



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“POLIMORFISMO G80A DEL ACARREADOR DE
FOLATOS REDUCIDOS Y RESPUESTA A
METOTREXATO EN LEUCEMIA AGUDA
LINFOBLÁSTICA”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

ADRIANA CONTRERAS QUIROZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. MARCO ANTONIO LEYVA VÁZQUEZ

CHILPANCINGO, GRO., DICIEMBRE DE 2009.



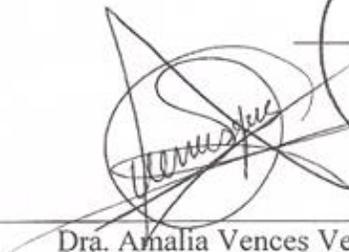
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 10 días del mes de julio de dos mil nueve, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Polimorfismo G80A del acarreador de folatos reducidos y respuesta a metotrexato en leucemia aguda linfoblástica", presentada por la alumna Adriana Contreras Quiroz, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

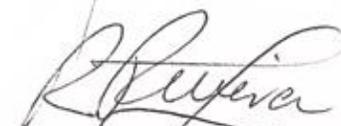
El Comité Tutorial

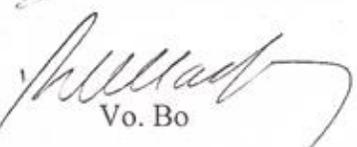
Dr. Marco Antonio Leyya Vázquez
Dirección de tesis


Dra. Amalia Vences Velázquez


Dra. Isela Parra Rojas

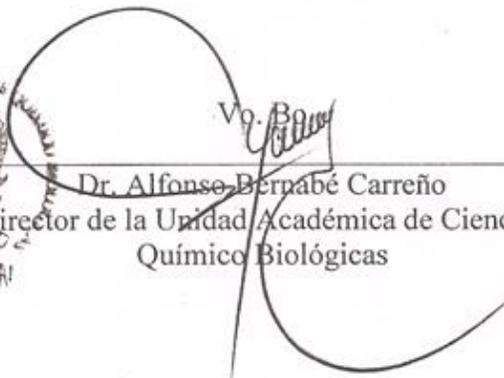

M en C. Eugenia Flores Alfaro


Dr. Roberto Rivera Luna


Vo. Bo


Dra. Berenice Illades Aguiar
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas


DIRECCIÓN


Vo. Bo

Dr. Alfonso Bernabé Carreño
Director de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero en Chilpancingo Guerrero.

Bajo la dirección de:
Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

La asesoría interna de:
MSP. Eugenia Flores Alfaro
Dra. Isela Parra Rojas
Dra. Amalia Vences Velázquez

La asesoría externa de:
Dr. Roberto Rivera Luna
Subdirector de la sección de Hemato-Oncología
Instituto Nacional de Pediatría
México, D.F.

La colaboración de:
Dr. Marco Antonio Terán Porcayo
Dra. Ana Bertha Rivera Ramírez
Instituto Estatal de Cancerología "Dr. Arturo Beltrán Ortega"
Acapulco, Gro.

Durante el periodo en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Adriana Contreras Quiroz recibió beca del CONACYT. Además, recibió la beca del programa de Movilidad Estudiantil del Banco Santander, durante el periodo de Julio a Diciembre de 2008.

Agradecimientos

Al Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez, por toda la paciencia, el apoyo y la confianza depositada en mi para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Roberto Rivera Luna, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, por aportar su experiencia y por la disposición mostrada en todo momento, ha sido un verdadero honor trabajar con usted.

A mis sinodales, MSP. Eugenia, Dra. Isela y Dra. Amalia, mil gracias por todo el esfuerzo que hicieron para obtener el resultado plasmado en este escrito.

A la Dra. Berenice Illades, porque gracias a ella conocí el mundo de la investigación, por impulsarme a seguir adelante con su ejemplo.

Al personal del Laboratorio de Biomedicina Molecular por todas las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

Al M en C. Pedro Rosendo Chalma, mi benefactor consentido, gracias por estar ahí cuando te necesité.

A los Laboratorios de Inmunobiología y Diagnóstico Molecular, Toxicología y Biología Molecular y Biología Celular del Cáncer, muchas gracias por todas sus atenciones.

A mis hermanitos científicos, Yazmín y Jorge, por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de aventuras: Julio, Jazmín, Kimberly, Carlos Daniel, Luilli, Luz Elena, América, Arianna y Alinne, mucho éxito en los proyectos que emprendan.

Dedicatorias

A Bety, el ángel de la guarda de nuestra familia y a mi angelito de la guarda personal.

A mis padres, Virginia y Francisco, por seguir acompañándome en el camino, por impulsarme a seguir adelante y por creer en mí .

A mi abuelita Celia, porque aunque a veces no entiende por qué me gusta complicarme tanto la vida, sabe que soy feliz.

A mis hermanos, Ada Katia, Jorge Luis y Monserrat Natividad, por todos los momentos que me perdí de su compañía, he aquí el fruto de tantas ausencias... Los quiero.

A toda mi familia, que me es imposible nombrar aquí, pero que siempre están en mi corazón.

A los hermanos que la vida me ha regalado a lo largo del camino: Ambar, Blanca, Lizbet, Ancelma, Norma, Edenia, Lucecita, Nicolás, Adolfo, Zambri, Esimeman, mil gracias por acompañarme en el camino y por hacerme saber que siempre, siempre están ahí.

A mis ángeles guardianes: Didi, Mirna, Miguel y Lucio, por quedarse a mi lado siempre, por no dejarme caer, por creer y darme las fuerzas necesarias para seguir adelante.

A los peques de la MCB: Adrián, Jorge, Idanya, Jorge Sotelo, Magaly, Lupita, Jesús y Faustino, mucha suerte en sus proyectos, ha sido un placer compartir el camino con ustedes.

