

**Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Postgrado de Biología Celular**



***“ESTUDIO DE ANOMALÍAS GÉNICAS Y FARMACOGENÉTICA EN
PACIENTES VENEZOLANOS CON LEUCEMIA”***

**Tesis Doctoral presentada ante la ilustre Universidad Central de Venezuela por la
Lic. Sabrina Ferraz, para optar al Título de Doctor en Ciencias Mención Biología
Celular**

Tutor(a): Dra. Anabel Arends

Caracas – Venezuela

Octubre del 2017



Comisión de Estudios de Postgrado

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

ACTA DE PRESENTACIÓN DE TESIS
DOCTORAL

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias y el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, para examinar la Tesis Doctoral presentada por: **Sabrina María Ferraz Cabral** portadora de la cédula de identidad N° **V-15.800.660**, bajo el título "**Estudio de Anomalías Génicas y Farmacogenética en Pacientes Venezolanos con Leucemia**", a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **Doctor en Ciencias Mención Biología Celular**, dejan constancia de lo siguiente:

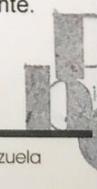
1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 06 de diciembre de 2017 a las 11:00 am, para que Sabrina María Ferraz Cabral lo defendiera en forma pública, lo que hizo en la Sala de Usos Múltiples del Instituto de Biología Experimental, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLA**, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por Sabrina María Ferraz Cabral, que dicho trabajo se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado es un aporte importante que permite conocer las anomalías génicas involucradas en el desarrollo de la leucemia en una muestra de la población de Venezuela, así como, sirve de referencia para futuras investigaciones farmacogenéticas, que permitan la optimización de los protocolos quimioterapéuticos según el genotipo del paciente.



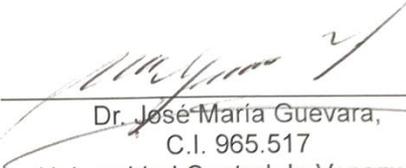
Handwritten signatures of the jury members on the right margin.



En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 06 días del mes de diciembre del año 2017. Conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuaron como miembros del jurado Dra. Guillermina Alonso (UCV); Dr. José María Guevara (UCV); Dra. Antonietta Porco (USB) y Dra. María Fátima Garcés (UCV). El presente trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Anabel Arends (UCV).


Dra. Guillermina Alonso,
C.I. 6.201.870

Universidad Central de Venezuela
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad de Ciencias


Dr. José María Guevara,
C.I. 965.517

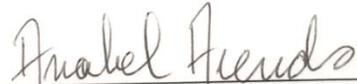
Universidad Central de Venezuela
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad de Ciencias


Dra. Antonietta Porco,
C.I. 9.062.313

Universidad Simón Bolívar
Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado


Dra. María Fátima Garcés,
C.I. 10.489.427

Universidad Central de Venezuela
Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado


Dra. Anabel Arends,
C.I. 3.481.149
Universidad Central de Venezuela
Tutor



DEDICATORIA

A mis padres, Manuel y Emilia, quienes han sido mis pilares, mi ejemplo de trabajo, honestidad y humildad.

A todos los pacientes con leucemia, cada minuto valió la pena por ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por bendecirme cada día, por guiarme durante todo este tiempo para alcanzar este gran sueño, por darme la fuerza para superar cada obstáculo y levantarme de las caídas. A mi amada Virgen de Fátima por escuchar mis suplicas, por ayudarme a mantener mi fe y esperanza. Mis ángeles, gracias por tanto amor.

A mis padres, Manuel y Emilia, les agradeceré eternamente su apoyo y amor incondicional, llegar hasta aquí no hubiera sido posible sin ustedes.

A mis hermanos, Víctor Manuel y Emily, gracias por animarme, por llenarme de alegrías y por su apoyo en los momentos más difíciles; como siempre les digo, vuelen alto y luchen por sus sueños.

A mi tutora, Dra. Anabel Arends, le agradezco por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo y abrirme las puertas de su laboratorio, por ser mi ejemplo de sabiduría, perseverancia, dedicación y pasión por la investigación en la hematología.

Al gran equipo del Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales, una segunda familia, a la Dra. Martha Bravo, le agradezco por su valioso apoyo, amistad, orientación y disposición en todo momento; a la Lic. Marycarmen Chacín, mi fren, muchas gracias por la amistad, por la compañía hasta largas horas de la noche para trabajar, por compartir tus conocimientos y valioso apoyo; al Lic. Gilberto Gómez, Lic. Gloria García, Lic. Odalys García, Lic. Silvia Fonseca y Maribel Sanchez, por su compañerismo y por hacerme parte de esta familia.

A todo el equipo que integra el Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Caracas, médicos y enfermeras, les agradezco enormemente su valiosa colaboración y dedicación con mucho amor a todos los pacientes, en especial a mi amiga, la Dra. María Gabriela Marcano (QEPD), por creer fielmente en este trabajo y brindarme su apoyo desde el inicio; a las Dras. Yehey Calderón, María Angela Panozo, Carina Araujo y Dalia Velásquez, por el tiempo dedicado y colaboración en las tomas de muestra.

A mis amigas de toda la vida, mis casi hermanas, Yoselin, Paula, Rosángela, Loren, Ana Paula, Desireé y Annelys, por su valiosa amistad, su motivación, por estar siempre que las necesité y por llenarme de alegría.

A mi abuelita, por su valioso apoyo y abrirme siempre las puertas de su hogar; a mis tíos, Jenny, Mariela, Fátima, Betty y José; les agradezco su cariño, apoyo y la linda familia que tenemos.

A mis primos David y Andrea, gracias por ser mis casi hermanos, entenderme y acompañarme en este camino.

A la Dra. Guillermina Alonso y al Dr. José María Guevara, por sus sabios consejos, y acertadas sugerencias que me permitieron aprender y enriquecer este trabajo.

A mis compañeros de trabajo del Departamento de Bioquímica de la Escuela de Bioanálisis, los profesores Beatriz, Adrián, Celsy, Matilde, Fátima y María Luisa, por su apoyo, motivación y comprensión.

A mis amigos del postgrado, Ingrid, Daisy, Roberto, Keyla y Andreína por ser los mejores compañeros de estudios y aprendizajes del Postgrado de Biología Celular.

A la Unidad de Estudios Genéticos y Forenses del IVIC, en especial al Lic. Juan Manuel Nuñez por su excelente disposición y trabajo; y al Instituto de Biociencias de la Universidad Estadual de Sao Paulo, por su valiosa colaboración en la secuenciación del ADN de las muestras.

Por último, pero no menos importante, le agradezco de todo corazón a los pacientes que colaboraron con su importante participación, sin ellos esta tesis doctoral no hubiera sido posible, me demostraron la lucha más importante de sus vidas, fueron un ejemplo de fe en todo momento, fueron y seguirán siendo mi mayor motivación para continuar...

A todos, ¡¡¡muchas gracias!!!

“Comienza haciendo lo que es necesario, después lo que es posible y de repente estarás haciendo lo imposible”
San Francisco de Asis



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

POSTGRADO DE BIOLOGÍA CELULAR

**ESTUDIO DE ANOMALÍAS GÉNICAS Y FARMACOGENÉTICA EN
PACIENTES VENEZOLANOS CON LEUCEMIA**

Doctorante: Lic. Sabrina Ferraz

Tutor: Dra. Anabel Arends

RESUMEN

Las leucemias son neoplasias malignas de la médula ósea provocadas por una alterada tasa de replicación celular, siendo afectada generalmente un tipo de línea celular hematopoyética. Las translocaciones cromosómicas que producen los genes quiméricos BCR-ABL, PML-RAR α y TEL-AML1, así como, las mutaciones en el oncogén RAS y en el gen supresor de tumores TP53, son claves en la diferenciación, proliferación y apoptosis celular, estando implicados en la leucemogénesis. Los polimorfismos descritos en los genes Gultación S-Transferasa (GST) y Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR), han sido relacionados con el riesgo de desarrollo de leucemia y considerados biomarcadores farmacogenéticos predictivos de la respuesta a fármacos. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de los oncogenes y mutaciones en RAS y TP53; y polimorfismos de GST y MTHFR en pacientes venezolanos con leucemia para evaluar si existe relación con el desarrollo de la enfermedad y su evolución clínica. El análisis molecular se llevó a cabo a partir de las técnicas de PCR, RT-PCR, PCR-Multiplex y secuenciación directa. Los resultados obtenidos mostraron que el transcrito b2a2 de BCR-ABL fue el más frecuente en los pacientes con leucemia mieloide crónica, el oncogén PML-RAR α se encontró en 11,1% de los pacientes con leucemia promielocítica aguda, y el oncogén TEL-AML1 fue

detectado en 18,2% de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda cuya evolución clínica fue favorable. Se encontraron mutaciones en el gen TP53 en 13% de los pacientes y una mutación c.36T>G del gen K-RAS en un paciente con leucemia mieloide aguda, todas con pronóstico clínico desfavorable. El polimorfismo del gen GSTM1- nulo y el modelo recesivo del polimorfismo del gen GSTP1 (rs1695) representan un factor de riesgo de susceptibilidad de desarrollar leucemia. El polimorfismo MTHFR 1298 A/C (rs1301131) se asocia con una menor supervivencia global en pacientes con LLA. Este estudio pionero en Venezuela permite conocer la frecuencia de las anomalías génicas involucradas en el desarrollo de la leucemia en nuestra población, así como, sirve de referencia para futuras investigaciones farmacogenéticas a través del análisis de los genes involucrados en el metabolismo de los fármacos usados en los protocolos quimioterapéuticos, permitiendo de esta manera, la optimización y personalización de las terapias según el genotipo del paciente.

Palabras clave: Leucemia, Polimorfismo, Oncogén, *TP53*, *RAS*, *GST*, *MTHFR*

ÍNDICE DE CONTENIDO

	página
Resumen	v
Índice General	vii
Índice de figuras	xi
Índice de tablas	xv
Listado de Abreviaturas	xvii
Introducción	1
CAPÍTULO I	
Justificación del problema	5
Objetivo general	8
Objetivos específicos	8
CAPÍTULO II	
Marco teórico	9
1. Aspectos históricos	9
2. Definición y concepto de neoplasia hematológica	11
3. Clasificación de leucemias	12
3.1 Neoplasias mieloides	12
3.2 Neoplasias linfoides	17
4. Incidencia de leucemia	19
5. Translocaciones cromosómicas en leucemia	21
5.1 t(9;22)(q34;q11) con fusión génica de <i>BCR-ABL</i>	22
5.2 t(12;21)(p13;q22) con fusión génica de <i>TEL-AML1</i>	27
5.3 t(15;17)(q22;q21) con fusión génica <i>PML-RARα</i>	30
6. Genes reguladores de la función celular	34
6.1 Oncogenes	34
6.1.1 Alteraciones de los genes <i>NRAS</i> y <i>KRAS</i> en leucemia	35
6.2 Genes Supresores en leucemia	37
6.2.1 Alteraciones del gen <i>TP53</i> en leucemia	38
7. Farmacogenética en leucemia	41
7.1 GST (Glutación S-Transferasa)	44

7.2 Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)	52
7.3 Supervivencia asociada a los genotipos de MTHFR en pacientes con LLA	58
CAPÍTULO III	
Metodología	62
3.1 Población	62
3.2 Muestras	63
3.3 Procedimiento de toma de muestras	63
3.4 Obtención de la muestra	63
3.4.1 Aislamiento de células mononucleares humanas	63
3.4.2 Obtención del material genético	64
3.4.2.1 Extracción de ADN	64
3.4.2.2 Cuantificación y visualización de calidad del ADN	65
3.4.2.3 Extracción de ARN	66
3.4.2.4 Determinación de la concentración y calidad del ARN	66
3.5 Transcripción Inversa	67
3.6 Detección de fusión <i>BCR-ABL</i> por la técnica RT-PCR	67
3.7 Detección de fusión <i>PML-RARα</i> por la técnica RT-PCR	69
3.8 Detección de fusión <i>TEL-AML1</i> por la técnica RT-PCR	72
3.9 Amplificación del gen <i>TP53</i>	74
3.10 Amplificación del gen <i>RAS</i>	76
3.11 Purificación de los productos de PCR por el kit Qiagen Kit	78
3.12 Secuenciación de los productos de PCR de los genes <i>TP53</i> y <i>RAS</i>	79
3.13 Análisis bioinformático de secuencias de los genes <i>TP53</i> y <i>RAS</i>	80
3.14 Farmacogenética: genotipificación de Glutación S- transferasa	80
3.14.1 <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i>	80
3.14.2 <i>GSTP1</i>	82
3.15 Farmacogenética: genotipificación de Metilentetrahidrofolato Reductasa	84
3.15.1 <i>MTHFR</i> 1298A/C	84
3.15.2 <i>MTHFR</i> 677C/T	86
3.16 Recolección de datos de la evolución clínica de la enfermedad	88
3.17 Análisis estadístico	89
3.18 Estimación de supervivencia global y libre de evento en pacientes con LLA tratados con metotrexato y su asociación con los polimorfismos de <i>MTHFR</i>	89
CAPÍTULO IV	

Resultados	91
4.1 Distribución poblacional de pacientes con leucemia	91
4.2 Detección de transcritos quiméricos moleculares de translocaciones cromosómicas por la técnica RT-PCR	92
4.2.1 <i>BCR-ABL</i> t(9;22)(q34;q11)	93
4.2.2 <i>PML-RARα</i> t(15;17)(q24;q21)	95
4.2.3 <i>TEL-AML1</i> t(12,21)(p13;q22)	96
4.3 Análisis de los exones 5, 6, 7 y 8 del Gen Supresor de Tumores TP53 en pacientes con leucemia	97
4.4 Análisis de los genes NRAS y KRAS en pacientes con leucemia	106
4.5 Evolución clínica de los pacientes con leucemia	109
4.6 Farmacogenética de polimorfismos de genes que codifican enzimas metabolizadoras de xenobióticos en pacientes con leucemia	111
4.6.1 Genotipificación del gen Glutación S- Transferasa	111
4.6.1.1 GSTM1/GSTT1	111
4.6.1.1.1 Frecuencia alélica y genotípica de la GSTM1 y GSTT1 en pacientes con Leucemia	112
4.6.1.1.2 Distribución poblacional de la frecuencia alélica y genotípica de GSTM1 y GSTT1 en base al tipo de Leucemia	114
4.6.1.1.3 Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de GSTM1 y GSTT1 en pacientes con leucemia y su relación con la evolución clínica	120
4.6.1.2 GSTP1	121
4.6.1.2.1 Frecuencia genotípica de GSTP1 en los pacientes con Leucemia	123
4.6.1.2.2 Distribución poblacional de la frecuencia genotípica de la GSTP1 en base al tipo de Leucemia	124
4.6.1.2.3 Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de GSTP1 en pacientes con leucemia y su relación con la evolución clínica	128
4.6.2 Genotipificación del gen Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR)	130
4.6.2.1 <i>MTHFR</i> 1298 A/C	130
4.6.2.1.1 Frecuencia genotípica de MTHFR 1298 en pacientes con Leucemia	131
4.6.2.1.2 Distribución poblacional de la frecuencia genotípica de la MTHFR 1298 en base al tipo de Leucemia	132
4.6.2.1.3 Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de MTHFR 1298 en pacientes con leucemia y su relación con la evolución clínica	136
	137

4.6.2.2 MTHFR 677C/T	
4.6.2.2.1 Frecuencia genotípica de MTHFR 677 en pacientes con Leucemia	139
4.6.2.2.2 Distribución poblacional de la frecuencia genotípica de la MTHFR 677 en base al tipo de Leucemia	140
4.6.2.2.3 Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de MTHFR 677 en pacientes con leucemia y su relación con la evolución clínica	145
4.6.3 Tiempo de supervivencia global y libre de evento en pacientes con LLA tratados con MTX de acuerdo al genotipo <i>MTHFR</i>	146
CAPÍTULO V	
Discusión	153
CAPÍTULO VI	
Conclusiones	207
VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	210
VIII FINANCIAMIENTO	233
IX ANEXOS	234

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1. Representación de la translocación <i>BCR-ABL</i> p210	24
Figura 2. Representación de la translocación <i>BCR-ABL</i> p190	25
Figura 3. Mecanismos de acción del transcrito Bcr-Abl	26
Figura 4. Representación de la translocación <i>TEL-AML1</i>	29
Figura 5. Representación de la translocación <i>PML-RARα</i>	32
Figura 6. Efectos leucemogénicos de <i>PML-RARα</i> en leucemia promielocítica	33
Figura 7. Ciclo de las proteínas Ras	36
Figura 8. El gen <i>TP53</i> y la proteína p53 con sus dominios	38
Figura 9. Integración de la farmacogenética	43
Figura 10. Localización estructural del cluster de 100 Kb que codifica la subfamilia <i>GST</i> mu (cromosoma 1p13.3)	47
Figura 11. Localización estructural del cluster génico que codifica la subfamilia <i>GST</i> theta (cromosoma 22q11.2)	49
Figura 12. Mapa genético del gen <i>MTHFR</i>	53
Figura 13. Estructura del Metotrexato	55
Figura 14. Mecanismo de acción del Metotrexato	56
Figura 15. Distribución poblacional en base al tipo de leucemia de los pacientes del Hospital Universitario de Caracas	91
Figura 16. Imagen de la electroforesis de los productos de amplificación por RT-PCR de <i>BCR-ABL</i> de pacientes diagnosticados con leucemia mieloide crónica	94
Figura 17. Imagen de la electroforesis de los productos de amplificación por RT-PCR de <i>BCR-ABL</i> de pacientes diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda	94
Figura 18. Imagen de electroforesis de gel de agarosa de los productos de amplificación por RT-PCR de <i>PML-RARα</i> de pacientes diagnosticados con leucemia promielocítica aguda	95
Figura 19. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa de los productos de amplificación por RT-PCR de <i>TEL-AML1</i> de pacientes diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda	96
Figura 20. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa de los productos de amplificación del Exón 5 del gen <i>TP53</i>	97
Figura 21. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa de los productos de amplificación del Exón 6 del gen <i>TP53</i>	98
Figura 22. Imagen de electroforesis de gel de agarosa de los productos de amplificación del Exón 7 del gen <i>TP53</i>	98

Figura 23. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa de los productos de amplificación del Exón 8 del gen <i>TP53</i>	99
Figura 24. Electroferograma de la secuencia de un paciente con la mutación c.753_754ins en el exón 7 del gen <i>TP53</i>	100
Figura 25. Electroferograma de la secuencia del exón 6 del gen <i>TP53</i>	101
Figura 26. Electroferograma de la secuencia intrónica-7 del gen <i>TP53</i>	104
Figura 27. Análisis de electroferograma y secuencia consenso del SNP rs1625895 ubicado en la región intrón-6 del gen <i>TP53</i>	105
Figura 28. Análisis de electroferograma y secuencia consenso del SNP rs1642786 ubicado en la región intrón-7 del gen <i>TP53</i>	105
Figura 29. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación del gen <i>NRAS</i>	106
Figura 30. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación del gen <i>NRAS</i>	107
Figura 31. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación del gen <i>KRAS</i>	107
Figura 32. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación del gen <i>KRAS</i>	108
Figura 33. Análisis de la secuencia del gen <i>KRAS</i> codificante para el codón 12 de un paciente con LMA (1.180_Kcd)	109
Figura 34. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 2% de los productos amplificados por PCR Multiplex de los genes <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> y <i>Albúmina</i> en pacientes con leucemia...	112
Figura 35. Distribución porcentual de los genotipos de <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i> en pacientes con LLA	116
Figura 36. Distribución porcentual de los genotipos de <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i> en pacientes con LLC	116
Figura 37. Distribución porcentual de los genotipos de <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i> en pacientes con LMA	117
Figura 38. Distribución porcentual de los genotipos de <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i> en pacientes con LMC	117
Figura 39. Distribución porcentual de los genotipos de <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i> en pacientes con Tricoleucemia	118
Figura 40. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 2% de los productos amplificados del gen <i>GSTP1</i> en pacientes con leucemia	122
Figura 41. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 3% de los productos del gen <i>GSTP1</i> digeridos por RFLP usando la enzima de restricción <i>BsmAI</i> , en pacientes con leucemia	123
Figura 42. Distribución porcentual de los genotipos de <i>GSTP1</i> en pacientes con LLA	124

Figura 43. Distribución porcentual de los genotipos de <i>GSTP1</i> en pacientes con LLC	125
Figura 44. Distribución porcentual de los genotipos <i>GSTP1</i> en pacientes con LMA	125
Figura 45. Distribución porcentual de los genotipos de <i>GSTP1</i> en pacientes con LMC	125
Figura 46. Distribución porcentual de los genotipos de <i>GSTP1</i> en pacientes con Tricoleucemia	126
Figura 47. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 2% de los productos amplificados del gen <i>MTHFR</i> 1298 en pacientes con leucemia	130
Figura 48. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 4% de los productos del gen <i>MTHFR</i> 1298 digeridos por RFLP usando la enzima de restricción <i>MboII</i> , en pacientes con leucemia	131
Figura 49. Distribución porcentual de los genotipos de <i>MTHFR</i> 1298 en pacientes con LLA	133
Figura 50. Distribución porcentual de los genotipos de <i>MTHFR</i> 1298 en pacientes con LMA	133
Figura 51. Distribución porcentual de los genotipos de <i>MTHFR</i> 1298 en pacientes con LLC	134
Figura 52. Distribución porcentual de los genotipos de <i>MTHFR</i> 1298 en pacientes con LMC	134
Figura 53. Distribución porcentual de los genotipos de <i>MTHFR</i> 1298 en pacientes con Tricoleucemia	135
Figura 54. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 2% de los productos amplificados del gen <i>MTHFR</i> 677 en pacientes con leucemia	138
Figura 55. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 4% de los productos del gen <i>MTHFR</i> 677 digeridos por RFLP usando la enzima de restricción <i>HinfI</i> , en pacientes con leucemia	139
Figura 56. Distribución porcentual de los polimorfismos genéticos de <i>MTHFR</i> 677 en pacientes con LLA	141
Figura 57. Distribución porcentual de los polimorfismos genéticos de <i>MTHFR</i> 677 en pacientes con LMA	141
Figura 58. Distribución porcentual de los polimorfismos genéticos de <i>MTHFR</i> 677 en pacientes con LLC	142
Figura 59. Distribución porcentual de los polimorfismos genéticos de <i>MTHFR</i> 677 en pacientes con LMC	142
Figura 60. Distribución porcentual de los polimorfismos genéticos de <i>MTHFR</i> 677 en pacientes con Tricoleucemia	143
Figura 61. Gráfico de Supervivencia Global respecto al polimorfismo <i>MTHFR</i> 677	146
Figura 62. Supervivencia Global respecto al polimorfismo	148

<i>MTHFR</i> 1298	
Figura 63. Supervivencia libre de evento respecto al polimorfismo <i>MTHFR</i> 677	149
Figura 64. Supervivencia libre de evento respecto al polimorfismo <i>MTHFR</i> 1298	150
Figura 65. Marcadores moleculares para el diagnóstico y el pronóstico de la evolución clínica en leucemia	151
Figura 66. Marcadores moleculares de riesgo de susceptibilidad a desarrollar leucemia	152

ÍNDICE DE TABLAS

	página
Tabla 1. Clasificación de FAB de LMA	13
Tabla 2. Clasificación propuesta por la OMS, 2009 para neoplasias mieloides y leucemias agudas	14
Tabla 3. Clasificación propuesta por la OMS para neoplasias linfoides	18
Tabla 4. Secuencia de cebadores para amplificar los transcrito de la fusión <i>BCR-ABL</i>	68
Tabla 5. Secuencia de cebadores empleados en la PCR hemi-anidada para amplificar el transcrito de la fusión de <i>PML-RARα</i>	70
Tabla 6. Secuencias de cebadores utilizados en la PCR anidada para amplificar el transcrito de la fusión de <i>TEL-AML1</i>	72
Tabla 7. Secuencias de cebadores utilizados en la amplificación de los exones 5, 6, 7, 8 del gen <i>TP53</i>	75
Tabla 8. Secuencias de cebadores para la amplificación de las secuencias que codifican los codones 12,13 y 61 del gen <i>NRAS</i>	77
Tabla 9. Secuencias de cebadores para la amplificación de las secuencias que codifican los codones 12 y 61 del gen <i>KRAS</i>	77
Tabla 10. Secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación de los genes en farmacogenética	89
Tabla 11. Distribución de los pacientes con leucemia según el tipo de leucemia, la edad y el sexo	92
Tabla 12. Mutaciones en el gen <i>TP53</i> detectadas en pacientes con leucemia	101
Tabla 13. SNPs del gen <i>TP53</i> encontrados en pacientes con leucemia y controles sanos	102
Tabla 14. Distribución de SNPs del gen <i>TP53</i> en los pacientes con leucemia	103
Tabla 15. Evolución clínica de los pacientes con leucemia estudiados hasta el período marzo 2016	111
Tabla 16. Frecuencia alélica de los genes <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i> en los pacientes con leucemia	113
Tabla 17. Frecuencia genotípica de los genes <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i> en los pacientes con leucemia	114
Tabla 18. Distribución poblacional de la frecuencia alélica de del gen <i>GSTM1</i> en base al tipo de leucemia de pacientes	114
Tabla 19. Distribución poblacional de la frecuencia alélica del gen <i>GSTT1</i> en base al tipo de leucemia de pacientes	115

Tabla 20. Distribución de genotipos nulos de <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i> en pacientes con leucemia y controles	119
Tabla 21. Distribución de genotipos de los <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i> en pacientes con leucemia y en controles	119
Tabla 22. Análisis de asociación de alelos de los genes <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i> según el estado de evolución clínica de los pacientes con leucemia	120
Tabla 23. Análisis de asociación de alelos de los genes <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i> en pacientes con LLA tratados con quimioterapia	121
Tabla 24. Análisis de asociación de alelos de los genes <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i> en pacientes con LMA tratados con quimioterapia	121
Tabla 25. Frecuencia genotípica de <i>GSTP1</i> en los pacientes con Leucemia del Hospital Universitario de Caracas y en el grupo control	124
Tabla 26. Distribución de genotipos del gen <i>GSTP1</i> en pacientes con leucemia y en controles	127
Tabla 27. Análisis de asociación de los genotipos de los polimorfismos de <i>GSTP1</i> en pacientes con leucemia tratados con quimioterapia	128
Tabla 28. Análisis de asociación de genotipos de polimorfismos de <i>GSTP1</i> en pacientes con LLA tratados con quimioterapia	129
Tabla 29. Análisis de asociación de genotipos de polimorfismos de <i>GSTP1</i> en pacientes con LMA tratados con quimioterapia	129
Tabla 30. Frecuencia genotípica del gen <i>MTHFR</i> 1298 en pacientes con Leucemia	132
Tabla 31. Distribución de genotipos del gen <i>MTHFR</i> 1298 en pacientes con leucemia y controles	136
Tabla 32. Análisis de asociación de los genotipos de <i>MTHFR</i> 1298 en pacientes con LLA tratados con Metotrexato	137
Tabla 33. Frecuencia genotípica del gen <i>MTHFR</i> 677 en pacientes con Leucemia	140
Tabla 34. Distribución de los genotipos del gen <i>MTHFR</i> 677 en pacientes con leucemia y controles	144
Tabla 35. Análisis de asociación de genotipos de polimorfismos de <i>MTHFR</i> 677 en pacientes con LLA tratados con Metotrexato	145
Tabla 36. Análisis de asociación de los polimorfismos del gen <i>MTHFR</i> 677 y 1298 y los estadios de evolución clínica en pacientes con LLA tratados con Metotrexato	146

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ARN:** ácido ribonucleico
- COSMIC:** Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer
- dbSNP:** Database short genetic variation
- dNTP:** dinucleótido trifosfato
- EDTA:** ácido tetra etilendiamino
- GST:** glutatión S- transferasa
- GSTM1:** glutatión S-transferasa M1
- GSTP1:** glutatión S-Transferasa P1
- GSTT1:** glutatión S-Transferasa T1
- HUC:** Hospital universitario de Caracas
- IC:** intervalo de confianza
- LLA:** leucemia linfoblástica aguda
- LLC:** leucemia linfocítica crónica
- LMA:** leucemia mieloide aguda
- LMC:** leucemia mieloide crónica
- LMMJ:** leucemia mielomonocítica juvenil
- LPA:** leucemia promielocítica aguda
- MO:** médula ósea
- MTHFR:** Metilentetrahidrofolato reductasa
- MTX:** metotrexato
- OR:** Odds ratio
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- PCR-MULTIPLEX:** reacción en cadena de la polimerasa multiplex
- RFLP:** Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
- RT-PCR:** transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa
- SNP:** polimorfismo de nucleótido simple

INTRODUCCIÓN

La leucemia es una enfermedad neoplásica progresiva del sistema hematopoyético caracterizada por la proliferación no regulada de las células progenitoras no asignadas o parcialmente asignadas. Incluye a un grupo heterogéneo de neoplasias que difieren respecto a su agresividad y su célula de origen, la cual define el linaje mieloide o linfoide, presentación clínica y respuesta al tratamiento (1). La clasificación de la leucemia está definida en dos grupos según la progresión de los precursores hematopoyéticos. Las leucemias agudas son un grupo heterogéneo resultante de la mutación somática en una única célula madre hematopoyética, que desencadena la proliferación de células leucémicas inmaduras en la médula ósea (2), y las leucemias crónicas que presentan un inicio insidioso y se producen por alteraciones en etapas avanzadas de la maduración correspondiente a la línea celular afectada.

La etiología de las leucemias es multifactorial, siendo las alteraciones genéticas las desencadenantes de los eventos de leucemogénesis. Una de las principales causas de las neoplasias hematológicas son los oncogenes, que a su vez, son producto de la mutación de un gen normal denominado protooncogén. Estos eventos mutacionales incluyen la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores, lo cual altera la expresión del gen y la actividad/estructura de su producto proteico, causando una interrupción en la regulación de la proliferación y de la diferenciación celular.

El conocimiento de los mecanismos de transformación relacionados a las translocaciones cromosómicas ha tenido un alto impacto en el estudio y comprensión de la carcinogénesis en general y en los procesos de leucemogénesis en particular, gracias a la identificación de los genes implicados en este tipo de mutación cromosómica, siendo el cromosoma Philadelphia $t(9;12)(q34;q11)$ el primer cromosoma quimérico descubierto cuyo transcrito resultante de los genes *BCR-ABL*, ha sido considerado como marcador específico de células leucémicas descritas en la leucemia mieloide crónica y en la leucemia linfoblástica aguda. Otras translocaciones cromosómicas han sido descubiertas posteriormente

vinculadas al desarrollo de leucemias mieloides agudas, siendo en la actualidad, imprescindible su detección al momento del diagnóstico del subtipo celular, así como para realizar el monitoreo molecular de evolución de la enfermedad, como es el caso de las traslocaciones de los cromosomas 15;17 y 12;21 que comprometen a los genes *PML-RAR α* y *TEL-AML1* respectivamente, cuyos productos quiméricos son considerados oncogenes involucrados en el desarrollo de leucemias mieloides y linfoides.

