51	0	63
		%	7,5%	31,9%	0,0%	39,4%

(a) Se obtuvo el valor $p=0,161$ el cual indica que no existe asociación alélica de *MTHFR* 677C>T y el IMC

(b) Se obtuvo el valor $p=0,159$ el cual indica que no existe asociación alélica de *MTHFR* 1298A>C y el IMC

4.5.3 Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo a la hemoglobina.

Los individuos que poseen el alelo mutado para 677C>T presentaron mayor frecuencia en presentar valores normales de hemoglobina (56.9%), lo mismo ocurrió en el alelo mutado del segundo SNP, mostrando el 73.1% dirigido hacia la hemoglobina normal (Tabla 19).

Tabla 19. Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo a la hemoglobina.

VARIABLE			<i>MTHFR</i> 677C>T ^(a)		<i>MTHFR</i> 1298A>C ^(b)	
			Alelo C	Alelo T	Alelo A	Alelo C
Hemoglobina	Bajo	n	4	19	0	23
		%	2,5%	11,9%	0,0%	14,4%
	Normal	n	29	91	3	117
		%	18,1%	56,9%	1,9%	73,1%
	Alto	n	7	10	0	17
		%	4,4%	6,2%	0,0%	10,6%

(a) Se obtuvo el valor $p = 0,209$ el cual indica que no existe asociación alélica de *MTHFR* 677C>T y la hemoglobina.

(b) Se obtuvo el valor $p = 0,601$ el cual indica que no existe asociación alélica de *MTHFR* 1298A>C y la hemoglobina.

4.5.4 Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al hematocrito.

Se observa que, tanto para 677C>T como para 1298A>C, poseer el alelo mutado tiene mayor predominio en mostrar el hematocrito normal con el 58.1% y 75.6% respectivamente.

Tabla 20. Asociación alélica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo al hematocrito.

VARIABLE			<i>MTHFR</i> 677C>T ^(a)		<i>MTHFR</i> 1298A>C ^(b)	
			Alelo C	Alelo T	Alelo A	Alelo C
Hematocrito	Bajo	n	4	15	0	19
		%	2,5%	9,4%	0,0%	11,9%
	Normal	n	31	93	3	121
		%	19,4%	58,1%	1,9%	75,6%
	Alto	n	5	12	0	17
		%	3,1%	7,5%	0,0%	10,6%

- (a) Se obtuvo el valor $p=0,846$ el cual indica que no existe asociación alélica de *MTHFR* 677C>T y el hematocrito.
- (b) Se obtuvo el valor $p=0,642$ el cual indica que no existe asociación alélica de *MTHFR* 1298A>C y el hematocrito.

4.6 Asociación genotípica y alélica de 677C>T y 1298A>C de acuerdo a la variable de respuesta de tipo de riesgo de LLA según el inmunofenotipo.

A continuación se muestra la asociación genotípica como alélica de 677C>T y 1298A>C en función de una variable de respuesta que indica el tipo de riesgo de LLA, para lo cual se consideró a la LLA de células T como el grupo de alto riesgo, y a la de tipo Pre-B y células B como grupo de bajo riesgo.

4.6.1 Influencia genotípica de 677C>T y 1298A>C frente al tipo de riesgo de LLA en base al inmunofenotipo.

Para encontrar tal asociación se empleó el análisis estadístico de Odd Ratios (OR) con un intervalo de confianza del 95% y $p<0.05$, lo cual reportó que genotípicamente el SNP 677C>T, no tiene asociación con el grupo de alto o bajo riesgo de LLA en base al inmunofenotipo, pues no se consideró como factor de riesgo o protección como tal; aunque el valor de OR fue inferior a 1 ($OR=0.72$), el intervalo de confianza obtenido ($CI=0.18-2.89$) determinó que la asociación se reportó como estadísticamente no significativa (Tabla 21).

Tabla 21. Asociación genotípica del SNP 677C>T con el tipo de riesgo de LLA según el inmunofenotipo.

Genotipo	Alto Riesgo	Bajo riesgo	OR (95% CI)	Valor de p
C/C	3(21,4%)	37(25,3%)	1,00	0,64
C/T	11(78,6%)	109(74,7%)	0,72(0,18-3,58)	

Con respecto al segundo SNP *MTHFR* 1298A>C, se observaron resultados semejantes, ya que mediante la elección del modelo de herencia tipo sobredominante, se obtuvo que no existe asociación entre el SNP evaluado y el tipo de riesgo de LLA (Tabla 22).

Tabla 22. Asociación genotípica del SNP 1298A>C con el tipo de riesgo de LLA según el inmunofenotipo.

Genotipo	Alto Riesgo	Bajo Riesgo	OR (95% CI)	Valor de p
A/A C/C	11(78,6%)	124(84,9%)	1,00	0,41
A/C	3(21,4%)	22(15,1%)	0,54(0,13-2.22)	

4.6.2 Influencia alélica de 677C>T y 1298A>C frente al tipo de riesgo de LLA en base al inmunofenotipo.

Siguiendo el mismo análisis en función de los Odd Ratios, no se presenció asociación alélica entre 677C>T y el tipo de riesgo de LLA (OR= 1.24, 0.32 - 4.70, IC: 95%) (Tabla 23). Referente a 1298A>C no fue posible hallar el valor de OR, puesto a que no se obtuvo un recuento de individuos que se encuentren en el grupo de alto riesgo y que no manifiesten el alelo raro. Por tanto, no fue posible buscar tal asociación.

Tabla 23. Asociación alélica del SNP 677C>T con el tipo de riesgo de LLA según el inmunofenotipo.

Alelo	Alto Riesgo	Bajo Riesgo	OR (95% CI)	Valor de p
C	3(1,9%)	37(23,1%)	1,24 (0,32-4,70)	0,74
T	11(6,9%)	109(68,1%)		

4.7 Discusión

En el presente estudio, el SNP 677C>T del gen *MTHFR* obtuvo la siguiente distribución genotípica: 25% para el homocigoto normal o wild type C/C y 75% para el heterocigoto C/T, no se obtuvieron resultados para el genotipo mutado T/T, en cuanto a su frecuencia alélica se manifestó el 38% para el alelo mutado (T). El segundo SNP en estudio *MTHFR* 1298A>C del mismo gen presentó: 2% para el homocigoto normal A/A, 16% para el heterocigoto A/C y 82% para el homocigoto mutado C/C, mostrando una frecuencia alélica del 90% en cuanto al alelo mutado (C). Los resultados fueron parcialmente semejantes con una investigación reciente realizada por Gutiérrez en niños mexicanos diagnosticados de Leucemia linfoblástica aguda del Centro

Oncológico Pediátrico de Baja California y el Centro Estatal de Cancerología del Estado de Durango; en donde se relató que el 40% presentó el alelo mutado (T) de *MTHFR* 677C>T, porcentaje bastante similar con el expuesto inicialmente. Sin embargo para *MTHFR* 1298A>C el resultado contrastó, pues en tal estudio se encontró que sólo el 22% mostró el alelo mutado C. Genotípicamente los resultados comparados variaron para ambos polimorfismos, ya que en *MTHFR* 677C>T, los niños mexicanos si reportaron resultados para el genotipo mutado T/T con el 15% y en cuanto a *MTHFR* 1298A>C la mayor frecuencia se asentó en el genotipo wild type con el 67%. Gutiérrez demuestra además que existe una asociación significativa entre el genotipo 1298CC y el riesgo a LLA, quien sustenta que la existencia de esta variante en *MTHFR* en tales individuos pueda deberse a una insuficiente distribución intracelular de ácido fólico, el cual es necesario para conservar la estructura tridimensional de la proteína; teniendo así como resultado la producción de una metilación de ADN aberrante y la posterior síntesis de nucleótidos que aumentaría el riesgo de desarrollar LLA (Gutiérrez, 2016). Esto resulta importante mencionarlo, pues en nuestra población existió una alta frecuencia del genotipo mutado C/C (82%), por lo que posiblemente pudiera existir de igual manera tal asociación. Sin embargo, mientras no se logre comparar con población sana o normal, esto no sería posible saberlo.

Los resultados genotípicos obtenidos también difieren en parte con los de Zanrosso et al., quienes estudiaron la asociación de *MTHFR* en la patogenia de leucemias agudas de un grupo de niños de origen brasileño con LLA y encontraron que, el 10% de ellos presentó el genotipo mutado T/T para 677C>T y en cuanto a 1298A>C la mayor frecuencia se situó en el genotipo wild type con el 51% (Zanrosso et al., 2005). La variabilidad en la comparación de los resultados obtenidos particularmente con el genotipo mutado de 1298A>C y los de otras poblaciones se sustenta en que por una parte, la distribución de este polimorfismo es menos conocida que el SNP 677C>T; además de que su frecuencia varía ampliamente de una población a otra. (Martínez, Casanueva, Hernández, Torres, & García, 2019). Lo anterior se puede dilucidar al observar la diferencia entre frecuencias genotípicas y alélicas determinada en algunos países según un estudio de prevalencia realizado en el año 2016; donde México y África Occidental presentaron las frecuencias más altas y más bajas del alelo T y genotipo T/T de 677C>T respectivamente. Al contrario, estos dos países fueron las áreas con las frecuencias más bajas del alelo C y genotipo C/C de 1298A>C, siendo Francia quien presentó la frecuencia más alta (Guéant et al., 2006). Un estudio más

cercano analizó el polimorfismo 677C>T en 152 colombianos y obtuvieron que el alelo C presentó una frecuencia del 86,3% de los participantes y el 13,7% en el para el alelo T, el polimorfismo 1298A>C no ha reportado estudios de frecuencia en países de Sudamérica (Sánchez et al., 2015).