Si no creyera en lo que agencio
Si no creyera en mi camino
Si no creyera en mi sonido
Si no creyera en mi silencio
¿Qué cosa fuera?
Silvio Rodríguez

A todos los que de una u otra manera han tocado mi vida... Gracias

Ady

INDICE

	Página
I. Resumen	1
II. Abstract	2
III. Introducción	3
IV. Material y métodos	7
V. Resultados	9
VI. Discusión y Conclusiones	17
VII. Referencias	20

I. Resumen

Las leucemias se caracterizan por la proliferación descontrolada de leucocitos en sangre y médula ósea, dependiendo de la estirpe celular afectada, las leucemias pueden clasificarse en leucemia aguda linfoblástica (LAL) y leucemia aguda mieloide (LAM). En el estado de Guerrero las leucemias son un problema de salud pública, siendo este padecimiento la segunda causa de muerte entre la población infantil. El metotrexato es un fármaco clave en el tratamiento de leucemia aguda linfoblástica, el éxito del tratamiento depende en gran medida de la correcta captación del metotrexato por las células, el cual se lleva a cabo a través del acarreador de folatos reducidos (RFC). Entre las causas más frecuentes de falta de respuesta al tratamiento con metotrexato se encuentran defectos en el transporte al interior de las células, siendo el mecanismo predominante la presencia de mutaciones en el gene RFC. El objetivo de este estudio es evaluar el polimorfismo G80A en RFC y su impacto sobre la respuesta al tratamiento con metotrexato. A partir de un banco de DNA por medio de PCR y RFLP se hizo la caracterización molecular del genotipo del gen RFC en muestras de DNA de pacientes con leucemia aguda linfoblástica (casos) y población infantil sana (controles). Se encontró una frecuencia de 42.8% para el genotipo AA, 28.6% para el genotipo GA y 28.6% para el genotipo silvestre en los casos y una frecuencia de 25% de AA, 40.7% para GA y 34.3% en GG para la población control. El análisis de Kaplan-Meier arrojó diferencias significativas para tiempo de supervivencia y edad del paciente al momento de la recaída, no así en cuanto a la presencia del polimorfismo. Finalmente, los pacientes que sufrieron recaída de la enfermedad durante el tratamiento tuvieron 6.8 veces más posibilidades de fallecer que aquellos que no la tuvieron. Aunque con algunas limitantes, como el tamaño de muestra y la poca disponibilidad de información, los resultados obtenidos pueden servir para considerar la detección del polimorfismo G80A dentro de las pruebas diagnósticas para leucemia aguda linfoblástica, con el propósito eventual de una terapia anticáncer personalizada.

Palabras clave: Leucemia aguda linfoblástica, acarreador de folatos reducidos, metotrexato, recaída, supervivencia.

II. Abstract

Leukemia is a hematological disorder who is characterized by uncontrolled proliferation of leukocytes in the bone marrow and peripheral blood, depending upon the celular type affected. Leukemias are classified in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloblastic leukemia (AML). In the state of Guerrero, leukemias are a health public problem, this is the second cause of death among infant population. Methotrexate is a key component in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. The sucessfull treatment depend upon the correct methotrexate absortion by cells through reduced folate carrier (RFC). One of the most frequent cause of treatment failure of methotrexate is the impaired transport, resulted of cualitative and cuantitative alterations, being the predominant mechanism mutations in RFC gen. The aim in this study was to evaluate polymorphism G80A in the RFC and their impact in methotrexate treatment response. From a DNA bank, the samples were submitted to PCR and RFLP for molecular characterization of RFC genotype in DNA samples of children with acute lymphoblastic leukemia (cases) and healthy children (controls). We found a frequency of 42.8% for AA, 28.6% for GA and 28.6% for GG genotypes in ALL patients, while for the healthy population we found a frequency of 25% for AA, 40.7 for GA and 34.3% for GG genotype. The Kaplan-Meier analysis show significance in event free survival and age at relapse time, but do not show significance in the genotype carrier. Finally, patients who suffer relapse in the treatment have 6.8 times more probability to die than patients without relapse. Although this study have some limitations, like size sample and poor availability of information, the results can serve to consider the RFC genotype detection inside of molecular probes for ALL diagnosis, with the eventual purpose of anticancer personalized therapy.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, reduced folate carrier, methotrexate, relapse, survival.

III. Introducción

Las leucemias agudas se caracterizan por la proliferación descontrolada de leucocitos inmaduros en sangre y médula ósea, dependiendo de la estirpe celular afectada, las leucemias pueden clasificarse en leucemia aguda linfoblástica (LAL) y leucemia aguda mieloide (LAM) ^{1,2}.

Entre los factores de riesgo conocidos para leucemia se encuentran: exposición a radiaciones ionizantes y benceno; tratamientos de quimioterapia (cáncer secundario a tratamiento), así como también expresión aberrante de protooncogenes, translocaciones cromosomales, inversiones, eliminaciones o mutaciones puntuales debidas a susceptibilidad relacionada a polimorfismos en múltiples genes ²⁻⁴.

En México las leucemias son el padecimiento maligno más frecuente en pediatría, ocupan el segundo lugar de muerte entre niños de 4 a 15 años, siendo la leucemia aguda linfoblástica la de mayor frecuencia, con aproximadamente 75% del total de leucemias reportadas. En el estado de Guerrero la incidencia de leucemia en la población infantil está mostrando una tendencia a incrementarse, según lo reportado por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI); en el reporte de 2006, anualmente se están presentando entre 600 y 650 casos entre la población, lo que convierte a la LAL en la segunda causa de muerte entre los niños de 1 a 19 años en nuestro Estado ⁵⁻⁷.

Para el diagnóstico de LAL el aspirado de médula ósea sigue siendo una herramienta indispensable, ya que los hallazgos que se hacen en ella contribuyen de manera importante al diagnóstico, el cual debe ser complementado con las nuevas técnicas moleculares que están disponibles, como la citometría de flujo, histoquímica, FISH y PCR ⁸⁻¹³.

El tratamiento de la LAL consiste en tres fases: inducción a la remisión, consolidación y terapia de mantenimiento ^{6,10}. En la inducción del tratamiento se administran vincristina, prednisona/dexametasona, L-asparaginasa y doxorubicina con el objetivo de restaurar la homeostasis hematopoyética tanto en médula ósea como en sangre periférica. En la segunda etapa del tratamiento (consolidación y mantenimiento) se administra metotrexato, el cual fue la primera clase de antifolato usado en oncología clínica, ^{14,15}. El metotrexato es uno de los fármacos de primera elección usado en el tratamiento de leucemias ^{16,17}, la principal vía de entrada a la célula es mediante el acarreador de folatos reducidos ^{18,19}. El éxito del tratamiento radica en gran parte de la correcta captación y distribución del medicamento en las células blanco ^{16,20}.