En la actualidad, es necesario el abordaje integral genético-molecular de los mecanismos leucemogénicos que participan en el desarrollo y en la evolución de esta patología, a través del estudio de las anomalías génicas implicadas que comprenden la participación de múltiples eventos genéticos y epigenéticos independientes (3). Las mutaciones en el oncogén *RAS* conducen a una activación constitutiva de la proteína ras, siendo un factor importante para el desarrollo de células cancerosas, debido al descontrol del ciclo celular. En la leucemia, la frecuencia de aparición de mutaciones de este gen localizadas en los codones 12, 13 y 61 varían de acuerdo a la clasificación, oscilando de 10 a 40% aproximadamente (4). Niveles elevados de la proteína Ras mutada unida a GTP, afectan las diferentes vías de señalización celular dependientes de Ras que se vinculan al desarrollo hematopoyético, así como la afectación de la evolución clínica de la enfermedad, siendo reportado su relación con pronósticos desfavorables (5). Las alteraciones génicas producto de mutaciones en el gen *TP53* que codifica la proteína p53 conocida como la proteína supresora de tumores, afectan la regulación crítica de la proliferación celular, principalmente la inducción a la apoptosis. En las neoplasias hematológicas se han descrito mutaciones en este gen y su relación con el avance del cuadro clínico, fracaso terapéutico y pronóstico de supervivencia de la enfermedad, siendo en los casos de las leucemias de linaje linfóide y leucemia mieloide crónica en crisis blástica un factor de mal pronóstico (6)(7), como consecuencia de una desregulación de ciclo celular, inestabilidad genómica y resistencia a la quimioterapia (8). La detección de las mutaciones de los genes *RAS* y *TP53* en pacientes diagnosticados con leucemia permite conocer su espectro y su frecuencia; y la posible asociación con la evolución clínica de los pacientes.

En el genoma, pueden existir variaciones en la ubicación de los nucleótidos con una frecuencia mayor al 1%, conocida como polimorfismos genéticos, que han sido asociados con la susceptibilidad a desarrollar determinadas enfermedades y se han relacionado con la farmacocinética y la farmacodinámica debido a la respuesta variable a los medicamentos (9). Al conocer cómo un determinado polimorfismo genético afecta el metabolismo y la acción de los medicamentos, podría ser posible predecir para cada paciente que medicamento es el que ofrece mayor beneficio terapéutico, y qué probabilidad existe de desarrollar una reacción adversa (toxicidad), en función de su dotación genética, lo cual sería una información valiosa para los pacientes que cursan con leucemia. Actualmente, surgen cada vez más estudios que buscan relacionar el genoma del individuo con la respuesta al tratamiento farmacológico, gracias a la farmacogenética, que se define como la disciplina científica orientada al estudio de los aspectos genéticos, relacionados con la variabilidad de la respuesta a los medicamentos en individuos o en poblaciones.

En este sentido, se estudiaron los polimorfismos en los genes que codifican las enzimas encargadas de metabolizar xenobióticos en los pacientes con leucemia. Los genes de la familia de Glutación S- Transferasa: *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1*, pertenecen a esta superfamilia de isoenzimas que regulan el metabolismo y detoxificación de sustancias extrañas introducidas en las células; por medio de reacciones de fase II; ya que catalizan la conjugación de fármacos, mutágenos, carcinógenos, contaminantes ambientales y algunos compuestos endógenos que podrían dañar tanto al ADN, como a los lípidos de membrana, siendo ésta la razón por lo que los estudios han asociado la presencia de los polimorfismos de estas enzimas con el riesgo de padecer algún tipo de leucemia, e inclusive han sido relacionados con el pronóstico evolutivo de la enfermedad, debido a que metabolizan algunos fármacos que son empleados en los protocolos quimioterapéuticos (10). Por otra parte, la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) se encarga de proveer los grupos metilo a la célula y catalizar la conversión de 5-10 metilentetrahidrofolato en 5-metiltetrahidrofolato (5-MTF), que es la forma circulante del folato; así como participar en la producción de

dTMP vía timidilato sintetasa y síntesis de purina, por lo que, juega un papel importante en la provisión de nucleótidos esenciales para la síntesis de ADN. Los polimorfismos del gen *MTHFR* 677 C/T y 1298 A/C han sido descritos como un posible factor de riesgo de desarrollo de leucemia (11). En diferentes protocolos de tratamiento en pacientes con leucemia linfoblástica aguda se emplea el fármaco Metotrexato que actúa en el metabolismo del folato, inhibiendo a varias enzimas que participan en el mismo. Estudios han encontrado que los polimorfismos del gen *MTHFR* pueden afectar el metabolismo del Metotrexato, ocasionando una disminución de la efectividad en la respuesta al tratamiento, así como la aparición de efectos adversos (12).

De acuerdo a lo anteriormente señalado, en esta tesis doctoral se evaluó la presencia de diferentes mutaciones y polimorfismos en genes que están involucrados en los procesos de leucemogénesis, así como la evolución clínica y la respuesta a los fármacos empleados en pacientes venezolanos con leucemia, enmarcado dentro de la línea de investigación “Estudio de anomalías génicas y cromosómicas; y polimorfismos genéticos en pacientes con neoplasias hematológicas y su correlación con la evolución de la enfermedad y la respuesta al tratamiento”. Se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales del Instituto Anatómico Dr. José Izquierdo de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela en conjunto con el Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Caracas.

CAPÍTULO I

JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LAS LEUCEMIAS EN VENEZUELA

En Venezuela, de acuerdo al último boletín epidemiológico de la situación del cáncer publicado por el Dr. Capote Negrín que corresponde al Anuario Epidemiológico del año 2012, refiere que las leucemias ocupan el quinto lugar de incidencia y mortalidad por cáncer en el sexo masculino y el séptimo lugar de incidencia y noveno lugar en mortalidad en el sexo femenino, superando los 1700 casos anuales; mientras que en la población infantil y juvenil, las leucemias ocupan el primer lugar de incidencia y de mortalidad, representando aproximadamente un 45% del total de las patologías neoplásicas, convirtiéndose en un importante problema de salud pública en la actualidad (13).

El desarrollo y la rápida evolución clínica de la leucemia se ha convertido en un verdadero reto para el clínico, quien se apoya en las distintas metodologías diagnósticas para definir, monitorear y establecer las estrategias terapéuticas con el fin de erradicar completamente la enfermedad (3). El surgimiento de los avances científicos han contribuido favorablemente con el conocimiento de las bases moleculares de la leucemia, afianzando la necesidad primordial de la investigación de los distintos marcadores que predigan el curso de la patología, con altos índices de sensibilidad, como el estudio de las anomalías génicas que permitan conocer el fenotipo molecular y que puedan afectar la expresión o función de genes que controlen la diferenciación y el crecimiento celular, cuyo principio fundamental es el aporte de información que oriente al clínico para la toma de decisiones e implementación del esquema terapéutico, como por ejemplo, conocer si un paciente puede ser candidato para un trasplante de precursores

hematopoyéticos o la implementación de un nuevo protocolo terapéutico personalizado.

En la práctica clínica se han observado grandes variaciones interindividuales, tanto en la eficacia de la respuesta como en la toxicidad, asociadas con las terapias anticancerígenas. Si bien la etiología de estas variaciones es multifactorial (adherencia al tratamiento, interacciones fármaco-fármaco, dieta, etc.), las variaciones genéticas del paciente han cobrado mucho interés en el último tiempo (14). La farmacogenética estudia el rol de la herencia en la variación individual en la respuesta a fármacos (15). Gracias al avance de la farmacogenética y la farmacogenómica en la última década, se puede predecir la eficacia y los posibles efectos adversos de las drogas a través del análisis de polimorfismos en los genes que codifican las enzimas que metabolizan los diferentes fármacos que se emplean en los protocolos quimioterapéuticos.

Por los motivos planteados anteriormente, esta tesis doctoral propone evaluar la presencia de las translocaciones cromosómicas *BCR-ABL*, *PML-RAR α* y *TEL-AML1* cuyas proteínas quiméricas de fusión están involucradas en los procesos de leucemogénesis, del mismo modo, evaluar la presencia de mutaciones en los oncogenes *RAS* (*NRAS* y *KRAS*) y el gen supresor de tumores *TP53*, claves en la diferenciación, proliferación y apoptosis celular, implicados en la patogénesis leucémica, debido a que existe escasa información de sus frecuencias en pacientes venezolanos, a diferencia de otras poblaciones, contribuyendo al conocimiento molecular que permita brindar un apoyo en el diagnóstico y en el manejo terapéutico adecuado. Adicionalmente, para conocer la variabilidad genética y la respuesta de los pacientes ante la terapia farmacológica, se hace necesario el análisis de los polimorfismos de los genes *GST* y *MTHFR*, implicados en el metabolismo de diversas drogas empleadas en los protocolos quimioterapéuticos, así como para determinar su vinculación con el desarrollo de la enfermedad.

En este sentido, se plantea este estudio en pacientes venezolanos con leucemia que asisten al Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Caracas. Estos elementos moleculares involucrados en la leucemogénesis y en la farmacogenética sirven de base para el conocimiento, la predicción del

comportamiento y evolución durante el padecimiento de la enfermedad, predicción de recaídas moleculares y el establecimiento de terapias quimioterapéuticas personalizadas al conocer los genotipos de genes metabolizadoras de xenobióticos, que se ajusten a las características genéticas de cada paciente, con el fin de que el clínico seleccione tratamientos más eficaces y menos tóxicos, para favorecer la calidad de vida y expectativas de supervivencia.

Este estudio forma parte de proyectos de investigación financiado por FONACIT MC-2007001066, MC- 2008001053, que plantea el estudio de anomalías génicas y cromosómicas en pacientes con neoplasias hematológicas y su correlación con la evolución de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, desarrollado en el Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales (Universidad Central de Venezuela) y el Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Caracas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la frecuencia de mutaciones génicas y polimorfismos genéticos de enzimas metabolizadoras de xenobióticos en pacientes venezolanos con leucemia.

Objetivos específicos

1. Detectar la presencia de las siguientes translocaciones cromosómicas: t(9;22)(q34;q11) con fusión génica de *BCR-ABL*, t(12;21)(p13;q22) con fusión génica de *TEL-AML1* y t(15;17)(q22;q21) con fusión génica *PML-RAR α* , en muestras de médula ósea y sangre periférica, mediante la técnica de Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la polimerasa (RT-PCR).
2. Determinar las mutaciones de los genes *TP53* y *RAS* en pacientes con leucemia, mediante las técnicas de Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) y Secuenciación Automatizada.
3. Determinar la frecuencia de los polimorfismos de los genes de glutatión S-Transferasa (GSTs), *GSTT1* y *GSTM1*, a través del método PCR-Multiplex.
4. Determinar la frecuencia de los polimorfismos del gen de Glutatión S-Transferasa (GSTs), *GSTP1*, a través del método PCR-RFLP.
5. Determinar la frecuencia de los polimorfismos del gen Metilentetrahidrofolato Reductasa (*MTHFR* 1298 y *MTHFR* 677), a través del método PCR-RFLP.
6. Correlacionar la evolución clínica y la presencia de mutaciones en los genes *TP53* y *RAS* en los pacientes con leucemia.
7. Evaluar la asociación entre los polimorfismos de los genes *GST* y *MTHFR*, y el desarrollo de la enfermedad así como su relación con la respuesta al

tratamiento farmacológico.

8. Estimar el tiempo de supervivencia global y libre de evento en pacientes diagnosticados con LLA tratados con Metotrexato de acuerdo al genotipo de *MTHFR*

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

1. Aspectos históricos

La leucemia fue descubierta en el mundo hace casi 200 años, por lo que puede considerarse un problema reciente comparado con otros grandes flagelos de la humanidad. Desde su descripción inicial, las leucemias han sido foco de una impresionante investigación médica, debido a varias razones: sus dramáticas manifestaciones clínicas, su frecuencia e impacto en la niñez, la sencillez en los análisis de sangre periférica y de médula ósea que permitieron comprender mejor la hematopoyesis, y su tratamiento, adaptado posteriormente a otros tipos de neoplasias del ser humano. El primero en describir la enfermedad fue Velpeau en 1827, el cual observó un paciente de 63 años con fiebre, debilidad y un crecimiento descomunal del abdomen. Sus hallazgos en la necropsia describió un gran crecimiento del hígado y del bazo (el bazo pesaba 4 kg), y la “sangre era como una papilla de avena que recordaba la consistencia y el color de las levaduras del vino tinto” (Velpeau, 1827). Otro caso similar fue publicado por Barth (1856), quien estudió en 1839 un paciente cuya sangre fue analizada por Donné, el cual observó en la necropsia al microscopio, unos “glóbulos mucosos muy parecidos a las células del pus”. De acuerdo con esta secuencia, Donné fue el primero en describir microscópicamente las células leucémicas. Estos autores los consideraban como procesos infecciosos y en Virchow recae el mérito de valorar su naturaleza diferente.

Los estudios iniciales de pacientes vivos con leucemia se hicieron en 1845 por tres investigadores de la época: Virchow en Alemania, el cual llamó a la enfermedad sangre blanca y la definió como “un proceso *sui generis*, debido a una alteración en la diferenciación normal de las células productoras de sangre. Conocemos las secuelas de la enfermedad pero no su causa”, este científico describió un paciente que presentaba un material blanquecino en los vasos

sanguíneos; otros de los investigadores de la época fueron Bennett (1845) y Craigie (1845) en Escocia, los cuales reconocieron también la entidad, como un problema propio de los glóbulos blancos. Virchow (1856) introdujo dos años después el término leucemia (leukos, blanco y haima, sangre), el cual ha perdurado hasta nuestros días, dado que el nombre de leucocitemia propuesto por Bennett (1852) prevaleció sólo por corto tiempo. Virchow diferenció en su trabajo la leucemia de la leucocitosis, describiendo a la vez dos tipos de leucemias: el esplénico, asociado con esplenomegalia, y el linfático, donde se presentaba aumento del tamaño de los ganglios linfáticos (16).

En 1878, Neumann añadió un nuevo tipo: la mielógena. Este mismo autor, había descrito previamente que la médula ósea era un lugar importante en la fabricación de corpúsculos hemáticos. Gowers, en 1879, clasificó las leucemias agudas en leucocitemia esplénica y linfadenosis, haciendo equivalente este término a la enfermedad descrita por Thomas Hodgkin en 1832. Este hecho inició un período de confusión que se arrastró durante más de un siglo. A finales del siglo XIX y principios del siglo XX los términos leucemia, pseudoleucemia, leucosarcoma, cloroma, linfosarcoma, reticulosis, mielosis, mieloma y aún otros fueron empleados por distintos autores sólo o en combinación y con diferentes criterios.

Es importante destacar el trabajo de estos pioneros en el descubrimiento de la leucemia, sobre todo porque científicamente, la clasificación y el estudio de la leucemia no pudieron visualizarse sino hasta que se conoció la tinción de Ehrlich (1891), la cual, permitió diferenciar las distintas etapas madurativas de los leucocitos e identificar las diferentes variantes de las células leucémicas.

En 1889, Ebstein describió los primeros casos de leucemia aguda, Naegeli en 1900 y Schilling en 1913, describieron las leucemias mieloblásticas y monocíticas, respectivamente (17).

En 1960, Nowell y Hungerford detectaron la anormalidad conocida como cromosoma Philadelphia (Ph), en pacientes con leucemia mieloide crónica. Más adelante en 1973, Rowley describió que el cromosoma Ph resultaba del desplazamiento recíproco entre los brazos largos del cromosoma 9 y 22, fue entonces que esta alteración cromosómica fue designada como $t(9;22)(q34;q11)$

(18)(19). En 1976, en un esfuerzo para mejorar y estandarizar la clasificación de las leucemias agudas, un grupo de médicos franceses, americanos y británicos (FAB) propuso un sistema de clasificación y nomenclatura basado en las características morfológicas de las células blásticas en frotis teñido con Romanowsky y en los resultados de las tinciones citoquímicas. A mediados del decenio de 1980, grupos de científicos de todo el mundo se reunieron para investigar la subtipificación de las leucemias linfoides y mieloides agudas con el uso de criterios morfológicos, inmunológicos y citogenéticos (20).

Desde el descubrimiento de la primera fusión génica, *BCR-ABL* en t(9;22), otras aberraciones cromosómicas han sido descritas gracias a las herramientas de la biología molecular.

2. Definición y concepto de neoplasia hematológica.

El término neoplasia hematológica engloba los diversos tipos de proliferaciones tumorales de las células sanguíneas o de sus precursores en médula ósea y en los órganos linfoides. Se han definido dos categorías de neoplasias hematológicas: las leucemias y los linfomas. Las primeras afectan a la médula ósea y se extienden a la sangre periférica, mientras que los linfomas se originan en los diferentes tejidos linfoides (ganglios linfáticos, tejido linfoide asociado a mucosas, bazo).

La leucemia es una enfermedad resultante de la proliferación neoplásica de las células hematopoyéticas. Ocurre como consecuencia de la mutación a nivel de las células madres, cuya progenie formaría posteriormente un clon de células leucémicas. Las alteraciones genéticas contribuyen a la transformación maligna, tales como la expresión inapropiada de oncogenes y la pérdida de función de genes supresores de tumores (21).

La célula afectada puede ser un precursor mieloide, un precursor linfoide o una célula pluripotente que es capaz de diferenciarse en células de la línea mieloide o linfoide. Las leucemias mieloides pueden derivarse de una célula del

linaje o de una célula pluripotente capaz de diferenciarse en los linajes eritroide, granulocítico, monocítico o megacariocítico.

3. Clasificación de leucemias.

La clasificación de la OMS de neoplasias hematológicas (1997) agrupa aquellas entidades clínicas con trascendencia nosológica bien establecida, atendiendo a los siguientes criterios:

1. Cuadro clínico
2. Características morfológicas observadas en el microscopio convencional
3. Inmunofenotipo
4. Alteraciones genéticas

Esta clasificación incorpora algunos de los criterios estandarizados realizados por el grupo FAB (French-American-British Cooperative Group) para las leucemias agudas y síndromes mieloproliferativos y mielodisplásicos (22) y por otra parte la clasificación REAL de los linfomas. Las cuatro categorías más importantes son:

- I. Neoplasias mieloides
- II. Neoplasias linfoides
- III. Enfermedades de las células cebadas o mastocitos
- IV. Neoplasias histiocíticas

3.1 Neoplasias mieloides

En la clasificación FAB se definen tres grandes grupos de neoplasias mieloides: las leucemias mieloides agudas, los síndromes mielodisplásicos, y los síndromes mieloproliferativos crónicos. El recuento de los elementos blásticos, la diferenciación de la línea celular y el grado de maduración servirían como

criterios diagnósticos y se definen mediante morfología, citoquímica e inmunofenotipo (tabla 1) (23).

Tabla 1. Clasificación de FAB de LMA.

Subtipo FAB	Denominación	% de casos	Comportamiento citoquímico	
			MPO/NS inespecíficas	esterasas
M0	LMA con diferenciación mínima	<5	-	-
M1	LMA sin maduración	15-20	+	-
M2	LMA con maduración	15-25	+	-
M3	Leucemia aguda promielocítica	5-10	+	-
M4	Leucemia aguda mielomonocítica	20	+	+
M4 Eo	Leucemia aguda mielomonocítica con eosinofilia	5-10	+	+
M5	Leucemia aguda monocítica	10-20	-	+
M6	Eritroleucemia	3-5	+	-
M7	Leucemia aguda megacarioblástica	<5	-	+

MPO: mieloperoxidasa, NS: negro Sudán.

El reconocimiento de las diferentes alteraciones citogenéticas y moleculares, así como la presencia de displasia asociada como factores que modifican el pronóstico de enfermedades, han sido tomados en cuenta en la nueva clasificación de la OMS. Los patólogos propusieron cuatro grandes grupos de enfermedades

mieloides: síndromes mieloproliferativos (SMP), síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos (SMD/SMP), síndromes mielodisplásicos (SMD) y leucemias mieloides agudas (LMA). Dentro de la categoría de LMA se describen cuatro grupos: (1) LMA con translocaciones citogenéticas recurrentes; (2) LMA con displasia simultánea; (3) LMA y SMD relacionados con tratamientos y (4) LMA sin clasificación. (24) Sin embargo, recientemente la Organización Mundial de la Salud publicó en su 4ta edición de series monográficas, una revisión de los criterios diagnósticos, incorporando nueva información clínica y científica. Vardiman *et al.*, (25), describen los nuevos cambios propuestos por la OMS en cuanto a la clasificación de neoplasias mieloides y leucemias agudas, ver tabla 2.

Tabla 2: Clasificación propuesta por la OMS, 2009 para neoplasias mieloides y leucemias agudas.

<p>Neoplasias mieloproliferativas (NMP):</p> <p>Leucemia mieloide crónica, <i>BCR-ABL1</i>- positivo (LMC)</p> <p>Leucemia neutrofílica crónica</p> <p>Policitemia vera</p> <p>Mielofibrosis primaria</p> <p>Trombocitemia esencial</p> <p>Leucemia eosinofílica crónica, no clasificadas en otra</p> <p>Mastocitosis</p> <p>Neoplasias mieloproliferativas, sin clasificar.</p>
<p>Neoplasias mieloides y linfoides asociadas a eosinofilia y anormalidades de <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i>, o <i>FGFR1</i>:</p> <p>Neoplasia mieloide y linfoide asociada con reordenamientos de <i>PDGFRA</i></p> <p>Neoplasia mieloide asociada con reordenamientos de <i>PDGFRB</i></p> <p>Neoplasia mieloide y linfoide asociada con anormalidades de <i>FGFR1</i></p>
<p>Neoplasias mielodisplásica/ mieloproliferativa (SMD/NMP):</p>

<p>Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)</p> <p>Leucemia mieloide crónica atípica, <i>BCR-ABL1</i>- negativo</p> <p>Leucemia mielomonocítica juvenil</p> <p>Neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa, sin clasificar</p> <p><i>Provisional</i>: anemia refractaria con anillos con sideroblastos en anillo y trombocitosis.</p>
<p>Síndromes mielodisplásicos (SMD):</p> <p>Citopenia refractaria con displasia de una sola línea</p> <p style="padding-left: 20px;">Anemia refractaria</p> <p style="padding-left: 20px;">Neutropenia refractaria</p> <p style="padding-left: 20px;">Trombocitopenia refractaria</p> <p>Anemia refractaria con sideroblastos en anillo</p> <p>Citopenia refractaria con displasia multilínea</p> <p>Anemia refractaria con exceso de blastos</p> <p>Síndrome mielodisplásico con aislados del (5q)</p> <p>Síndrome mielodisplásico, sin clasificar</p> <p>Síndrome mielodisplásico infantil</p> <p><i>Provisional</i>: citopenia refractaria infantil</p>
<p>Leucemia mieloide aguda y neoplasias relacionadas:</p> <p>Leucemia mieloide aguda con anomalías genéticas recurrentes</p> <p style="padding-left: 20px;">LMA con t (8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i></p> <p style="padding-left: 20px;">LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i></p> <p style="padding-left: 20px;">LMA con t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i></p> <p style="padding-left: 20px;">LMA con t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i></p> <p style="padding-left: 20px;">LMA con t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i></p> <p style="padding-left: 20px;">LMA con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVII</i></p> <p style="padding-left: 20px;">LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKLI</i></p>

Provisional: LMA con mutación de *NPM1*

Provisional: LMA con mutación de *CEBPA*

Leucemia mieloide aguda con cambios relacionados a mielodisplasia

Neoplasias mieloides relacionadas a terapias

Leucemia mieloide aguda, sin clasificar en otra

LMA con diferenciación mínima

LMA sin maduración

LMA con maduración

Leucemia mielocítica aguda

Leucemia monoblástica/monocítica aguda

Leucemia eritroide aguda

Leucemia eritroide pura

Eritroleucemia, eritroide/mieloide

Leucemia megacarioblástica aguda

Leucemia basofílica aguda

Panmielosis con mielofibrosis

Sarcoma mieloide

Proliferaciones mieloides relacionadas al síndrome de Down

Mielopoyesis anormal transitoria

Leucemia mieloide asociada con síndrome de Down

Neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas

Leucemias agudas de linaje ambiguo:

Leucemia aguda indiferenciada

Leucemia aguda de fenotipo mixto con t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*

Leucemia aguda de fenotipo mixto con t(v;11q23); reordenamiento *MLL*

Leucemia aguda de fenotipo mixto, B-mieloide, no clasificada en otra

Leucemia aguda de fenotipo mixto, T-mieloide, no clasificada en otra

Provisional: Leucemia/linfoma linfoblástica de células natural killer (NK)
--

Parte de las modificaciones que se incluyen al nuevo consenso de las clasificaciones conviene destacar por su importancia (24):

1. El conteo de 20% de blastos en sangre periférica o en médula ósea establece el diagnóstico de LMA, a diferencia que anteriormente se estimaba con 30% de blastos.
2. Se debe emplear la identificación molecular/citogenética
3. Separación de leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) del grupo de SMD.
4. Reconocimiento de citopenia refractaria con displasia dentro de SMD.
5. La leucemia mieloide crónica Ph- , se denomina LMC atípica y se incluye en el grupo de SMD/NMP.
6. La nomenclatura ha sido modificada de síndrome mieloproliferativo (SMP) a neoplasia mieloproliferativa (NMP).
7. Las leucemias formalmente designadas como “leucemia bilineal aguda” y “leucemia aguda bifenotípica”, son denominadas actualmente “leucemia aguda de fenotipo mixto”.

3.2 Neoplasias linfoides

En la clasificación de las neoplasias linfoides se han adoptado los criterios y categorías de clasificación propuestos por Revised European-American Lymphoma (REAL) en 1994 (24). La Organización Mundial de la Salud en el boletín del año 2008, incluye cambios significantes de nomenclatura para las neoplasias de precursores linfoides (25) ver tabla 3:

1. La nomenclatura “leucemia/linfoma linfoblástica de precursor B” y “leucemia/linfoma linfoblástica de precursor T” ha sido modificada a

“leucemia/linfoma linfoblástica B” y “leucemia/linfoma linfoblástica T”, respectivamente.

2. La leucemia /linfoma linfoblástica B ha sido dividida en siete distintas entidades definidas por anomalías cromosómicas recurrentes; casos de LLA-B que no presenten esas anormalidades se denominan como “sin clasificar”.

Tabla 3. Clasificación propuesta por la OMS para neoplasias linfoides.

Neoplasias de células B

1. Leucemia /linfoma B linfoblástica:

Leucemia /linfoma B linfoblástica, “sin clasificar”

Leucemia /linfoma B linfoblástica con anomalías genéticas recurrentes

Leucemia /linfoma B linfoblástica con t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*

Leucemia /linfoma B linfoblástica con t(v;11q23); reordenamiento *MLL*

Leucemia /linfoma B linfoblástica con t(12;21)(p13;q22); *TEL-AML1*

Leucemia /linfoma B linfoblástica con hiperdiploidía

Leucemia /linfoma B linfoblástica con hipodiploidía

Leucemia /linfoma B linfoblástica con (5;14)(q31;q31) *IL3-IGH*

Leucemia /linfoma B linfoblástica con t(1;19)(q23;p13.3); *TCF3-PBX1*

2. Maduras:

Leucemia linfocítica crónica de células B

Leucemia prolinfocítica B

Linfoma linfoplasmocítico

Linfoma esplénico de la zona marginal con o sin linfocitos vellosos

Plasmocitoma

Linfoma de la zona marginal extranodal de tipo MALT

Linfoma folicular

Linfoma de células del manto

<p>Linfoma de células B difusas</p> <p>Linfoma de Burkitt</p>
<p>Neoplasias de células T y NK:</p> <p>1. Leucemia /linfoma T linfoblástica</p> <p>2. Maduras:</p> <p>Leucemia prolinfocítica de células T</p> <p>Leucemia linfocítica granular de células T</p> <p>Leucemia de NK agresiva</p> <p>Linfoma de células T adultos</p> <p>Linfoma NK extra nodal de tipo nasal</p> <p>Linfoma de tipo T tipo enteropatía</p> <p>Linfoma de células T hepatoesplénico gamma-delta</p> <p>Linfoma T de paniculitis subcutánea</p> <p>Micosis fungoide/síndrome de Sezary</p> <p>Linfoma de células T grandes anaplásticas de tipo cutáneo primario</p> <p>Linfoma de células T sin clasificación</p> <p>Linfoma T angioinmunoblástico.</p>
<p>Linfoma de Hodgkin</p> <p>Linfoma linfocítico nodular</p> <p>Linfoma clásico Hodgkin: linfoma de esclerosis nodular (grado 1 y 2)</p> <p>Linfoma Hodgkin de celularidad mixta.</p>

4. Incidencia de leucemia

Las leucemias y todas las variantes de neoplasias hematológicas presentan una incidencia variable de acuerdo al tipo de la patología, sexo, edad y raza.

La leucemia es la segunda causa de muerte más común en niños menores de 1 año. Esto representa el 5-10% de las leucemias infantiles, con una incidencia de 44 infantes por cada millón. Aproximadamente 200 infantes son diagnosticados con leucemia en Estados Unidos cada año. Las leucemias infantiles incluyen la leucemia linfoblástica aguda y la leucemia mieloide aguda, incluyendo las variantes raras de leucemia de linaje mixto o bifenotípica (26).

Se ha reportado que la leucemia se puede presentar desde el útero, la leucemia fetal ha sido detectada en muestras de sangre umbilical a las 33 semanas de gestación cuando a través del ultrasonido se observa polihidramnios, hidrops, y/o hepatoesplenomegalia fetal (27).

En el caso de la leucemia mieloide aguda, su incidencia aumenta drásticamente con la edad (> 55 años), la remisión es escasa, con una supervivencia a largo plazo menor del 10% (28).

La leucemia mieloide crónica representa entre el 15 al 20% del total de las leucemias y su incidencia en los países occidentales se ha estimado en 1,6 por 100.000 hab/año, cuyo rango de edad es de 40 a 60 años y predomina ligeramente en varones, con una relación 1.3:1 (19).

Una revisión de las estadísticas del National Institute of Cancer (U.S), donde se publican las tasas de incidencia de leucemias en la población estadounidense desde el año 1975 hasta el 2006, prevalece la LLC seguida de la LMA, LMC y de la LLA. A su vez, se observa que existe un predominio de casos en individuos de sexo masculino sobre el sexo femenino y también de raza blanca en comparación con la tasa de casos en la raza negra. Otra variable de interés es la incidencia de las leucemias en el grupo etario, evidenciándose que la LLA predomina en infantes < 1 año y en 1-4 años, la LLC predomina en el grupo intervalo de 50 a 80 años, y las leucemias mieloides agudas y crónicas predominan en grupos etarios de 50 a 60 años (www.seer.cancer.gov.cs).

En nuestro país se ha reportado que el cáncer constituye una de las causas más frecuentes de enfermedad o muerte, representando el 15% de los casos, ocupando el segundo lugar en la mortalidad general después de las enfermedades del corazón. Las leucemias ocupan el 5to lugar de incidencia en hombres y 6to

lugar de incidencia en mujeres; en cuanto a la incidencia de mortalidad, ocupan el 4to lugar. La incidencia anual de cáncer de niños y jóvenes menores de 15 años es dominada por las leucemias (más de 600 casos anuales), representando el 40% seguido de malignidades del sistema nervioso central con un 11% y los linfomas con un 10% (29). Uno de los estudios precursores de la casuística de leucemia linfoblástica aguda en Venezuela fue realizado en el Hospital Universitario de Caracas en 1988 por Guevara J, Arends A, *et al.*, donde se reportó un predominio de casos en el sexo masculino con una relación M/F 1.6:1, las edades estaban comprendidas entre los 3 y los 75 años, con un 82% de los pacientes mayores de 3 años (30).