En Ecuador no existen datos disponibles al respecto, por lo que este estudio se consideraría como uno de los primeros en describir el comportamiento de la frecuencia de los SNPs 677C>T y 1298A>C de *MTHFR* en pacientes diagnosticados con LLA. De acuerdo al lugar de procedencia de la población, se identificó que de los genotipos con mayor frecuencia, heterocigoto C/T en 677C>T y homocigoto mutado C/C en 1298A>C; Azuay se registró en primer lugar, seguido de Loja, ocupando el Oro el tercer lugar.

El género masculino fue el que predominó en los genotipos más frecuentes: 41,2% en el genotipo C/T de 677C>T y 45,6% en el genotipo mutado C/C para 1298A>C; no obstante, presentar el alelo raro en ambos polimorfismos tuvo mayor tendencia hacia las niñas, alelo T (41,2%) y alelo C (56,2%); lo que indicaría que el género femenino tiene más predisposición a poseer el alelo mutado que el masculino. Sin embargo, no se encontró asociación entre el género y la distribución genotípica o alélica de los SPNs estudiados, lo cual coincide con Alghasham et al, quien logró demostrar en un grupo de participantes que en términos de género, no existe diferencia significativa relacionada con los genotipos y alelos estudiados de *MTHFR* 677C>T y 1298A>C (Alghasham, Settin, Ali, Dowaidar, & Ismail, 2012). Así mismo, Martínez et al., corroboran la falta de asociación encontrada, quienes al analizar el polimorfismo *MTHFR* 1298A>C en pacientes cubanos, tampoco registró asociación entre la frecuencia genotípica hallada y el sexo de tales pacientes ($p=0.941$) (Martínez et al., 2019). De los grupos etarios que comprendieron la población, hubo una distribución uniforme entre la edad escolar (6-11 años) y adolescente (12-18 años) para los genotipos más frecuentes de ambos polimorfismos.

En cuanto al estado nutricional de los pacientes, González et al., mediante un análisis reciente de cierta población del occidente de México, encontró que existe una asociación positiva entre el genotipo T/T de 677C>T y el peso corporal, sin embargo ninguno de los genotipos se asoció con el índice de masa corporal ($p>0,4$). Para el polimorfismo 1298A>C reportaron que existe una tendencia a asociarse con el IMC pero sin significación estadística. Sus hallazgos claramente muestran concordancia con los hallados en el presente estudio, debido a que tampoco se encontró asociación tanto alélica como genotípica y el IMC ($p>0,05$) (González et al., 2014).

Referente a la caracterización del fenotipo de la LLA y su distribución genotípica y alélica de los SNPs en estudio, no se observaron diferencias significativas, lo que concuerda con Skibola et al., quien luego de estudiar un grupo de pacientes con leucemia aguda del Centro de Investigación de Leucemia Británica, concluyó que no se observaron diferencias significativas en las frecuencias mutantes de *MTHFR* 677C>T y 1298A>C entre los grupos caracterizados en función del inmunofenotipo, considerando como uno solo a los de tipo ALL-B y ALL-T para su análisis (Skibola et al., 1999). De Jonge et al., también sostienen la anterior aclaración a través de un estudio más reciente en 245 pacientes pediátricos con LLA de Europa occidental, concluyendo que aún es reciente la exploración de conocer si los pacientes con determinado tipo de LLA difiere en la cinética del folato por medio de sus SNPs en *MTHFR*. Los autores excluyeron a los pacientes con ALL-T del análisis y obtuvieron que no existía resultados significativamente diferentes (de Jonge et al., 2009).

Si bien no se encontró relación entre el inmunofenotipo de la LLA y los polimorfismos en estudio del gen *MTHFR*, y además en vista de que no existían datos que reflejen la siguiente asociación; se planteó conseguir una correlación genotípica y alélica frente a una variable de respuesta que refirió el grupo de riesgo al que pertenecía cada individuo en base al inmunofenotipo de expresión. De ello, se obtuvo que en general no existe asociación estadísticamente significativa que se demuestre entre los SNPs de *MTHFR* 677C>T y 1298A>C con el tipo de riesgo de LLA, lo que indica que el riesgo es independiente de presentar determinado genotipo.

Tomando en consideración que se ha demostrado asociaciones estadísticas entre los SNPs *MTHFR* 677C>T y 1298A>C y las concentraciones de folato y homocisteína (Herrera et al., 2016), se intentó asociar los niveles de hemoglobina así como los del hematocrito. Esto, sabiendo de antemano que la hemoglobina requiere factores como la vitamina B12, hierro y ácido fólico para su producción y que en contexto con el metabolismo del ciclo de folato; estos podrían de alguna forma ser indicadores de desnutrición. No se encontró tal asociación genotípica ni alélica, en donde la población presentó valores normales de hemoglobina y hematocrito en los genotipos y alelos más frecuentes; lo que concuerda con la investigación de Gonzáles et al., al no hallar diferencias significativas después de analizar la relación de los SNPs en mención y variables bioquímicas como las mencionadas (González et al., 2014).

Cabe recordar que la importancia de desarrollar un análisis en cuanto a la distribución de las frecuencias de dos de los más influyentes polimorfismos correspondientes al gen de la enzima *MTHFR* radica en que ésta, es una de las enzimas potencialmente

involucrada en el metabolismo y acción del MTX; fármaco antifolato utilizado en altas dosis en la mayoría de protocolos poliquimioterapéuticos durante la fase de consolidación y mantenimiento del tratamiento de la LLA y existe evidencia de que se manifiesta una asociación entre los polimorfismos más comunes del gen *MTHFR*, 677C>T y 1298A>C con la toxicidad y eficacia del tratamiento con MTX además de otros agentes antifolatos (Cateura, 2016).

Los alelos 677T y 1298C provocados en *MTHFR*, claramente desencadenan una disminución en cuanto a la funcionalidad de su actividad enzimática (Enciso et al., 2006). Estudios demuestran que los individuos con el genotipo T/T de 677C>T presenta un 30% de actividad de la enzima MTHFR in vitro en comparación con el tipo salvaje y que aquellos con genotipo C/T mantienen alrededor del 60% de actividad de la enzima de tipo salvaje. Es factible asumir que en la población estudiada, la mayoría expresaría también el segundo porcentaje de actividad manifestada en cuanto a la enzima, ya que fue el genotipo heterocigoto C/T quien predominó en tales individuos. Algo parecido ocurriría con 1298A>C, ya que se manifiesta que poseer el genotipo C/C, el cual predominó en este estudio, presenta de igual manera una disminución al 60% de actividad de MTHFR (Robien & Ulrich, 2003). Los metabolitos del metotrexato inhiben a la MTHFR, y por consiguiente al poseer los pacientes con LLA baja actividad endógena, tendrán un mayor riesgo de mucositis, toxicidad hematológica y hepática inducida por el fármaco (Prado Vizcaíno et al., 2011).

Sin embargo, hasta la fecha aún existen resultados que generan controversia entre uno u otro estudio. Tal es así que Chiusolo et al., por ejemplo relata que luego de realizar un estudio retrospectivo en 78 pacientes con LLA en terapia de mantenimiento, concluyó que el genotipo T/T se asoció significativamente con un aumento de la toxicidad hepática durante la administración de metotrexato (Chiusolo et al., 2002). En adición a lo expuesto, Suthandiram et al., también demostraron que un alto porcentaje de pacientes con neoplasias hematológicas presentó toxicidad hematopoyética y hepática en relación con el genotipo mutado T/T de *MTHFR* 677C>T y que en cuanto al SNP 1298A>C no encontraron asociación con ningún tipo de toxicidad (Suthandiram et al., 2014). En contraste a ello, al desarrollar un estudio en 270 pacientes pediátricos con LLA de origen franco-canadiense; Krajinovic et al., concluyeron que no existe asociación entre los SNPs 677C>T y 1298A>C y la toxicidad inducida por fármacos antifolatos, mostrando incluso un efecto protector (Krajinovic et al., 2004).



El estudio de las frecuencias de polimorfismos genéticos en las enzimas que forman parte del metabolismo de la farmacoterapia de la LLA, como lo fue en el gen de la enzima MTHFR; representa el primer paso para estudiar el comportamiento de su distribución en diferentes poblaciones, y como ésta pueda manifestar un impacto significativo tanto en el control, riesgo así como en la toxicidad medicamentosa. Es así, que luego de comprender las bases moleculares de tales eventos, se podrá determinar la forma en la que éstas variantes genéticas influyen por ejemplo en las respuestas farmacológicas para así lograr optimizar su uso. Esto hace referencia a la medicina personalizada, la cual en pocas palabras se basa en administrar a cada paciente el fármaco en dosis y concentración adecuada en línea con su eficacia y seguridad.