Entre los polimorfismos estudiados están los que se presentan en el gen *rfc*, el cual codifica para el acarreador de folatos reducidos (RFC), en humanos se localiza en el cromosoma 21 (21q22.2-22.3), la proteína Rfc consta de 591 aminoácidos, contiene 12 dominios transmembranales, su extremo amino terminal es corto y el carboxilo terminal es largo, se presume que ambos residen en el citoplasma. En el primer dominio transmembranal de la proteína se encuentra un sitio de glicosilación, el cual hace que el peso molecular de esta proteína oscile entre los 70 y 120 KDa. ²¹

Varios estudios han documentado que los defectos en el transporte resultado de alteraciones cualitativas o cuantitativas del RFC han sido reconocidas como un mecanismo frecuente de resistencia antifolato ²², siendo el mecanismo de resistencia predominante mutaciones en el gen RFC ²³⁻²⁶ (Figura 1).

Entre las principales causas de resistencia al tratamiento con metotrexato tenemos:

- a) pérdida de la función del RFC, debido a polimorfismos presentes en el primer dominio transmembrana del acarreador ^{23,27,28},
- b) polimorfismos en el gen de varias enzimas importantes en el metabolismo de los antifolatos, entre ellas:
 - Dihidrofolato Reductasa (DHFR);²⁹,

- Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) ³⁰;
- Timidilato Sintasa (TS) ²⁶ y
- γ -Glutamil Hidrolasa (GGH) ³¹.

Diversos estudios se han centrado en la búsqueda de polimorfismos relacionados con moléculas que participan en el metabolismo del folato, incluido el acarreador de folatos reducidos, en aquellas enfermedades que usan tratamiento con metotrexato, como es la leucemia aguda linfoblástica, artritis reumatoide y psoriasis, con el objetivo de identificar blancos de acción para nuevas estrategias de tratamiento, la caracterización de biomarcadores para el diagnóstico, así como hacer una evaluación de la eficacia del metotrexato entre la población de estudio ³²⁻³⁵.

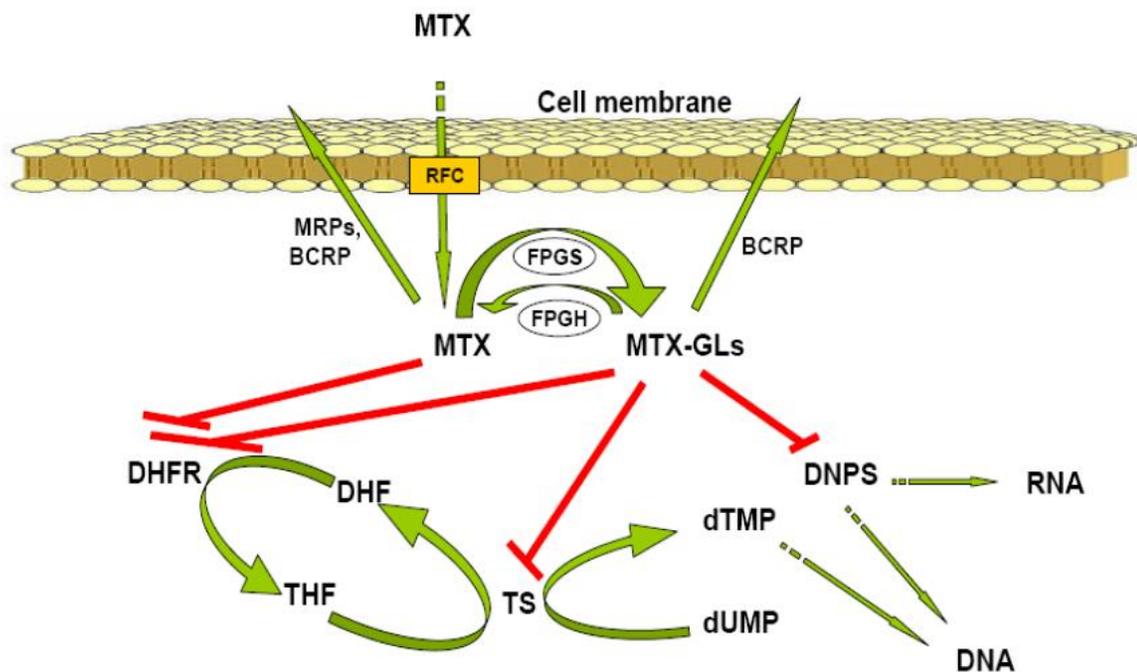


Figura 1. Resumen del metabolismo intracelular y blancos del metotrexato en la célula. El metotrexato es transportado activamente dentro de la célula por el acarreador de folatos reducidos (RFC), donde sufre poliglutamilación y ejerce sus efectos tóxicos inhibiendo a la dihidrofolato reductasa (DHFR), timidilato sintasa (TS) y la síntesis *de novo* de purinas (PDNS). Modificado de Fotoohi, 2007. ³⁶

Hasta el momento se desconoce la frecuencia del polimorfismo G80A en los pacientes con leucemia aguda linfoblástica en la población del estado de Guerrero, el comportamiento de dicho polimorfismo sobre la correcta captación y distribución del metotrexato en las células, así como el estudio de la respuesta al tratamiento de los pacientes frente a los diferentes medicamentos que conforman la terapia contra el cáncer, el cual es de vital importancia.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la asociación entre el polimorfismo G80A del acarreador de folatos reducidos y su impacto sobre la respuesta al tratamiento con metotrexato en los pacientes con leucemia aguda linfoblástica.

IV . Material y métodos

Se estudiaron 210 individuos, 70 pacientes con LAL de 0 a 18 años de edad, de uno u otro sexo, con diagnóstico confirmado por citomorfología de médula ósea. Todos los casos estuvieron en tratamiento con metotrexato o con modificación del mismo por falta de respuesta al metotrexato y se eligieron como controles a 140 individuos aparentemente sanos de 0 a 18 años de edad, de uno u otro sexo, con cuenta de leucocitos normal ($4 - 10 \times 10^3$ leucocitos/mm³) y sin antecedentes familiares de leucemia. Los individuos a los que presentaron otra enfermedad en la que se les administró metotrexato fueron excluidos del estudio, así como también aquellos individuos que no tuvieron expediente clínico completo. Todas las personas seleccionadas fueron originarias del estado de Guerrero.