Fernández *et al.*, (31) publicaron los resultados de la casuística de biopsias realizadas en el Hospital Miguel Pérez Carreño (período 1985-1994). De un total de 64,650 biopsias, 716 (1.1%) correspondieron a biopsias de médula ósea, de las cuales 275 (38,41%) fueron controles de neoplasias hematológicas, siendo 10 biopsias (1,4%) referentes a pacientes con LMC y 29 (4,05%) a pacientes con LLC. Se encontraron 7 casos de LLC (24,14%) asociados con agentes externos, siendo 3 (42,86%) asociados con cigarrillo y cloro y 4 (57,14%) con derivados del petróleo.

5. Translocaciones cromosómicas en las leucemias

Los estudios citogenéticos en pacientes con leucemias han establecido una fuerte correlación entre la citogenética y los fenotipos clínicos de las variantes de leucemia. Las translocaciones cromosómicas pueden ser detectadas en la mayoría de las leucemias haciendo posible el conocimiento del fenotipo molecular de los pacientes, contribuyendo positivamente para la valoración diagnóstica y pronóstica de la entidad.

Desde el descubrimiento de la primera fusión génica de los genes *BCR-ABL* en t(9;22), otras anomalías cromosómicas con fusiones génicas han sido identificadas. Los genes involucrados en las anomalías génicas en las leucemias

agudas juegan un rol importante en el desarrollo y en la función de las células mieloides y linfoides. Estos genes frecuentemente codifican factores de transcripción, reguladores del ciclo celular, moléculas de transducción de señales, receptores, inmunoglobulinas (Ig) y moléculas de receptor de células T moléculas (TCR) (32).

Debido a la importancia y el alto impacto que ha tenido el diagnóstico de éstas anomalías cromosómicas en las leucemias, se describen a continuación algunos de los biomarcadores de interés en el seguimiento de la respuesta durante el tratamiento y posterior a su culminación, y su valioso rol en la detección de la enfermedad mínima residual.

Cabe destacar, que el término de enfermedad mínima residual (EMR) se refiere al mínimo nivel de los biomarcadores de la enfermedad que son capaces de detectarse posterior a la aplicación del protocolo de inducción y que también reflejan la recaída después de una remisión a largo plazo (33). Los métodos que se emplean en la actualidad para el diagnóstico de EMR están basados en las técnicas de citometría de flujo y PCR (RQ-PCR, ASO-PCR), que permiten detectar gracias a una alta sensibilidad y especificidad la expresión de inmunofenotipos aberrantes y marcadores moleculares específicos según cada tipo de leucemia (34). El seguimiento de la EMR se ha convertido en una herramienta esencial en la práctica clínica de rutina y ha demostrado ser un buen factor pronóstico de riesgo de fracaso terapéutico, permitiendo realizar ajustes y modificaciones en el tratamiento con miras a lograr la remisión completa de la enfermedad.

5.1 t(9;22)(q34;q11) con fusión génica de *BCR-ABL*

La translocación (9;22) conocida como cromosoma Philadelphia (Ph) fue el primer marcador citogenético tumoral, identificado en cáncer humano conllevando a la clonación de la proteína de fusión Bcr/Abl. El extremo NH₂- del gen *BCR* ubicado en el cromosoma 22 se fusiona al gen *c-ABL* ubicado en el cromosoma 9. La proteína de fusión bcr-abl puede variar de 190 a 230 kDa, según el sitio del punto de ruptura en el gen *BCR*. Los puntos de corte del cromosoma 9 están generalmente en el extremo 5' del exón 2 del gen *ABL* y los

puntos de corte del cromosoma 22 difieren en su posición dentro del gen *BCR*, dando lugar a transcritos de fusión con diferentes tipos de uniones de *BCR-ABL* (*breakpoint cluster region–c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase*) (32).

En los pacientes con LMC, los puntos de ruptura del gen *BCR* en el cromosoma 22 se denominan (*M-bcr*) y representan transcritos con diferentes tipos de uniones de *BCR-ABL*. Este transcrito codifica una proteína de 210KDa, llamada p210 *BCR-ABL*, ocupando una región de tamaño 5.8 Kb abarcando los exones 12 a 16 (denominados antiguamente b1 a b5) del gen *BCR*. Los pacientes con LMC poseen el punto de ruptura en una región de 2.9kb ubicada entre los exones 13 y 15 (llamados anteriormente exón b2 y b4) del gen *BCR* que se fusiona con el intrón 1b y 2 del gen *ABL* (ver figura 1). Esta translocación recíproca resulta en un transcrito híbrido *BCR-ABL* de 8.5Kb que contiene el exón b2 o b3 del gen *BCR* y el exón 2 (también denominado a2) del gen *ABL* (32). En este sentido, los transcritos de p210 *BCR-ABL* descritos en pacientes con LMC son b3a2 (55%), b2a2 (40%) y en menor frecuencia se pueden detectar los transcritos b2a3 y b3a3 (35). Cabe destacar que p210 *BCR-ABL* también puede estar presente en otros tipos de neoplasias hematológicas, alrededor de un 30% (20-50%) en pacientes adultos con LLA y en un 2-10% en pacientes con LLA infantil, así como ocasionalmente se puede encontrar en casos de LMA (<2%), linfoma y mieloma (32)(36).

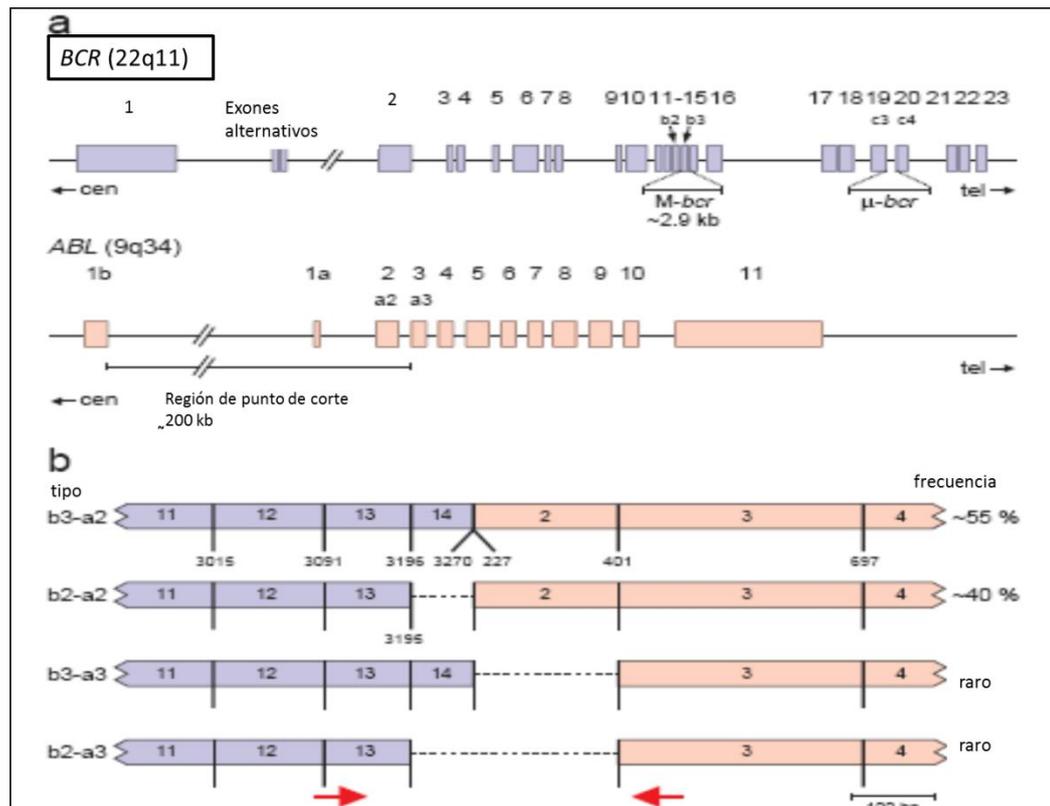


Figura 1. Representación de la translocación *BCR-ABL* p210. (a) diagrama esquemático de la estructura exón/intrón de los genes *BCR-ABL* de la translocación (9;22)(q34;q11). Se observa el punto de corte *M-bcr*. (b) esquema del transcrito **p210BCR-ABL**, se indican dos tipos de transcritos, b3-a2, b2-a2, b3a3 y b2a3 y sus frecuencias.

El segundo punto de ruptura en el gen *BCR* ha sido identificado en pacientes con LLA Ph+ casi de manera exclusiva, en este caso, los puntos de ruptura del gen *ABL* son localizados a lo largo de la región intrónica que abarca un tamaño de ~200kb, ubicada entre el exón 1b y el exón 2 (denominado también exón a2). Con respecto al gen *BCR*, el punto de ruptura ocurre en el primer exón (exón e1), en la región nombrada *m-bcr* (*minor-bcr*) por ser de menor tamaño comparada con la región *M-bcr*, y se une al exón 2 del gen *ABL*, formando un transcrito de fusión e1a2 *BCR-ABL* de 7 Kb (32)(37). La proteína resultante tiene un peso molecular de 190 kDa denominada p190 *BCR-ABL*. Esta anomalía génica ha sido descrita presente en aproximadamente 25% de los pacientes adultos con LLA y en un 5% en pacientes infantiles, asociada con un pronóstico desfavorable en su evolución clínica (37).

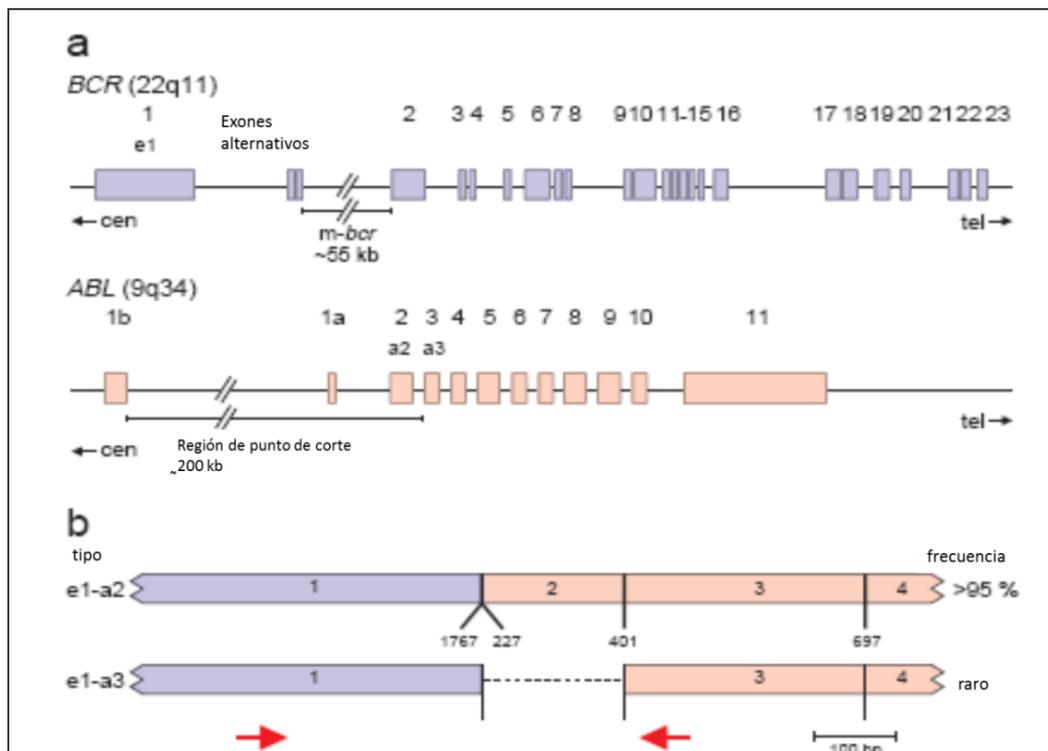


Figura 2. Representación de la translocación *BCR-ABL* p 190. (a) diagrama esquemático de la estructura exón/intrón de los genes *BCR-ABL* de la translocación (9;22)(q34;q11). Se observa el punto de corte de menor tamaño del gen *BCR* *m-bcr*. (b) esquema del transcrito **p190BCR-ABL**, se indican dos tipos de transcritos, *e1-a2* y *e1-a3*.

La proteína Bcr es una fosfoproteína de 160.000Da con actividad serina-treonina quinasa localizada en su primer exón. Este primer exón contiene dos dominios ricos en serina que se unen específicamente al dominio SH2 de Abl de un modo no dependiente de fosfoserina. Estas secuencias ricas en serina en la forma de fosfoserina están involucradas regulando la actividad oncogénica de Bcr-Abl (38). En las células normales, la actividad quinasa de Abl es finamente regulada en respuesta a factores de crecimiento y otros estímulos.

La proteína quimérica Bcr-Abl adquiere la habilidad transformante a través de la sobre regulación de la actividad tirosina quinasa de Abl, promoviendo la transformación leucémica de las células progenitoras hematopoyéticas (149). A través de la fusión a Bcr, la proteína Abl se convierte a un estado activo. Esto conlleva a la activación constitutiva de las vías de transducción de señales río abajo, incluyendo Ras, Jak/stat y PI-3 quinasa (figura 3). La supresión de la actividad constitutiva quinasa de Abl con inhibidores específicos de quinasas

como Imatinib (132), Dasatinib (39) y Nilotinib (40), revierten el potencial oncogénico de Bcr-Abl (41).

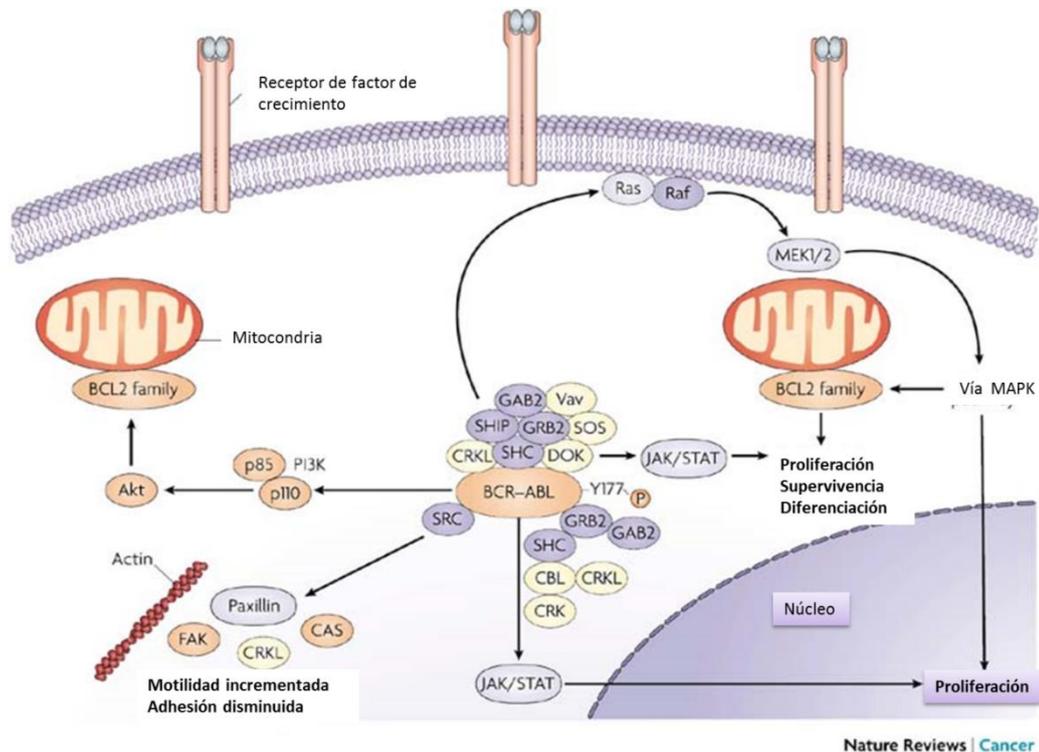


Figura 3. Mecanismos de acción del transcrita Bcr-Abl. Con la ayuda de varias proteínas mediadoras, Bcr-Abl se asocian con Ras y estimulan su activación. La proteína adaptadora, receptor de factor de crecimiento unido a proteína 2 (GRB2), interactúa con Bcr-Abl a través del sitio de unión a SRC homología 2 (SH2) proximal que se expone cuando el residuo tirosina 177 de Bcr-Abl es autofosforilado. GRB2 cuando se une a Bcr-Abl, interactúa con la proteína SOS. El resultado del complejo de proteínas Bcr-Abl-GRB2-SOS es la activación de Ras. Ras y la vía de la proteína quinasa mitógena activada (MAPK) son acopladas por Raf (serina/treonina quinasa). Raf cataliza la fosforilación de MEK 1 y MEK2, resultando en su activación. Bcr-Abl al asociarse con la vía fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), suprime la muerte celular programada e incrementa la supervivencia celular. De la misma manera Bcr-Abl puede asociarse con componentes de adhesión como actina, paxilina y quinasa de adhesión focal (FAK), la activación de CRKL-FAK-PYK2 conlleva a una disminución de la adhesión celular. Otra de las vías de acción de Bcr-Abl es su asociación con Janus quinasa activando la vía de transcripción (JAK-STAT). Finalmente, Bcr-Abl activan además otras vías relacionadas a respuestas de factores quimiotácticos, lo cual conlleva a un incremento de la migración celular. Tomado de Weisberg y col, Nature, 2007 (42).

En LMC, la secuencia quimérica del ARNm *bcr-abl* puede ser usado como blanco y ser un marcador específico de células leucémicas (43).

Debido a que esta translocación t(9;22)(q34;q1) se observa en 25 a 40% en pacientes adultos con LLA de células B, en 4 a 6% en niños con LLA, y en pacientes adultos con LMA con una frecuencia de 1 a 3%, este marcador ha sido

propuesto como blanco útil para diagnóstico de enfermedad mínima residual en este grupo de pacientes (44).

Durante los protocolos de los tratamientos, la detección del transcrito de fusión t(9;22)(q34;q1) por RT-PCR representa el método de elección para el monitoreo de la enfermedad mínima residual, apoyado también por la citometría de flujo. La validez clínica de este método en los casos de la LLA ha sido demostrada en pacientes que reciben trasplante de médula ósea. En estos pacientes la reaparición de la positividad de la translocación post-trasplante ha sido asociada significativamente a una recaída hematológica (32). En la actualidad, la detección del transcrito *BCR-ABL* se realiza por diferentes métodos de biología molecular que han ido ajustando su sensibilidad y especificidad a un nivel superior, con el fin de realizar un diagnóstico y monitoreo óptimo de las diferentes variantes en pacientes con LMC y LLA. La técnica RQ-RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa en tiempo real) se perfila con la sensibilidad más alta (10^{-4} - 10^{-6}) considerada “gold standard” para la detección de *BCR-ABL*, siendo estandarizada para uso aprobado en laboratorios clínicos (34). Alikian *et al.*, propusieron el método RT-Digital PCR como una alternativa con un buen índice de reproducibilidad y sensibilidad comparable, aunque aún por debajo de RQ-RT-PCR para detectar los transcritos *BCR-ABL* en pacientes con LMC, para el monitoreo de respuesta a los fármacos inhibidores de tirosina quinasa y el diagnóstico de enfermedad mínima residual (45).

5.2 t(12;21)(p13;q22) con fusión génica de TEL-AML1

La translocación (12;21) específica en pacientes con LLA es ocasionada por la fusión de dos genes, *TEL-ETV6* del cromosoma 12 y *AML1-CBFA2* ubicado en el cromosoma 21 (32) (figura 4).

El gen *AML1* codifica una proteína que forma un heterodímero con el CBF β que activa la transcripción. El heterodímero CBF (*core binding factor*) está formado por la subunidad β (CBF β) y la subunidad α (CBF α o AML), a través de esta última se une al ADN en la secuencia (TGT/cGGT) y regula la expresión de diversos genes, siendo diana de tres frecuentes fusiones génicas en leucemias

agudas, como *TEL-AML1*. La subunidad $CBF\alpha$ se une al ADN directamente, en cambio la subunidad β aumenta la afinidad de $CBF\alpha$ modificando su configuración, pero no se une al ADN directamente. El dominio RUNT de la subunidad α es el responsable tanto de la unión al ADN, como de la interacción con la subunidad β . El CBF regula la expresión de una gran variedad de proteínas que se expresan en las células hematopoyéticas como la interleucina 3, el factor estimulante de colonias granulomonocíticas (GM-CSF), el receptor del factor estimulante de colonias monocíticas (M-CSF), el receptor de células T (TCR), la mieloperoxidasa, CD3e, HoxB2 y la elastasa de los neutrófilos. El gen *TEL* codifica un factor de transcripción de la familia ETS identificado por su fusión con el locus PDGFRb en casos de leucemia mielomonocítica crónica (46).

El gen *AML1* también se asocia a otra translocación t(8;21) presente en pacientes con LMA, y el gen *TEL* se asoció primero a la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) en la translocación t(5;12) (47). El gen *TEL* está ubicado en el cromosoma 8 y consta de 8 exones, cuyo punto de ruptura se encuentra en una región de tamaño 15Kb ubicada entre los exones 5 y 6. En el gen *AML1* se estima que el punto de ruptura puede ocurrir en el intrón 1 o en el intrón 2 (más frecuente) (ver figura 4a).

El transcrito de la fusión *TEL-AML1* producto de la translocación (12;21), consta de la unión del exón 5 del gen *TEL* al segundo exón del gen *AML1* (ver figura 4b) (32). La proteína de fusión Tel-Aml1 presenta la capacidad de formar homodímeros o heterodímeros con el Tel normal inhibiendo la activación transcripcional de la proteína Aml1 normal.

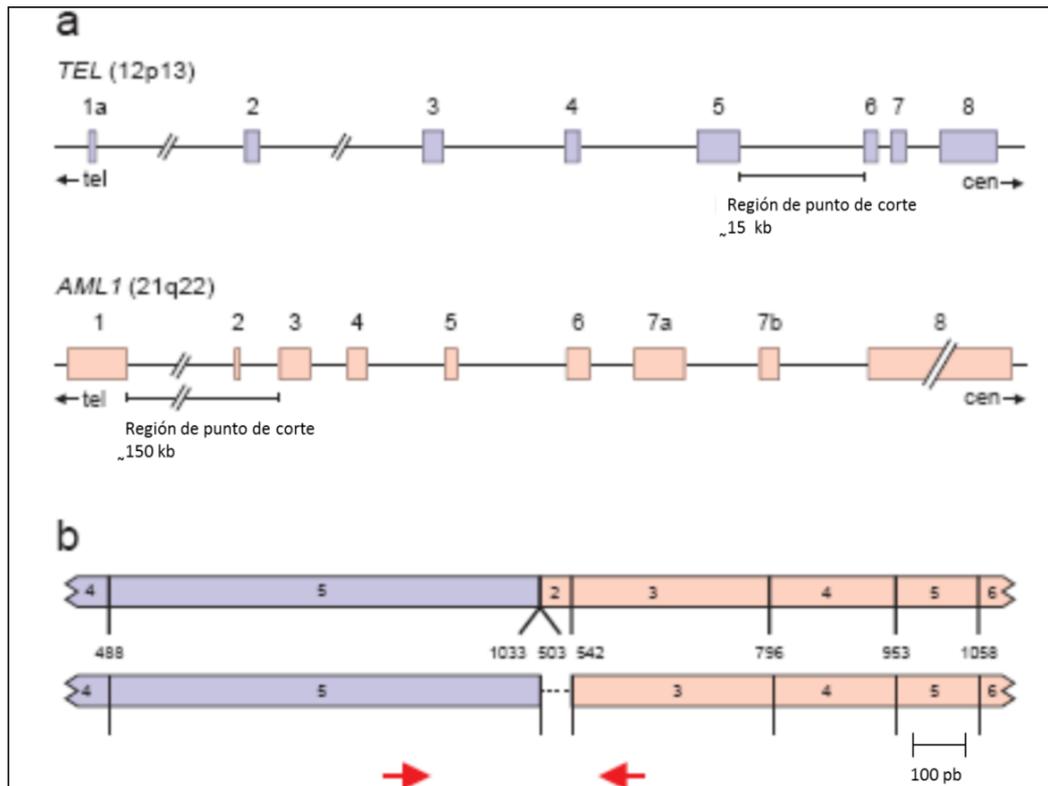


Figura 4. Representación de la translocación *TEL-AML1*. (a) diagrama esquemático de la estructura exón/intrón de los genes *TEL* y *AML1* de la translocación (12;21)(p13; q22). Se observan los puntos de corte. (b) esquema del transcrito *TEL-AML1*.

Cayuela *et al.*, (47) mostraron en un estudio que los transcritos *TEL-AML1* son frecuentemente detectados en pacientes pediátricos con LLA de células precursoras pre-B a través de RT-PCR, y son eficientes como blancos moleculares que pueden simplificar las estrategias diagnósticas de enfermedad mínima residual y su monitoreo en infantes.

La mayoría de los pacientes que resultan positivos se encuentran en un intervalo etario de 1 a 12 años al momento del diagnóstico, predominando en los casos de la LLA y en la leucemia/linfoblástica B. No obstante, pacientes positivos para esta fusión génica *TEL-AML1* mantienen un buen pronóstico y parecieran tener un mayor tiempo de demora para que ocurra una recaída. Otros grupos reportan una muy baja incidencia de recaída en pacientes con LLA con este transcrito (32). Harbott *et al.*,(48) reportaron los resultados de estudios de muestras de médula ósea de niños con recaída de LLA con una frecuencia de 19.6%. El rol del transcrito *TEL-AML1* en la LLA de células B en niños ha sido descrito; sin embargo, el mecanismo en la leucemogénesis no está del todo claro.

La identificación de las vías específicas que son moduladas por *TEL-AML1* y su contribución al bloqueo de la diferenciación que caracteriza el desarrollo de LLA-B es de gran utilidad para el monitoreo de la enfermedad y diseño de drogas específicas.

El oncogen *TEL-AML1* es capaz de inhibir la activación del factor regulatorio de interferón 3 (IRF3) a través de la inhibición de mTOR, afectando la señalización de IFN α/β y la maduración de los linfocitos B. La diferenciación de las células que expresan la proteína de fusión Tel-Aml1 puede ser reestablecida tratando a las células con IFN β *in vitro*, sugiriendo que las citoquinas que activan a IRF3 o las vías de IFN pueden representar una alternativa terapéutica efectiva en pacientes con LLA de células B que expresen el transcrito *TEL-AML1* (49).

La detección del transcrito *TEL-AML1* empleando herramientas de biología molecular se realiza a través de PCR con transcripción reversa, para evidenciar la presencia de los mismos, siendo la variante RQ-PCR la que permite cuantificar con un mayor nivel sensibilidad, necesario para el monitoreo de enfermedad mínima residual (32).

5.3 t (15;17)(q22;q21) con fusión génica *PML-RAR α*

La translocación cromosómica (15;17) está asociada específicamente a la leucemia promielocítica aguda (LPA) (M3 clasificación FAB) o LMA con t(15;17)(q22;q12); *PML-RAR α* , para la clasificación actual. Los dos genes afectados en esta translocación, son el gen *PML* ubicado en el cromosoma 15, que codifica un factor de transcripción putativo, y el gen del receptor del ácido retinoico (*RAR α*) que se ubica en el cromosoma 17 (32).

El gen *RAR α* codifica para la proteína *RAR α* que es un miembro de la superfamilia de receptores hormonales nucleares y funciona como factor de transcripción dependiente de ligando, regulando la expresión de un elevado número de genes diana, algunos de los cuales resulta crítico para la diferenciación celular mieloide normal. Normalmente *RAR α* funciona como un heterodímero tras unirse a un miembro de los receptores retinoides-X (RXR). En ausencia de ligando, los heterodímeros *RAR α /RXR* se unen a elementos de respuesta al ácido

retinoico (RARE) específicos, en los promotores de los genes diana, lo que conduce a represión de la transcripción. Esta represión es mediada por la formación de un complejo que incluye el heterodímero RAR α /RXR, el receptor co-represor nuclear N-CoR/SMRT, los co-represores transcripcionales Sin3A o Sin3B y una deacetilasa de histonas (HDAC). Este complejo induce directamente la deacetilación de residuos lisina de las proteínas histona dentro de los nucleosomas de los genes diana transcripcionales. La deacetilación de las histonas regenera la carga positiva de las lisinas lo que aumenta su afinidad por el ADN. Se piensa que esta modificación da lugar a un cambio de estructura del nucleosoma que interfiere con la transcripción (50).

La proteína PML controla la diferenciación de progenitores hematopoyéticos, proliferación celular y tumorigénesis, además coordina las funciones supresoras de tumor como la inducción de la apoptosis, arresto de factores del crecimiento celular y senescencia celular (51). Se ha demostrado la presencia de estructuras subnucleares de PML, las cuales han sido denominadas con diversos nombres como cuerpos nucleares PML (PML-NBs), cuerpos de Kremer, ND10 (dominio nuclear 10) o POD (dominios oncogénicos de PML). Las células mieloides contienen aproximadamente 10-30 unidades de estas estructuras moleculares cuya cantidad y tamaño varían durante el ciclo celular (52). Las proteínas que se co-localizan junto a PML dentro NB, incluyen Sp100, p53, pRb, Daxx y CBP, sugieren que PML es capaz de modular al menos por parte de NB, una variedad de procesos nucleares como la expresión génica y la estabilización del genoma (51).

El punto de ruptura del cromosoma 17 está localizado en un fragmento de ADN de 15kb en el intrón 2 del gen *RAR α* . En contraste, en el gen *PML* existen tres puntos de ruptura envueltos en la translocación: intrón 6 (*bcr1*; 55% de los casos), exón 6 (*bcr2*; 5%) y el intrón 3(*bcr3*; 40%) (Figura 5). La existencia de diferentes regiones de puntos de ruptura en el locus de *PML* y la presencia de “splicing” alternativo de los transcritos de *PML* son responsables de la gran heterogeneidad de las uniones *PML-RAR α* observadas en los pacientes con LPA (32).

La translocación genera un gen quimérico *PML-RAR α* y por ende una

proteína de fusión PML-RAR α . Debido a que el gen quimérico está presente específicamente en la LPA, la formación de PML-RAR α es determinante en la patogénesis primaria. Fue demostrado en la década pasada que la proteína de fusión PML-RAR α inhibe la diferenciación o promueve la supervivencia de células precursoras mieloides *in vitro*, sugiriendo que esta proteína tiene un papel fundamental en la patogénesis de leucemia promielocítica aguda (49).

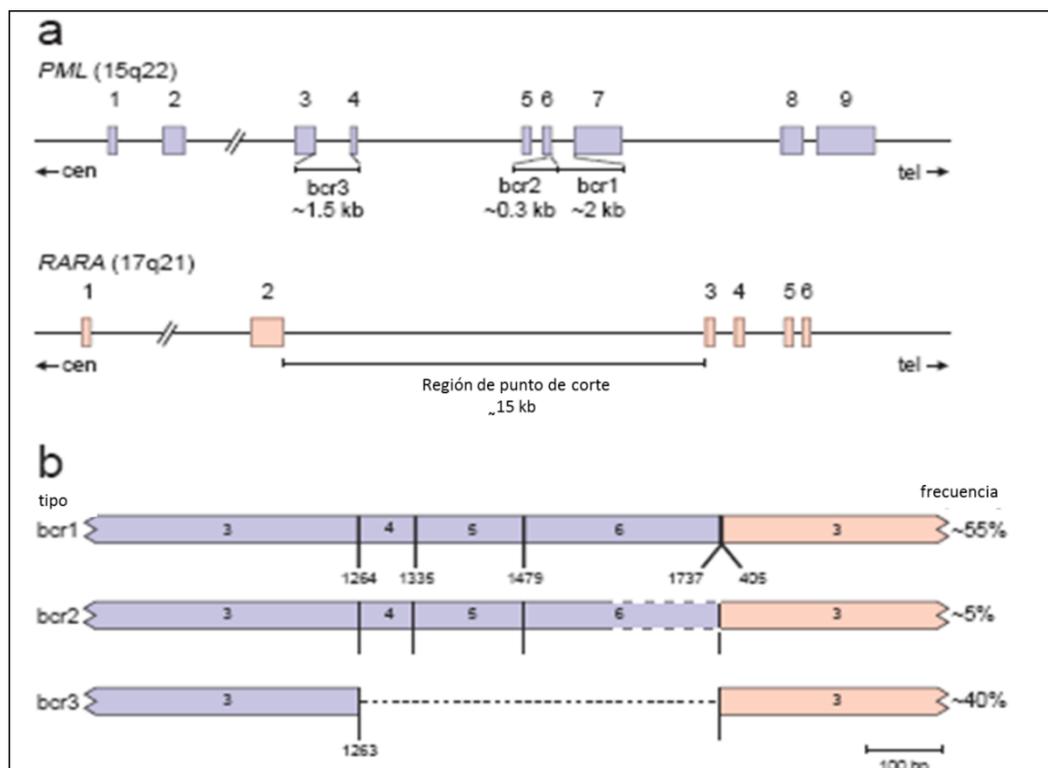


Figura 5. Representación de la translocación PML-RAR α . (a) diagrama esquemático de la estructura exón/intrón de los genes PML y RAR α de la translocación (15;17)(q22;q21). Se observan los puntos de corte. (b) esquema del transcrito PML-RARA relacionado con los diferentes puntos de cortes del gen PML y su frecuencia.