Es posible, que en pocos años incluso se emplee un formato de genotipos específicos acorde a la frecuencia que prevalezca en la población para este tipo de neoplasia, para así conseguir identificar a su vez subconjuntos de pacientes predispuestos genéticamente a desarrollar posible toxicidad inducida por la farmacoterapia.

CAPÍTULO 4

5. Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

En la población estudiada conformada por 160 pacientes diagnosticados con LLA, se evidenció para el SNP de *MTHFR* 677C>T una frecuencia genotípica de 25% para el homocigoto normal C/C y 75% para el heterocigoto C/T, sin encontrar resultados en el genotipo homocigoto mutado T/T. Para el SNP *MTHFR* 1298A>C se encontró una frecuencia genotípica de 2% para el homocigoto normal, 16% para el heterocigoto A/C y 82% para el homocigoto mutado C/C.

La distribución de la frecuencia alélica se mostró de la siguiente manera: para *MTHFR* 677C>T se obtuvo 38% para el alelo mutado T y en cuanto a *MTHFR* 1298 A>C, 90% correspondió para el alelo mutado C.

En el análisis estadístico no se encontró asociación genotípica ni alélica con las variables (sexo, edad, IMC, inmunofenotipo, hemoglobina y hematocrito), así como tampoco se manifestó una correlación estadísticamente significativa entre el genotipo y alelo frente al tipo de riesgo de LLA.

Recomendaciones

La distribución genotípica y alélica de los SNPs estudiados del gen *MTHFR*, fueron contradictorios respecto a las reportadas en diferentes poblaciones de estudio, por lo que resultaría conveniente realizar nuevas investigaciones semejantes que refuercen y corroboren los hallazgos de la presente investigación.

Se consideraría ideal que se efectúe un estudio de casos y controles para de esta manera, observar el comportamiento genotípico y alélico de los polimorfismos estudiados en poblaciones sanas frente a aquellas que presenten LLA u otro tipo de neoplasia.

Sería conveniente otorgar continuidad con la misma población de estudio mediante un nuevo análisis, sugiriendo que se pretenda relacionar la frecuencia de tales polimorfismos en función de las reacciones adversas manifestadas por los pacientes, esto en base a la importancia que sustenta la literatura consultada.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcoceba, M. (2010). *Estudio de polimorfismos genéticos en la evolución clínica de pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Alghasham, A., Settin, A. A., Ali, A., Dowaidar, M., & Ismail, H. (2012). Association of MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms with hypertension. *International Journal of Health Sciences*, 6(1), 3–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23267299>
- Argüelles, G. R., Linares, L. C., Garcés, J. E., & Núñez, V. R. (2007). Methotrexate-induced mucositis in acute leukemia patients is not associated with the MTHFR 677T allele in Mexico. *Hematology*, 12(5), 387–391. <https://doi.org/10.1080/10245330701448479>
- Caratechea, M. A. C. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas*, 20(3), 214–215. Retrieved from www.iner.gob.mx
- Castañeda, E. (2009). Leucemia linfoblástica aguda. *REVISTA MÉDICA MD*, 1(4), 3–5. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2009/md094c.pdf>
- Cateura, A. G. (2016). *Farmacogenética del metotrexate en adultos uruguayos con patología hematooncológica*. Retrieved from <http://riquim.fq.edu.uy/archive/files/e4e7ee7a6475565b48901dcc71fc8215.pdf>
- Cepi, F., Cazzaniga, G., Colombini, A., Biondi, A., & Conter, V. (2015). Risk factors for relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: prediction and prevention. *Expert Review of Hematology*, 8(1), 57–70. <https://doi.org/10.1586/17474086.2015.978281>
- Chiusolo, P., Reddiconto, G., Casorelli, I., Laurenti, L., Sorà, F., Mele, L., ... Sica, S. (2002). Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate. *Annals of Oncology*, 13(12), 1915–1918. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf322>
- Chona, Z. N., Montero, E. F., & Inaty, J. J. (2010). LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA: EVALUACIÓN CLÍNICO TERAPÉUTICA DEL PROTOCOLO TOTAL XV MODIFICADO. *Redalyc.Org*, 73(2), 18–28. Retrieved from

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=367937040004>

- Conter, V., Rizzari, C., Sala, A., Chiesa, R., Citterio, M., & Blondy, A. (2004). Acute Lymphoblastic Leukemia. *Orphanet Encyclopedia*, 2–14. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62187-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62187-4)
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5), 299–305. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73092-X](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73092-X)
- Costea, I., Moghrabi, A., Laverdiere, C., Graziani, A., & Krajcinovic, M. (2006). Folate cycle gene variants and chemotherapy toxicity in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 91(8), 1113–1116. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16870553>
- D´Oncología, I. C. (2006). SNPStats | Programa de Prevenció i Control del Càncer. Retrieved July 15, 2019, from <https://www.snpstats.net/>
- de Jonge, R., Tissing, W. J. E., Hooijberg, J. H., Jansen, G., Kaspers, G. J. L., Lindemans, J., ... Pieters, R. (2009). Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 113(10), 2284–2289. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-165928>
- De Mattia, E., & Toffoli, G. (2009). C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. *European Journal of Cancer*, 45(8), 1333–1351. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.12.004>
- DeGennaro, L. (2014). Leucemia linfoblástica aguda. *Leukemia & Lymphoma Society*, 10. <https://doi.org/10.1145/1178823.1178929>
- Díaz, A. S., Rentería, L. F., Cortez, J. A., & Palacios, E. S. (2014). PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa. In *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos - PDF* (pp. 53–55). Retrieved from <https://docplayer.es/2657627-Herramientas-moleculares-aplicadas-en-ecologia-aspectos-teoricos-y-practicos.html>
- Dres, A., D´Aloi, K., Chertkoff, L., & Felice, M. (2007). AVANCES Y APLICACIONES DE ESTUDIOS FARMACOGENETICOS EN LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA EN PEDIATRIA. *Medicina Infantil*, 14(2), 156–161. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Lilien_Chertkoff/publication/265569601_AVA

NCES_Y_APLICACIONES_DE_ESTUDIOS_FARMACOGENETICOS_EN_LEUCEMIA_LINFOBLASTICA_AGUDA_EN_PEDIATRIA/links/54a7f88e0cf256bf8bb7dd50.pdf

EDVOTEK. (2016). *Principios y práctica de la electroforesis en gel de agarosa*. Retrieved from www.edvotek.com/safety-data-sheets

Enciso, I., Martínez, S., Rojas, A., Espinoza, F., Canseco, L., Vidal, O., ... Ortiz, R. (2006). Revista de investigación clínica. In *Revista de investigación clínica* (Vol. 58). Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762006000500007

Fuentes, L., Flores, M., Iglesias, A., Luzuriaga, A., Rendón, N., Ordoñez, R., ... Añez, R. (2018). Características de la leucemia linfoblástica aguda y neutropenia febril en niños y adolescentes atendidos en un hospital de Guayaquil, Ecuador. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35(2), 272. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.352.2862>

Gervasini, G., & Vagace, J. M. (2012). Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in Genetics*, 3(249), 1. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00249>

Godoy, S. G. de M. (2018). *INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA RESPUESTA TERAPÉUTICA A METOTREXATO DE PACIENTES CON NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS*. Retrieved from http://dehesa.unex.es/bitstream/handle/10662/7630/TDUEX_2018_Gonzalez_de_Murillo_Godoy.pdf?sequence=1&isAllowed=y

González, M. G., Rivas, F., Salazar, M., Gallegos, M. P., Morán, M. C., Moreno, A., & Dávalos, I. P. (2014). Homocisteína, polimorfismos MTHFR C677T, A1298C y variables clínico-bioquímicas en población mexicana. *Redalyc.Org*, 48(1), 23–31.