En la primera etapa de la investigación se procedió a revisar los expedientes clínicos de los pacientes con leucemia aguda linfoblástica, así como las encuestas de la población que conforma el grupo control. De cada individuo se obtuvieron datos sociodemográficos y cuenta de leucocitos al momento de la aplicación de la encuesta o del diagnóstico; en el caso de los pacientes con LAL se obtuvo la dosis de metotrexato administrada, la duración del tratamiento y respuesta al mismo, según lo reportado en sus expedientes clínicos. Para este fin se consideró falta de respuesta al tratamiento con metotrexato la recaída de los pacientes.

Detección del polimorfismo G80A del acarreador de folatos reducidos. Se determinó por medio de los métodos PCR-RFLP adaptados de Dervieux y cols¹⁷. La amplificación se realizó usando 900 nM de oligonucleótidos iniciadores (sentido 5'AGTGTCACCTTCGTCCCCTC3' ; antisentido 5'CTCCCGCGTGAAGTTCTT'3), 1 unidad de Taq polimerasa (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones de PCR consistieron en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 96°C seguidos de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos, alineación/extensión por 1

minuto a 60°C y una extensión final de 7 minutos a 72°C. El producto obtenido fue de 230 pb. El producto de PCR obtenido se sometió a restricción usando la enzima HhaI (New England Biolabs), el polimorfismo G80A suprime un sitio de restricción sobre el producto de PCR, de manera que para el genotipo GG se observarán tres fragmentos (126, 68 y 37 pb), para el genotipo GA se observarán cuatro fragmentos (162, 125, 68 y 37) y para el genotipo AA se observarán dos fragmentos (162 y 68 pb). La restricción se visualizó por medio de geles de agarosa al 4% teñidos con bromuro de etidio y analizados en un fotodocumentador.

Análisis estadístico. Los datos de las variables estudiadas son descritos en frecuencias o medias y desviación estándar, en la determinación de las diferencias de frecuencias entre los grupos de estudio se utilizó la prueba de Ji cuadrada (X^2) y la diferencia de medias por la prueba de t “student”. En el grupo control se hizo la evaluación del equilibrio génico de Hardy-Weinberg del polimorfismo G80A en el acarreador de folatos reducidos. Se realizó análisis de supervivencia utilizando el método de Kaplan-Meier, prueba de log-rank y modelo de riesgos proporcionales, para evaluar el efecto del tratamiento (recaída o no) y del polimorfismo G80A sobre la probabilidad de supervivencia en los pacientes con LAL. Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales, con un nivel de significancia de 0.05 y fueron procesadas en el paquete estadístico stata versión 9.1.

V. Resultados

a). Características generales de la población con LAL y controles.

En el cuadro 1 se presenta un resumen de las características generales de la población en estudio. El rango de edad de 13 a 18 años contuvo la mayoría de los controles, mientras que para los casos el 48.6% de ellos estuvieron entre 1 y 6 años de edad. Por género, la mayor frecuencia se registró en el masculino, con un 64.3% en los casos y un 53.6% en los controles. La cuenta de leucocitos para los controles se concentró en el rango de 1,000 a 10,000, mientras que para los casos la mayor frecuencia se observó en el rango de 10,001 a 100,000.

Cuadro 1. Características generales de la población de estudio

Característica	Grupo de estudio	
	Casos n(%)	Controles n(%)
Edad (años)		
1 a 6	34 (48.6)	46 (32.9)
7 a 12	24 (34.3)	43 (30.7)
13 a 18	12 (17.1)	51 (36.4)
Sexo		
Femenino	25 (35.7)	65 (46.4)
Masculino	45 (64.3)	75 (53.6)
Cuenta de leucocitos al diagnóstico/toma de muestra		
1,000 a 10,000	29 (41.4)	140 (100)
10,001 a 100,000	34 (48.6)	-
100,001 a 290,000	7 (10)	-

En el cuadro 2 se resumen las características de la población con leucemia aguda linfoblástica, agrupada de acuerdo a su respuesta al tratamiento con metotrexato, para dicho fin, la falta de respuesta al tratamiento se definió como la presencia de recaída de la enfermedad. El 68.6% de la población con LAL sufrió recaída (n=48), de estos el 66.6% eran del sexo femenino y el 33.3% del sexo masculino, el 91.6% de ellos recibieron una dosis intermedia de metotrexato, 58.3% de ellos tenían menos de un año bajo el régimen de tratamiento con metotrexato cuando

presentaron la recaída, de estos 48 pacientes con recaída, el 75% ya fallecieron. De los 22 pacientes que no sufrieron recaída (31.4%) el 59% eran mujeres. El 95.5% de ellos recibieron dosis intermedia de metotrexato durante su tratamiento, el 91% tienen más de un año en terapia con metotrexato y hasta la fecha sólo el 18% de ellos han fallecido. Se encontraron diferencias significativas en el tiempo de tratamiento con metotrexato y el estado del paciente.

Cuadro 2. Características de la población con leucemia aguda linfoblástica			
Variable	Pacientes con recaída (n=48)	Pacientes sin recaída (n=22)	p
Edad	8.03 ±4.6	6.8±4.6	0.491
Número de leucocitos al diagnóstico	14250 (5500 - 33150)	11550 (5300 - 40000)	0.390
Sexo			
Femenino	32 (66.6)	13 (59)	0.539
Masculino	16 (33.3)	9 (41)	
Dosis metotrexato administrada			
Baja (<0.5 g/m ²)	2 (4.16)	1 (4.5)	0.623
Intermedia (0.5 – 3 g/m ²)	44 (91.6)	21 (95.5)	
Alta (> 3 g/m ²)	2 (4.16)	0	
Tiempo de tratamiento con MTX			
Menos de un año	28 (58.3)	2 (9)	<0.001
Más de un año	20 (41.7)	20 (91)	
Situación actual paciente			
vivo	12 (25)	18 (81.8)	<0.001
muerto	36 (75)	4 (18.2)	

Edad, años (media ±SD); cuenta leucocitos al diagnóstico, mediana (percentil 25-75); sexo, dosis metotrexato administrada, tiempo de tratamiento y situación actual del paciente, n(%).

b). Identificación del polimorfismo G80A en las muestras de casos y controles

En las figuras 2 y 3 se muestra la detección y genotipificación del polimorfismo G80A en la población con leucemia aguda linfoblástica (casos) y población infantil saludable (controles).