Al unirse el ligando ácido retinoico (RA), se transactivan los genes blancos críticos para la inducción de la diferenciación de células hematopoyéticas mieloides. El complejo quimérico PML-RAR α retiene tanto al ADN, como a los dominios de unión al ligando de RAR α y es capaz de inhibir la función transcripcional de un reclutamiento aberrante de correpresores y de deacetilasas de histona, actuando como un mutante dominante negativo sobre RAR α (silvestre). (52)

La oncoproteína PML-RAR α puede afectar la transcripción en otras vías incluyendo aquellas en la cual el factor de transcripción AP1 y factores de respuesta a interferón están involucrados. También esta oncoproteína se une a la proteína dedos de zinc de leucemia promielocítica (PLZF), afectando sus funciones, como supresión del crecimiento y represión de la transcripción; control del medio ambiente celular y diferenciación. La PML-RAR α previene la apoptosis a través de la deslocalización de PML y otras proteínas del cuerpo nuclear, finalmente, esta proteína de fusión es capaz de cooperar con otras proteínas para generar leucemia promielocítica aguda, como es el caso de FLT3, una tirosina quinasa que permanece activada cuando se encuentra mutada (figura 6) (53).

Todas estas interacciones de la oncoproteína PML-RAR α pueden estar involucradas en la leucemogénesis de LPA. El ATRA (ácido retinoico) y el trióxido de arsénico forman parte del tratamiento actual de la LPA, actúan degradando y escindiendo a la oncoproteína PML.

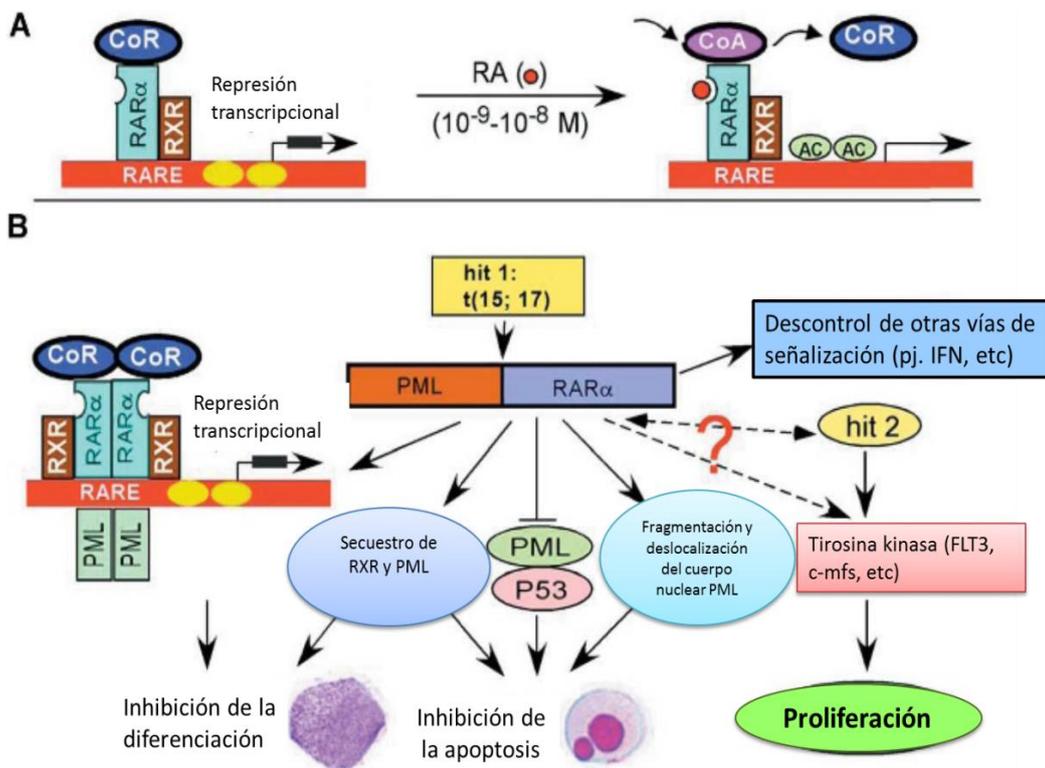


Figura 6. Efectos leucemogénicos de PML-RAR α en leucemia promielocítica. (a) En ausencia de RA, el heterodímero RAR α /RXR recluta el correpresor transcripcional (CoR), el cual media el silenciamiento transcripcional por mecanismos que incluyen la inhibición directa de la

transcripción basal y reclutamiento de enzimas modificadores de la cromatina. La modificación de la cromatina incluye la deacetilación de histonas, encargadas de la compactación de la estructura de la cromatina impidiendo el acceso de activadores transcripcionales. En presencia de concentraciones fisiológicas de RA el correpresor de la transcripción es liberado y es reclutado el coactivador hacia el heterodímero RAR α /RXR, resultando en la acetilación de histonas (AC) y transcripción. (b) La proteína de fusión PML-RAR α se une a los genes blanco de RAR α o sobre estos, o con RXR y juntos reclutan correpresores conllevando a la represión de la transcripción. La oncoproteína PML-RAR α secuestra a PML y RXR normales, inhibiendo la vía apoptótica de PML/P53, y deslocaliza a PML y otras proteínas desde el cuerpo nuclear. También se puede afectar el interferón (IFN) y otras vías de señalización. Anormalidades en las proteínas tirosinas quinasas (por ejemplo, FLT3, c-fms) pueden colaborar con PML-RAR α para causar LPA. Tomado y modificado de Guang y col., 2005)

Jurgic *et al.*,⁽⁵⁴⁾ basados en resultados experimentales del estudio del transcrito de la fusión PML-RARA en pacientes con LPA tratados con ciclos de ácido retinóico y quimioterapia, reportaron que la presencia o positividad de la fusión detectada por RT-PCR en muestras de médula ósea es altamente predictiva de recaída, en caso de ser negativo, se asocia fuertemente a una remisión a largo plazo. La técnica de RT-PCR permite diagnosticar la translocación, monitorear el curso clínico de LPA y la detección de enfermedad mínima residual (54)(55).

6. Genes reguladores de la función celular

Diversas alteraciones en el genoma celular afectan la expresión o función de genes que controlan la diferenciación y el crecimiento celular que pueden ser consideradas causas del inicio del cáncer. Estos eventos mutacionales incluyen activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores.

6.1 Oncogenes

Los oncogenes se definen como genes transformantes virales y son formas alteradas de genes celulares llamados proto-oncogenes. Los proto-oncogenes funcionan como puntos críticos en las vías de regulación de cascadas de eventos que mantienen la progresión del ciclo, división y diferenciación celular, así tenemos proto-oncogenes que codifican citoquinas, receptores, proteínas citoplasmáticas de señalización y factores de transcripción.

De los proto-oncogenes implicados en neoplasias humanas se encuentra la familia del gen *RAS* (56).

6.1.1 Alteraciones de los genes *N-RAS* y *K-RAS* en leucemia

En la superficie celular se expresan diferentes receptores en respuesta a las señales extracelulares provenientes del medio ambiente. Posterior a la unión del ligando, la activación del receptor conlleva al inicio de una serie de reacciones bioquímicas secuenciales donde la participación de las GTPasas es crucial (60). Las proteínas Ras producto del proto-oncogen *RAS*, juegan un papel importante en la transducción de la señal, proliferación y transformación maligna (18).

Los tres genes *RAS*: *N*, *K*, y *H-RAS* ubicados en el cromosoma 12q2, codifican las proteínas p21, las cuales se localizan en el interior de la membrana plasmática y tienen una actividad GTPasa intrínseca (56). De acuerdo a sus siglas, *N*-(de línea celular de neuroblastoma), *K*- (kirsten), y *H*-(Harvey) *RAS*, contienen 4 exones. *KRAS* codifica una proteína A y B a partir de 4 exones, los cuales son expresados en todos los tipos de tejidos y células, aunque el patrón de expresión varía dependiendo del órgano y el estadio de desarrollo (57)(58). El producto codificado por los genes *RAS* es una proteína de 188 aminoácidos de aproximadamente 21 KDa. Las proteínas p21 están codificadas por tres genes homólogos en sus primeros 164 aminoácidos, los primeros 86 residuos N-terminal pueden ser idénticos; sin embargo, difieren en 25 residuos en el extremo carboxilo terminal, con la excepción de la cisteína 186. Por esta razón, la región que comprende los residuos 165-185 ha sido denominada región heterogénea (58).

Las proteínas Ras son GTPasas que participan en el ciclo entre la guanosina difosfato inactiva y la guanosina trifosfato, ambas unidas a estas proteínas, conformando los complejos Ras-GDP y Ras-GTP, respectivamente (59). Primero, una proteína activadora de GTPasa reconoce la proteína de unión a GTP activa y estimula la actividad GTPasa intrínseca de Ras para formar la proteína de unión a GDP inactiva. En segundo lugar, los factores de intercambio de nucleótidos de guanina promueven la formación de un estado de unión a GTP activo (18) (figura 7).

Las proteínas reguladoras que controlan el ciclo GDP/GTP de Ras incluyen proteínas activadoras de GTPasa (GAPs), las cuales aceleran la tasa de hidrólisis de GTP a GDP, y los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs, por ejemplo: SOS y CD25), induciendo la disociación de GDP para permitir la asociación con GTP. En el estado de Ras unido a GTP, ésta se acopla a señales de activación de receptores de factor de crecimiento hacia los efectores mitogénicos. Por definición, las proteínas que interactúan con la forma activa unida a GTP de Ras, transmiten señales que son llamadas efectores de Ras. Los mecanismos por el cual Ras-GTP influencia la actividad de estos efectores incluyen la activación directa (por ejemplo, B-Ras, PI-3 quinasa), reclutamiento de la membrana plasmática (por ejemplo, c-Raf-1) y la asociación con sustratos (Ral-GDS). Otros candidatos para los efectores de Ras pueden ser proteínas quinasas, lípidos quinasas y GEFs (4).

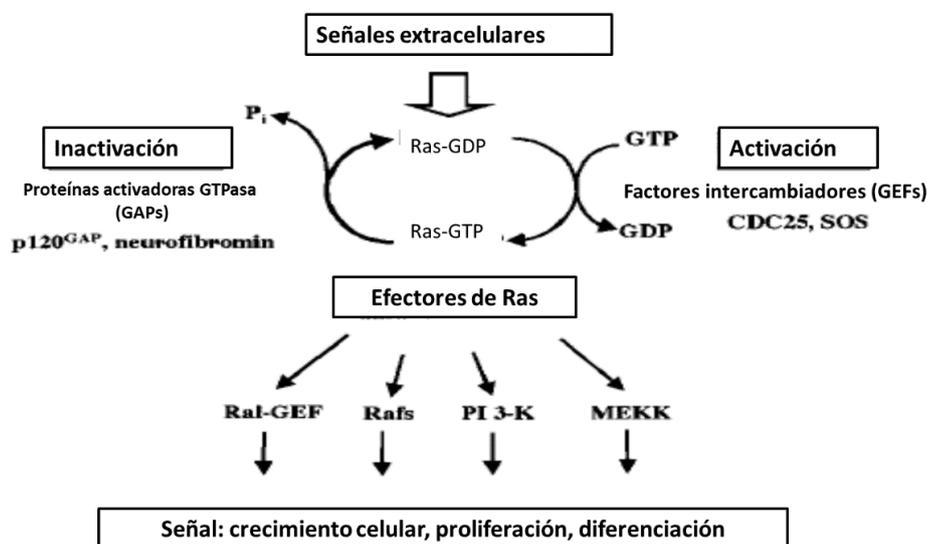


Figura 7. Ciclo de las proteínas Ras. Se observan los ciclos de ras entre el estado activo unido a GTP y el estado inactivo unido a GDP. Las señales mitogénicas activan los factores de intercambio (GEFs) como SOS y CDC25. Los GEFs incrementan la disociación de GDP y estabiliza la forma libre de nucleótido de ras, conllevando la unión de GTP a la proteína ras. Ras puede ser activada también por la inhibición de GAPs. Tomado y modificado de Cristoph et al. 2000 (4).

La familia de proteínas Ras juega un rol importante en redes de señalización que permiten conectar una gran variedad de señales efectoras relacionadas al control funcional de la progresión del ciclo celular, crecimiento, migración, cambios en el citoesqueleto, apoptosis y senescencia (5).

Las mutaciones del gen *RAS* en el exón 2 que codifica los codones 12 y 13, y en el exón 3 que codifica el codón 61, confieren una activación constitutiva de la proteína Ras, la cual se encuentra en el estado unido a guanosin trifosfato (GTP) (60). Estas mutaciones, son frecuentes en alteraciones genéticas

encontradas alrededor de 20 a 30% de todos los tumores humanos, con variaciones según el tipo de tumor. Estas mutaciones resultan en la supresión de la actividad normal GTPasa de la proteína ras. Mientras los mutantes de ras forman complejos con GAP (proteínas de activación GTPasa), la reacción GTPasa de ras no puede ser estimulada por GAP, causando un incremento de la vida media de los mutantes Ras-GTP (60).

Con respecto a las neoplasias hematológicas, las mutaciones del proto-oncogen *RAS* son frecuentemente observadas en neoplasias hematológicas como la leucemia mieloide aguda (20 a 30%) y en el mieloma múltiple (56)(60). Las mutaciones puntuales de este proto-oncogen han sido encontradas en 10 a 40% en pacientes con síndromes mielodisplásicos (SMD) y de 10 a 20% en pacientes con leucemia linfoblástica aguda. De igual modo, en leucemia mielomonocítica crónica las mutaciones de *N-RAS* han sido encontradas como una anomalía común con una incidencia de 20 a 60%, mientras es poco común encontrarlas en leucemia mieloide crónica (61).

Bowen *et al.*, (60) reportaron una frecuencia de mutaciones del gen *N-RAS* de 28% en su estudio de 232 pacientes con leucemia mieloide aguda. Del mismo modo, señalan que las mutaciones del gen *RAS* son relativamente frecuentes en la LMA y en el SMD, siendo las más comunes las mutaciones del gen *N-RAS*, seguido por el gen *K-RAS* y *H-RAS*.

La participación de las mutaciones de los genes *RAS* en la patogénesis de LMA o SMD no está del todo definida. Ensayos clonogénicos han permitido identificar variantes de colonias mutantes y no mutantes de *N-RAS* en progenitores de médula ósea de LMA. Estas mutaciones del gen *N-RAS* fueron encontradas solo en progenitores maduros, sugiriendo que las mutaciones de *N-RAS* se asemejan más a los eventos post-iniciación contribuyendo a la progresión/proliferación de subclones en LMA (60).

6.2 Genes supresores de tumores

Los genes supresores de tumores codifican proteínas que intervienen en la regulación del crecimiento o diferenciación celular mediante un proceso de

control negativo y la pérdida de su función, contribuye directamente a la aparición de un fenotipo tumoral.

6.2.1 Alteraciones del gen *TP53* en leucemia

El gen *TP53* que codifica la proteína p53 se localiza en el cromosoma 17p13.1, se extiende a lo largo de 20kb de ADN genómico y contiene 11 exones. La proteína p53 se encuentra conservada en diferentes especies, de modo que las secuencias de p53 humana y de ratón presenta una similitud del 80% (62).

La proteína p53 consta de 393 aminoácidos y varios dominios que juegan un papel importante en la regulación, estas subunidades se han clasificado desde la subunidad I hasta IV, como se muestra en la figura 8, la subunidad I comprende el dominio de activación 1 (AD1) y dominio de activación 2 (AD2); II: dominio rico en prolina (PRD); III: dominio de unión secuencia específica al ADN (DBD); IV: dominio de tetramerización (TD), y V: dominio alcalino (DB). La proteína p53 actúa como regulador, deteniendo el ciclo celular e iniciando la apoptosis en respuesta al daño del ADN, ya sea por irradiaciones, luz UV o agentes químicos mutágenos, también en respuesta a cambios en el potencial redox celular, hipoxia, senescencia, y otros factores estresantes que puedan no dañar directamente el ADN (63).

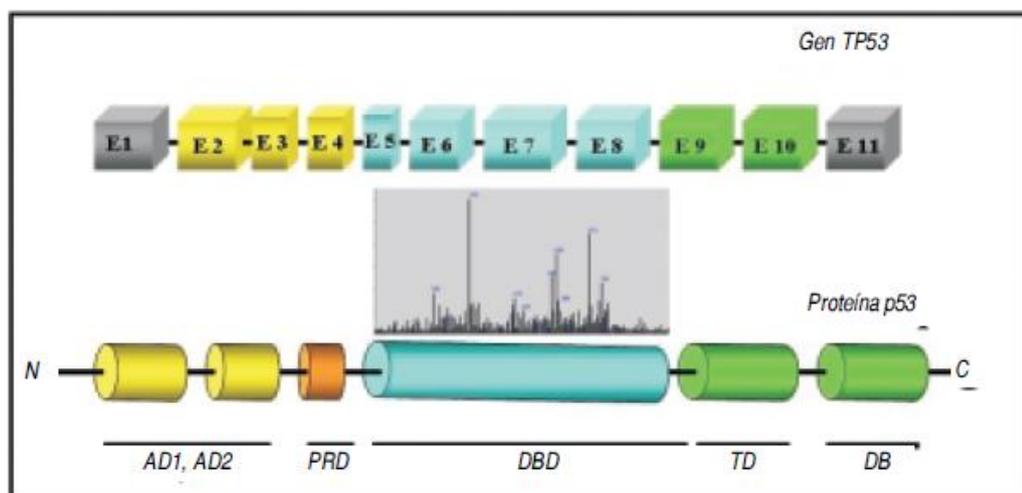


Figura 8. El gen *TP53* y la proteína p53 con sus dominios. Representación esquemática del gen *TP53* y sus exones (E1-E11). *TP53* codifica una proteína de 393 aa, la cual tiene 5

dominios: AD1-AD2, son los dominios de activación de la transcripción, PRD es el dominio rico en prolina, DBD es el dominio de unión a secuencia específica de ADN, TD es el dominio de tetramerización y DB es el dominio básico o alcalino. Arriba del dominio DBD que es el más grande y donde se ha registrado el mayor número de mutaciones, se observa un gráfico en el que se muestra la frecuencia de hotspots en este dominio. Tomado y modificado de Rangel-López (63).

Los dominios AD1 y AD2 están involucrados en la activación de la transcripción de genes blanco, el dominio PRD es necesario para la completa actividad supresora de p53 y se ha visto que participa en la inducción de apoptosis, DBD participa en el reconocimiento y unión de secuencias específica de ADN. Las mutaciones dentro de este dominio inactivan funcionalmente a p53, particularmente cuando ocurre dentro de puntos calientes críticos (*hotspots*) necesarios para la proteína, como son: para el contacto con el ADN (codones 248 y 273), o para la estabilidad de la proteína (codones 175, 249, 282), en estos sitios se presentan las mayorías de las mutaciones relacionadas con cáncer (63). La proteína p53 actúa como factor de transcripción estimulando la transcripción de varios genes que median la detención del ciclo celular y la apoptosis. Esta proteína inicia la detención de la fase G1 del ciclo celular, induciendo la expresión del inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CDK): p21, WAF-1, Pic1, Cip1 y SDI-1, las cuales contribuyen al control del ciclo celular (64). La proteína p53 también coopera con la reparación induciendo directamente la transcripción de *GADD45*, que codifica una proteína implicada en la reparación del ADN. Si el daño no se repara con éxito, la proteína p53 activa los genes inductores de apoptosis, como *BAX*, esta proteína Bax se une a la proteína inhibidora de apoptosis Bcl-2 y la bloquea, promoviendo de esta manera la muerte celular (65).

Los análisis realizados en el gen *TP53* ha permitido evidenciar que sus mutaciones son frecuentes en más de 50 variedades de neoplasias humanas, como cáncer de pulmón, mama, tiroides, gastrointestinal, ovarios, leucemias/linfomas y tumores cerebrales (64). Esto fue posible a través del estudio de aislados de líneas de células cancerígenas, y subsecuentemente, se descubrió que tenían mutaciones sin sentido y las proteínas mutadas tenían propiedades diferentes con respecto a los proteínas p53 silvestres (66).

Los efectos de las mutaciones en el gen *TP53* han sido descritos de la siguiente manera, primero, en modelos de ratones se evidenció que las proteínas

p53 mutadas tenían una vida media más prolongada que la proteína silvestre, conociendo que la vida media estimada es de 6 a 20 minutos y en las proteínas mutadas se extiende a 4 – 8 horas; segundo, muchos de los complejos de las proteínas mutadas se unen a la familia de proteínas de choque térmico hsp70 y tercero, las proteínas mutadas pierden frecuentemente los epítopes conformacionales observados en modelos murinos (66). Las células que presentan mutaciones en el gen *TP53* tienen la incapacidad de mantener el control del ciclo celular, ya que la proteína p53 mutante no puede detener el ciclo celular en la fase G1 para la reparación del daño en el ADN, antes del inicio de la síntesis del ADN (64).

En las neoplasias hematológicas es común observar mutaciones en el gen *TP53*, con diferentes frecuencias según la entidad. En pacientes adultos con LMA se han reportado 15% de mutaciones de *TP53* en células hematopoyéticas, demostrando que estas mutaciones están asociadas con rangos de edades mayores y reducción de la supervivencia total (28). La expresión y estructura del gen *TP53* se encuentra alterada en un 20 – 30% de los pacientes con LMC en crisis blásticas, mientras que en la fase crónica es poco común observar la presencia de esta mutación (64).

Wada *et al.*, (25) reportaron una incidencia de 2- 3% de mutaciones en *TP53* en muestras de LLA de células B. Sin embargo, en la leucemia de células T, la incidencia de mutaciones en *TP53* es de 50%, interesantemente cerca del 30% de las muestras de pacientes con recaídas presentaban esta mutación. Otros estudios han descrito la presencia de mutaciones en *TP53* en 15% de células leucémicas de pacientes con LLC (64).

Bowen *et al.*, (57) investigaron la asociación de las mutaciones en el gen *TP53* y la presencia de anormalidades cromosómicas en pacientes con leucemias mieloide aguda, encontrando que los pacientes con LMA que presentan anormalidades cromosómicas tales como, deleciones de los cromosomas 5, 17 y 3, tienen un alta frecuencia de disfunción de la proteína p53, lo cual se asocia con pronósticos desfavorables.

A su vez, Dicker *et al.*, (67) reportaron la relación entre las mutaciones en *TP53* con las aberraciones cromosómicas (17p) observadas a través de FISH, con

el curso clínico de los pacientes con LLC, encontrando la asociación de las mismas con la rápida progresión de la enfermedad.

Por lo tanto, resulta de gran importancia el estudio a través de una pesquisa de mutaciones en el gen *TP53* en pacientes con leucemia venezolanos, con el fin de conocer el espectro de las mismas de acuerdo al tipo de leucemia y su implicación en la evolución clínica.

7. Farmacogenética en leucemia

La agencia europea para la evaluación de productos médicos (*The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA-2002*) define “farmacogenética” como el estudio de variaciones interindividuales en las secuencias de ADN relacionadas a la respuesta a drogas (68).

La variación individual en la respuesta a los fármacos constituye un importante problema en la medicina actual. Esta variación no sólo puede causar modificaciones en la acción de los medicamentos, sino que supone la aparición de reacciones adversas e interacciones medicamentosas cuyas consecuencias clínicas a veces impredecibles, acarrear desde ligeras molestias hasta serias complicaciones, que comprometen la vida de muchos pacientes.

Con los avances de la secuenciación del genoma humano por el “Proyecto de Genoma Humano” y el “Proyecto HapMap”, se comenzó a enfocar la visión de la medicina a un nivel más molecular, ya que se empezaron a emplear estos datos moleculares para una mejor clasificación de las enfermedades, facilitando el desarrollo e innovación de nuevas terapias, para tratar a los pacientes con más especificidad, eficacia y con menos efectos adversos (68).

Todos los individuos no responden igual a un fármaco de la misma manera. Algunos pacientes pueden experimentar efectos adversos a algunas drogas, lo que no necesariamente ocurre con otros pacientes frente a las mismas drogas y dosis. De esta manera, una droga puede manejar distintos niveles de eficacia en diferentes pacientes. En el pasado, las diferencias en los índices riesgo/ beneficio

entre pacientes que tomaban la misma droga, eran atribuidas a factores no genéticos como edad, sexo, estado nutricional, condición médica general (por ejemplo: función hepática y renal), y estilo de vida (dieta, alcohol, cigarrillo).

Actualmente, en adición a estos factores, las diferencias en la genética de los pacientes han sido reconocidas y juegan un papel importante en la respuesta individual a las drogas.

Una de las mayores causas de la variación interindividual de los efectos de las drogas es la variación genética del metabolismo de las mismas. Las mutaciones y los polimorfismos en los genes que codifican las enzimas involucradas en diferentes actividades metabólicas o para receptores con afinidad por las drogas, se encuentran en algunos casos con variaciones particulares según el grupo étnico en una misma población (68).

Los polimorfismos genéticos de las enzimas metabolizadoras de drogas conllevan a un amplio rango de distintos subgrupos en la población que difieren en su habilidad para participar en las reacciones de biotransformación de las drogas. Éstos han sido descritos para una amplia variedad de drogas y enzimas metabolizadoras de xenobióticos. Las mutaciones en estos genes producen enzimas con disfunciones en su actividad, así como, su ausencia parcial o total (9).

La disposición y destino de las drogas (farmacocinética) y su efecto terapéutico y toxicológico (farmacodinamia), dependen de varios procesos complejos que involucran proteínas codificadas por diferentes genes, que influyen el transporte, metabolismo y mecanismo de acción de las drogas. Las variaciones localizadas en una región codificante de un gen pueden ocurrir por una sustitución de un aminoácido en una posición específica y como consecuencia puede afectar la función de la proteína. Cuando las variaciones ocurren en una región regulatoria pueden afectar los mecanismos transcripcionales y transduccionales con la consecuente modulación de los niveles de expresión de los productos génicos (ARNm y proteínas) (68).

Los marcadores genéticos pueden indicar nuevos blancos para drogas o modificadores que se influyen por los efectos de las drogas y su toxicidad,

como la reversión de la resistencia a una droga e incremento de la captación celular. Los intentos de la farmacogenética por el desarrollo de modelos poligénicos, que predigan la respuesta a las drogas y a la toxicidad en individuos, sirven para emplear regímenes de tratamiento personalizados prospectivos con el objetivo de aumentar la eficacia y la seguridad (69).

En la figura 9, se observa esta interacción entre las variantes genómicas con el metabolismo de las drogas, a través de la farmacocinética (FC) que implica la absorción, distribución, metabolismo y excreción de las drogas, y la farmacodinamia (FD), que dirige las drogas hacia su blanco hasta obtener finalmente la respuesta al fármaco. Este conjunto de procesos actúan sobre los efectos farmacológicos influenciando su eficacia y toxicidad.

La exposición al medio ambiente y susceptibilidad genética juega un rol importante en la etiología de las leucemias. El benceno, la radiación ionizante y las terapias citotóxicas son algunas de las causas propuestas de las leucemias. Los daños en el ADN en las células precursoras hematopoyéticas son esenciales para el desarrollo de la leucemia, a pesar de contar con mecanismos de prevención y reparación de daños (70).

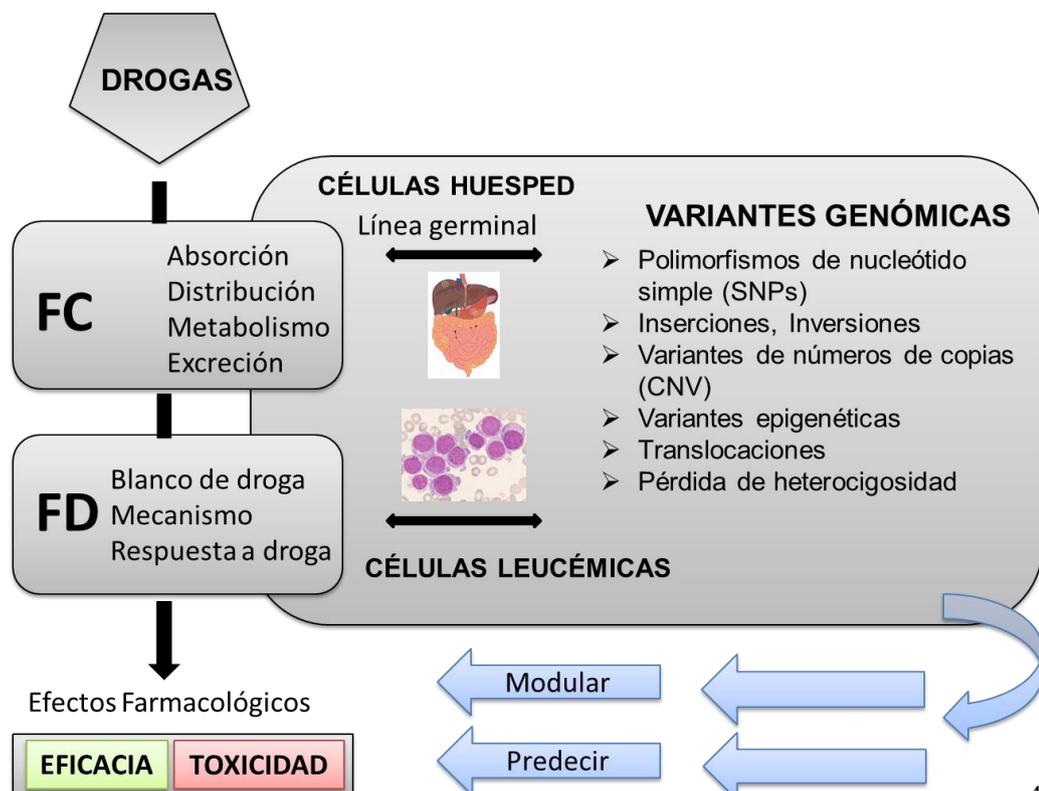


Figura 9. Integración de la farmacogenética. Se ilustran las variantes genómicas de las células de línea germinal y células leucémicas, junto a su efecto modulador y predictivo en el metabolismo de las drogas, comprendidos por proceso farmacocinéticos (FC) y farmacodinámicos (FD). Tomado y modificado de Cheek et al., 2009.