GRH. (2009). Genetics Home Reference. Retrieved June 18, 2019, from MTHFR gene methylenetetrahydrofolate reductase website: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR#location>

Guéant, R.-M., Guéant, Jean, L., Debard, R., Thirion, S., Hong, L. X., Bronowicki, J.-P., ... Mutchinick, O. M. (2006). Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West

- African, and European populations. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(3), 701–707. <https://doi.org/10.1093/ajcn.83.3.701>
- Gutiérrez, O. (2016). *“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”*. Retrieved from https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/24144/1/TESIS_FINAL.pdf
- Herrera, J., Muñoz, A., & Parra, B. (2016). FACTORES DETERMINANTES DEL ESTADO NUTRICIONAL DEL FOLATO Y EL ROL DE LA VARIANTE GENÉTICA C677T DE LA ENZIMA METILEN TETRAHIDROFOLATO REDUCTASA - MTHFR-. *Revista Chilena de Nutrición*, 43(4), 336–345. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182016000400001>
- Hung, R. J., Hashibe, M., McKay, J., Gaborieau, V., Szeszenia-Dabrowska, N., Zaridze, D., ... Brennan, P. (2007). Folate-related genes and the risk of tobacco-related cancers in Central Europe. *Carcinogenesis*, 28(6), 1334–1340. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm067>
- Krajinovic, M., Lamothe, S., Labuda, D., Lemieux-Blanchard, E., Theoret, Y., Moghrabi, A., & Sinnett, D. (2004). Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 103(1), 252–257. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-1794>
- Lainez, V. R. V. (2017). *“LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA B, CORRELACIÓN ENTRE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL Y RECAIDA MEDULAR EN PACIENTES PEDIÁTRICOS”* (Universidad de Guayaquil). Retrieved from <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/29349/1/CD 012- Victor Villarroel.pdf>
- Lassaletta, A. (2016). Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatría Integral*, XXII(1), 380–389. Retrieved from www.sepeap.org
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (62), 5. <https://doi.org/10.3791/3923>
- Marqués, M., Pérez, A., Romero, P., Espinosa, A., & Ruiz, A. (2016). Incidencia y

- gravedad de reacciones adversas a metotrexato en relación con la ingesta dietética de folatos en pacientes con leucemia linfoblástica aguda. *Revista de Hematología México*, 17(3), 175–186. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/hematologia/re-2016/re163d.pdf>
- Martínez, M. T., Calero, K. C., Hernández, B., Torres, W., & García, G. (2019). Polimorfismo MTHFR A1298C en pacientes cubanos con trombofilia. *Revista de Hematología México*, 20(1), 5–10.
- Peña, C. A. P., Dapena, J. D., Galisteo, E. M., Ruiz, J. A. B., & Alfonso, C. G. (2006). *Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico*. Retrieved from <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/17 ELECTROFORESIS ACS NUCLEICOS GELES AGAROSA.pdf>
- Prado Vizcaíno, Y., Alberto Arencibia Núñez, I., Dra María de los Vizcaíno Londian, I. A., Carlos Manuel Abeledo García, I., Dra Idania Rodeiro Guerra IV I Facultad de Ciencias Médicas, I. C., Cabrera, E., & Habana, L. (2011). Farmacogenética aplicada al tratamiento de la leucemia linfocítica aguda Pharmacogenetics applied to the treatment of acute lymphoid leukemia. In *Inmunología y Hemoterapia* (Vol. 27). Retrieved from <http://scielo.sld.cu>
- Quilmes, U. N. de. (2010). *Cuantificación de ADN y electroforesis en gel de agarosa*. Retrieved from <https://ibcmunq.files.wordpress.com/2010/03/tp5.pdf>
- Ramos, M., Martínez, F., & Barreiro, M. (2001). Alteraciones cromosómicas en la leucemia linfoblástica aguda. *Anales de Pediatría*, 55(1), 45–52. [https://doi.org/10.1016/S1695-4033\(01\)77624-2](https://doi.org/10.1016/S1695-4033(01)77624-2)
- Reina, Y. M. M. (2018). *EPIDEMIOLOGIA DE LEUCEMIA AGUDA EN HOSPITAL PEDIATRICO FRANCISCO ICAZA BUSTAMANTE DURANTE LOS AÑOS 2016-2017* (Universidad de Guayaquil). Retrieved from http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/31028/1/CD_2434-MANTUANO_REINA_YANALIN_MABEL.pdf
- Robien, K., & Ulrich, C. M. (2003). 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Leukemia Risk: A HuGE Minireview. *American Journal of Epidemiology*, 157(7), 571–582. <https://doi.org/10.1093/aje/kwg024>
- Rodríguez, G. (2014). *CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS* (p. 1). p. 1.

- Retrieved from <https://www.iib.uam.es/portal/documents/76122/76162/CUANTIFICACION+DE+ÁCIDOS+NUCLEICOS+V2.pdf/04333940-c6ff-4419-ad85-cfd1e04dbca8>
- Salas, Z. J., Martínez, P. C. C., Castañón, L. N. B., & Martínez, B. E. G. (2001). POLIMORFISMOS DE LA METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA Y SU ASOCIACIÓN CON LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL. *Respyn. Revista Salud Pública y Nutrición*, 2(3), 6. Retrieved from www.medigraphic.org
- Sánchez, C., Gutierrez, A., Gómez, P., Gómez, M., & Briceño, I. (2015). Frecuencia del polimorfismo c677t (rs1801133) del gen MTHFR en individuos colombianos. *Colombia Medica*, 46(2), 75–79.
- Sánchez, M. A. O., Ortega, M. L. O., & Barrientos, J. V. R. (2007). Leucemia linfoblástica aguda Manuel. *Medicina Interna de México*, 23(1), 26–33. Retrieved from <http://www.latindex.org>
- Skibola, C. F., Smith, M. T., Kane, E., Roman, E., Rollinson, S., Cartwright, R. A., & Morgan, G. (1999). Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12810–12815. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12810>
- SOLCA. (2018). *INFORME DE LABORES 2016-2018 de la revista Sociedad de Lucha Contra el Cáncer del Ecuador*. Retrieved from <https://www.solca.med.ec/wp-content/uploads/2018/10/SOLCA-Informe-labores-2018.pdf>
- Sonoma, W. (2018). Inicio | St. Jude Cure4Kids: un sitio web de educación médica internacional y un centro de colaboración en línea. Retrieved July 15, 2019, from Protocolo Total XV website: <https://www.cure4kids.org/>
- Suthandiram, S., Gan, G.-G., Mohd Zain, S., Bee, P.-C., Lian, L.-H., Chang, K.-M., ... Mohamed, Z. (2014). P0177 Impact of genetic polymorphisms of MTHFR, SLC, and ABC on high-dose methotrexate toxicity and plasma levels in adults with haematological malignancies. *European Journal of Cancer*, 50(4), e60. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2014.03.221>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Tecnología en salud. *Medigraphic*, 2(2), 70–78. Retrieved from www.medigraphic.org
<http://www.medigraphic.com/ridwww.medigraphic.org>

- Thermo Fisher. (2016). Mini kit de ADN genómico PureLink - Thermo Fisher Scientific. Retrieved June 11, 2019, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K182002>
- Ueland, P. M., Hustad, S., Schneede, J., Refsum, H., & Vollset, S. E. (2001). Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(4), 195–201. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01675-8](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01675-8)
- UNAM, I. de B. (n.d.). Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN. Retrieved June 18, 2019, from Cuantificación de Oligonucleótidos y Acidos Nucleicos por Espectroscopía de UV website: <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/cuantificacion.html#top>
- Urbina, R. S., Hernández, C. G., Ramírez, A. S., Barroso, V. M., & Cavazos, R. G. (2006). Perinatol Reprod Hum. *Perinatol Reprod Hum*, 20(1,2 y3), 39–47. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/prh/v20n1-3/v20n1-3a6.pdf>
- Velázquez, L. P. A., Martínez, M. del C. A., & Romero, A. C. (2012). *Extracción y purificación de ADN*. Retrieved from www.eoearth.org/view/article/158858.
- Vizcaíno, M., Lopera, J., Martínez, L., Reyes, I. D. los, & Linares, A. (2016). Guía de atención integral para la detección oportuna, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de leucemia linfocítica aguda en niños, niñas y adolescentes. *Revista Colombiana de Cancerología*, 20(1), 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.rccan.2015.08.003>
- Vizcaíno, Y. P., Núñez, A. A., Londian, M. de los Á. V., García, C. M. A., & Guerra, I. R. (2011). Farmacogenética aplicada al tratamiento de la leucemia linfocítica aguda. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 27(3), 283–290. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892011000300003
- Wall, A. M., & Rubnitz, J. E. (2003). Pharmacogenomic effects on therapy for acute lymphoblastic leukemia in children. *The Pharmacogenomics Journal*, 3(3), 128–135. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500174>
- Wiemels, J. L., Smith, R. N., Taylor, G. M., Eden, O. B., Alexander, F. E., Greaves, M. F., & United Kingdom Childhood Cancer Study investigators, U. K. C. C. S. (2001). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of

molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), 4004–4009. <https://doi.org/10.1073/pnas.061408298>

Zanrosso, C. W., Emerenciano, M., Figueiredo, A., Reis, M., Nô, S., Cordeiro, S., ... Pombo-De-Oliveira, M. S. (2005). Influência da metileno-tetrahidrofolato redutase na patogênese das leucemias agudas infantis. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 51(4), 289–295. Retrieved from https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/31840530/novoartigo.pdf?response-content-disposition=inline%3Bfilename%3DInfluencia_da_metileno-tetrahidrofolato.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20190708%2Fus-east-1%3A%2F%2F&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host

Zaruma, F., Lares, I., Reyes, A., Loera, V., Almanza, H., & Arias, M. C. (2015). IMPACTO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LA VÍA METABÓLICA DEL METOTREXATO SOBRE LA SOBREVIVENCIA DE NIÑOS MEXICANOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA) IMPACT. *Vitae*, 22(3), 177–187. Retrieved from <https://www.redalyc.org/html/1698/169845538002/>