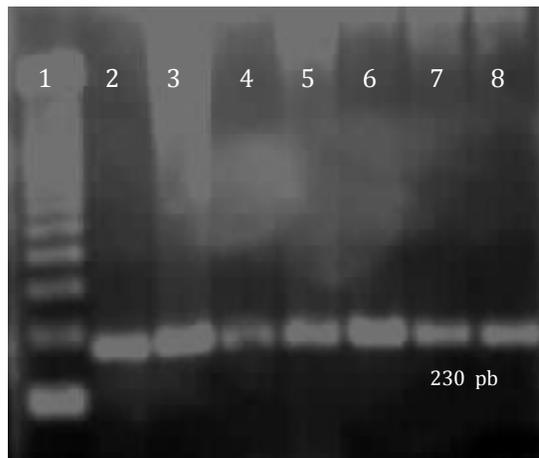


Figura 2. Producto de PCR del polimorfismo G80A en gel de agarosa al 2%. Carril 1 marcador de peso molecular de 123 pb; carriles 2, 3, 4 y 5 casos; carriles 6, 7 y 8 controles.

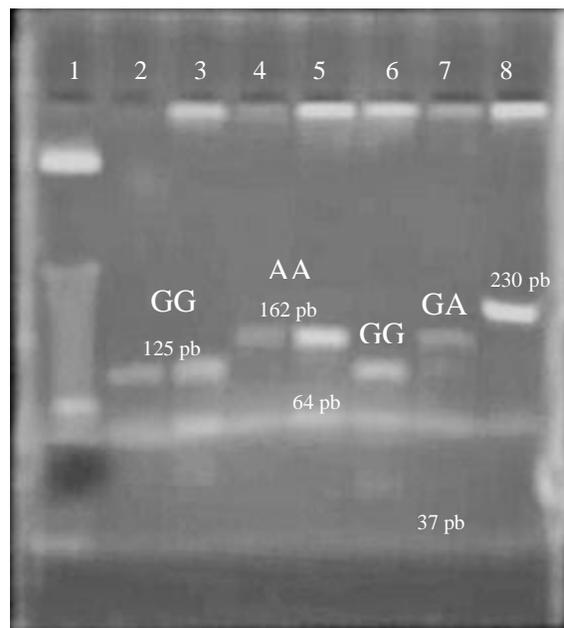


Figura 3. RFLP's del polimorfismo G80A en gel de agarosa al 4%. Carril 1 marcador de peso molecular de 10 pb; carril 2, 3 y 6 genotipo GG, carril 4 y 5 genotipo AA carril 7 genotipo GA, carril 8 producto de PCR sin digerir.

c) Distribución de los genotipos del polimorfismo G80A en la población de estudio.

El cuadro 3 resume la distribución genotípica y alélica del polimorfismo G80A en pacientes con y sin respuesta al tratamiento con metotrexato. En los pacientes que respondieron al tratamiento el 50% presentaron el genotipo silvestre del acarreador de folatos reducidos (GG), entre las frecuencias encontradas para los genotipos de riesgo, el 13.6% presentaron el genotipo heterocigoto (GA) y 36.3% el genotipo de riesgo (AA); entre los pacientes que no respondieron al tratamiento 45.8% presentaron el genotipo de riesgo, 35.4% el genotipo heterocigoto y sólo 18.7% presentó el genotipo silvestre. En cuanto a la distribución alélica en el grupo que respondió al tratamiento hay un 56.8% para el alelo G y un 43.2% para el alelo A, mientras que para el grupo que no respondió hay un 63.5% de alelo A y un 36.5% de alelo G, tanto para las frecuencias genotípicas y alélicas se encontraron diferencias estadísticamente significativas. La prueba de Hardy Weinberg demostró que la población en estudio no tuvo equilibrio génico.

Cuadro 3. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo G80A del RFC en pacientes con y sin respuesta al tratamiento con metotrexato			
Genotipos	Respuesta n(%)	No respuesta n(%)	p
GG	11 (50)	9 (18.7)	0.01
GA	3 (13.6)	17 (35.5)	
AA	8 (36.4)	22 (45.8)	
Alelos			
G	25 (56.8)	35 (36.5)	0.001
A	19 (43.2)	61 (63.5)	

El cuadro 4 resume la distribución genotípica y alélica del polimorfismo en la población de estudio. La población con LAL presentó una frecuencia para los genotipos de riesgo de 42.86% para el genotipo AA y 28.5% para el genotipo GA, mientras que el genotipo silvestre tuvo una frecuencia de 28.5%. Para la población infantil de control la presencia de los genotipos de riesgo fue de 25% para el genotipo

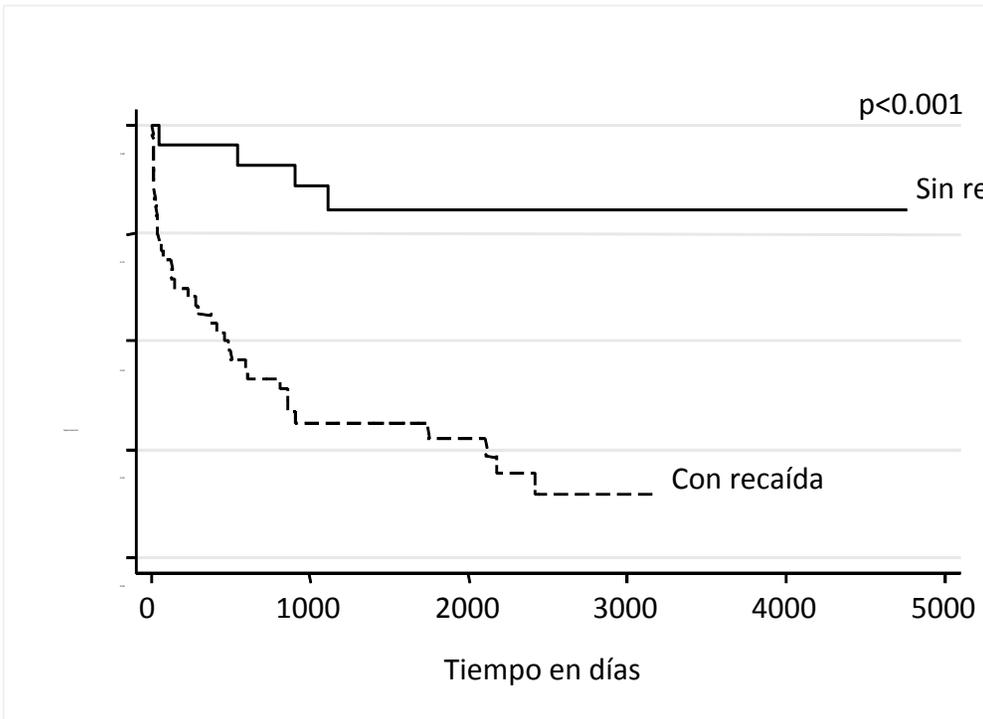
AA y 40.71% para el genotipo GA, mientras que el genotipo silvestre se presentó con una frecuencia de 34.3%, presentando estos datos diferencias significativas.