Las enzimas metabolizadoras de drogas catalizan o modifican los grupos funcionales de las moléculas de las drogas (clasificadas como reacciones de fase I) o la conjugación de las drogas con sustancias endógenas para hacer más rápidamente excretadas (clasificadas como reacciones de fase II). Los polimorfismos genéticos influyen en el metabolismo de las drogas y su disposición. Las enzimas citocromo P450 y las quinonas oxidoreductasas son ejemplos de las enzimas de fase I. Del mismo modo, las enzimas de fase II incluyen la Glutación S-Transferasa (GSTs), Tiopurina S-Metiltransferasa (TPMT) y UDP glucuronosil Transferasa (UGT) (69). Los polimorfismos en los genes que codifican las enzimas detoxificadoras producen la variabilidad en la capacidad de metabolizar los carcinógenos medioambientales. Esto puede explicar las diferencias inter-individuales en el riesgo al desarrollo de leucemia como resultado a exposiciones exógenas.

En esta tesis doctoral, se estudió uno de los componentes de los mecanismos de detoxificación, a través del estudio de polimorfismos genéticos de Glutación S-Transferasa, así como, los polimorfismos genéticos de Metilentetrahidrofolato Reductasa, involucrados en el metabolismo del folato.

7.1 GST (Glutación S-Transferasa) ec 2.5.1.18.

La superfamilia de isoenzimas Glutación S-Transferasa (GSTs) regula el metabolismo y detoxificación de sustancias extrañas introducidas en las células; esto por medio de reacciones de fase II; ya que catalizan la conjugación de fármacos, mutágenos, carcinógenos, contaminantes ambientales y algunos compuestos endógenos que podrían dañar tanto al ADN, como a los lípidos de membrana, tales como: epóxidos, hidróxidos, aldehídos, y los productos generados por el catecol, especies reactivas del oxígeno inducida por el daño a las moléculas intracelulares (71) (todos considerados moléculas electrofílicas altamente reactivas), con L-glutación que actúa como un escudo protector, ya que

al unirse a estas moléculas impide que ellas formen aductos con proteínas y/o ácidos nucleicos, lo que conlleva a la generación de compuestos menos reactivos y más solubles (polares), fácilmente eliminados de la célula a través de transportadores de membrana específicos (72).

Un segundo mecanismo, que también usa glutatión (GSH) como sustrato, consiste en la reducción de peróxidos con la oxidación concomitante de GSH y un tercer mecanismo implica sencillamente la asociación de un ligando con la GST en una asociación no covalente. Por tanto, esta enzima determina la cantidad de fármaco activo que puede existir en el tejido.

Debido a los mecanismos que por lo general emplea esta enzima GST, se establece que tiene una función en la protección celular, contrarrestando la acción de sustratos electrofílicos y productos de estrés oxidativo. Inversamente, las GST catalizan también algunas reacciones que convierten precursores no tóxicos en agentes tóxicos, tal es el caso del bencil, isotiocianato de fenetilo y haluro de alquilo, conllevando a una mayor toxicidad de los mismos en vez de la detoxificación (73).

Características de la estructura de la proteína GST:

- Se compone de 200 a 250 aminoácidos con una masa molecular que va desde 20 hasta 28 kDa. Se caracteriza por un eje binario y un sitio de unión independiente en cada subunidad.
- El pliegue básico de cada subunidad de GST contiene dos dominios: un dominio N-terminal y un dominio C-terminal. El dominio N-terminal consta de hélices de cadenas α y β . Los dos motivos estructurales del dominio N-terminal se compone de la N-terminal $\beta 1 \alpha 1 \beta 2$ y el C-terminal $\beta 3 \beta 4 \alpha 3$, que están unidos por un lazo largo que alberga el α -hélice $\alpha 2$ (74).
- El dominio C-terminal es α -helicoidal y está conectado con el dominio N-terminal por una corta secuencia de unión de aproximadamente 10 residuos. A diferencia del dominio N-terminal, el dominio C-terminal es muy variable con respecto a la secuencia y la topología lo que conduce a distintas especificidades de sustrato hidrofóbico.

- El sitio activo está formado por los residuos de los dominios N-y C-terminal. Se compone de dos sub-sitios: un sitio específico de glutatión (G-site) construido a partir de residuos del dominio N-terminal, y un sitio de unión del sustrato hidrofóbico (H-site), formada por cadenas laterales no-polares del dominio C-terminal. Un residuo de Tyr se conserva en el sitio activo de mamíferos clases Alfa, Mu y Pi, y un residuo Ser conservado en Theta, Zeta, Phi, Tau y clases de Delta, están involucrados en la activación catalítica de GSH, actuando como enlace de hidrógeno a los donantes el grupo tiol del GSH. Esto conduce a la formación y estabilización del anión tiolato muy reactivo, que es susceptible a un ataque nucleofílico por un sustrato electrófilo (72)(75).

Isoenzimas de Glutatión S-Transferasa:

En mamíferos estas isoenzimas (GSTs) existen como homodímeros (proteínas compuestas por dos subunidades idénticas), o como heterodímeros. Tienen una masa molecular de aproximadamente 25 kDa por subunidad y un sitio activo por monómero. Se clasifican en seis subfamilias (alfa, mu, omega, pi, theta y zeta) que se diferencian tanto en su secuencia, propiedades inmunológicas y papel fisiológico.

Clasificación de las subfamilias de GST:

- Alfa (α): codificadas por el gen *GSTA1-2* localizado en el cromosoma 6.
- Mu (μ): codificadas por el gen *GSTM1-5* localizado en el cromosoma 1.
- Omega (ω): codificadas por el gen *GSTO1* localizado en el cromosoma 10.
- Pi (π): codificadas por el gen *GSTP1* localizado en el cromosoma 11.
- Theta (θ): codificadas por el gen *GSTT1-2* localizado en el cromosoma 22.
- Zeta (ζ): codificadas por el gen *GSTZ1* localizado en el cromosoma 14.

A pesar de existir seis subfamilias conocidas de GST, se realizó énfasis en tres de las subfamilias principales en los seres humanos, designadas como: GST μ , GST θ , GSTP π . Cada una de estas subfamilias están compuestas por varios miembros, algunos de los cuales muestran polimorfismo genético (76).

- **GSTM1:** esta proteína es codificada por el gen *GSTM1*, que se encuentra localizado en la región 1p13 y codifica para un enzima de 218 aminoácidos. Se ha encontrado expresada en el hígado y en menores cantidades en testículo, cerebro, glándulas suprarrenales, vejiga, riñón y pulmón. Esta enzima aparentemente no es inducible (ni tampoco se puede inhibir in vivo). Tiene importancia como enzima detoxificadora porque entre sus substratos, se encuentran cantidades de hidrocarburos policíclicos carcinogénicos.

Se conocen hasta el presente tres polimorfismos en el gen *GSTM1*, uno de los cuales causa la desaparición de esta enzima en portadores homocigotos (*GSTM1* nulo) lo que conduce a la ausencia de actividad de la enzima fenotípica, (77) siendo el polimorfismo más importante en el locus *GSTM1*, una delección parcial que conlleva una pérdida total de la actividad enzimática.

El gen *GSTM1* es delimitado por regiones idénticas de 4.2 kb. El genotipo *GSTM1* nulo (*GSTM1**0) se origina por recombinación homóloga entre dos regiones repetidas, las cuales resultan en una delección de 16 Kb que contienen la región entera del gen *GSTM1* (figura 10). El gen *GSTM1* es escindido, quedando los genes adyacentes *GSTM2* y *GSTM5* intactos (78).

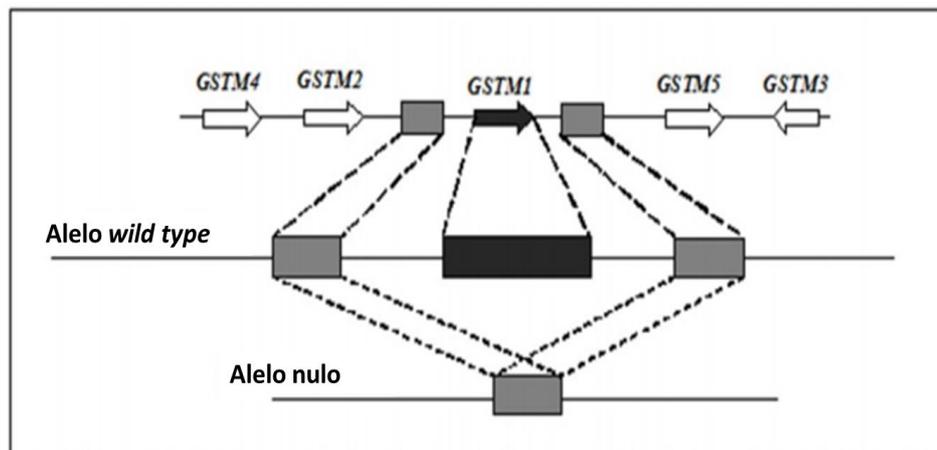


Figura 10. Localización estructural del cluster de 100 Kb que codifica la subfamilia GST mu (cromosoma 1p13.3). La figura indica el evento de recombinación homóloga que puede ocasionar el alelo nulo *GSTM1*⁻ (78).

La frecuencia de este polimorfismo es del 50% en personas de raza caucásica pero puede llegar hasta más del 60% en otras poblaciones (79). Se han detectado importantes diferencias en la expresión de esta enzima en diversas razas étnicas y se ha tratado de relacionar esto con la incidencia de ciertos cánceres en poblaciones europeas, particularmente cáncer de la vejiga en pacientes con genotipo homocigoto nulo.

- **GSTT1:** el gen *GSTT1* se encuentra localizado en la región 22q11. Codifica para una proteína de 240 aminoácidos. *GSTT1* también presenta una mutación asociada a ausencia de actividad enzimática cuya presencia es menor en personas de raza caucásica (20%) (79).

Esta clase sólo muestra 7% de identidad de la secuencia en general con respecto a las clases Alfa, Pi y Mu. Además, a diferencia de las enzimas de clase Alfa, Mu y Pi, en la clase Theta de GST existe una serina catalíticamente esencial en lugar de una tirosina en la región N-terminal (80). En humanos, la *GSTT1* se expresa en eritrocitos y juega un rol en la detoxificación de xenobióticos y carcinógenos.

La subfamilia *GST* theta consiste en dos genes, *GSTT1* y *GSTT2*, separados por una región de 50 Kb aproximadamente. Los análisis de la región de 119 Kb revela a los genes ubicados en dos regiones que flanquean a *GSTT1*, los genes

HA3 y *HA5*, con más de 90% de homología entre sí (figura 11). Los genes *HA3* y *HA5* contienen dos repeticiones idénticas de 403 pb, que probablemente al recombinarse, se genere como consecuencia el alelo *GSTT1*⁻ (78).

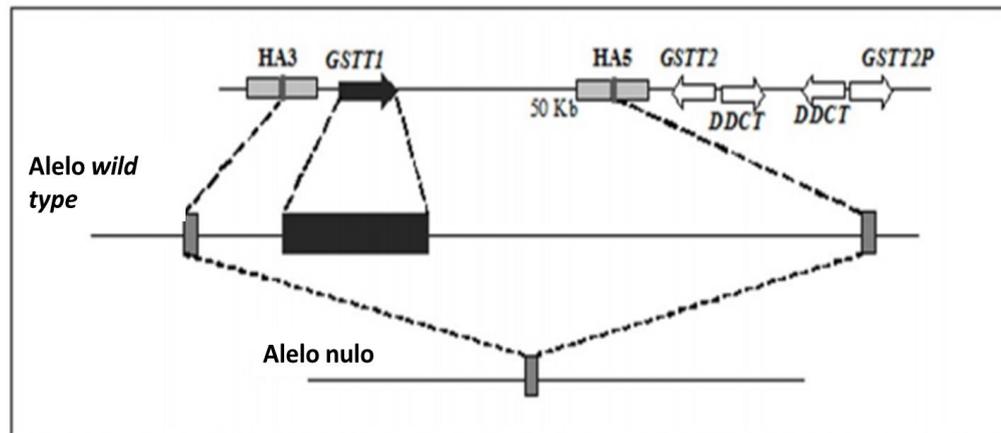


Figura 11. Localización estructural del cluster génico que codifica la subfamilia GST theta (cromosoma 22q11.2). El alelo nulo *GSTT1*⁻ se origina por recombinación homóloga de las repeticiones de 403 pb que se encuentran a su izquierda y derecha, las cuales resultan en una delección de 54 Kb que contiene el gen *GSTT1* entero.

- **GSTP1:** se encuentra en la región del cromosoma 11q13 y codifica para una proteína de 210 aminoácidos (81). Se expresa en varios tejidos extra hepáticos como: cerebro, y en menor cantidad en corazón, pulmones, testículos, riñón y páncreas. Sus substratos son: Acrilaldehído, ácido etacrínico y clorodinitrobenceno (82). Además también metaboliza una gran variedad de carcinógenos potenciales, incluyendo químicos derivados del humo del cigarrillo tales como el benzo(a) pireno diol epóxido y acroleína.

Tiene un polimorfismo en el codón 105 donde una transición A/G (Adenina/Guanina), cambia los aminoácidos Isoleucina por Valina, provocando diferencias en la afinidad de unión a los sustratos y en su actividad catalítica (71)(83). Y otro polimorfismo se ubica en el codón 114 cambiando Alanina por Valina (80).

Varios estudios poblacionales han demostrado que existe una relación entre el polimorfismo *GSTP1* I105V (rs1695) y la susceptibilidad a desarrollar cáncer de seno, pulmón, cerebro, esófago, y vejiga y testículo (84). Se sospecha que modificaciones genéticas de las enzimas metabolizadoras de glutatión pueden tener efecto sobre la incidencia de ciertos cánceres.

Existen muchos estudios que han intentado asociar la presencia de estos polimorfismos con numerosas enfermedades dentro de las cuales se encuentran: ciertos tipos de cáncer, enfermedades del sistema nervioso central, leucemia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y otros síndromes menores; sin embargo estos estudios arrojan hasta ahora resultados inconsistentes o contradictorios (79).

Algunos grupos han investigado la asociación de polimorfismos de los genes *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1* con diversos tumores malignos como el cáncer de pulmón (inducido por el tabaco), el de vejiga, el de mama y el gastrointestinal (82)(77).

Diversos estudios proponen la existencia de un mayor riesgo de desarrollo de neoplasias, para individuos con genotipos de *GST* cuyas proteínas poseen una menor actividad enzimática (82)(85). En cambio, otros estudios establecen que las *GST*, pueden conferir resistencia a agentes quimioterapéuticos citotóxicos utilizados para tratar cáncer. Postulados más recientes han tratado de relacionar los polimorfismos genéticos de *GST* con leucemia, y han arrojado resultados en el que se han observado asociaciones con el riesgo de recaída en la leucemia linfoblástica infantil (86).

Sin embargo, en contraste con el papel de la *GST* en la carcinogénesis ambiental, los genotipos de *GST* con una menor actividad enzimática, pueden ser de ventaja para las personas que reciben tratamiento de quimioterapia en enfermedad neoplásica, porque la desintoxicación potencialmente reducida mejora la eficacia de los fármacos antineoplásicos, lo cual se asocia con una mayor tasa de supervivencia, ya que los efectos antineoplásicos tanto de la quimioterapia como de la radioterapia son debidos, en gran medida, a la generación de especies reactivas de oxígeno. Puesto que las isoformas de *GST* determinan un aclaramiento de estas sustancias, parece lógico encontrar que una actividad menor

de la enzima se asocie a mejores respuestas. En cualquier caso, hay otros estudios que concluyen que los déficits enzimáticos se asocian a una menor supervivencia. Estos resultados contradictorios, probablemente, se deban a que, en la mayoría de los casos, los regímenes terapéuticos contienen varios fármacos y por tanto, los resultados de los diferentes estudios no son comparables.

La importancia de la GST en mecanismos de detoxificación y resistencia a fármacos, y la disponibilidad de una familia amplia de isoenzimas, que está distribuida irregularmente en cuanto a sus miembros, con respecto al tejido normal y tumoral, combinada con diferencias entre los miembros de la familia en especificidad de sustratos y sensibilidad a inhibidores, hace que esta familia sea un objetivo importante para diseñar terapias para condiciones asociadas con malignidad.

En particular, parece que los niveles de GST, especialmente de ciertos subtipos de la misma, están elevados en células de tumores que han adquirido resistencia a fármacos quimioterapéuticos. Así, el uso de pro fármacos activados por GST, es particularmente eficaz, para atacar células de tumores que han adquirido resistencia a fármacos. Sin embargo, hay que destacar que la quimioterapia es un arma de doble filo, puesto que la administración de drogas citotóxicas que eliminan células tumorales, produce la inevitable muerte de un importante número de células sanas, debido a la falta de selectividad de este tipo de tratamiento.

Los polimorfismos de *GST* pueden afectar la supervivencia al cáncer, pero pocas investigaciones epidemiológicas moleculares han considerado que el rol en la variación genética de estas enzimas es determinante en la supervivencia. Las hipótesis acerca de los polimorfismos de *GST* y la supervivencia han sido desarrollados a través de dos líneas de razonamiento: a) varios agentes quimioterapéuticos son sustratos para la conjugación catalizada por GST, como los productos celulares del daño de especies reactivas de oxígeno, así como los pacientes pueden diferir en la respuesta a las quimioterapias y radioterapias dependiendo de la actividad de GST; y b) los genotipos de *GSTs* susceptibles han sido reportados asociados con patrones característicos de cambios somáticos en el

tejido tumoral (por ejemplo, mutaciones de *TP53* y *RAS*), y asociándolos con la tasa de supervivencia. (87)

Investigadores han reportado la influencia de los polimorfismos genéticos en los pronósticos de leucemia después de la quimioterapia. Fue reportado que el genotipo nulo de glutatión S-transferasa theta 1 (*GSTT1*) está asociado con un pronóstico desfavorable en leucemia mieloide aguda en niños por presentar una menor supervivencia en comparación con aquellos que presentaban el genotipo *GSTT1 wild type* (88). Naoe *et al.*, (89) estudiaron la significancia pronostica del polimorfismo del gen *GSTT1* y *GSTM1* además de otras enzimas en pacientes con leucemia mieloide aguda, encontrando que el genotipo *GSTT1*⁻ fue asociado a un peor pronóstico en comparación con *GSTT1*⁺, debido a un incremento de muerte temprana después de la quimioterapia inicial.

Aydin- Sayitoglu *et al.*, (70) estudiaron los polimorfismos de los genes *GSTT1* y *GSTM1* en pacientes con leucemia aguda, adultos e infantiles, encontrando que las frecuencias de genotipos nulos de *GSTM1* se observan incrementadas en pacientes con LLA y LMA comparado con los controles. Adicionalmente, los individuos con genotipo *GSTM1* nulo no metaboliza los aductos de ADN incrementados que conllevan a mutaciones en oncogenes o genes supresores de tumores, finalmente estos autores concluyen que el polimorfismo de delección de *GSTM1* tiene un rol en la susceptibilidad en el adulto en comparación con los infantes y en el riesgo de LMA.

7.2 Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

El gen *MTHFR* está localizado en el cromosoma 1p36.3 y consta de 11 exones, los cuales tienen una extensión variable de entre 102 a 432 pares de base y 10 intrones (90) (figura 10).

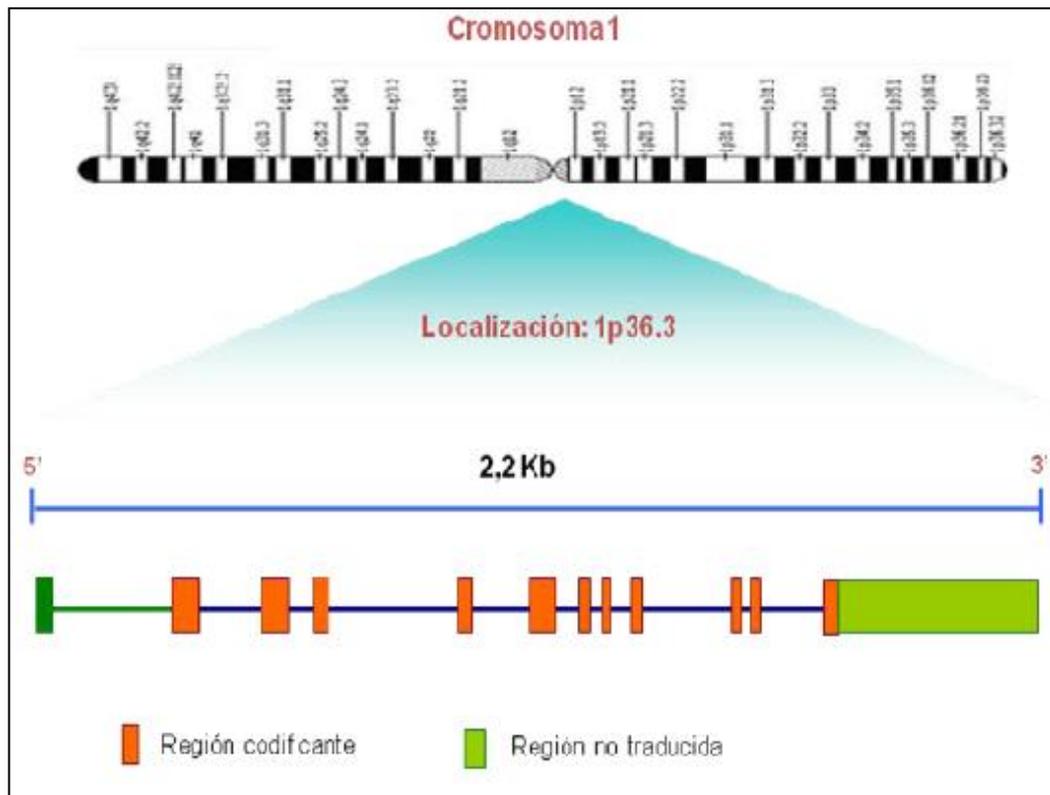


Figura 12. Mapa genético del gen *MTHFR*. El gen *MTHFR* está localizado en la región 36.3 del brazo corto del cromosoma 1, está integrado por 11 exones en intrones de longitud variable (90).

La enzima MTHFR es la encargada de proveer los grupos metilo a la célula, cataliza la conversión de 5-10 metilentetrahidrofolato en 5-metiltetrahidrofolato (5-MTF), que es la forma circulante predominante del folato. El 5-MTF participa en la remetilación de la homocisteína, proceso dependiente de la vitamina B12, donando un grupo metilo para la síntesis de metionina, reacción catalizada por la enzima metionina sintetasa, la cual utiliza vitamina B12 como cofactor. La metionina es metabolizada por la enzima metionina adenosiltransferasa a S-Adenosil Metionina (ASM), la cual actúa como donador universal de grupos metilo en humanos por medio de la enzima metil transferasa, en procesos de metilación de ADN, proteínas, neurotransmisores y fosfolípidos. El producto de esta reacción genera S-adenosil homocisteína que es metabolizada, por la enzima adenosilhomocisteinasa, que elimina adenosina y forma homocisteína (91).

La homocisteína (HCY) es un aminoácido sulfurado. Es producida por la desmetilación intracelular de la metionina y es exportada al plasma, donde circula principalmente en forma oxidada. Se une a las proteínas del plasma como el bisulfuro mixto y la HCY con albúmina, en forma de bisulfuro de HCY y en pequeñas cantidades en forma reducida. Entre los factores que influyen en la concentración sérica de HCY en humanos, se consideran los siguientes: genéticos (por la presencia de polimorfismos en genes que codifican para enzimas o transportadores proteicos involucrados en el metabolismo de la homocisteína; nutricionales (principalmente implicados con la captación de folato y la vitamina B12); demográficos; fisiológicos (como la edad y la presencia de embarazo); patológicos (presencia de enfermedades); trasplantes y el consumo de ciertos medicamentos (91).

La enzima MTHFR tiene un papel paralelo, debido a ya que el 5-MTF participa en la producción de dTMP vía timidilato sintetasa y síntesis de purina, por lo tanto, juega un papel importante en la provisión de nucleótidos esenciales para la síntesis de ADN (69)(92).

El Metotrexato (MTX) (ácido 4-amino-N10-metilpteroilglutámico) es un anti metabolito, análogo del ácido fólico. Es un inhibidor reversible de la dihidrofolato reductasa, enzima necesaria para la conversión de ácido fólico a su forma activa, el tetrahidrofolato. Éste último compuesto sirve como donador de un fragmento de carbono para la síntesis de timidina in vivo. De esta forma, el MTX actúa como un potente inhibidor de la síntesis del ADN. Se clasifica como un agente específico de fase, ya que elimina células durante la fase S del ciclo celular y tiene su mayor eficacia cuando inicia la fase logarítmica de su proliferación. Los efectos tóxicos del MTX no pueden ser revertidos ni siquiera con dosis altas de ácido fólico. Sin embargo el ácido polínico (factor leucovorin), que es el análogo del tetrahidrofolato, puede inhibir el bloqueo enzimático si se administra en las primeras 48 horas después de administrar MTX (93).

El MTX contiene un anillo timidilato, un ácido paraminobenzóico y un ácido glutámico, su estructura es muy similar a la del ácido fólico, como se muestra en la Figura 13.

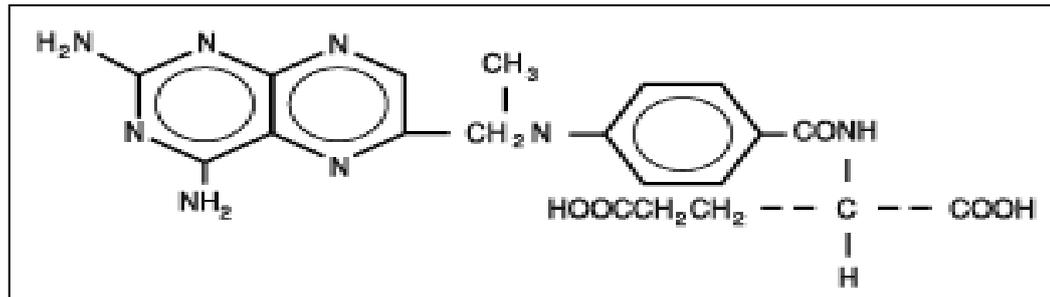


Figura 13. Estructura del Metotrexato.(94)

El ingreso del MTX a la célula es mediado vía receptor de folatos y por el transformador de membrana RFC. Una vez en el interior de la célula es poliglutamizado por la enzima poliglutamato sintetasa 16, tanto el MTX como el MTX poliglutamizado inhiben a la enzima Dihidrofolato reductasa, evitando así la formación de Tetrahidrofolato. Y de esta manera se inhibe la formación de purinas y en consecuencia la síntesis de ADN (Figura 14).

Existe una gran variabilidad entre los pacientes con respecto a la respuesta farmacológica al MTX y a su toxicidad, la cual puede ser una limitante del tratamiento. Una de las causas para esta variabilidad es la aparición de polimorfismos en genes que codifican enzimas dianas del MTX.

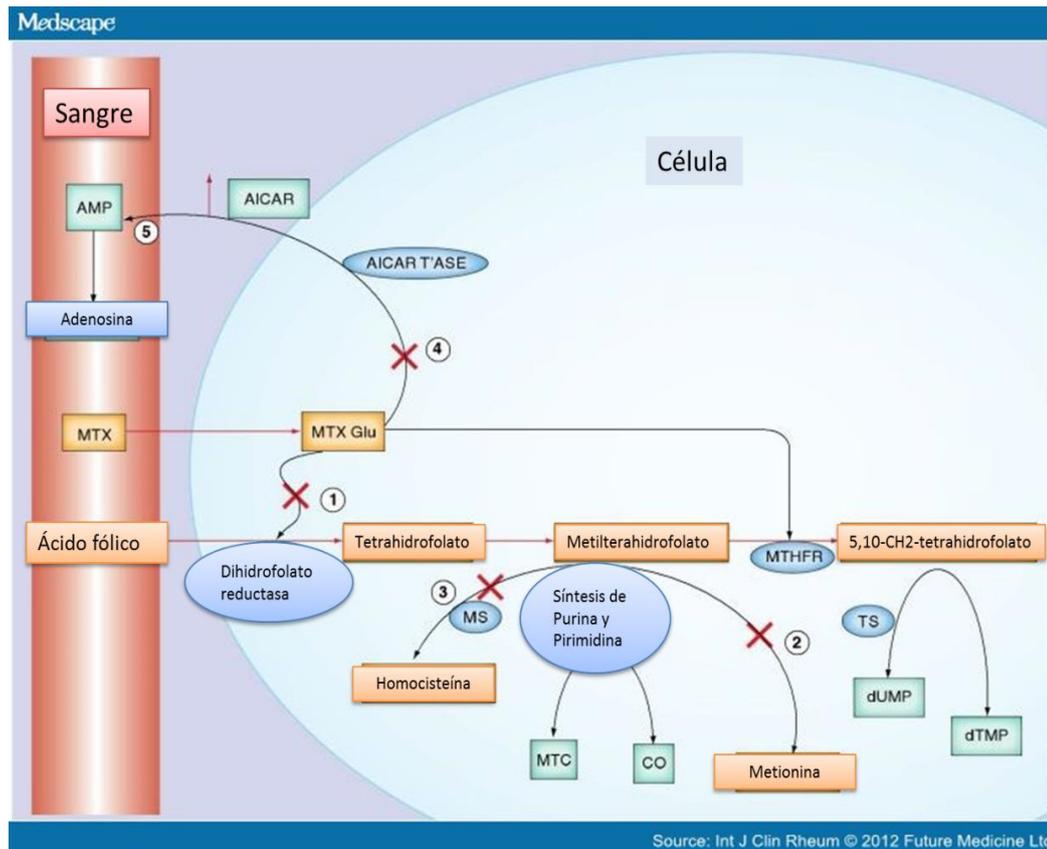


Figura 14. Mecanismo de acción del Metotrexato. TMP timidinmonofosfato, dUMP desoxiuridinmonofosfato, FH2 dihidrofolato, TTP timidintrifosfato, RFC proteína acarreadora de folato, DHFR dihidrofolato reductasa, MTHFR metil tetrahidrofolato reductasa. Tomado y modificado de Kaltsonoudis *et al.* (95)

Hasta ahora se han descrito más de una docena de polimorfismos del gen *MTHFR*, de éstos, las variantes 677 C/T y 1298 A/C se han asociado con efectos adversos graves y eficacia farmacológica alterada. El polimorfismo 677 C/T produce una enzima *MTHFR* con sólo el 35% de actividad residual, esta deficiencia altera la distribución de los folatos intracelulares y potencia la acción farmacológica de fármacos como el metotrexato produciendo entre otras cosas una mielosupresión grave. Este polimorfismo en la posición 677 es bastante común, siendo el 10% de las personas caucásicas homocigotas para la mutación (genotipo 677 T/T), mientras que el 40% de la población es heterocigoto y tiene el 60% de actividad enzimática (96)(97).

La homocigocidad para el alelo *MTHFR* 677 T/T, resulta en una disminución de su actividad en un 70%, en comparación con sujetos no homocigotos para este polimorfismo, con un aumento en los niveles de

homocisteína en el caso de la ingesta baja de ácido fólico. Esta variabilidad se ha asociado con aumento de toxicidad en pacientes con LLA; un ejemplo de ello es el estudio de Chiusolo et al., donde encontraron que el genotipo T/T del gen *MTHFR* (677T) estaba asociado con un incremento en la toxicidad del MTX en médula ósea, hígado y mucosas en pacientes italianos con LLA (98).