ANEXOS

ANEXO 1. Variables del estudio

VARIABLE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	TIPO	CATEGORÍA
Polimorfismo del gen <i>MTHFR</i> 677C>T (rs1801133)	Presencia del alelo T o ausencia del alelo C.	Presencia	Cualitativa nominal	Presente Ausente
Polimorfismo del gen <i>MTHFR</i> 1298A>C (rs1801131)	Presencia del alelo C o ausencia del alelo A.	Presencia	Cualitativa nominal	Presente Ausente
Sexo	Identificación sexual.	Género	Cualitativa (nominal)	Masculino Femenino
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el momento de la toma de muestra	Años	Cuantitativa (Nominal)	Pre-escolar: 1 – 5 años Escolar: 6 – 11 años Adolecente: 12 – 18 años
Índice de masa corporal	Relación entre el peso en Kg y la estatura en m ² .	Kg/m ²	Cualitativa (Ordinal)	Bajo peso: IMC entre 12.7 – 13.8 Normo peso: IMC entre 13.9 – 16.9 Sobrepeso: IMC entre 17.0 –

				19.1 Obesidad: IMC ≥19.2
Inmuno- fenotipo	Grado de diferenciación celular	Inmunofluore scencia	Cualitativa (Nominal)	Precusores - B Células B Células T Bifenotípica
Hemoglobina	Es el contenido proteico del glóbulo rojo, encargado de transportar el O ₂ y el CO ₂ .	g/L	Cuantitativa (Ordinal)	Baja, Normal, Alta: De 1 - 5 años: 11 - 14 g/dL De 6 – 11 años: 11.5 - 15.5 g/dL De 12 – 18 años: 12 -16 g/dL
Hematocrito	Es el volumen de los eritrocitos con respecto al volumen sanguíneo total	Porcentaje (%)	Cuantitativa (Ordinal)	Bajo, Normal, Alto De 1 - 5 años: 34 - 42 % De 6 – 11 años: 35 - 45 % De 12 – 18 años: 36 - 49 %
Procedencia	Región desde donde acude el individuo para ser tratado.	Región del país Provincia	Cualitativa (Nominal)	Costa Sierra Amazonía

ANEXO 2. Consentimiento informado

Código 2017-106E



Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos
Universidad San Francisco de Quito
El Comité de Revisión Institucional de la USFQ
The Institutional Review Board of the USFQ

Formulario de Consentimiento Informado

Título de la investigación: Translocaciones cromosómicas y polimorfismos genéticos de enzimas de la vía del folato y de transportadores de metotrexato como posibles marcadores predictores de la toxicidad en niños con leucemia linfoblástica aguda.

Organización del investigador: Universidad de Cuenca

Nombre del investigador principal: Dr. Fausto Leonardo Zaruma Torres, PhD

Datos de localización del investigador principal 07 5051120, 0983051850,

fausto.zaruma@ucuenca.edu.ec

Co-investigadores

- BQF. Adriana Monserrath Orellana Paucar, PhD
- Dra. Sandra Paola Cabrera Feicán, Mgt
- BQF. Maritza Raphaela Ochoa Castro, Mgt
- Dra. Zulma Beatriz Zamora Burbano, Mgt
- BQF. Geovanny Patricio Barrera Luna
- Dr. Oswaldo Aguirre Valdiviezo
- Dr. Enmanuel Guerrero Quiroz
- Dr. Andrés Andrade Galarza
- Dr. Ismael Lares Asseff, PhD
- Dr. Néstor García Chong, PhD

**DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO****Introducción**

Este formulario incluye un resumen del propósito de este estudio. Usted puede hacer todas las preguntas que quiera para entender claramente su participación y despejar sus dudas. Puede tomarse el tiempo que necesite para consultar con su familia y/o amigos y permitirnos conocer si desea participar en este estudio o no.

Usted ha sido invitado(a) a participar en una investigación sobre alteraciones genéticas que promueven un posible riesgo de reacción adversa no deseada o no esperada por la administración de metotrexato. Este medicamento se utiliza como parte del tratamiento del padecimiento de LLA. Se le ha hecho la invitación a participar debido a que usted cumple con los siguientes criterios:

- Paciente de cualquier sexo, niño o niña, con tratamiento actual con metotrexato (MTX) y con edad comprendida entre los 0 y 18 años.
- Paciente de cualquier ciudad del país, sin importar su condición económica, lengua, costumbres o raza.
- Paciente con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda, LLA (L1, y L2)
- Paciente actual de SOLCA Cuenca o SOLCA Loja

Entiéndase por alteración genética al cambio de la información genética en su cuerpo, lo cual se puede manifestar como alteraciones en las funciones normales de los órganos o como signos o síntomas que no son comunes. Estos cambios se producen por diferentes causas ya sean hereditarias (del padre o de la madre) o

Código 2017-106E

provocados por diferentes sustancias (por ejemplo: los medicamentos). El MTX es un medicamento, por eso las alteraciones genéticas relacionadas con MTX que se identifiquen en este estudio serán tratadas como un marcador de toxicidad, es decir serán un indicador de toxicidad. El MTX es un medicamento clave en el tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda, se usa para disminuir la producción descontrolada de glóbulos blancos inmaduros, puede ser tóxico si se utiliza en dosis altas. Usted recibe este medicamento porque es de gran ayuda para el tratamiento de su enfermedad.

Propósito del estudio

El metotrexato (MTX), fue el primer medicamento utilizado desde 1948 en el tratamiento de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) en niños. Este trabajo pretende identificar posibles indicadores que permitan predecir la posible toxicidad por la administración de MTX, lo cual podría contribuir al aseguramiento de una terapia personalizada y de precisión de MTX basada en pacientes con diagnóstico clínico de LLA.

Descripción de los procedimientos**Actividad: Aceptación de participación en el estudio****Tiempo invertido por el participante o su tutor legal: 1 hora**

Luego de llevado a cabo el escrutinio y selección de los pacientes se realizará la socialización del estudio, en la que se verán involucrados también los familiares o representante del paciente. Posteriormente se firmará el consentimiento/asentimiento informado. El consentimiento informado se aplicará a participantes con una edad de 18 años cumplidos al momento de la ejecución del estudio y el asentimiento para el caso del padre/madre o tutor legal de pacientes con una edad comprendida entre los 0 y 17 años. En el caso de pacientes con edades entre los 12 y 17 años firmarán también el asentimiento informado conjuntamente con sus padres o tutores legales, para el caso de pacientes con edad inferior a los 12 años firmará únicamente el padre o tutor legal.

Actividad: Extracción de muestra de sangre de los participantes**Tiempo invertido por el participante: De 1 a 48 horas**

La extracción de muestra de sangre se iniciará una vez que se apruebe el plan de toma de muestra en el que se determine cantidad de muestras, intervalo y condiciones para cada paciente, causando la mínima molestia al paciente.

El estudio consta de dos etapas: fase farmacogenética y fase farmacocinética.

Si usted participa en la etapa farmacogenética, se le tomará una sola muestra de sangre con un volumen total aproximado de 4 a 5 mL en cualquier momento de su estancia en el hospital.

Si usted participa en la etapa farmacocinética, se le tomarán cuatro muestras de sangre con una cantidad de 5 mL cada una, la primera muestra se tomará antes de la administración de MTX, la segunda entre la 1 y 12 horas, la tercera entre las 12 y 24 y la cuarta entre las 24 y 48 horas luego de la administración de MTX. En este caso se le colocará un catéter venoso heparinizado del cual se tomarán todas las muestras para evitar múltiples punciones.

El investigador que le explique este formulario también le dirá en qué etapa usted va a participar.



Código 2017-106E

Riesgos y beneficios

De acuerdo al diseño del estudio y variables involucradas se consideran riesgos mínimos para los individuos participantes. Se han considerado estrategias para minimizar los riesgos físicos, emocionales y psicológicos, entre las que se encuentran:

- Evitar la realización de intervenciones adicionales (toma de muestras) a las planificadas en el proyecto.
- Contar con personal técnico calificado para la toma de muestras de sangre.
- Ejecutar la toma de muestras de sangre conforme a los protocolos médicos y técnicos establecidos para este fin.
- Disminuir el posible nivel de estrés en el participante ocasionado por la toma de muestra de sangre, mediante la coordinación previa con el personal del centro hospitalario y el empleo de dispositivos que permitan varias tomas de muestra de sangre en distintos tiempos mediante una sola punción.

El estudio no presenta riesgos físicos para el paciente, incluso la posibilidad de síncope vagal o desmayo no está presente debido a que las muestras se tomarán de los pacientes que están hospitalizados por lo que cuentan con control médico permanente.

El riesgo emocional y psicológico se reducirá con la intervención del oncohematólogo, pues es con el médico con quién el paciente se encuentra familiarizado.

Con la finalidad de garantizar la integridad emocional y psicológica de los participantes, se respetarán sus derechos como ser humano, la libertad de expresión de acuerdo a sus creencias, cultura y etnia. Los resultados que se obtengan de este estudio no significarán ningún peligro para la salud ni la vida del paciente, en caso de hallarse alguna anomalía se le hará conocer al médico tratante para que sea quién tome las mejores decisiones en cuanto a la prescripción.

Beneficios al paciente

Este estudio beneficiará directamente a los pacientes (se entregarán los resultados a los médicos tratantes de los casos, para que sean quienes hagan las correcciones adecuadas en cuanto al medicamento), a los padres o tutores legales del paciente y a la Institución que patrocina el tratamiento de esta enfermedad en el sentido de que permitirá evitar gastos adicionales por estancias hospitalarias y atención profesional para corregir estos probables eventos no deseados, comunes en quimioterapia por MTX. Cabe recalcar que el paciente no deberá pagar ningún valor por los exámenes que se le realicen dentro de este estudio, puesto que los costos serán cubiertos por este proyecto de investigación.