La población con LAL presentó una frecuencia alélica de 42.85% para el alelo G y un 57.15% para el alelo A; la población control presentó una frecuencia de 54.6% para el alelo G y un 43.4% para el alelo A, encontrando también en este caso diferencias significativas.

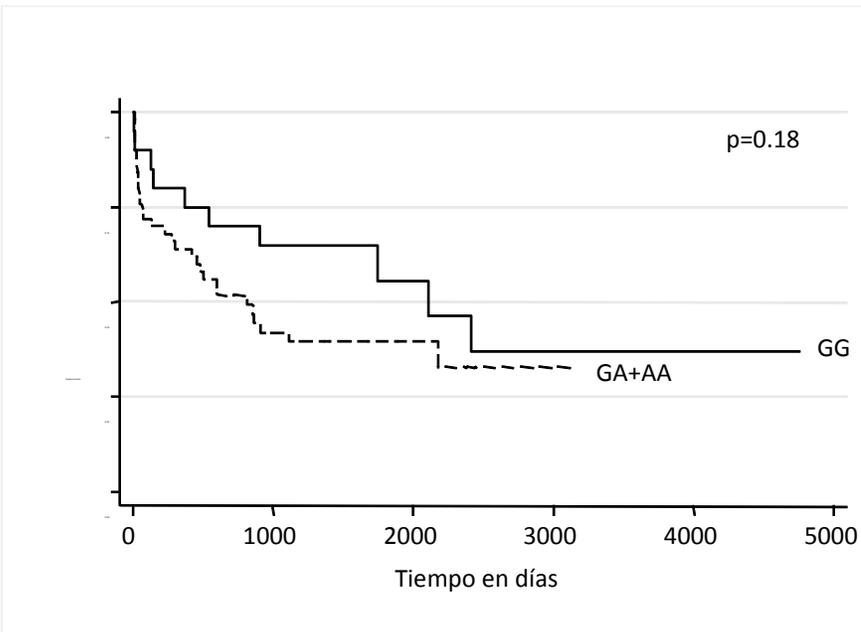
Cuadro 4. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo G80A del RFC en la población en estudio			
Genotipos	Casos n (%)	Controles n (%)	p
GG	20 (28.6)	48 (34.3)	0.02
GA	20 (28.6)	57 (40.7)	
AA	30 (42.8)	35 (25)	
Alelos			
G	60 (42.9)	153 (54.6)	0.001
A	80 (57.1)	127 (45.4)	

En la gráfica 1 se resume la supervivencia entre la población con LAL dividida de acuerdo a su respuesta al tratamiento con metotrexato, la curva de Kaplan-Meier muestra que la probabilidad de supervivencia de los pacientes que sufrieron recaída durante el tratamiento con metotrexato fue mucho menor que los pacientes que no tuvieron recaída ($p < 0.001$).

Al agrupar a la población con LAL por genotipos, en la gráfica 2 observamos que los portadores de los genotipos de riesgo (GA o AA) tienen una supervivencia menor que aquellos que presentaron el genotipo silvestre, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas.



Gráfica 1. Curva de Kaplan-Meier de los pacientes con LAL con y sin recaída. Valor de p correspondiente a log-rank



Gráfica 2. Curva de Kaplan-Meier de los pacientes con LAL distribuidos por genotipo. Valor de p correspondiente a log-rank

En la tabla 5 se indica que en los primeros tres años ocurrió el mayor número de muertes (35/70), 50%, porcentaje elevado considerando que el porcentaje total de muertes fue de 57% (40/70); por otra parte, se observa que después de los 7 años de tratamiento la probabilidad de supervivencia fue del 100%.

Cuadro 5. Supervivencia acumulada de los niños con leucemia aguda linfoblástica

Intervalo (años)	Número de pacientes en el intervalo	Número de censuras	Muertes	Proporción de muertes	Supervivencia acumulada
0-1	70	0	22	0.314	0.686
1-2	48	4	8	0.174	0.567
2-3	36	3	5	0.145	0.484
3-4	28	8	1	0.042	0.464
4-5	19	3	1	0.057	0.438
5-6	15	3	2	0.148	0.373
6-7	10	4	1	0.125	0.326
8-9	5	2	0	0.000	0.326
10-11	3	1	0	0.000	0.326
11-12	2	1	0	0.000	0.326
13-14	1	1	0	0.000	0.326

Al evaluar los factores que pronostican el mayor riesgo de morir en los niños con LAL, se observa que los portadores del genotipo GA o AA tuvieron 1.6 veces más riesgo de morir en comparación con los portadores homocigotos GG, no obstante, este riesgo no fue significativo. Los pacientes que sufrieron recaída durante el tiempo de tratamiento con metotrexato tuvieron mayor riesgo de morir (RR=6.8) que los pacientes que no tuvieron recaída ($p < 0.001$); por otra parte, los pacientes con una cuenta de más de 100,000 leucocitos al momento del diagnóstico, el riesgo de morir fue mayor (RR=2.4) en comparación con los que tuvieron menos de 100,000 leucocitos, sin embargo tampoco se encontró significativo (cuadro 6).

Cuadro 6. Factores asociados al riesgo de morir en los niños con leucemia aguda linfoblástica				
Factor ^a	RR (IC 95%) ^b	Valor p	RR (IC 95%) ^c	Valor p
GA o AA del polimorfismo RFC	1.6 (0.8-3.4)	0.185	1.6 (0.8-3.3)	0.207
Presencia de recaída	6.9 (2.5-19.6)	<0.001	6.8 (2.4-9.2)	<0.001
De 10,001 a 100,000 leucocitos/mm ³	1.0 (0.5-2.0)	0.946	1.0 (0.5-.9)	0.939
De 100,001 a 290,000 leucocitos/mm ³	2.0 (0.7-5.5)	0.185	2.4 (0.8-6.9)	0.103

^aCategorías de referencia: GG, sin recaída, de 6 años o menos de edad, de 1,000 a 10,000 leucocitos. ^b Modelos de riesgos proporcionales crudos. ^c Modelos de riesgos proporcionales ajustados por edad y sexo
RR: riesgo relativo; IC: intervalo de confianza

VI. Discusión y conclusiones.

Algunos estudios han mostrado que el polimorfismo G80A en el acarreador de folatos reducidos es un mecanismo causante de falta de respuesta al tratamiento con metotrexato^{25,27}. El éxito del tratamiento radica en la correcta captación del metotrexato por las células, entonces si éstas presentan dificultades para captar el medicamento, esto afectará notablemente el resultado final del tratamiento.