La presencia de la variante alélica 677T se ha asociado con intolerancia al metotrexato en tratamientos de leucemia, artritis reumatoide o artritis idiopática juvenil por aparición de efectos secundarios como síntomas gastrointestinales, elevación de transaminasas, vómitos, *rash* cutáneo, etc. También se ha asociado a mayor índice de recidivas en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica, aguda tratados con MTX (99).

Otro polimorfismo descrito en el gen *MTHFR* es la transición 1298 A/C, la cual resulta en la sustitución del aminoácido glutamato por alanina en la posición 429 del dominio regulatorio de la enzima MTHFR. Tanto el genotipo homocigoto como el heterocigoto (A/C o C/C) se han asociado a una actividad MTHFR alterada. Los individuos homocigotos para la mutación representan aproximadamente el 10% de la población (99). Se ha reportado que la homocigocidad del alelo 1298 A/C mutado, induce una disminución en la actividad enzimática.

De acuerdo con algunos estudios, los individuos heterocigotos compuestos para los alelos 677 C/T y 1298 A/C, los cuales presentan un genotipo 677C/T-1298A/C, tienen una reducción en la actividad *in vitro* de la MTHFR de 40 a 50% y un perfil bioquímico similar al observado en individuos con homocigocidad para el alelo 677 C/T, con incremento en los niveles de homocisteína y disminución de los niveles de folato (100)(101).

Hasta la fecha, además de los dos polimorfismos ya descritos, se han identificado más de 20 mutaciones en el gen *MTHFR*, que causan deficiencia enzimática severa. Algunos otros cambios descritos son poco frecuentes y sólo están presentes en algunas familias con un cuadro clínico que incluye: retardo psicomotor, debilidad muscular proximal, marcha inestable, patología vascular (trombosis vascular) y homocisteinuria (102). Por otro lado, se ha establecido que

una estrategia de dosificación del metotrexato basada en el genotipo MTHFR es menos costosa y más efectiva que las estrategias convencionales.

7.3 Supervivencia global y libre de evento asociada a los genotipos de *MTHFR* 677 y 1298 en pacientes con LLA

En múltiples ocasiones se busca conocer el tiempo de ocurrencia de un evento específico de interés, ya sea este beneficioso como la curación, perjudicial como la muerte o incluso indiferente como cambio de tratamiento o recaída (292)103. Para evaluar la respuesta de los pacientes a un tratamiento en particular se realizan los análisis de supervivencia global y libre de evento. Estos parámetros permiten conocer el comportamiento de la población en estudio con respecto al desenlace de la enfermedad, para así determinar la eficacia que pueda tener dicho tratamiento, y de esta manera ajustar los protocolos utilizados aumentando con esto, no solo la calidad sino el tiempo de vida de los pacientes (104).

Se conoce como supervivencia global, el tiempo que transcurre desde que un individuo contrae una enfermedad o la fecha de diagnóstico de la misma hasta que fallece o se demuestra su curación por un seguimiento mantenido de por vida. Por otra parte, la supervivencia libre es definida como el espacio de tiempo que media entre la remisión completa por cualquier método terapéutico y su recaída (104).

Uno de los métodos utilizados para la estimación de dichas supervivencias es el de Kaplan-Meier, el cual, es un método no paramétrico que consiste en estimar la probabilidad de supervivencia de un grupo de pacientes en un intervalo de tiempo definido. La variable estudiada es el tiempo que transcurre hasta que el evento (muerte, curación o recaída) ocurra; esta diferencia de tiempo corresponde a la duración de la supervivencia. La función de supervivencia de Kaplan-Meier consta de una serie de escalones de líneas rectas, horizontales entre dos tiempos de ocurrencia del suceso consecutivo, y una caída vertical en cada tiempo en la que un evento ocurre (105).

En el cáncer, como en el caso de la LLA, conocer la supervivencia es un buen indicador de severidad de la enfermedad y de pronóstico durante una determinada cantidad de tiempo. Típicamente, el pronóstico del cáncer se valora

determinando el porcentaje de pacientes que sobrevive al menos cinco años después del diagnóstico. De igual manera, permite predecir el tiempo y la probabilidad de recaer luego de presentar una remisión completa de la enfermedad (106). En Venezuela, los estudios de supervivencia en LLA fueron iniciados por Guevara J, Arends A *et al.*, a través de la evaluación de la respuesta al tratamiento con el protocolo nacional 80 en la Unidad de Hematología y Banco de Sangre del Hospital Universitario de Caracas durante el período de 1980 – 1985. Encontraron una remisión completa de 86% con una sobrevida libre de enfermedad de 11 meses en el 50% de los pacientes infantiles con LLA de riesgo estándar; en referencia a los pacientes con alto riesgo, solo alcanzaron la remisión completa el 66% de ellos con una sobrevida libre de enfermedad de 6 meses, siendo ésta inferior en comparación al grupo de riesgo estándar (30).

Perera *et al.*, realizaron un estudio de seguimiento en 209 niños con LLA que fueron tratados con el protocolo 87-01 del Dana Faber Cancer Institute (DFCI) modificado por el Grupo Cooperativo del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales (GC-IVSS) entre los años 1989 y 1998. Evaluaron la supervivencia libre de enfermedad en los niños tratados con Epirrubicina frente a los tratados con Doxorubicina; así como también evaluaron los resultados de protocolos de radioterapia y Metotrexato intratecal en los pacientes de alto riesgo y los de muy alto riesgo. La supervivencia libre de evento en pacientes con riesgo estándar tratados con este protocolo fue de $72\% \pm 4\%$, en los pacientes de alto riesgo fue de $62\% \pm 4\%$ y en los pacientes con muy alto riesgo fue de $63\% \pm 11\%$; al comparar los 3 sub grupos no se encontró asociación estadísticamente significativa (*p-value*: 0,18712); sin embargo, este estudio demostró que los pacientes con LLA que presentan un menor riesgo tienen una mayor tasa de supervivencia libre de enfermedad (107).

Un estudio clínico-epidemiológico, descriptivo y retrospectivo realizado mediante la revisión de historias clínicas de pacientes menores de 18 años, en el Hospital Universitario de Caracas, tuvo como objetivo identificar los aspectos clínico-hematológicos, evolución terapéutica y morbimortalidad en niños con LLA *de novo* tratados con el Protocolo Total XV modificado que incluye Metotrexato. Los resultados encontrados mostraron que la sobrevida global y la

sobrevida libre de enfermedad con una mediana de seguimiento de 50 meses, fue: 19,2% y 10,3%, respectivamente, sugiriendo que la estrategia para adaptar el Protocolo Total XV modificado en el Servicio de Hematología, no fue efectiva para mejorar la Sobrevida de estos pacientes al compararlo con la literatura internacional (157).

Son muchos los factores que tienen un impacto en el tratamiento y la supervivencia de los pacientes con LLA, como la edad, el sexo, la raza, el recuento inicial de leucocitos y la presencia de translocaciones cromosómicas. Desde hace varios años se sabe que los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) son algunas de las variaciones genéticas de la población que influyen mucho en la respuesta al tratamiento de pacientes con LLA, modificando el metabolismo de los agentes químicos utilizados en la quimioterapia por afectar a la actividad normal de las enzimas implicadas en el metabolismo de los fármacos. Es por esto, que estos SNPs, tienen un papel muy importante en el resultado y supervivencia adecuados de los pacientes con LLA bajo tratamiento (108).

Dos polimorfismos en el gen que codifica la enzima metilentetrahidrofolato reductasa, *MTHFR* 677 y 1298, se han visto relacionados con la supervivencia en pacientes con LLA tratados con metotrexato. Ojha *et al.*, realizaron un estudio en los niños diagnosticados con LLA entre las edades de 0 y 19 años que evaluaron el polimorfismo *MTHFR* 677 C/T en relación con la supervivencia, identificando seis estudios con 909 pacientes pediátricos con LLA. Evidenciaron que los niños con LLA con al menos un alelo mutado T pueden tener un mayor riesgo relativo de mortalidad, con mayor significancia estadística para el genotipo *MTHFR* 677 T/T. En base a esto, concluyeron que la genotipificación del polimorfismo *MTHFR* 677 al momento del diagnóstico podría proporcionar una opción para la individualización del tratamiento y reducir aún más la mortalidad en niños con LLA en ciertas poblaciones (109).

Tantawy *et al.*, demostraron en niños egipcios, que el genotipo T/T de *MTHFR* 677, se asoció significativamente con la recaída y la supervivencia global (110). Por su parte, Radtke *et al.*, en niños alemanes, evidenciaron que el genotipo *MTHFR* 1298 A/C se ve asociado con una disminución en la supervivencia libre de evento, con respecto al genotipo *wild type* A/A (111).

En América Latina, específicamente en el Centro Estatal de Cancerología de Durango- México, Zaruma Torres *et al.*, publicaron su estudio titulado “*Impacto de polimorfismos genéticos de la vía metabólica del metotrexato sobre la sobrevida de niños mexicanos con leucemia linfoblástica aguda (LLA)*” que tuvo como objetivo determinar la asociación de 10 polimorfismos genéticos de la vía del folato: en transportadores celulares (COL18A1, SLC19A1, ABCB1 y ABCC5) y las enzimas folilpoliglutamil sintetasa (FPGS) y xantina oxidasa (XO), con la sobrevida de los niños con leucemia linfoblástica aguda con un seguimiento de 5 años, en el que se estudiaron 39 niños con la enfermedad y que eran tratados con MTX y 102 controles sin la enfermedad. Estos investigadores concluyeron que solo el polimorfismo de la XO presentó riesgo para leucemia linfoblástica aguda; así mismo, se encontró una asociación importante entre los portadores del polimorfismo *FPGS* que modificaría la sobrevidas de los pacientes tratados con MTX (112).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

Marco metodológico

3.1 Población

Pacientes

La muestra poblacional estuvo conformada por 122 pacientes de ambos sexos y diferentes edades diagnosticados con leucemia que asistieron a la consulta del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Caracas. Los pacientes se prestaron voluntariamente al estudio después de ser notificados de la finalidad del mismo y firmado el consentimiento informado, aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Universitario de Caracas y siguiendo las directrices de la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos, y la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. (Anexo I)

- Criterios de inclusión: Fueron incluidos en el estudio pacientes con diagnóstico de leucemia en cualquier fase de la enfermedad, que estuvieran o no bajo un protocolo de tratamiento quimioterapéutico para el momento de la toma de la muestra.
- Criterios de exclusión: Fueron excluidos del estudio individuos sanos e individuos con diagnóstico de otra patología diferente a la leucemia.

Controles

El grupo control consistió en 322 individuos voluntarios sanos de diferentes regiones geográficas y grupos étnicos de Venezuela. Voluntarios no estaban relacionados entre sí ni con los pacientes.

3.2 Muestras

El análisis experimental se realizó usando muestras de ADN y/o ARN humano, el cual fue extraído a partir de muestras de sangre periférica o de médula ósea (MO), dependiendo del caso del paciente. En la población control solo se obtuvo muestras de sangre periférica.

3.3 Procedimiento de toma de muestra

Fueron recolectados aproximadamente 5 ml de sangre periférica en adultos, 3 ml en niños y/o 2 ml de aspirado de médula ósea (MO) de cada paciente. La muestra de sangre periférica se obtuvo por punción venosa en la región del antebrazo y el aspirado medular a través de una punción y extracción de la cresta ilíaca postero-superior previa asepsia y luego de aplicar anestesia local. Ambas muestras se almacenaron en tubos al vacío con sal sódica al 10% (EDTA) como anticoagulante. Este último procedimiento fue realizado por médicos del Servicio de Hematología. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales (LIHA) ubicado en el Instituto Anatómico José Izquierdo en la Universidad Central de Venezuela.

Los procedimientos experimentales se basaron en una serie de protocolos partiendo de la extracción del material genético (ADN y ARN), posteriormente se realizaron las determinaciones de los genotipos, la detección de las mutaciones y los polimorfismos genéticos, finalmente se realizaron los análisis estadísticos con la finalidad de conocer si existe asociación entre los resultados encontrados con el riesgo de padecimiento de leucemia y el impacto que tienen como factores pronósticos de la evolución y en la supervivencia de la enfermedad en los pacientes venezolanos.

3.4 Obtención de la muestra

3.4.1 Aislamiento de células mononucleares humanas

La separación y obtención de células mononucleares humanas se realizó bajo el protocolo de separación de fracciones globulares por centrifugación en

gradiente de densidad (Mongini, 1996)(113), utilizando 3 ml del reactivo Ficoll-Hypaque 400 (Pharmacia), el cual fue agregado en tubos del tipo falcon debidamente identificados para muestras de sangre periférica o de médula ósea, luego cuidadosamente se agregó 5 ml de sangre por las paredes del tubo, procurando no mezclar ambas fases. Para las muestras de médula ósea se agregaron 15 ml del reactivo Ficoll- Hypaque y cuidadosamente se agregó la muestra al tubo. Posteriormente se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 30 minutos. Se recolectaron los leucocitos y se trasvasaron a otro tubo falcon. A los leucocitos provenientes de las muestras de sangre periférica se les agregó 8 ml de buffer estéril TE (Tris-HCl 10mM: EDTA 0.2mM) y a los provenientes de las muestras de médula ósea se completó hasta 12 ml con buffer TE. Se realizaron 3 lavados con buffer TE y se centrifugó a 3.000 r.p.m. por 10 minutos cada uno. Al terminar el último lavado se descartó el sobrenadante y el paquete de leucocitos se resuspendió en 500 μ l de buffer TE y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

3.4.2 Obtención del material genético

- **Extracción de ADN:**

El ADN se aisló a partir de los leucocitos por el método de Welsh y Bunce (114). Se empleó el método modificado de Miller *et al* (115). El paquete de leucocitos previamente almacenado a -20°C , se dejó reposar a temperatura ambiente y se le agregó 9 ml de *Buffer* de lisis de glóbulos rojos (RCLB) ($0,144 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de cloruro de amonio, $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de bicarbonato de sodio), se mezcló por inversión y se congeló a -20°C por 30 minutos. Luego, se dejó descongelar y fue centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregó 2 ml de RCLB (este paso se realizó dos veces), posteriormente, se descartó el sobrenadante. Seguidamente, se resuspendió el precipitado con 600 μ l de NLB + SDS (Buffer de lisis de glóbulos blancos + dodecil sulfato de sodio) ($0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaCl, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 8,2, $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ de EDTA disódico), luego se transfirió el precipitado a un tubo de eppendorf y se incubó a 56°C durante toda la noche.

Posterior a la incubación, se agregó 100 µl de NaCl 6 M, se mezcló durante un minuto en el vórtex, y se añadió 600 µl de cloroformo para desnaturalizar las proteínas, luego se agitó nuevamente con el vórtex hasta observar una solución de aspecto lechoso. Se procedió a centrifugar a 3.000 rpm por 15 minutos, y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo de eppendorf. Posteriormente se agregó 1000 µl de alcohol al 100% (almacenado a -20 °C), mezclando por inversión, hasta observar la malla de ADN, luego se incubó a -20 °C durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante por inversión, y se agregó 1000 µl de alcohol al 70 % (almacenado a -20 °C), luego se centrifugó nuevamente a 12.000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente invirtiendo el tubo sobre un papel absorbente. Una vez seco el precipitado, el ADN se resuspendió con 100 µl de agua estéril y se incubó a 65 °C por 15 minutos. Finalmente, el ADN extraído fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

- ***Cuantificación y visualización de la calidad del ADN***

La cuantificación del ADN se realizó mediante la electroforesis, un método que permite la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico en un gel de agarosa a una concentración de 1.5 %, en buffer TAE 1X (0,8 mmol·l⁻¹ Tris-Acido Acético, 0,02 mmol·l⁻¹ EDTA pH 7,5). A la preparación de la agarosa se le agregó 1,5 µl de Bromuro de Etidio (10mg. ml⁻¹), sustancia que se intercala entre las bases del ADN y es fluorescente cuando se expone a la luz ultravioleta. Una vez que la agarosa se solidificó, se añadieron 3 µl de las muestras de ADN y se mezclaron con 2 µl de buffer de carga (glicerol, azul de bromofenol, xileno cianol) en los pozos respectivos. La corrida electroforética se realizó a 150 V por 20 minutos. Posteriormente, el gel de agarosa fue visualizado en un equipo de fotodocumentación (Digi Doc-IT Imaging System UVP) con una lámpara de luz ultravioleta, que permitió la estimación y cuantificación cualitativa según la intensidad de las bandas de ADN, comparando con un patrón de referencia.

- ***Extracción de ARN***

A través de esta metodología se extrajo el ARN total de leucocitos de sangre periférica y de médula ósea. Se empleó el protocolo usando el reactivo TRIzol® (TRIzol Reagent, Invitrogen). Este reactivo está conformado por una mezcla monofásica de fenol, e isotiocianato de guanidina, que permite extraer el ARN basado en el método desarrollado por Chomczynski y Sacchi (116). El ADN y las proteínas son separados por precipitación de la fase orgánica.

A partir de los leucocitos obtenidos por gradiente de Ficoll, se tomaron 100 µl y se agregó 100 µl de TRIzol, agitándose por 10 segundos. Se mantuvo en hielo por 5 minutos. Posteriormente se agregó 30 µl de cloroformo, se agitó durante 20 segundos y se incubó en hielo por 5 minutos. Se centrifugó a 12.000 r.p.m durante 15 minutos a 4 °C. Se extrajo la fase acuosa superior que contiene el ARN y se transfirió a otro tubo eppendorf estéril. Se agregó el volumen equivalente al medido de isopropanol a esta fase acuosa y se mezcló por inversión. Se incubó a -20 °C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12.000 r.p.m por 20 minutos a 4 °C. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante (el pellet es ARN). Se agregó un volumen equivalente de Etanol frío al 75 %, se mezcló en vórtex durante 10 segundos, y se centrifugó a 14.000 r.p.m por 20 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante. Posteriormente, se invirtieron los tubos sobre papel absorbente limpio y se dejó secar al aire. Se resuspendió cada tubo con 40 µl de agua-DEPC 1 % (dietilpropiocarbonato) (solución de agua bidestilada y DEPC a una concentración de 1%, incubada durante 4 horas y autoclavada posteriormente). Almacenándose a -20 °C hasta su procesamiento.

- ***Determinación de la concentración y de la calidad del ARN***

La concentración del ARNt fue determinada por cuantificación espectrofotométrica (260/280) y su calidad fue visualizada a través de una corrida electroforética de agarosa al 0,8 % con buffer TBE 0,5X (0.045 M Tris - Borato, 0.001M EDTA, pH 8,0), ésta se llevó a cabo en una cámara horizontal libre de ARNasa previamente (peines lavados con NaOH 1.0 N) a un voltaje de 100 V durante 30 minutos. Posteriormente, el gel fue sumergido en una solución con

bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y observado a través de luz UV con el equipo de fotodocumentación Digi Doc-IT Imaging System UVP.

3.5 Transcripción Inversa

Esta técnica se realizó con la finalidad de obtener la síntesis del ADNc a partir del ARN aislado para utilizarlo posteriormente para las reacciones de amplificación de PCR (117).

Se preparó la siguiente mezcla de reacción sobre hielo: 5x RT- Buffer de la superscript III (Invitrogen), 0.1 M DTT, 10 mM dNTPs, 50 uM pd(N)₆, Inhibidor de RNasas (1 U/µl final), Superscript III (2.5 U/µl final), 18 µl agua bidestilada estéril. Se mantuvo la mezcla sobre hielo hasta su uso, agregándose posteriormente en cada tubo 18 µl de la mezcla de reacción y 2 µl de ARN. Se introdujeron los tubos en el termociclador (Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer) en el programa estandarizado: 1 ciclo de 45 min a 50 °C y 3 min a 95 °C, y se mantuvieron a 4 °C como temperatura final. Finalmente, se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

3.6 Detección de fusión BCR-ABL por la técnica RT-PCR

La translocación t(9;22)(q33;q34) se detecta en un porcentaje importante de pacientes con LLA y LMC. La t(9;22) provoca la fusión entre los genes *BCR* y *ABL*. El ARNm correspondiente es utilizado de preferencia para la detección del cromosoma Philadelphia, dado que el intrón de tamaño variable situado alrededor del punto de fusión es eliminado por corte y empalme (*splicing*). A nivel molecular se pueden distinguir 3 subtipos llamados e1a2, b2a2 y b3a2. Para su detección se convierte primero el ARN total de los leucocitos de sangre periférica o de médula ósea del paciente en ADNc. Posteriormente, se amplificó con los cebadores (tabla 4), de los cuales uno hibrida al exón b2 y uno al exón e1 del gen *BCR*, y el otro al exón a2 del gen *ABL*. De esta manera se obtuvo sólo en presencia de la fusión bcr/abl un producto de amplificación.

Tabla 4. Secuencia de cebadores para amplificar los transcrito de la fusión *BCR-ABL* (32).

Productos	Cebador	Secuencia de cebador	Tamaño del producto
Bcr/abl	LCP 27	5' TCGTGTGTGAAACTCCAGAC 3'	b3a2: 349 pb
	LCP 28	5'CCATTCCCCATTGTGATTAT 3'	b2a2: 274 pb
Bcr e1a2	BCR-e1	5'ACTGCCCCGGTTGTCGTGT 3'	e1a2: 317 pb
	LCP 28	5'CCATTCCCCATTGTGATTAT 3'	
Abl (control interno)	LCP 29	5'TAGCATCTGACTTTGAGCCT 3'	abl: 200 pb
	LCP 28	5'CCATTCCCCATTGTGATTAT 3'	

La alineación de los cebadores en las secuencias de *BCR-ABL* se muestra a continuación, usando las referencias de GenBank del gen *BCR* X02596.1 y del gen *ABL* X16416.1 Las secuencias marcadas en color amarillo indican los cebadores, las de azul son las correspondientes al gen *BCR* y las de verde corresponden al gen *ABL*.

BCR-ABL: b2a2 y b3a2

AGCTGCAGATGCTGACCAAC TCGTGTGTGAAACTCCAGAC TGTCCACAGCATTCCGCTGACCATCAAT
AAGGAAGATGATGAGTCTCCGGGGCTCTATGGGTTTCTGAATGTCATCGTCCACTCAGCCACTGGATTTAAGC
AGAGTTCAAAAAGCCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGACTTTGAGCCTCAGGGTCTGAGTGAAGCCGCTCGTT
GGAACTCCAAGGAAAACCTTCTCGCTGGACCCAGTGAAAATGACCCCAACCTTTTCGTTGCACTGTATGATTT
TGTGGCCAGTGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGTGAAAAGCTCCGGGTCTTAGCTATAATCACAATG
GGGAATGGTGTGAAGCCCAAAACCAAAAATGGCCAAGGCTGGGTC

BCR-ABL: e1a2

TCGACAGCAGCAGTCCCCCAGCCGCGAGTGCCATAAGCGGCACCGGC ACTGCCCGGTTGTCGTGTCC
GAGGCCACCATCGTGGGCGTCCGCAAGACCGGGCAGATCTGGCCCAACGATGGCGAGGGCGCCTTCCATGGAG
ACGCAGGTGAAAAGCTCCGGGTCTTAGGCTATAATCACAATGGGGAATGGTGTGAAGCCCAAAACCAAACTGGG
TCATAATCACAATGGGGAAT

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo de la preparación del *master mix* de 50µl de volumen final, buffer 1x RT-PCR (268 mM Tris-HCL pH 8.8, 470 mM KCl, 7mM MgCl₂, 1.0 % Tritón X-100, 0,1 % gelatina), cada cebador (20 pmol/µl), 1U de Taq DNA polimerasa y 10 µl de ADNc de las muestras. La reacción de amplificación se inició con una desnaturalización de 60 seg a 95 °C, seguida de 40 ciclos consecutivos de desnaturalización de 15 seg a 94 °C, alineación de 20 seg a 60 °C y extensión de 20 seg a 72 °C, y para finalizar un

período de extensión de 2 min a 72 °C, bajo el programa FILAL en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 Applied Biosystem. Se realizaron las reacciones por triplicado en cada paciente para validar el resultado y se aplicó un control negativo utilizando agua destilada estéril. Así mismo, se utilizó como control positivo el ADNc de la muestra de un paciente con LMC que tenía reportado previamente la presencia de *BCR-ABL*. Posteriormente, se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X (0.045 M Tris - Borato, 0.001M EDTA, pH 8,0) a 150 voltios por 35 minutos y posteriormente el gel se sumergió en una solución de Bromuro de Etidio para visualización de las amplificaciones con luz UV.

3.7 Detección de fusión *PML-RARα* por la técnica RT-PCR

La translocación t(15;17) (q24;q21). Es un marcador molecular que se encuentra en pacientes con leucemia promielocítica aguda (LPA). La t(15;17) produce una fusión entre dos genes, *PML* y *RARα*. EL ARNm es utilizado de preferencia para la detección de la translocación, dado que el intrón de tamaño variable situado alrededor del punto de fusión es eliminado por el proceso de corte y empalme (*splicing*). A nivel molecular se pueden distinguir 3 subtipos llamados bcr1, bcr2 y bcr3. Subsecuentemente, se amplificó con los cebadores de los cuales uno hibrida al exón 3 y uno al exón 5 del gen *PML* y el otro al exón 3 del gen *RARα*. De esta manera, se obtendría un producto de amplificación sólo en presencia del transcrito de fusión *PML-RARα*. Para aumentar la sensibilidad se realizó una PCR hemi-anidada cambiando sólo al iniciador que hibrida al exón 3 del gen *RARα*. Los cebadores que se utilizaron en la primera y en la segunda amplificación se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Secuencia de cebadores empleados en la PCR hemi-anidada para amplificar el transcrito de la fusión de *PML-RARα* (32).

Productos	Cebador	Secuencia de cebador	Tamaño del producto
bcr 1-2	PML-A1	5' CAGTGTACGCCTTCTCCATCA 3'	bcr 1: 214 pb
	RARA-B	5'GCTTGTAGATGCGGGGTAG 3'	
	PML-C1	5'TCAAGATGGAGTCTGAGGAGG 3'	
	RARA-D	5' CTGCTGCTCTGGGTCTCAAT 3'	
bcr 3	PML-A2	5'CTGCTGGAGGCTGTGGAC 3'	bcr 3: 289 pb
	RARA-B	5'GCTTGTAGATGCGGGGTAG 3'	
	PML-C2	5' AGCGCGACTACGAGGAGAT 3'	
	RARA-D	5' CTGCTGCTCTGGGTCTCAAT 3'	
Abl (control interno)	LCP 29	5'TAGCATCTGACTTTGAGCCT 3'	abl: 200 pb
	LCP 28	5'CCATTCCCCATTGTGATTAT 3'	

La alineación de los cebadores en las secuencias de *PML-RARα* se muestra a continuación, usando las referencias de GenBank del gen *PML* M73778.1 y del gen del receptor de ácido retinóico (*RARα*) X06538.1. Las secuencias marcadas en color amarillo indican los cebadores externos, las rosadas indican los cebadores internos, las de azul son las correspondientes al gen *PML* y las de verde corresponden al gen *RARα*.

BCR 1

TGGCTGAAGCCCAGCCTATGGCTGTGGTACAGTCAGTGCCCGGGGCACACCCCGTGC **CAGTGTACGCCTTCTC**
CATCAAAGGCCCTTCTATGGAGAGGATGTCTCCAATAACAACGACAGCCAGAAGAGGAAGTGCAGCCAGACCC
 AGTGCCCCAGGAAGGTCA **TCAAGATGGAGTCTGAGGAGG** **GGAAGGAGGCAAGGTTGGCTCGGAGCTCCCCGGA**
GCAGCCCAGGCCAGCACCTCCAAGGCAGTCTCACCACCCACCTGGATGGACCGCCTAGCCCCAGGAGCCCC
GTCATAGGAAGTGAGGTCTTCTGCCCCAACAGCAACCACGTGGCCAGTGGCCCGGGGAGGCA **CCATTGAGA**
CCCAGAGCAGCAGTTCTGAAGAGATAGTGCCAGCCCTCCCTCGCCACCCCT **CTACCCCGCATCTACAAGC**
 TTGCTTTGTCTGTTCAGGACAAGTCTCAGG

BCR 3

AGCGCGAGC **TGCTGGAGGCTGTGGAC** GCGCGGTACC **AGCGCGACTACGAGGAGATGGCCAGTGGCTGGGCCG**
CCTGGATGCTGTGCTGCAGCGCATCCGCACGGGACGCGCTGGTGCAGAGGATGAAGTGTACGCCTCGGAC
CAGGAGGTGCTGGACATGCACGGTTTCTGCGCCAGGCGCTCTGCCGCTGCGCCAGGAGAGCCCCAGAGCC
TGCAAGCTGCCGTGCGCACCGATGGCTTCGACGAGTTCAAGGTGCGCCTGCAGGACCTCAGCTCTTGATCAC
CCAGGGGAAA **CCATTGAGACCCAGAGCAGCAG**TTCTGAAGAGATAGTGCCAGCCCTCCCTCGCCACCCCT
CTACCCCGCATCTACAAGCCTTGCTTTGTCTGTTCAGGACAAGTCTCAGGCTACCACATATGGGGTCAGCGCCT

G

La primera amplificación se realizó a partir de un *master mix* de un volumen final de 50 μ l, en el cual se adicionó el buffer 1x PCR (100mM Tris-HCl pH 8.8, 500mM KCl, 1.0% Triton X-100, 0.1% gelatina), $MgCl_2$ 2.5 mM, 0.2 mM dNTP's, 20 pmol/ μ l de cada cebador (PML-A1, RARA-B, PML-A2, LCP 29 y LCP 28), 1U de Taq DNA polimerasa y 3 μ l de ADNc obtenido de la reacción de RT previa. Las muestras fueron sometidas a un período inicial de desnaturalización a 95 °C por 4 min. Luego por 25 ciclos consecutivos, las muestras se sometieron a un período de desnaturalización por 3 seg a 94 °C, de alineación por 6 seg a 65 °C y de extensión por 6 seg a 72 °C, con un período final de extensión de 2 min a 72 °C, en el programa PML-PROT 1 del termociclador GeneAmp PCR System 2400 Applied Biosystem.

La segunda amplificación se realizó con el *master mix* de volumen final de 50 μ l, en el cual se adicionaron: Buffer 1x PCR (100mM Tris-HCl pH 8.8, 500mM KCl, 1.0% Tritón X-100, 0.1% gelatina), $MgCl_2$ 2.5 mM, 0.2 mM dNTP's, 20pmol/ μ l de cada cebador (PML-C1, RARA-D y PML-C2) y 1U de Taq DNA polimerasa. Posteriormente se tomó 1 μ l de las amplificaciones correspondientes del protocolo previo y se procedió a colocar los tubos en el termociclador. Se empleó el programa PML-PROT 2 siguiendo el siguiente protocolo: período inicial de desnaturalización de 4 min a 95 °C, 35 ciclos consecutivos con un período de desnaturalización de 3 seg a 94 °C, alineación de 6 seg a 65 °C y extensión de 6 seg a 72 °C y luego con un período de extensión final de 2 min a 72 °C, en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 Applied Biosystems. Finalmente, la detección de los productos se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 2 % en buffer TBE 1X (0.045 M Tris - Borato, 0.001M EDTA, pH 8,0) a 150 voltios por 35 minutos. Se sumergió en una solución de Bromuro de Etidio que permitió la visualización bajo luz UV. Se realizaron las reacciones por triplicado a cada paciente para validar los resultados y se aplicó un control negativo utilizando agua destilada estéril. Los productos de amplificación específicos tienen un tamaño molecular de 214 pb bcr1, 289 pb bcr3, 200 pb abl. Los productos de bcr2 tienen pesos moleculares variables e inferiores al de bcr1.