Beneficios a la sociedad

Esta investigación se enmarca dentro de la nueva línea científica de la medicina translacional o de precisión (es decir, se pretende dar el tratamiento correcto, en el momento correcto, a la persona correcta), la misma que busca la aplicación de los hallazgos en laboratorio como herramientas para un óptimo tratamiento individualizado en los niños. De lo que se conoce, en nuestro medio no se han realizado investigaciones que asocien estudios farmacogenéticos de la vía del folato con la farmacocinética poblacional de MTX y sus posibles complicaciones toxicológicas. Los resultados de esta investigación favorecerán la prevención de reacciones adversas (cualquier malestar después de la ingesta del medicamento) por administración de MTX con lo que se espera optimizar el tratamiento farmacológico con un balance riesgo/beneficio adecuado.



Código 2017-106E

Confidencialidad de los datos
Para nosotros es muy importante mantener su privacidad, por lo cual aplicaremos las medidas necesarias para que nadie conozca su identidad ni tenga acceso a sus datos personales:
1) La información o datos que nos proporcione se identificarán con un código, el cual nosotros le asignaremos en base a letras y números, con ello se reemplazará su nombre y se guardará en un lugar seguro donde solo el investigador y los co investigadores tendrán acceso.
2) Si se toman muestras de sangre de su persona, estas muestras serán utilizadas únicamente para esta investigación y destruidas tan pronto termine el estudio.
3) Su nombre no será mencionado en los reportes o publicaciones científicas derivadas de este estudio.
4) El Comité de Bioética de la USFQ podrá tener acceso a sus datos en caso de que surgieran problemas en cuanto a la seguridad y confidencialidad de la información o de la ética en el estudio.
5) Los resultados finales serán entregados y socializados con el médico tratante para que sea quién tome las mejores decisiones en el tratamiento con MTX.
6) Los resultados de este estudio se publicarán de forma general, en revistas científicas sin su nombre o código asignado por lo que la confidencialidad de la identidad de su hijo(a) o representado(a) está garantizada.
Derechos y opciones del participante
Usted puede decidir participar o no participar en este estudio. Si decide no participar solo debe decirselo al investigador principal o a la persona que le explica este documento. Además, aunque decida participar puede retirarse del estudio cuando lo desee, sin que ello afecte los beneficios de los que goza en este momento. Usted no recibirá ningún pago ni tendrá que pagar absolutamente nada por participar en este estudio.
Información de contacto
Si usted tiene alguna pregunta sobre el estudio por favor llame al siguiente teléfono: 0983051850, que pertenece al Dr. Fausto Zaruma Torres, PhD, o envíe un correo electrónico a fausto.zaruma@ucuenca.edu.ec
Si usted tiene preguntas sobre este formulario puede contactar al Dr. William F. Waters, Presidente del Comité de Bioética de la USFQ, al siguiente correo electrónico: comitebioetica@usfq.edu.ec



Código 2017-106E

Consentimiento informado	
Comprendo mi participación en este estudio. Me han explicado los riesgos y beneficios de participar en un lenguaje claro y sencillo. Todas mis preguntas fueron contestadas. Me permitieron contar con tiempo suficiente para tomar la decisión de participar y me entregaron una copia de este formulario de consentimiento informado. Acepto voluntariamente participar en esta investigación.	
Firma del participante	Fecha
Firma del testigo <i>(si aplica)</i>	Fecha
Nombre del investigador que obtiene el consentimiento informado	
Firma del investigador	Fecha



ANEXO 2. Asentimiento informado

Código 2017-106E



Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos
Universidad San Francisco de Quito
El Comité de Revisión Institucional de la USFQ
The Institutional Review Board of the USFQ

Formulario de Asentimiento Informado

Título de la investigación: Translocaciones cromosómicas y polimorfismos genéticos de enzimas de la vía del folato y de transportadores de metotrexato como posibles marcadores predictores de la toxicidad en niños con leucemia linfoblástica aguda.

Organización del investigador: Universidad de Cuenca

Nombre del investigador principal: Dr. Fausto Leonardo Zaruma Torres, PhD

Datos de localización del investigador principal 07 5051120, 0983051850,

fausto.zaruma@ucuenca.edu.ec

Co-investigadores

- BQF. Adriana Monserrath Orellana Paucar, PhD
- Dra. Sandra Paola Cabrera Feicán, Mgt
- BQF. Maritza Raphaela Ochoa Castro, Mgt
- Dra. Zulma Beatriz Zamora Burbano, Mgt
- BQF. Geovanny Patricio Barrera Luna
- Dr. Oswaldo Aguirre Valdiviezo
- Dr. Enmanuel Guerrero Quiroz
- Dr. Andrés Andrade Galarza
- Dr. Ismael Lares Asseff, PhD
- Dr. Néstor García Chong, PhD



DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Introducción

Este formulario incluye un resumen del propósito de este estudio. Usted puede hacer todas las preguntas que desee para entender claramente su participación y despejar sus dudas. Puede tomarse el tiempo que necesite para consultar con su familia y/o amigos y permitimos conocer si desea participar en este estudio o no.

Su hijo(a) o representado(a) ha sido invitado(a) a participar en una investigación sobre alteraciones genéticas que promueven un posible riesgo de reacción adversa no deseada o no esperada por la administración de metotrexato. Este medicamento se utiliza como parte del tratamiento del padecimiento de LLA. Se le ha hecho la invitación a participar en este proyecto debido a que su representado(a) cumple con los siguientes criterios:

- Paciente de cualquier sexo, niño o niña, con tratamiento actual con metotrexato (MTX) y con edad comprendida entre los 0 y 17 años.
- Paciente de cualquier ciudad del país, sin importar su condición económica, lengua, costumbres o raza.
- Paciente con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda, LLA (L1, y L2)
- Paciente actual de SOLCA Cuenca o SOLCA Loja

Entiéndase por alteración genética al cambio de la información genética en su cuerpo, lo cual se puede manifestar como alteraciones en las funciones normales de los órganos o como signos o síntomas que no son comunes. Estos cambios se producen por diferentes causas ya sean hereditarias (del padre o de la madre) o provocados por diferentes sustancias (por ejemplo: los medicamentos). El MTX es un medicamento, por eso

Código 2017-106E

las alteraciones genéticas relacionadas con MTX que se identifiquen en este estudio serán tratadas como un marcador de toxicidad, es decir serán un indicador de toxicidad. El MTX es un medicamento clave en el tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda, se usa para disminuir la producción descontrolada de glóbulos blancos inmaduros, puede ser tóxico si se utiliza en dosis altas. Usted recibe este medicamento porque es de gran ayuda para el tratamiento de su enfermedad.

Propósito del estudio

El metotrexato (MTX), fue el primer medicamento utilizado desde 1948 en el tratamiento de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) en niños.

Este trabajo pretende identificar posibles indicadores que permitan predecir la posible toxicidad por la administración de MTX, lo cual podría contribuir al aseguramiento de una terapia personalizada y de precisión de MTX basada en pacientes con diagnóstico clínico de LLA.

Descripción de los procedimientos**Actividad: Aceptación de participación en el estudio****Tiempo invertido por el participante o su tutor legal: 1 hora**

Luego de llevado a cabo el escrutinio y selección de los pacientes se realizará la socialización del estudio, en la que se verán involucrados también los familiares o representante del paciente. Posteriormente se firmará el consentimiento/asentimiento informado. El consentimiento informado se aplicará a participantes con una edad de 18 años cumplidos al momento de la ejecución del estudio y el asentimiento para el caso del padre/madre o tutor legal de pacientes con una edad comprendida entre los 0 y 17 años. En el caso de pacientes con edades entre los 12 y 17 años firmarán también el asentimiento informado conjuntamente con su padres o tutores legales, para el caso de pacientes con edad inferior a los 12 años firmará únicamente el padre o tutor legal.

Actividad: Toma de muestra de sangre de los participantes**Tiempo invertido por el participante: De 1 a 48 horas**

La extracción de muestra de sangre se iniciará una vez que se apruebe el plan de toma de muestra en el que se determine cantidad de muestras, intervalo y condiciones para cada paciente, causando la mínima molestia al paciente.

El estudio consta de dos etapas: fase farmacogenética y fase farmacocinética.

Si su hijo(a) participa en la etapa farmacogenética, se le tomará una sola muestra de sangre con un volumen total aproximado de 4 a 5 mL en cualquier momento de su estancia en el hospital.

Si su hijo(a) participa en la etapa farmacocinética, se le tomarán cuatro muestras de sangre con una cantidad de 5 mL cada una, la primera muestra se tomará antes de la administración de MTX, la segunda entre la 1 y 12 horas, la tercera entre las 12 y 24 y la cuarta entre las 24 y 48 horas luego de la administración de MTX. En este caso se le colocará un catéter venoso heparinizado del cual se tomarán todas las muestras para evitar múltiples punciones.