Chango *et al*, en el año 2000 reportan que en adultos sanos la presencia del genotipo AA confiere niveles aumentados de homocisteína en plasma y disminución del nivel de folato en células rojas en comparación con los portadores del genotipo silvestre, lo cual nos indica que aún en personas saludables la presencia del polimorfismo tiene afectación sobre los procesos fisiológicos normales en los que está involucrado el acarreador. En el presente estudio, debido a las limitaciones en cuanto a datos y material biológico disponible sólo se trabajó la presencia del polimorfismo en las muestras del banco de DNA, sin embargo no se descarta la posibilidad de que la población control que presenta el genotipo de riesgo también presente alteraciones en los niveles de homocisteína y folato comparados con los niveles presentados por portadores del genotipo silvestre.

Whetstine *et al* en 2001 en un estudio que incluyó 54 muestras de pacientes con leucemia aguda linfoblástica y 51 muestras de personas sanas en una población estadounidense encontraron el genotipo mutante en el 37% de las muestras de LAL y en el 33.3% de las muestras de personas sanas, en nuestra población el 42.86% de los casos y el 25% de los controles presentan el genotipo de riesgo, cifras ligeramente más altas y aunque no se obtuvieron diferencias significativas los resultados obtenidos pudieran sugerir el papel del polimorfismo G80A en el acarreador de folatos reducidos como uno de los factores causantes de la falta de respuesta al metotrexato en el tratamiento de leucemia.

Laverdière *et al* en el 2002 reportan en una población infantil con leucemia aguda linfoblástica originaria de Canadá y la cual dividen según la respuesta obtenida al protocolo de tratamiento para leucemia que están recibiendo, que el 28.6% de los niños que sufren recaída de la enfermedad son portadores del genotipo AA, mientras que de los niños que no presentan recaída sólo el 20.7% presentan el genotipo AA. Al dividir a nuestra población con leucemia aguda linfoblástica según la respuesta al tratamiento la primera diferencia encontrada es el número de pacientes con recaída; Laverdière reporta en su población de estudio que 35 de 204 niños presentan falta de respuesta al tratamiento, en nuestra población de estudio 48 de 70 sufrieron falta de respuesta a metotrexato, de los cuales el 45.83% son portadores del genotipo AA. Una de las principales diferencias observadas entre estas dos poblaciones es la dosis de metotrexato administrada; la población canadiense reporta el uso de metotrexato a dosis altas (4 g/m^2 o más); en nuestra población de estudio, 65 de 70 pacientes recibieron una dosis intermedia, equivalente a $0.5 - 3.0 \text{ g/m}^2$ de metotrexato.

En cuanto a los resultados encontrados en el análisis de supervivencia, Laverdière encuentra que los portadores del genotipo AA tienen peor pronóstico que aquellos portadores del genotipo silvestre u homocigoto, en el modelo de riesgos proporcionales de Cox, la presencia del genotipo AA y la edad parecen tener el valor predictivo más alto, con diferencias significativas marginales. En nuestro estudio encontramos diferencias significativas en la supervivencia clasificada de acuerdo a la presencia de recaída de la enfermedad y a pesar de observar diferencias en la función de supervivencia entre los individuos portadores de los genotipos de riesgo comparados con los que tuvieron el genotipo silvestre, esta no fue significativa, probablemente debido a un efecto del pequeño tamaño de la muestra. La diferencia en los tiempos de tratamiento sobre la función de supervivencia fue significativa ($p= 0.03$) (datos no mostrados).

Aunque se conoce la presencia de otros polimorfismos dentro del acarreador de folatos reducidos, hasta el momento todos los reportados son polimorfismos silentes y el único que se ha demostrado provocar un cambio en la afinidad del receptor por su ligando es el G80A, razón por la cual las investigaciones se han centrado en el estudio de este polimorfismo. Otra de las líneas de estudio dentro del fenómeno de resistencia al tratamiento con metotrexato involucra polimorfismos en moléculas río abajo que están involucradas en el metabolismo del metotrexato en la célula, entre ellas la enzima folilpoliglutamato sintasa, que es la que se encarga de poliglutarar al metotrexato, potenciando su efecto inhibitor de la síntesis del DNA. Se sugiere, a partir de los resultados obtenidos, fortalecer la investigación realizando un estudio prospectivo, para de esta manera poder determinar si se puede atribuir la falta de respuesta al tratamiento con metotrexato al polimorfismo G80A.

Algunas de las limitaciones del estudio radican en la ausencia de factores predictores en la estratificación de riesgo de la LAL, como es el diagnóstico molecular, así como la falta de material biológico para realizar otras mediciones, como el nivel de folato, homocisteína y metotrexato en suero, los cuales nos servirían como indicadores de la respuesta al tratamiento y complementarían los datos de la presente investigación.

En conclusión, los resultados obtenidos son los primeros en población guerrerense con respecto al acarreador de folatos reducidos y su relación con la respuesta al tratamiento con metotrexato y podrían servir para considerar la detección del polimorfismo G80A dentro de las pruebas moleculares de diagnóstico de LAL, como marcador predictivo de resistencia al tratamiento y la obtención de una terapia personalizada para los pacientes.