3. 8 Detección de fusión TEL-AML1 por la técnica RT-PCR

La translocación t(12;21)(p12;q22) es un marcador presente con frecuencia en pacientes jóvenes con LLA. La t(12;21)(p12;q22) provoca una fusión entre dos genes, *TEL* y *AML1*. El ARNm correspondiente es utilizado de preferencia para la detección de la translocación, dado que el intrón de tamaño variable situado alrededor del punto de fusión es eliminado por corte y empalme (*splicing*). A nivel molecular se pueden distinguir 2 subtipos llamados S1 y S2. Para su detección se convierte primero el ARN total de los leucocitos de sangre periférica o de médula ósea del paciente en ADNc. Posteriormente, se amplificó con dos cebadores, de los cuales uno hibrida río arriba del punto de ruptura con el gen *TEL* y el otro río abajo del punto de ruptura con el gen *AML1*. De esta manera, se obtuvo sólo en presencia de la fusión *TEL-AML1* un producto de amplificación. Para aumentar la sensibilidad se realizó a través del método PCR anidada (*nested PCR*). Los cebadores diseñados para las dos PCR para la amplificación del transcrito *TEL-AML1* se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Secuencias de cebadores utilizados en la PCR anidada para amplificar el transcrito de la fusión de *TEL-AML1* (32).

Productos	Cebador	Secuencia de cebador	Tamaño del producto
Tel/aml1	1. TEL-e	5' AGCCCCATCATGCACCCTCTGATCC 3'	Tel-aml1 s1: 271 pb
	1. AML1-e	5' GTGGTCGGCCAGCACCTCCACC 3'	
	2. TEL-i	5'ACTCCGTGGATTTCAAACAGTCC 3'	Tel-aml1 s2: 232 pb
	2. AML1-i	5'AACGCCTCGCTCATCTTGCCTGGGCTC 3'	
Abl (control interno)	LCP 29	5'TAGCATCTGACTTTGAGCCT 3'	abl: 200 pb
	LCP 28	5'CCATTCCCCATTGTGATTAT 3'	

La alineación de los cebadores en las secuencias de *TEL-AML1* se muestra a continuación, usando las referencias de GenBank del gen *TEL* U11732.1 y del gen *AML1* D43969.1. Las secuencias marcadas en color amarillo indican los cebadores externos, las rosadas indican los cebadores internos, las de azul son las correspondientes al gen *TEL* y las de verde corresponden al gen *AML1*.

TEL-AML1

GCCATCCAGCCCCGGCAGGAGAGCACACGCGTGATCCAGCTGATGCCCAGCCCCATCATGCACCCTCTGATC
CTGAACCCCCGGCACTCCGTGGATTTCAAACAGTCCAGGCTCTCCGAGGACGGGCTGCATAGGGAAGGGAAGC
CCATCAACCTCTCTCATCGGGAAGACCTGGCTTACATGAACCACATCATGGTCTCTGTCTCCCCGCCTGAAGA
GCACGCCATGCCCATTTGGGAGAATAGCAGGTGAGTGAGTTCCCCTCTCGCCGCTCCAGCATCATGGGGACCTG
ACAAAGTCTATATATAGTGTGTAATGCATACTTGGAATGAATCCTTCTAGAGACGTCCACGATGCCAGCACG
AGCCGCGCCTTCACGCGCCTTCCACCGCGCTGAGCCGAGGCAAGATGAGCGAGGCGTTGCCGCTGGGCGCCC
CGGACGCCGGCGCTGCCCTGGCCGGCAAGCTGAGGAGCGGCGACCCGACGATGGTGGAGGTGCTGGCCGACCA
CCGGGCGAGCTGGTGCACACC

La primera amplificación se realizó a partir del *master mix* del siguiente modo: a partir de un volumen final de 50 µl: buffer 1x RT-PCR (268mM Tris-HCl pH 8.8, 470mM KCl, 1.0% Triton X-100, 0.1% gelatina, 7mM MgCl₂), 0,2 mM de dNTP's, MgCl₂ 2.5 mM, 20 pmol/µl de cada cebador (TEL-e, AML1-e, LCP 29 y LCP 28), 1U de Taq DNA polimerasa y 10 µl de la reacción de ADNc de la reacción RT previa. Las muestras fueron sometidas a un período inicial de desnaturalización a 95 °C por 1 min. Luego por 35 ciclos, iniciándose el período de desnaturalización por 15 seg a 94 °C, de alineación por 3 seg a 64 °C y de extensión por 3 seg a 72 °C, con un período final de extensión de 2 min a 72 °C, en el programa TEL (1) del termociclador GeneAmp PCR System 2400 Applied Biosystem.

La segunda amplificación se realizó a partir del *master mix* del siguiente modo: con un volumen final de 50 µl, en el cual se adicionaron: buffer 1x PCR (100mM Tris-HCl pH 8.8, 500mM KCl, 1.0% Triton X-100, 0.1% gelatina, 15 mM MgCl₂), 0.2 mM de dNTP's, MgCl₂ 2.5mM, 20 pmol/µl de cada cebador (TEL-i, AML1-i), 1U de Taq DNA polimerasa y 5 µl de las amplificaciones correspondientes de la primera reacción. Estas muestras fueron sometidas a un período inicial de desnaturalización de 1 min a 95 °C, le siguieron 25 ciclos consecutivos con períodos de desnaturalización de 15 seg a 94 °C, alineación de 3 seg a 60 °C y extensión de 3 seg a 72 °C, y culminó con una extensión final de 2 min a 72 °C en el programa TEL(2) del termociclador GeneAmp PCR System 2400 Applied Biosystem. Los productos amplificados se almacenaron a 4 °C o a -20 °C. La detección de la amplificación se realizó por electroforesis en gel de agarosa 2 % en buffer TBE 1X (0.045 M Tris – Borato, 0.001 M EDTA, pH 8,0), a 150 voltios por 35 minutos. Se sumergió en una solución de Bromuro de Etidio

y posteriormente se visualizó por luz UV. Se realizaron las reacciones por triplicado a cada paciente para validar los resultados y se aplicó un control negativo utilizando agua destilada estéril. El Tamaño de los productos *TEL-AML1* resultantes son: *TEL-AML1* s1 inner 271pb, *TEL-AML1* s2 inner 232pb, Abl 200 pb.

3.9 Amplificación del gen *TP53*

Se estandarizó el protocolo de amplificación de los exones 5, 6, 7, 8 del gen *TP53*, mediante la técnica de PCR en un termociclador Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer.

El proceso de estandarización para la amplificación del exón 6 se llevó a cabo empleando un gradiente de temperaturas de alineación de 55 °C a 75 °C (55,0 °C; 56,6 °C; 59,0 °C; 62,6 °C; 71,3 °C; 73,6 °C; 75,0 °C) y un gradiente con diferentes concentraciones de MgCl₂, con el fin de conocer las condiciones adecuadas de la reacción. El protocolo de PCR para este exón quedó conformado de la siguiente manera: desnaturalización por 5 minutos a 94 °C, 30 ciclos de 15 seg de desnaturalización a 94 °C, 60 seg de alineación a 56,2 °C y 60 segundos de extensión a 72 °C, y una extensión final de 7 minutos a 72 °C.

La estandarización de la PCR para la amplificación de los exones 5, 7 y 8 del gen *TP53* se realizó también empleando un gradiente de temperatura de alineación de 55 °C a 70 °C (55,0 °C; 56,2 °C, 58 °C, 60,7 °C; 64,7 °C; 67,3 °C; 69,0 °C; 70,0 °C) en conjunto con un gradiente de diferentes concentraciones de MgCl₂, para establecer las condiciones adecuadas de la reacción. El protocolo de PCR para estos exones quedó establecido de la siguiente manera: desnaturalización por 5 minutos a 94 °C, 30 ciclos de 15 seg de desnaturalización, 60 seg de alineación a 64,7 °C (exón 5) y 56,2 °C (exones 7 y 8), y 60 seg de extensión a 72 °C, y finalmente una extensión de 7 minutos a 72 °C

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó a través de la mezcla maestra (*master mix*) de un volumen final 50 µl, estuvo compuesta por: agua destilada estéril, buffer 1x PCR (100mM Tris-HCl pH 8,8, 500 mM KCl, Tritón X-100 1.0%, gelatina 0.1%), MgCl₂ 2.5mM, 0,2 mM de dNTP's, 20 pmol/µl de

cada cebador sentido y antisentido, 1U de Taq ADN polimerasa y 100 ng de ADN de las muestras. Este protocolo se realizó en 22 pacientes que fueron seleccionados de los diferentes tipos de leucemia y 10 controles. Se aplicó un control de calidad negativo utilizando agua destilada estéril en cada reacción. Las secuencias de los cebadores se muestran en la tabla 7 (107).

Una vez amplificadas las secuencias de cada exón, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 2.0 % en buffer TBE 1x (0.045M Tris-Borato; 0.001M 342333 EDTA, pH8.0) a 150 voltios por 40 minutos. Se sumergió en una solución de Bromuro de Etidio y fueron visualizadas en un equipo de fotodocumentación bajo luz UV.

Tabla 7. Secuencias de cebadores utilizados en la amplificación de los exones 5, 6, 7, 8 del gen TP53 (118).

Exón	Cebador	Secuencia de cebador	Tamaño del producto
5	TP53-5F	5'TTGCTGCCGTCTTCCA 3'	300 pb
	TP53-5R	5'CAACCAGCCCTGTCGTCTCT 3'	
6	TP53-6F	5'GGCTGGAGAGACGACAGGG 3'	305 pb
	TP53-6R	5'ATCTCATGGGGTTATAGGGAG 3'	
7	TP53-7F	5'TTGCCACAGGTCTCCC 3'	264 pb
	TP53-7R	5'ATGGAAGAAATCGGTAAGAG 3'	
8	TP53-8F	5'TTTAAATGGGACAGGTAGGAC 3'	209 pb
	TP53-8R	5'CTTACCTCGCTTAGTTGCT 3	

La alineación de los cebadores en las secuencias de los exones del TP53 se muestra a continuación, usando la referencia de GenBank NG_017013.2. Las secuencias marcadas en color amarillo indican los cebadores *foward* y *reverse* empleados en la PCR.

TP53 EXON 5

```

17221 tacgcatgtttgtttct ttgctgccgtcttccagttgctttatctgttcacttgtgccct
17281 gactttcaactctgtctccttctcttctctacagtactcccctgccctcaacaagatggt
17341 ttgccaaactggccaagacctgccctgtgcagctgtgggttgattccacacccccgcccg
17401 caccgcgctccgcgccatggccatctacaagcagtcacagcacatgacggaggtgtgag

```

17461 gcgctgccccaccatgagcgctgctcagatagcgatggtgagcagctggggctggagag
 17521 acgacagggctggtgcccagggccccaggcctctgattcctcactgattgctcttagg
 ←

TP53 EXON 6

17461 gcgctgccccaccatgagcgctgctcagatagcgatggtgagcagctggggctggagag
 17521 acgacagggctggtgcccagggccccaggcctctgattcctcactgattgctcttagg
 17581 tctggcccctcctcagcatcttatccgagtggaaggaaatttgctgtggagtatttga
 17641 tgacagaaacacttttcgacatagtggtggtgcccctatgagccgcctgaggctggtt
 17701 tgcaactggggtctctgggaggaggggttaagggtggttgtcagtggccctccaggtgag
 17761 cagtaggggggctttctcctgctgcttatttgacctccctataaccccatgagatgtgca
 ←

TP53 EXON 7

18181 aaaaaaaaaaggcctcccctgcttgccacaggtctccc caaggcgactggcctcatctt
 18241 gggcctgtgttatctcctaggttggtctgactgtaccaccatccactacaactacatgt
 18301 gtaacagttcctgcatggcgcatgaaccggaggccatcctcaccatcatcacactgg
 18361 aagactccaggtcaggagccacttgccaccctgcacactggcctgctgtgcccagcctc
 18421 tgcttgccctctgaccccctgggcccactctttaccgatttcttccat actactacccatcc
 ←

TP53 EXON 8

18601 gctccagaaaggacaaggggtggttgggagtagatggagcctggtttttaaatgggacag
 18661 gtaggactgatttccttactgcctcttgcttctcttttccatcctgagtagtggtaat
 18721 ctactgggacggaacagctttgaggtgctggttgtgacctgctgaggagagaccggcgc
 18781 acagaggaagagaatctccgcaagaaaggggagcctcaccacgagctgccccagggagc
 18841 actaagcgaggttaagcaagcaggacaagaagcgggtggaggagaccaaggggtgcagttatg
 ←

3.10 Amplificación del gen RAS

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar las secuencias que codifican los codones 12, 13 y 61 en el gen *N-RAS* y para los codones 12 y 61 en el gen *K-RAS*, para analizar la presencia de mutaciones génicas. El protocolo de PCR se realizó a través de la mezcla maestra (*master mix*) de un volumen final 50 µl, estuvo compuesta por: agua destilada estéril, buffer 1x PCR (100mM Tris-HCl pH 8,8, 500 mM KCl, Tritón X-100 1.0%, gelatina 0.1%), MgCl₂ 2.5mM, 0,2 mM de dNTP's, 20 pmol/µl de cada cebador sentido y antisentido, 1U de Taq ADN polimerasa y 200 ng de ADN de las muestras. El protocolo de PCR para la amplificación de las secuencias génicas

que codifican para exones 2 y 3 del gen *N-RAS* y del gen *K-RAS*, se realizó de la siguiente manera: se inició con una desnaturalización previa durante 5 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos, de 60 seg de desnaturalización a 94 °C, 60 seg de alineación a 60 °C, y 60 seg a 72 °C durante el período de extensión, finalmente con un período de extensión final de 7 minutos a 72 °C. Los cebadores utilizados se pueden observar en la tabla 8 para el gen *N-RAS* y en la tabla 9 para el gen *K-RAS* (119). Se empleó un control de calidad negativo empleando agua destilada estéril en cada reacción.

Tabla 8. Secuencias de cebadores para la amplificación de las secuencias que codifican los codones 12,13 y 61 del gen *NRAS* (119).

Exón	Codón	Cebador	Secuencia de cebador	Tamaño del producto
2	12,13	NRAS 12-13F	5'CTGGTGTGAAATGACTGAGT'3'	116 pb
		NRAS 12-13R	5' GGTGGGATCATATTCATCTA 3'	
3	61	NRAS 61-F	5'GTTATAGATGGTGAAACCTG 3'	112 pb
		NRAS 61-R	5'ATACACAGAGGAAGCCTTCG 3'	

Tabla 9. Secuencias de cebadores para la amplificación de las secuencias que codifican los codones 12 y 61 del gen *KRAS* (119).

Exón	Codón	Cebador	Secuencia de cebador	Tamaño del producto
2	12	KRAS 12-F	5' CCTGCTGAAAATGACTGAAT 3'	115 pb
		KRAS 12-R	5' TGTGGATCATATTCGTCCA 3'	
3	61	KRAS 61-F	5' GTAATTGATGGAGAAACCTG 3'	113 pb
		KRAS 61-R	5' ATACACAAAGAAAGCCCTCC 3'	

La alineación de los cebadores en las secuencias de los genes *NRAS* y *KRAS* se muestran a continuación, usando las referencias de GenBank NG_007572.1 y NG_007524.1, respectivamente. Las secuencias marcadas en color amarillo indican los cebadores *forward* y *reverse* empleados en la PCR.

NRAS 12, 13 (exón 2)

5701 ttactggttttccaacaggttcttgctgggtgtgaaatgactgagtacaaaactgggtgggtgt
 5761 tggagcaggtgggtgttgggaaaagcgactgacaatccagctaataccagaaccactttgt
 5821 agatgaatatgatcccaccatagaggtgaggcccagtggttagcccgctgacctgatcctg

NRAS 61 (exón 3)

7921 cttacagaaaacaagtggttatagatggtgaaacctgtttggttggacatactggatacag
 7981 ctggacaagaagagtacagtgccatgagagaccaatacatgaggacaggcgaaggcttcc
 8041 tctgtgtatttgccatcaataatagcaagtcatttgcgatattaacctctacaggtact

KRAS 12 (exón 2)

10501 acattttcattatTTTTATTATAAGGcctgctgaaaatgactgaatataaaacttgtggta
 10561 gttggagctgggtggcgtaggcaagagtgacctgacgatacagctaattcagaatcatttt
 10621 gtggacgaatatgatccaacaatagaggtaaactctgttttaatatgcatattactgggt

KRAS 61 (exón 3)

28501 cttctcaggattcctacaggaagcaagtagtaattgatggagaaacctgtctcttggata
 28561 ttctcgacacagcaggtcaagaggagtacagtgcaatgagggaccagtacatgaggactg
 28621 ggaggggctttctttgtgtatttgccataaataataactaaatcatttgaagatattcacc

Una vez amplificadas las secuencias de interés, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 3 % en buffer TBE 1x (0.045M Tris-Borato; 0.001M EDTA, pH8.0) a 150 voltios durante 45 minutos. Se sumergió en una solución de Bromuro de Etidio para ser visualizadas en un equipo de fotodocumentación bajo luz UV.

3.11 Purificación de los productos de PCR por el kit Qiagen Kit.

Se realizó la purificación de los productos de reacciones de PCR de los genes *TP53* y *RAS* con la finalidad de eliminar contaminantes interferentes que puedan afectar la reacción de secuenciación de los ácidos nucleicos. Inicialmente, se planteó la realización de la técnica de polimorfismo de conformación de cadena simple “*single-strand conformation polymorphism*” (SSCP) para detectar mutaciones a modo de tamizaje, sin embargo, no se logró la estandarización final del método por inconvenientes técnicos del equipo de electroforesis. Por tal

motivo, se decidió seleccionar un grupo de pacientes con leucemia cuyos productos de PCR de ambos genes fueron directamente secuenciados con el objetivo de investigar la presencia de mutaciones y polimorfismos.

Se aplicó el protocolo de purificación de Qiagen de productos de PCR, empleando el método de microcentrifugación: En una relación 5:1 se añadió buffer PB (Hidrocloruro de guanidina, indicador para $\text{pH} \leq 7,5$) y buffer de unión, a cada uno de los productos de PCR en la columna de reacción provista en el kit. Se centrifugó durante 60 segundos para lograr la unión del producto de PCR a la membrana existente en la columna. Se descartó el producto obtenido en el tubo secundario, colocando la columna en el mismo tubo. Se realizó un lavado añadiendo 750 μl de Buffer PE (Buffer etanol) a la columna, centrifugando durante 60 segundos. Se descartó el producto obtenido en el tubo secundario, la columna se colocó nuevamente en el tubo y se centrifugó 60 segundos adicionales. Se colocó la columna en un nuevo tubo (limpio) de reacción de 1,5 ml. Para eluir el producto de PCR de la membrana se añadieron 50 μl de Buffer EB (10 mM Tris-Cl, $\text{pH} 8,5$), buffer de elución, en el centro de la membrana, y se sometió a centrifugación durante 60 segundos. Para obtener una mayor concentración de producto de PCR se agregó 30 μl de Buffer de elución al centro de la membrana y se centrifugó durante 60 segundos. Para analizar el producto final se preparó un gel de agarosa al 2% y se añadió 1 μl de Buffer de carga a 5 μl de los productos de purificación y se realizó una electroforesis por 15 a 20 minutos y luego se observó usando luz UV.

3.12 Secuenciación de los productos de PCR de los genes TP53 y RAS

Se empleó el método de terminación de cadena de Sanger, (120) a aquellas muestras que fueron seleccionadas con la finalidad de determinar la presencia de alteraciones genéticas en cada caso. Se utilizó el protocolo BigDye Terminator v3.1 para la reacción de secuenciación (cycle sequencing kit) de Applied biosystems. La metodología de secuenciación se llevó a cabo de manera automatizada por el secuenciador Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer, en el Centro de Secuenciación de Ácidos Nucleicos (CeSAAn) del Instituto de Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Venezuela y en el Laboratorio

de Biología y Genética de Peces del Instituto de Biociencias de la Universidad Estadual de Sao Paulo (UNESP), Brazil.

3.13 Análisis bioinformático de secuencias de los genes TP53 y RAS

El análisis bioinformático de las secuencias fue realizado a través de los programas Geneious Basic 4.8.5 y BioEdit v7.2.5. Se utilizaron las siguientes bases de datos para el estudio de las mutaciones y polimorfismos encontrados: COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutation In Cancer*) www.cancer.sanger.ac.uk, IARC TP53 Database www.p53.iarc.fr, P53 Knowledgebase www.p53.bii.a-star.edu.sg y dbSNP Short Genetic Variations www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/.

3.14 Farmacogenética: Genotipificación de Glutación S- transferasa

3.14.1 GSTM1 y GSST1

La genotipificación se realizó a través de la reacción en cadena de la polimerasa multiplex (PCR-Multiplex) para detectar la presencia de genes *GSM1* y *GSTT1*, siguiendo el protocolo empleado por Arand *et al.*, (121). Para ello, se utilizaron pares de cebadores correspondientes a cada gen para lograr la amplificación separada de los fragmentos genómicos de *GSTM1* y *GSTT1* y además, 2 cebadores del gen de albúmina (*ALB*) que fue usado como control interno positivo de la reacción. La mezcla de reacción de PCR para un volumen final de 50 µl estuvo compuesta de: buffer 1x PCR (100mM Tris-HCl pH 8.8, 500 mM KCl, Tritón X-100 1.0%, gelatina 0.1%), MgCl₂ 2.5mM, 1.0 mM de dNTP's, 20 pmol/µl del cada cebador, 1U de Taq ADN polimerasa, agua libre de nucleasas y 100 ng de ADN genómico de las muestras y controles.

La reacción de PCR se realizó bajo el programa GSTM1DC en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems, de acuerdo al siguiente protocolo: desnaturalización de 5 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94 °C de desnaturalización, 45 seg a 58 °C de alineación y 30 seg a 72 °C de elongación. El paso de elongación final se llevó a cabo a 72 °C por otros 30 °C. La conservación de los productos de PCR fue a 4 °C. En la tabla 10, se muestran las secuencias de cebadores para esta reacción.

Posteriormente, se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X (0.045 M Tris – Borato, 0.001 M EDTA, pH 8,0), a 150 voltios por 20 minutos. Se sumergió en una solución de Bromuro de Etidio (10mg/ml). Finalizada la corrida se utilizó un equipo de fotodocumentación (Digi Doc-IT Imaging System UVP) que permitió visualizar la presencia o ausencia de los genotipos de *GSTM1* (219 pb) y *GSTT1* (480 pb) que pudieron ser identificadas al ser comparadas con un marcador de tamaño molecular de 100 pb, y con ello se pudo determinar los siguientes genotipos: M1⁺/T1⁺ (normal, *wild type*), M1⁰/T1⁰ (doble nulo, tipo homocigoto), M1⁰/T1⁺ y M1⁺/T1⁰ (tipo heterocigoto). Cabe destacar que la banda de amplificación correspondiente al gen *ALB* como control positivo siempre debió estar presente para validar la reacción de PCR.

La alineación de los cebadores en las secuencias de los genes *GSTM1*, *GSTT1* y *ALB* se muestran a continuación, usando las referencias de GenBank NG_000001.11, NT_187633.1 y AH001427.2, respectivamente. Las secuencias marcadas en color amarillo indican los cebadores *forward* y *reverse* empleados en la PCR.

GSTM1

2461 TGTTTTCTGCCTCAGGAGAAACTGAAGCCAAAGTACTTGGAGGAACTCCCTGAAAAGCTA
 2521 AAGCTCTACTCAGAGTTTCTGGGGAAGCGCCATGGTTTGCAGGAAACAAGGTAAAGGAG
 2581 GAGTGATATGGGGAATGAGATCTGTTTTGCTTCACGTGTTATGGAGGTTCCAGCCACAT
 2641 ATTCTTGGCCTTCTGCAGATCACTTTTGTAGATTTTCTCGTCTATGATGTCTTGACCTC
 2701 CACCGTATATTTGAGCCCAAGTGCTTGGACGCCTTCCCAAATCTGAAGGACTTCATCTCC

GSTT1

7381 TGGATGTGACCCTGCAGTTGCTCGAGGACAAGTTCCTCCAGAACAAGGCCTTCCTTACTG
 7441 GTCCTCACATCTCCTTAGCTGACCTCGTAGCCATCACGGAGCTGATGCATGTGAGTGCTG
 7501 TGGGCAGGTGAACCCACTAGGCAGGGGGCCCTGGCTAGTTGCTGAAGTCTGCTTATGCT
 7561 GCCACACCGGCTATGGCACTGTGCTTAAGTGTGTGTGCAAAACACCTCCTGGAGATCTGT
 7621 GGTCCCCAAATCAGATGCTGCCATCCCTGCCCTCACAACCATCCATCCCCAGTCTGTAC
 7681 CCTTTTCCCCACAGCCCGTGGGTGCTGGCTGCCAAGTCTTGAAGGCCGACCCAAGCTGG
 7741 CCACATGGCGGCAGCGCTGGAGGCAGCAGTGGGGGAGGACCTCTCCAGGAGGCCCATG
 7801 AGGTCATTCTGAAGGCCAAGGACTTCCCACCTGCAGACCCACCATAAAGCAGAAGCTGA

7861 TGCCCTGGGTGCTGGCCATGATCCGGTGA GCTGGGAAACCTCACCCCTGCACCGTCCTCA

3.14.2 *GSTP1*

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa para el gen *GSTP1* empleando el protocolo descrito por Crasson *et al.*, (122). Se preparó el *master mix* con un volumen final de la reacción de 50 μ L: buffer 1X (KCl, Tris-HCl, pH 8,4.), $MgCl_2$ 2.5mM, 0.2 mM de dNTP's, 20 pmol/ μ l de cada cebador (tabla 10), DMSO (Dimetil sulfósido al 100%) el cual actúa como coadyuvante de la reacción, 1,5 U de Taq DNA polimerasa, agua destilada libre de nucleasas y por último se le agregó aproximadamente 100 ng de ADN genómico de pacientes y controles. Como control de calidad interno de la reacción se preparó un control negativo, el cual contenía agua destilada estéril.

La alineación de los cebadores en la secuencia del gen *GSTP1* se muestra a continuación, usando las referencias de GenBank NC_000011.10. Las secuencias marcadas en color amarillo indican los cebadores *forward* y *reverse* empleados en la PCR.

GSTP1

1261 CAGCCCTCTGGAGTGGAGGAACTGAGACCCACTGAGGTTACG TAGTTTGCCCAAGGTCA
 1321 AGCCTGGGTGCCTGCAATCCTTGCCCTGTGCCAGGCTGCCTCCCAGGTGTCAGGTGAGCT
 1381 CTGAGCACCTGCTGTGTGGCAGTCTCTCATCCTTCCACGCACATCCTCTCCCCTCCTCC
 1441 CAGGCTGGGGCTCACAGACAGCCCCCTGGTTGGCCCATCCCCAGTGACTGTGTGTTGATC
 1501 AGGCGCCAGTCACGGGCTGCTCCCCCTCCACCAACCCAGGGCTCTATGGGAAGGAC
 1561 CAGCAGGAGGCAGCCCTGGTGGACATGGTGAATGACGGCGTGGAGGACCTCCGCTGCAAA
 1621 TACATCTCCCTCATCTACACCAACTATGTGAGCATCTGCACCAGGGTTGGGCACTGGGGG
 1681 CTGAACAAAGAAAGGGCTTCTTGTGCCCTCACCCCTTACCCTCAGGTGGCTTGGGC

La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp System PCR System 9700 Applied Biosystems, de acuerdo al siguiente protocolo: un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 minutos, luego se continuó con 40 ciclos a 94 °C de 30 segundos de desnaturalización, a 56 °C por 30 segundos de amplificación y a 72 °C durante 30 segundos de elongación. El paso de elongación final se llevó a cabo a 72 °C por 7 minutos. La conservación se realizó a 4 °C.

La visualización de los fragmentos amplificados se realizó a través de la electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X (0.045 M Tris – Borato, 0.001 M EDTA, pH 8,0), a 150 voltios por 15 minutos. Para ello, se tomaron 8 µl de producto de PCR y se mezcló con 2 µl de buffer de carga (glicerol 70%, azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol 0,05%). Finalizada la corrida, se sumergió el gel en una solución de bromuro de etidio (10 mg/dl) y se utilizó un equipo de fotodocumentación (Digi Doc-IT Imaging System. UVP) que permitió visualizar la presencia del amplicón de 442 pb y al ser comparado con un marcador de tamaño molecular de 100 pb.

- **Técnica de RFLP** (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)

Para determinar las distintas variantes polimórficas del gen *GSTP1*, se procedió a realizar la técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), la cual se basa en la digestión con enzimas de restricción de productos de amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas (123), para lo cual se siguió el protocolo desarrollado por Crasson *et al.*, (122). El producto de PCR amplificado fue sometido a digestión enzimática con la enzima *BsmAI*. Para un volumen de 20 µl se utilizó buffer 1X (50Mm de acetato de potasio, 20 mM de Tris Acetato, 10 mM de acetato de magnesio, 1 mM ditiotreitól, pH 7,9) de New England, BioLabs, 5 U/µl de enzima de restricción *BsmAI* (*Bacillus stearothermophilus*), agua destilada y 10 µl de producto de PCR. La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems, donde se incubó a 55 °C por 5 horas y se inactivó por 20 minutos a 80 °C, luego se almacenó a 4 °C hasta el día siguiente. Para la visualización de las variantes polimórficas del producto digerido, se procedió a realizar una corrida electroforética en un gel de agarosa al 3% en buffer TBE 1X (0.045 M Tris – Borato, 0.001 M EDTA, pH 8,0), a 150 voltios por 30 minutos, usándose como control interno de la reacción el producto de PCR de muestra sin digerir (control negativo). Finalizada la corrida se sumergió el gel en una solución bromuro de Etidio (10 mg/ml) y utilizó un equipo de fotodocumentación (Digi Doc-IT Imaging System. UVP) que permitió identificar tres tipos de variantes

polimórficas al ser comparadas con un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Promega, Madison, WI, USA): A/A (Normal, *Wild type*) con dos bandas (329 pb y 113 pb), A/G (Heterocigoto) con tres bandas (329 pb, 216 pb y 113 pb) y G/G (Homocigoto mutante) con dos bandas (216 pb y 113 pb).

3.15 Farmacogenética: genotipificación de Metilentetrahidrofolato Reductasa

3.15.1 MTHFR 1298 A/C

Para realizar la PCR para el gen *MTHFR* 1298 fue utilizado el protocolo empleado por Van der Put *et al.*, (98). La mezcla de reacción estuvo constituida por: buffer 1X (KCl, Tris-HCl, pH 8,4), MgCl₂ 3.0 mM, 200 μM de dNTP's, 20 pmol/μl de cada cebador (tabla 10), DMSO (Dimetil sulfósido al 100%) el cual actúa como coadyuvante de la reacción, 1,5 U/μl de Taq polimerasa, agua destilada libre de nucleasas y por último se le agregó aproximadamente 100 ng/μl de ADN genómico de pacientes y controles. Como control de calidad interno de la reacción se preparó un control negativo el cual contenía agua destilada estéril.

La alineación de los cebadores en la secuencia del gen *MTHFR* 1298 se muestra a continuación, usando las referencias de GenBank NC_000001.1. Las secuencias marcadas en color amarillo indican los cebadores *forward* y *reverse* empleados en la PCR.