El investigador que le explique este formulario también le dirá en qué etapa su hijo(a) o representado(a) va a participar.



Código 2017-106E

Riesgos y beneficios

De acuerdo al diseño del estudio y variables involucradas se consideran riesgos mínimos para los individuos participantes. Se han considerado estrategias para minimizar los riesgos físicos, emocionales y psicológicos, entre las que se encuentran:

- Evitar la realización de intervenciones adicionales (toma de muestras) a las planificadas en el proyecto.
- Contar con personal técnico calificado para la toma de muestras de sangre.
- Ejecutar la toma de muestras de sangre conforme a los protocolos médicos y técnicos establecidos para este fin.
- Disminuir el posible nivel de estrés en el participante ocasionado por la toma de muestra de sangre, mediante la coordinación previa con el personal del centro hospitalario y el empleo de dispositivos que permitan varias tomas de muestra de sangre en distintos tiempos mediante una sola punción.

El estudio no presenta riesgos físicos para el paciente, incluso la posibilidad de síncope vagal o desmayo no está presente debido a que las muestras se tomarán de los pacientes que están hospitalizados por lo que cuentan con control médico permanente.

El riesgo emocional y psicológico se reducirá con la intervención del oncohematólogo, pues es con el médico con quién el paciente se encuentra familiarizado.

Con la finalidad de garantizar la integridad emocional y psicológica de los participantes, se respetarán sus derechos como ser humano, la libertad de expresión de acuerdo a sus creencias, cultura y etnia. Los resultados que se obtengan de este estudio no significarán ningún peligro para la salud ni la vida del paciente, en caso de hallarse alguna anomalía se le hará conocer al médico tratante para que sea quién tome las mejores decisiones en cuanto a la prescripción.

Beneficios al paciente

Este estudio beneficiará directamente a los pacientes (se entregarán los resultados a los médicos tratantes de los casos, para que sean quienes hagan las correcciones adecuadas en cuanto al medicamento), a los padres o tutores legales del paciente y a la Institución que patrocina el tratamiento de esta enfermedad en el sentido de que permitirá evitar gastos adicionales por estancias hospitalarias y atención profesional para corregir estos probables eventos no deseados, comunes en quimioterapia por MTX. Cabe recalcar que el paciente no deberá pagar ningún valor por los exámenes que se le realicen dentro de este estudio, puesto que los costos serán cubiertos por este proyecto de investigación.

Beneficios a la sociedad

Esta investigación se enmarca dentro de la nueva línea científica de la medicina translacional o de precisión (es decir, se pretende dar el tratamiento correcto, en el momento correcto, a la persona correcta), la misma que busca la aplicación de los hallazgos en laboratorio como herramientas para un óptimo tratamiento individualizado en los niños. De lo que se conoce, en nuestro medio no se han realizado investigaciones que asocien estudios farmacogenéticos de la vía del folato con la farmacocinética poblacional de MTX y sus posibles complicaciones toxicológicas. Los resultados de esta investigación favorecerán la prevención de reacciones adversas (cualquier malestar después de la ingesta del medicamento) por administración de MTX con lo que se espera optimizar el tratamiento farmacológico con un balance riesgo/beneficio adecuado.



Código 2017-106E

Confidencialidad de los datos
Para nosotros es muy importante mantener su privacidad, por lo cual aplicaremos las medidas necesarias para que nadie conozca su identidad ni tenga acceso a sus datos personales: 1) La información o datos que nos proporcione se identificará con un código, el cual nosotros le asignaremos en base a letras y números, con ello se reemplazará su nombre y se guardará en un lugar seguro donde solo el investigador y los coinvestigadores tendrán acceso. 2) Si se toman muestras de sangre de su hijo(a) o representado(a), estas muestras serán utilizadas únicamente para esta investigación y destruidas tan pronto termine el estudio. 3) El nombre de su hijo(a) o representado(a) nombre no será mencionado en los reportes o publicaciones científicas derivadas de este estudio. 4) El Comité de Bioética de la USFQ podrá tener acceso a sus datos en caso de que surgieran problemas en cuanto a la seguridad y confidencialidad de la información o de la ética en el estudio. 5) Los resultados finales serán entregados y socializados con el médico tratante para que sea quién tome las mejores decisiones en el tratamiento con MTX. 6) Los resultados de este estudio se publicarán de forma general, en revistas científicas sin su nombre o código asignado por lo que la confidencialidad de su identidad está garantizada.
Derechos y opciones del participante
Usted puede decidir la participación o no participación de su hijo(a) o representado(a) en este estudio. Si decide no participar solo debe decirselo al investigador principal o a la persona que le explica este documento. Además, aunque decida participar puede retirarse del estudio cuando lo desee, sin que ello afecte los beneficios de los que su hijo(a) o representado(a) goza en este momento. Usted y su hijo(a) o representado(a) no recibirán ningún pago ni tendrán que pagar absolutamente nada por participar en este estudio.
Información de contacto
Si usted tiene alguna pregunta sobre el estudio por favor llame al siguiente teléfono: 0983051850, que pertenece al Dr. Fausto Zaruma Torres, PhD, o envíe un correo electrónico a fausto.zaruma@ucuenca.edu.ec Si usted tiene preguntas sobre este formulario puede contactar al Dr. William F. Waters, Presidente del Comité de Bioética de la USFQ, al siguiente correo electrónico: comitebioetica@usfq.edu.ec



Código 2017-106E

Asentimiento informado	
Comprendo la participación de mi hijo(a) en este estudio. Me han explicado los riesgos y beneficios de participar en un lenguaje claro y sencillo. Todas mis preguntas fueron contestadas. Me permitieron contar con tiempo suficiente para tomar la decisión de participar y me entregaron una copia de este formulario de asentimiento informado. Acepto voluntariamente que mi hijo(a) participe en esta investigación.	
Firma de padre/madre o tutor legal	Fecha
Firma del paciente <i>(si aplica)</i>	Fecha
Nombre del investigador que obtiene el asentimiento informado	
Firma del investigador	Fecha



ANEXO 4. Carta de Aprobación emitido por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos Universidad San Francisco de Quito.

2017-106E



Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos
Universidad San Francisco de Quito

El Comité de Revisión Institucional de la USFQ
The Institutional Review Board of the USFQ

Aprobación MSP, Oficio No. MSP-VGV5-2016-0244-O, 26 de Abril de 2016

Quito, 5 de enero de 2018

Señor

Dr. Fausto Leonardo Zaruma Torres
Investigador Principal
UNIVERSIDAD DE CUENCA
Ciudad

De mi mejor consideración:

Por medio de la presente, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito se complace en informarle que su solicitud de revisión y aprobación del estudio de investigación "Translocaciones cromosómicas y polimorfismos genéticos de enzimas de la vía del folato y de transportadores de metotrexato como posibles marcadores predictores de la toxicidad en niños con leucemia linfoblástica aguda.", ha sido aprobada el día de hoy como un estudio *fullboard*, debido a que la investigación va a tomar datos personales pero el investigador asegura que serán codificados para el análisis y presentación de los resultados y una vez concluido el estudio cualquier dato que pudiese identificar al participante será borrado.

El CEISH - USFQ aprueba el estudio ya que cumple con los siguientes parámetros:

- El proyecto de investigación muestra metas y/o objetivos de significancia científica con una justificación y referencias.
- El protocolo de investigación cuenta con los procedimientos para minimizar sus riesgos de sus participantes y/o los riesgos son razonables en relación a los beneficios anticipados del estudio.
- Los participantes del estudio tienen el derecho a retirarse del estudio y su participación su conseguida a través de un proceso de consentimiento informado
- El protocolo cuenta con provisiones para proteger la privacidad y confidencialidad de los participantes del estudio en sus procesos de recolección, manejo y almacenamiento de datos
- El protocolo detalla las responsabilidades del investigador

Además el investigador principal de este estudio ha dado contestación a todas las dudas y realizado todas las modificaciones que este Comité ha solicitado en varias revisiones. Los documentos que se aprueban y que sustentan este estudio es la versión # 3 de diciembre 19, 2017 que incluyen:

- Solicitud de revisión y aprobación de estudio de investigación, 14 páginas;
- Solicitud de aplicación al consentimiento informado por escrito, 5 páginas;
- Solicitud de aplicación al asentimiento informado por escrito, 5 páginas;
- Herramientas, 8 páginas;

Casilla Postal 17-12-841, Quito, Ecuador
comitebioetica@usfq.edu.ec
PBX (593-2) 297-1700 ext 1149

ANEXO 5. Interpretación de resultados de PCR en Tiempo Real

❖ Polimorfismo *MTHFR* 677C>T

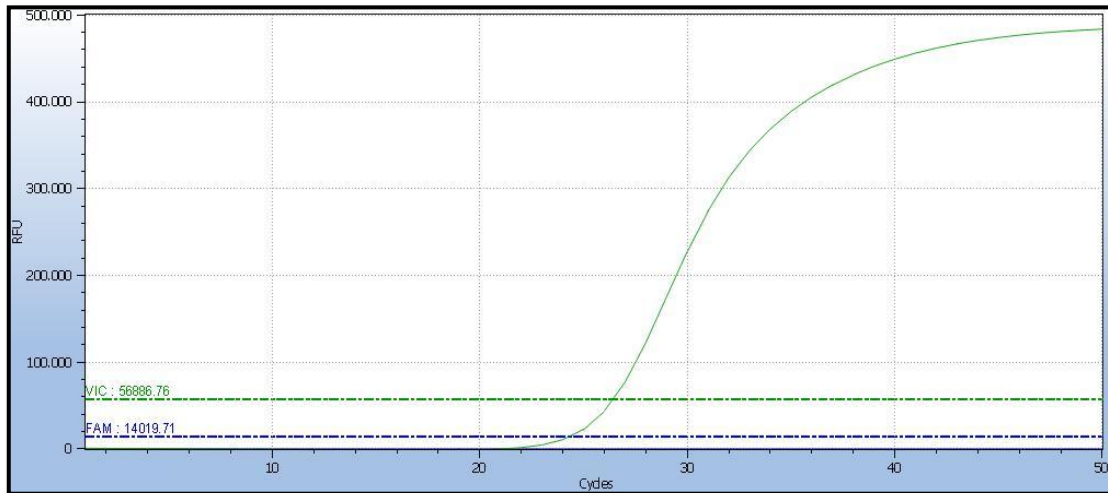


Figura 11. Amplificación de qPCR para sonda C__1202883_20 (rs1801133), Homocigoto Wild Type.