VII. Referencias

1. Lassaletta Atienza A. Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatr Integral*. 2004;VIII (5):435-42.
2. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2004 Apr 8;350(15):1535-48.
3. Zvara A, Hackler L, Jr., Nagy ZB, Micsik T, Puskas LG. New molecular methods for classification, diagnosis and therapy prediction of hematological malignancies. *Pathol Oncol Res*. 2002;8(4):231-40.
4. Martínez-Mancilla M, Reynoso-Gómez E, Astudillo-de la Vega H, Nambo-Lucio MJ, Benítez-Bribiesca L, Martínez-Avalos A, Rivera-Luna R, Gariglio P. La hematología molecular y las nuevas estrategias terapéuticas específicas en leucemia. *Gaceta Médica de México*. 2006;142(2):145-50.
5. Mejía Arangué JM, Lorenzana R, Juárez Ocaña S, de Reyes G, Pérez Saldivar ML, González Miranda G, Bernáldez Ríos R, Ortiz Fernández A, Ortega Alvarez M, Martínez García MC & Fajardo Gutiérrez A. Incidence of leukemias in children from El Salvador and Mexico City between 1996 and 2000: population-based data. *BMC Cancer*. 2005;5 (33):1-9.
6. Mejía Arangué JM, Fajardo Gutiérrez A. Epidemiología de las leucemias agudas en niños. *Rev Med IMSS*. 2005;43(4):323-33.
7. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/proyectos/continuas/vitales/BD/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>. 2009.
8. Nava Organista J. Polimorfismo C452T de la gamma-glutamil hidrolasa en leucemia linfoblástica aguda y respuesta a metrotexato Tesis de Maestría. Chilpancingo, Gro. Universidad Autónoma de Guerrero, 2009.
9. Coronel Morán RC. Importancia del laboratorio en el diagnóstico y pronóstico de leucemia aguda linfoblástica de la infancia. *Acta Pediatr Mex*. 2005;26(3):129-36.
10. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2006 Jan 12;354(2):166-78.
11. Saavedra Herrera MV. Caracterización molecular de leucemia aguda en niños en centros hospitalarios de Guerrero y Morelos. Tesis de Maestría. Chilpancingo, Gro. Universidad Autónoma de Guerrero, 2007.
12. Gómez Gómez Y. Polimorfismo C829T de la dihidrofolato reductasa en leucemia linfoblástica aguda y resistencia al metrotexato. Tesis de Maestría. Chilpancingo, Gro. Universidad Autónoma de Guerrero, 2009.
13. Martínez Carrillo KI. Polimorfismos C677T y A1298C de la Metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en pacientes con leucemia. Tesis de Mestría. Chilpancingo, Gro. Universidad Autónoma de Guerrero, 2008.
14. Milne E, Bockxmeer FV, Kees UR, Thompson JR, Baker D. Is there a folate-related gene-environment interaction in the etiology of childhood acute lymphoblastic leukemia? *Int J Cancer*. 2006;119:229 - 32.

15. Zhao R, Assaraf YG, Goldman ID. A mutated murine reduced folate carrier (RFC1) with increased affinity for folic acid, decreased affinity for methotrexate, and an obligatory anion requirement for transport function. *J Biol Chem.* 1998 Jul 24;273(30):19065-71.
16. Hider SL, Bruce IN, Thomson W. The pharmacogenetics of methotrexate. *Rheumatology (Oxford).* 2007 Oct;46(10):1520-4.
17. Dervieux T, Furst D, Lein DO, et al. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004 Sep;50(9):2766-74.
18. Kneuer C, Schrader S, Honscha W. Alternative transcripts of rat *slc19a1*: cloning, genomic organisation, tissue specific promoters and alternative splicing. *DNA Seq.* 2005 Feb;16(1):1-6.
19. Maggini V, Buda G, Galimberti S, et al. Association of folate transporter SLC19A1 polymorphisms with the outcome of multiple myeloma after chemotherapy and tandem autologous transplantation. *Leukemia.* 2007 Jan;21(1):176-8.
20. Matherly LH, Hou Z, Deng Y. Human reduced folate carrier: translation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Mar;26(1):111-28.
21. Bosson G. Reduced folate carrier: biochemistry and molecular biology of the normal and methotrexate-resistant cell. *Br J Biomed Sci.* 2003;60(2):117-29.
22. Cheok MH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2006 Feb;6(2):117-29.
23. Jansen G, Mauritz R, Drori S, et al. A structurally altered human reduced folate carrier with increased folic acid transport mediates a novel mechanism of antifolate resistance. *J Biol Chem.* 1998 Nov 13;273(46):30189-98.
24. Kobayashi H, Takemura Y, Ohnuma T. Variable expression of RFC1 in human leukemia cell lines resistant to antifolates. *Cancer Lett.* 1998 Feb 27;124(2):135-42.
25. Laverdiere C, Chiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajcinovic M. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2002 Nov 15;100(10):3832-4.
26. Gemmati D, Ongaro A, Scapoli GL, et al. Common gene polymorphisms in the metabolic folate and methylation pathway and the risk of acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 May;13(5):787-94.
27. Chango A E-FN, Potier de Courcy G, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS & Nicolas JP. A polymorphism (G80->A) in the Reduced Folate Carrier Gene and its associations with folate status and homocysteinemia. 2000.
28. Drori S, Jansen G, Mauritz R, Peters GJ, Assaraf YG. Clustering of mutations in the first transmembrane domain of the human reduced folate carrier in GW1843U89-resistant leukemia cells with impaired antifolate transport and augmented folate uptake. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):30855-63.
29. Dulucq S, St-Onge G, Gagne V, et al. DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood.* 2008 Apr 1;111(7):3692-700.

30. Chatzikyriakidou A, Vakalis KV, Kolaitis N, et al. Distinct association of SLC19A1 polymorphism -43T>C with red cell folate levels and of MTHFR polymorphism 677C>T with plasma folate levels. *Clin Biochem.* 2008 Feb;41(3):174-6.
31. Schneider E, Ryan TJ. Gamma-glutamyl hydrolase and drug resistance. *Clin Chim Acta.* 2006 Dec;374(1-2):25-32.
32. de Jonge R, Hooijberg JH, van Zelst BD, et al. Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2005 Jul 15;106(2):717-20.
33. de Jonge R, Tissing WJ, Hooijberg JH, et al. Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2009 Mar 5;113(10):2284-9.
34. Prey S, Paul C. Effect of folic or folinic acid supplementation on methotrexate-associated safety and efficacy in inflammatory disease: a systematic review. *Br J Dermatol.* 2009 Mar;160(3):622-8.
35. Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans BT, et al. Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis Rheum.* 2006 Apr;54(4):1087-95.
36. Fotoohi A. Resistance of Human Leukaemia Cells to the Antimetabolites. Solna Stockholm, Sweden: Karolinska University Hospital, 2007. 84 p.