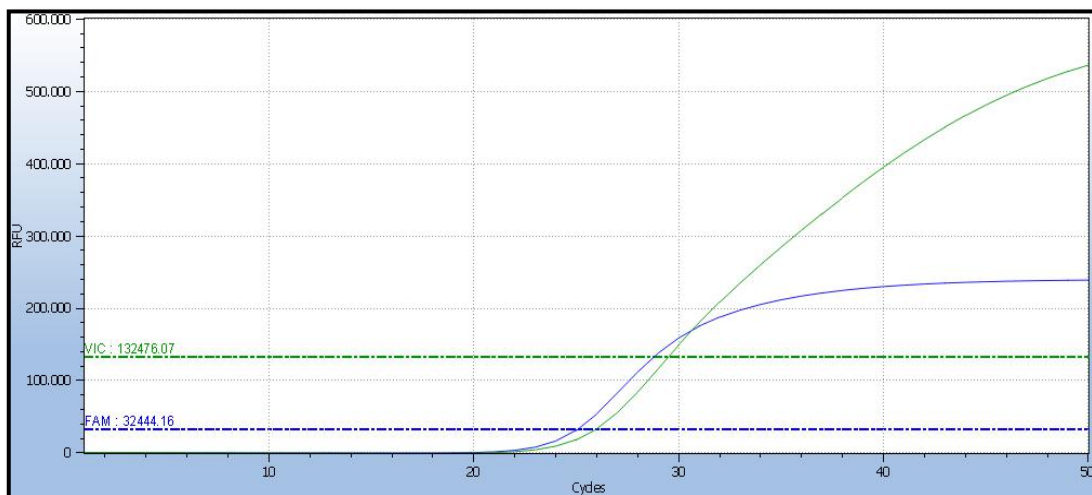


Figura 12. Amplificación de qPCR para sonda C__1202883_20 (rs1801133), Heterocigoto.

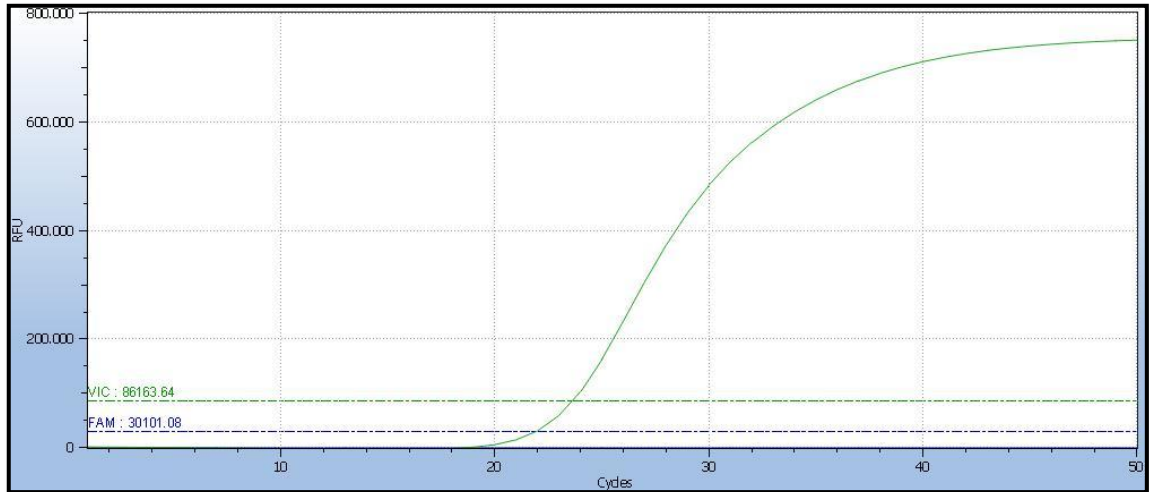
❖ Polimorfismo *MTHFR* 1298A>C

Figura 13. Amplificación de qPCR para sonda C__850486_20 (rs1801131), Homocigoto Wild Type.

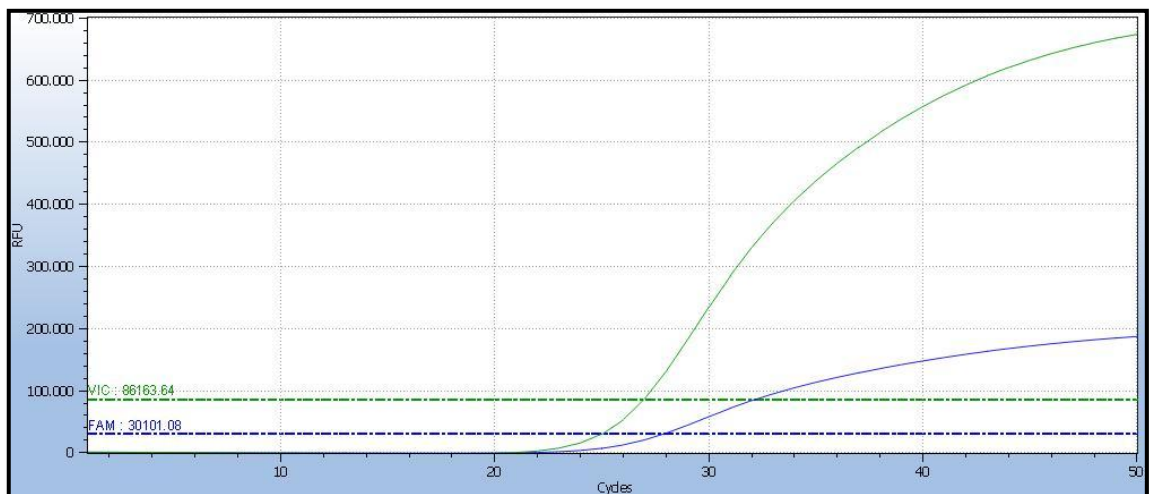


Figura 14. Amplificación de qPCR para sonda C__850486_20 (rs1801131), Heterocigoto.

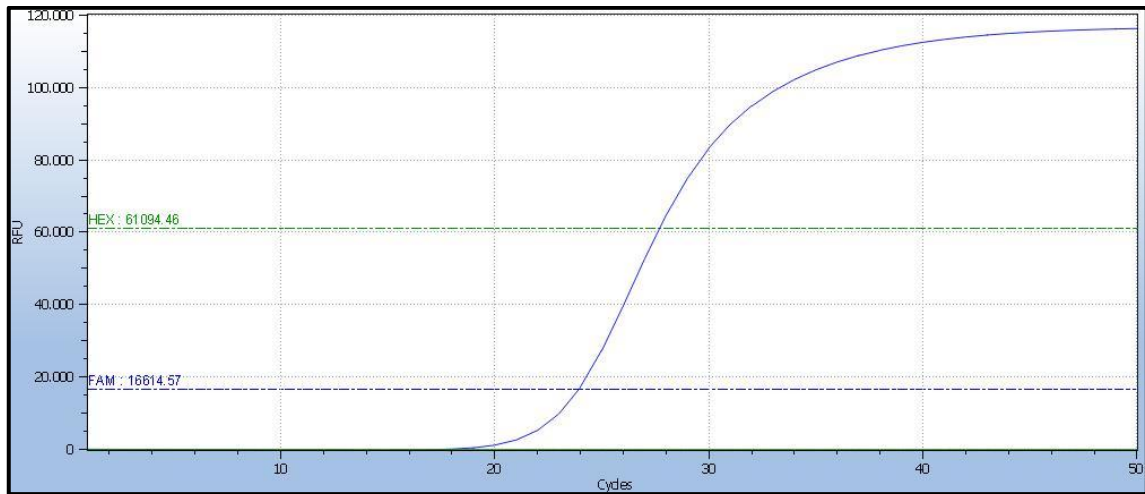


Figura 15. Amplificación de qPCR para sonda C_850486_20 (rs1801131), Homocigoto mutado.