MTHFR 1298

```

11581  CCCTGCCCTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTACTCTCTTCTACCTGAAGAGCAAGTCCCCCAA
11641  GGAGGAGCTGCTGAAGATGTGGGGGGAGGAGCTGACCAGTGAAGAAAGTGCTTTGAAGT
11701  CTTTCGTTCTTTACCTCTCGGGAGAACCAAACCGGAATGGTCACAAAGTGAGTGATGCTGG

```

La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp System PCR System 9700 Applied Biosystems, de acuerdo al siguiente protocolo: un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C durante 30 segundos, luego se continuó con 40 ciclos a 9 °C por 30 segundos de desnaturalización, a 60 °C por 30 segundos de amplificación y a 72 °C por 30 segundos de elongación. El paso de elongación

final se llevó a cabo a 72 °C por 7 minutos para asegurar una completa extensión de todos los productos de la PCR. La conservación se realizó a 4 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 %, en buffer TBE 1X (0.045 M Tris – Borato, 0.001 M EDTA, pH 8,0), a 150 voltios por 20 minutos. Para ello, se tomaron 8 µl de producto de PCR y se mezcló con 2 µl de buffer de carga (glicerol 70%, azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol 0,05%). Finalizada la corrida, se sumergió el gel en una solución de bromuro de etidio (10 mg/dl) y se utilizó un equipo de fotodocumentación (Digi Doc-IT Imaging System. UVP) que permitió visualizar la presencia del amplicón de 163 pb y al ser comparado con un marcador de tamaño molecular de 100 pb

- **Técnica de RFLP** (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)

Para determinar las distintas variantes polimórficas del gen *MTHFR 1298*, se procedió a realizar la técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (123), para lo cual se siguió el protocolo desarrollado por Van der Put *et al.*, (98). El producto de PCR amplificado fue sometido a digestión enzimática con la enzima *MboII*. Para un volumen de 20 µl se utilizó buffer B 2X (60 mM de Tris HCl, pH 7,5, 500 mM de NaCl, 60 mM de MgCl₂ y 10 mM DTT), 5 U/µl de enzima de restricción *MboII*, agua destilada y 10 µl de producto de PCR. La preparación se incubó a 37 °C durante toda la noche. Luego, se procedió a realizar una corrida electroforética de los productos de la digestión, con buffer de carga (glicerol 70%, azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol 0,05%) en gel de agarosa al 4% en buffer TBE 1X (0.045 M Tris – Borato, 0.001 M EDTA, pH 8,0), a 150 voltios por 30 minutos, usándose como control interno de la reacción el producto de PCR de muestra sin digerir (control negativo). Finalizada la corrida, se sumergió en una solución de Bromuro de Etidio (10 mg/ml) y se utilizó un equipo de fotodocumentación (Digi Doc-IT Imaging System) que permitió identificar tres tipos de variantes polimórficas: *MTHFR 1298 (A/A)* (Normal, *Wild type*) con cinco bandas (56 pb, 30 pb, 31 pb, 28 pb y 18 pb), *MTHFR 1298 (A/C)* (Heterocigoto) con cinco bandas (84 pb, 56 pb, 30 pb, 31 pb y 28 pb) y *MTHFR 1298 (C/C)* (Mutante) con cuatro bandas (84 pb, 30 pb, 31 pb y 18 pb) al

ser comparadas con un marcador de tamaño molecular de 100 pb. La banda de 18 pb puede ser imperceptible al salir del gel durante la corrida electroforética.

3.15.2 *MTHFR 677 C/T*

Para realizar la PCR para el gen *MTHFR 677* fue utilizado el protocolo descrito por Frosst *et al.*,(91) .La mezcla de reacción estuvo constituida por: buffer 1X (KCl, Tris-HCl, pH 8,4), MgCl₂ 2.0 mM, 0.8 mM de dNTPs, 20 pmol/μl de cada cebador (tabla 10), DMSO (Dimetil sulfósido al 100%), el cual actúa como coadyuvante de la reacción, 1,5 U/μl de Taq polimerasa, agua destilada libre de nucleasas y por último se le agregó aproximadamente 100 ng de ADN genómico de pacientes y controles. Como control de calidad interno de la reacción se preparó un control negativo de agua destilada estéril.

La alineación de los cebadores en la secuencia del gen *MTHFR 677* se muestra a continuación, usando las referencias de GenBank NC_000001.1. Las secuencias marcadas en color amarillo indican los cebadores *forward* y *reverse* empleados en la PCR.

MTHFR 677

```

9721   CCCCGAAGCAGGGAGCTTTGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGG
9781   AGCCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTGAGGCTGACACATTCTTCCGCTTTGTGAA
9841   GGCATGCACCGACATGGGCATCACTTGCCCCATCGTCCCCGGGATCTTTCCCATCCAGGT
9901   GAGGGGCCAGGAGAGCCATAAGCTCCCTCCACCCCACTCTCACCGCACCGTCTTCGCA

```

Se llevó a cabo la reacción empleando un termociclador GeneAmp System PCR System 9700 Applied Biosystems tras programar el siguiente protocolo: un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 minutos, luego se continuó con 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, amplificación a 60 °C por 30 segundos y elongación a 72 °C por 30 segundos, finalizando con el paso de elongación final que se llevó a cabo a 72 °C por 7 minutos. Luego se conservó a 4 °C hasta su uso. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 %, en buffer TBE 1X (0.045 M Tris – Borato, 0.001 M EDTA, pH 8,0), a 150 voltios por 20

minutos. Para ello, se tomaron 8 μ l de producto de PCR y se mezcló con 2 μ l de buffer de carga (glicerol 70%, azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol 0,05%). Finalizada la corrida, se sumergió el gel en una solución de bromuro de etidio (10 mg/dl) y se utilizó un equipo de fotodocumentación (Digi Doc-IT Imaging System. UVP) que permitió visualizar la presencia del amplicón de 198 pb y al ser comparado con un marcador de tamaño molecular de 100 pb

- **Técnica de RFLP** (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)

Para determinar las distintas variantes polimórficas del gen *MTHFR 677*, se procedió a realizar la técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (122), para lo cual se siguió el protocolo desarrollado por Frosst *et al.*, (91). El producto de PCR amplificado fue sometido a digestión enzimática con la enzima *Hinfi*. Para un volumen de 20 μ l se utilizó buffer B 2X (60 mM de Tris HCl, pH 7,5, 500 mM de NaCl, 60 mM de MgCl₂ y 10 mM DTT), 1 U/ μ l de enzima de restricción *MboII*, agua destilada y 10 μ l de producto de PCR. . La preparación se incubó a 37 °C durante toda la noche. Luego, se procedió a realizar una corrida electroforética de los productos de la digestión, con buffer de carga (glicerol 70%, azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol 0,05%) en gel de agarosa al 4% en buffer TBE 1X (0.045 M Tris – Borato, 0.001 M EDTA, pH 8,0), a 150 voltios por 30 minutos, usándose como control interno de la reacción el producto de PCR de muestra sin digerir (control negativo). Finalizada la corrida, se sumergió en una solución de Bromuro de Etidio (10 mg/ml) y se utilizó un equipo de fotodocumentación (Digi Doc-IT Imaging System) que permitió identificar tres tipos de variantes polimórficas: *MTHFR 677 C/C* (Normal, *Wild type*) con una banda (198 pb), *MTHFR 677 C/T* (Heterocigoto) con dos bandas (198 pb y 175 pb) y *MTHFR 677 T/T* (Mutante) con dos bandas (175 pb y 23 pb)

Tabla 10. Secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación de los genes en farmacogenética.

Cebador	Secuencia	Tamaño	Enzima	Fragmentos	Ref.
GST M1- F	5'GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC3'	219 pb	-	-	(110)
GST M1-R	5'CTTGGGCTCAAATATACGGTGG3'	219 pb	-	-	(110)
GST T1- F	5'TTCCTTACTGGTCCTCAATCTC3'	480 pb	-	-	(110)
GST T1- R	5'TCACCGGATCATGGCCAGCA3'	480 pb	-	-	(110)
Alb- F	5'GCCCTCTGCTAACAAGTCTAC3'	350 pb	-	-	(110)
Alb- R	5'GCCCTAAAAAGAAAATCGCCAATC3'	350 pb	-	-	(110)
MTHFR 1298-F	5'CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC 3'	163 pb	<i>MbolI</i>	84, 56, 31, 30 y 28 pb	(98)
MTHFR 1298-R	5'CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG 3'	163 pb	<i>MbolI</i>	84, 56, 31, 30 y 28 pb	(98)
MTHFR 677-F	5'TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGG GA C3'	198 pb	<i>Hinf I</i>	175 y 23 pb	(91)
MTHFR 677-R	5'CACTCTCACCGCACCGTCC T 3'	198 pb	<i>Hinf I</i>	175 y 23 pb	(91)
GST P1- F	5'TAGTTTGCCCAAGGTCAAG 3'	442 pb	<i>BsmAI</i>	329, 216 y 113 pb	(111)
GST P1- R	5'AGCCAACCTGAGGGGTAAG 3'	442 pb	<i>BsmAI</i>	329, 216 y 113 pb	(111)

3.16 Recolección de datos de la evolución clínica de la enfermedad

Se realizó una recopilación de tipo descriptiva cualitativa de las variables contempladas en el monitoreo de evolución clínica de los pacientes con leucemia. Se consideraron las variables clínicas: remisión completa, recaída posterior a los protocolos de quimioterapia, y fallecimiento; así como los eventos adversos de toxicidad asociada a fármacos que se podrían haber presentado durante el transcurso de la enfermedad. Este período de evolución fue comprendido desde el inicio de la toma de muestras (junio del año 2011) hasta el mes de marzo del año 2016, gracias a la información suministrada y validada por los médicos hematólogos del Servicio de Hematología del HUC.

3.17 Análisis estadístico

Se empleó el método de estadística descriptiva, usando tablas de contingencia simple 2x2 para evaluar la asociación entre las variables del estudio (genotipos) y el desarrollo de leucemia, así como su asociación con la evolución clínica del paciente. Se calculó el Chi cuadrado para conocer si la población estudiada se encontraba en equilibrio Hardy-Weinberg. Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de los genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* y *MTHFR*, obtenidas por contaje directo a partir de los fenotipos asignados a cada individuo. Se utilizó el test exacto de Fisher para evaluar la asociación entre presencia y ausencia del alelo nulo/ heterocigotos y mutantes, en casos y controles con respecto al riesgo de desarrollo de leucemia y la asociación entre las diferentes variables comprendidas de acuerdo a la evolución clínica de los pacientes. El riesgo relativo fue calculado por Odds Ratio (OR), considerando un IC de 95%. El paquete estadístico empleado para los análisis fue Graphpad Prism 6.0.

3.18 Estimación de supervivencia global y libre de evento en pacientes con LLA tratados con metotrexato y su asociación con los polimorfismos de MTHFR

La obtención de los datos fue por medio de la revisión de las historias clínicas de 32 pacientes diagnosticados con LLA que asistieron al Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Caracas y que recibieron cualquiera de estos protocolos de quimioterapia que incluyen dosis de Metotrexato (Nacional 2005, Total XIV, Hyper CVAD, BFM 95). Se diseñó un instrumento donde se registraron los datos recolectados que incluyen las variables de estudio necesarias para el análisis de la supervivencia global y libre de los pacientes con LLA del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Caracas (datos personales del paciente, fecha del diagnóstico, número y fecha de recaídas, protocolos de quimioterapia, fecha de la remisión completa, fecha del fallecimiento), esto se llevó a cabo en el Departamento de Información de Salud del HUC bajo la aprobación de la Adjuntoría Docente y del Jefe del Departamento de Información

de la Salud, gracias al apoyo del equipo médico del Servicio de Hematología. Se diseñó un modelo de análisis univariado que incluyeron variables como:

- Polimorfismo del gen *MTHFR* 677: se clasificaron según la presencia de los diferentes alelos, teniendo como genotipo *wild type* C/C a los que presentan el alelo común C, los genotipos heterocigotos homocigotos C/T y T/T, respectivamente, de acuerdo a la presencia del alelo variante T (124).
- Polimorfismo del gen *MTHFR* 1298: se clasificaron según la presencia de los diferentes alelos, teniendo como genotipo *wild type* A/A a los que presentan el alelo común A, los genotipos heterocigotos y homocigotos A/C y C/C, respectivamente, de acuerdo a la presencia del alelo variante C (124).

Estas variables se emplearon para el estudio de la asociación entre las tasas de supervivencia o recaída en conjunto con los genotipos. La supervivencia global se calculó como el tiempo desde la fecha del diagnóstico hasta la ocurrencia de la muerte o al final del seguimiento. La supervivencia libre de eventos se calculó como el tiempo transcurrido desde la fecha de la remisión completa hasta la aparición de la primera recaída, considerada como evento adverso en la evolución clínica de la LLA. Los pacientes que no asistieron mas a la consulta del Servicio de Hematología se consideraron censurados. Para elaborar el análisis estadístico de la supervivencia global y libre de evento, se empleó el estimador de Kaplan–Meier, método no paramétrico de la función de supervivencia. Se utilizó el test Log- Rank para contrastar las hipótesis de las curvas de las supervivencias. El programa utilizado fue el Software Libre Estadístico R

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Distribución poblacional de pacientes con leucemia

Los 122 pacientes diagnosticados con leucemia en el Servicio de Hematología del HUC fueron clasificados en base al tipo de leucemia, observándose una distribución variada de sus frecuencias (Figura 15).

Los pacientes con LLA representaron 47,5 % de la población estudiada, seguidos de los pacientes con LMA, los cuales representaron un 24,5 %. Se observó en este estudio que las leucemias de tipo agudas fueron más frecuentes con respecto a las leucemias de tipo crónicas, evidenciándose según las frecuencias obtenidas, que los pacientes con LMC representaron un 18,9 % y los pacientes con LLC un 4,9 %. La tricoleucemia (leucemia de células peludas) en conjunto con la leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) representaron una menor proporción de casos, con frecuencias de 3,3 % y 0,8 % respectivamente.

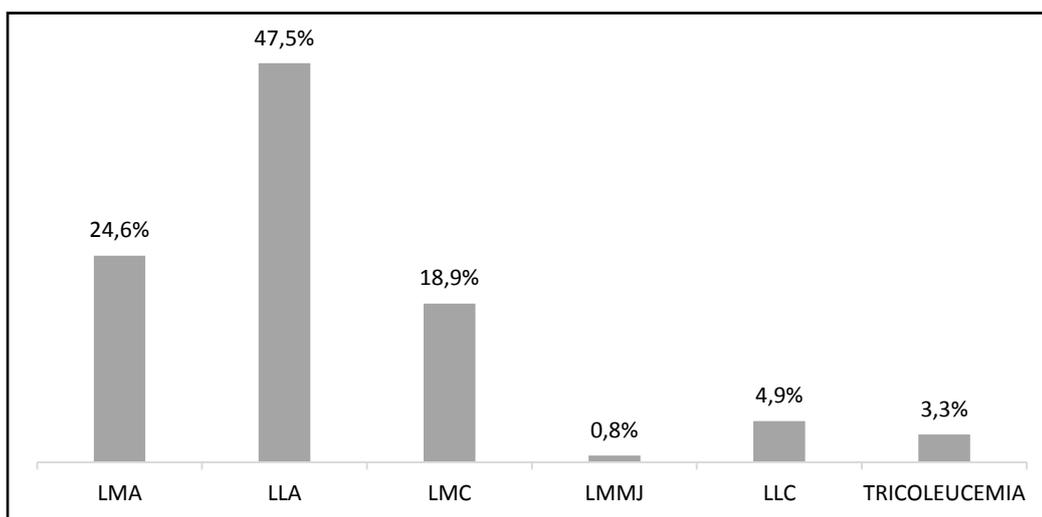


Figura 15. Distribución poblacional en base al tipo de leucemia de los pacientes del Hospital Universitario de Caracas.

La media de la edad de los pacientes estudiados fue 29,5 años y el rango de edades estuvo comprendido desde 11 meses hasta 76 años. En cuanto al sexo de la población estudiada, se evidenció una incidencia mayor del sexo masculino (71 pacientes) en comparación al sexo femenino (51 pacientes), representado en la tabla 11.

Tabla 11. Distribución de los pacientes con leucemia según el tipo de leucemia, la edad y el sexo.

Tipo de leucemia	Promedio de edad (rango)	Sexo	
		F	M
LLA	16,8 años (1 - 74)	28	30
LMA	34,7 años (3 - 76)	12	18
LMC	44,5 años (22 - 67)	7	16
LLC	59,6 años (41 - 74)	3	3
Tricoleucemia	47,3 años (40 - 56)	1	3
LMMJ	11 meses		1

4.2 Detección molecular de transcritos quiméricos de las translocaciones cromosómicas por medio de la técnica RT-PCR

Las muestras fueron recolectadas en pacientes en distintas fases de tratamiento quimioterapéutico: inducción, consolidación y mantenimiento. Los pacientes con leucemia mieloide crónica por tener un protocolo de tratamiento continuo con inhibidores de tirosina kinasa, supone variaciones en los resultados obtenidos en la determinación por medio de RT-PCR de los transcritos quiméricos codificados por las translocaciones *BCR-ABL* t(9;22)(q34;q11), ya que la presencia del mismo es detectable en el inicio de la enfermedad y/o diagnóstico, siendo blanco de las terapias farmacológicas. Con respecto a los transcritos *PML-RAR α* t(15;17)(q24;q21) y *TEL-AML1* t(12,21)(p13;q22), se estudiaron en los

pacientes con leucemia promielocítica aguda y leucemia linfoblástica aguda, respectivamente; ya que ellos juegan un rol importante en el monitoreo de la respuesta al tratamiento.

4.2.1 BCR-ABL

Los transcritos quiméricos *BCR-ABL* obtenidos a partir del aislamiento de ARNt y su posterior amplificación con la PCR de transcripción reversa (RT-PCR) se observan en las figuras 16 y 17. Las muestras de los pacientes fueron recolectadas sin distinción de la fase de la enfermedad para todos los tipos de leucemia. Se obtuvo 7 muestras positivas para este transcrito de un total de 23 pacientes con LMC, de los cuales sólo un paciente estaba recién diagnosticado. Los demás pacientes positivos iniciaban tratamiento quimioterapéutico con Imatinib (Glivec), un inhibidor de tirosina kinasa. Los transcritos encontrados fueron el b2a2 (4 pacientes) y el b3a2 (3 pacientes), ambos codifican para la proteína 210KDa de Bcr-Abl. En la figura 16 se puede observar la amplificación de una muestra positiva para este transcrito b3a2 de un paciente con LMC. En cuanto a la evolución clínica de estos pacientes solo dos han fallecido y el resto se encuentra en respuesta completa para la actualidad.

Se estudió este oncogen también en los pacientes con LLA, resultando positivos 6 muestras, cuyos pacientes fueron clasificados con el subtipo “alto riesgo”. El transcrito encontrado en las muestras de pacientes con LLA fue b2a2, que codifica la proteína de 210 KD de Bcr/Abl. En la figura 17 se visualiza la amplificación del transcrito b2a2 en un paciente con LLA, el resto de las muestras dieron negativas para dicho oncogen. El grupo de pacientes positivos corresponde a 4 niños y 2 adultos, de los cuales un niño y un adulto fallecieron, un paciente adulto se encuentra en recaída y los otros niños restantes están en remisión completa.

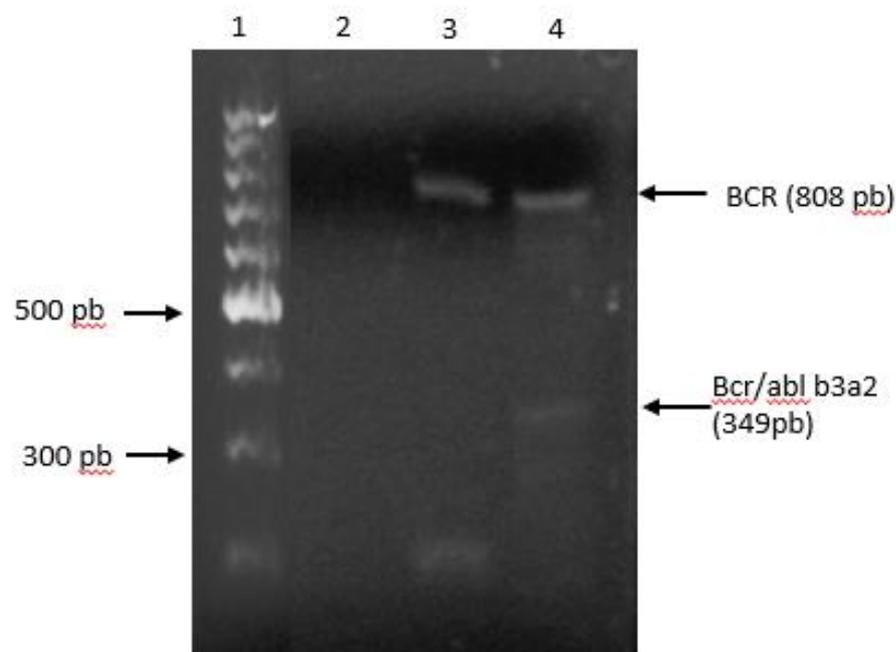


Figura 16. Imagen de la electroforesis de los productos de amplificación por RT-PCR de *BCR-ABL* de pacientes diagnosticados con leucemia mieloide crónica. En el carril 1 se observa el marcador de tamaño molecular de 100 pb, el carril 2 es un control negativo de la reacción en cadena de la polimerasa y en el carril 3 un paciente negativo para la transcrito. Se observó la presencia de la amplificación del transcrito de un solo paciente (carril 4) el transcrito b3a2 del gen *BCR-ABL*.

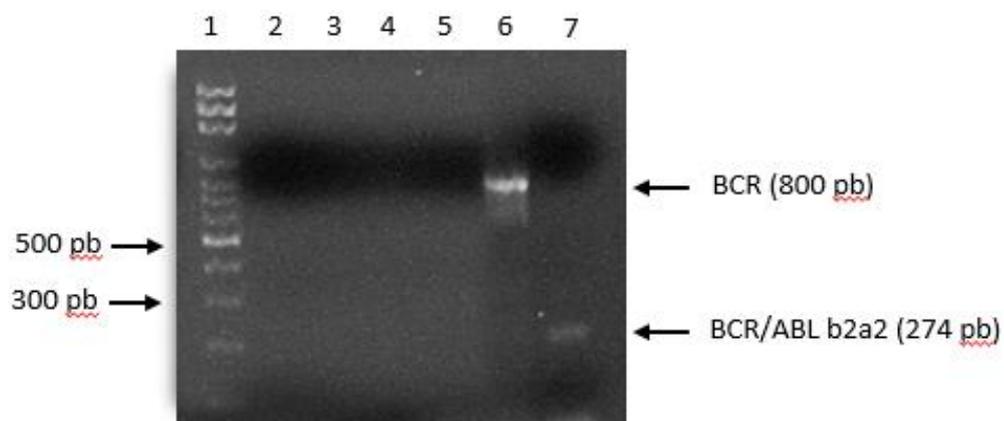


Figura 17. Imagen de la electroforesis de los productos de amplificación por RT-PCR de *BCR-ABL* de pacientes diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb, el carril 2 es un control negativo de la reacción de cadena de la polimerasa, los carriles 3 a 6 corresponden a pacientes negativos para el oncogén. En el carril 7 se evidencia la amplificación del transcrito b2a2 del gen *BCR-ABL* en un paciente con LLA.

4.2.2 *PML-RAR α*

Se realizó la determinación de los transcritos *PML/RAR α* a partir del ARNt aislado de 9 pacientes con LMA M3 (Leucemia Promielocítica Aguda, LPA), casi todos bajo tratamiento quimioterapéutico, a excepción de un solo paciente que se encontraba recién diagnosticado para el momento de la toma de la muestra. De los resultados obtenidos, sólo un paciente se encontraba positivo para el transcrito BCR1 (214 pb), cuya muestra fue tomada al momento del diagnóstico. En la figura 18 se visualiza la amplificación del transcrito BCR1 en un paciente con LPA, los demás pacientes resultaron negativos. El paciente que presentó el transcrito BCR1 se encuentra actualmente en remisión completa. Cabe destacar que este transcrito es detectable al inicio de la enfermedad, y permite corroborar el diagnóstico morfológico. A partir del inicio del tratamiento quimioterapéutico de ATRA (ácido transretinóico) en pacientes con LPA, se inhibe el transcrito *PML-RAR α* , siendo indetectable a través de esta metodología, empleándose a su vez para el monitoreo de la respuesta al fármaco. Los pacientes que resultaron negativos para la detección de este transcrito se encontraban en las fases de mantenimiento y consolidación de la quimioterapia, recibiendo el protocolo de tratamiento de LPA.

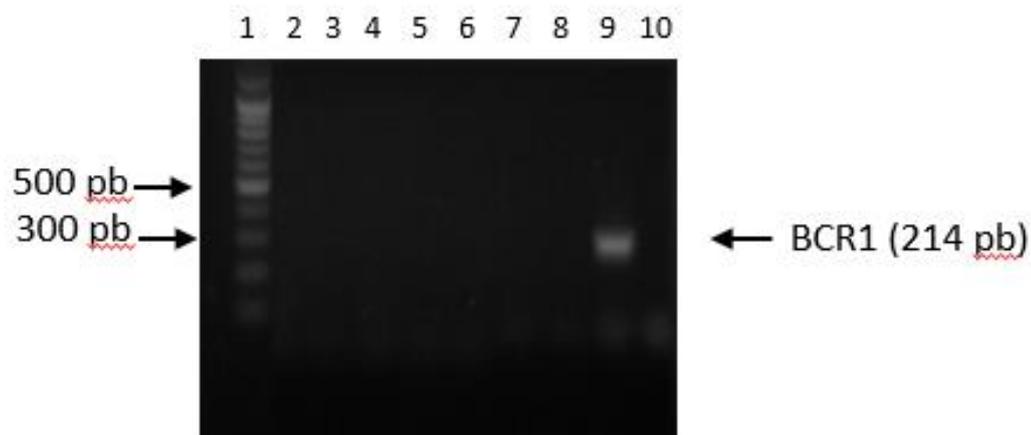


Figura 18. Imagen de electroforesis de gel de agarosa de los productos de amplificación por RT-PCR de *PML-RAR α* de pacientes diagnosticados con leucemia promielocítica aguda. En el carril 1 se encuentra el marcador de tamaño molecular de 100 pb, los carriles 2 a 8 no evidencian amplificación en esas muestras. El carril 9 se evidencia la amplificación de BCR1 de 214 pb en un paciente positivo. El carril 10 contiene el control negativo de la reacción de cadena de la polimerasa.

4.2.3 *TEL-AML1*

La determinación del transcrito *TEL-AML1* fue realizada a todos los pacientes con LLA de células B de 1 a 14 años, debido a que es un reordenamiento quimérico que ha sido descrito para este tipo de leucemia y con una mayor incidencia en este grupo etario. A partir del ARNt de 33 muestras de LLA de células B en diferentes fases de tratamiento farmacológico se realizó RT-PCR para la amplificación del transcrito *TEL-AML1*. Los resultados mostraron 6 pacientes positivos para el transcrito *TEL-AML1* de 271 pb. La figura 19 muestra la amplificación del transcrito en un paciente positivo. La presencia de este transcrito ha sido asociada en diferentes estudios como un marcador de buen pronóstico en pacientes con LLA del tipo B, siendo solicitado dentro del panel diagnóstico y de seguimiento en estos pacientes. Es importante destacar que los pacientes que presentaron el transcrito *TEL-AML1* se encuentran actualmente en remisión completa.

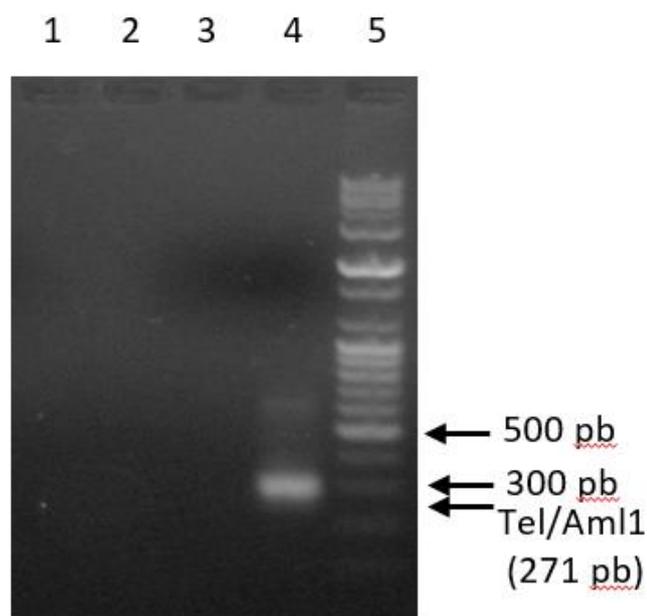


Figura 19. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa de los productos de amplificación por RT-PCR de *TEL-AML1* de pacientes diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda. En los carriles 1, 2 y 3 no se observó amplificación, resultando negativos. El carril 4 muestra la amplificación del transcrito *TEL-AML1* de 271 pb de un paciente y el carril 5 se encuentra el marcador de tamaño molecular de 100 pb.

4.3 Análisis de los exones 5, 6, 7 y 8 del Gen Supresor de Tumores TP53 en pacientes con leucemia

El análisis del gen *TP53* fue realizado en 22 pacientes con leucemia y 10 controles sanos con el fin de evaluar la presencia de mutaciones y polimorfismos genéticos. Se realizó la amplificación de los exones 5, 6, 7 y 8 del gen *TP53* a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estandarizada para cada exón. Posteriormente, las muestras fueron secuenciadas en el servicio de secuenciación de ADN de la Unidad de Estudios Genéticos y Forenses (UEGF) del IVIC, y en el servicio de secuenciación del Instituto de Biociencias de la UNESP, campus Botucatu (Sao Paulo, Brasil).

En las figuras 20, 21, 22 y 23 se presentan las imágenes fotografiadas de las electroforesis en gel de agarosa al 2%, visualizadas con Bromuro de Etidio de las amplificaciones correspondientes de cada exón del gen *TP53* de pacientes y controles. Las muestras que no amplificaron se repitieron posteriormente.

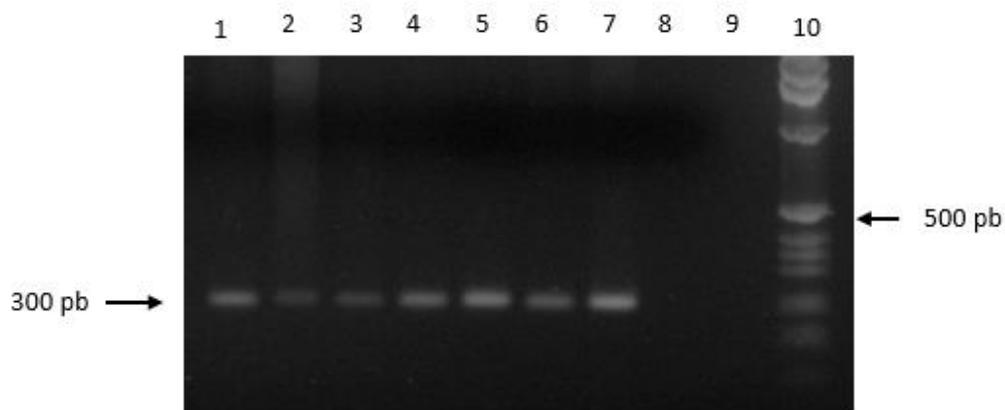


Figura 20. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa de los productos de amplificación del Exón 5 del gen *TP53*. Los carriles 1 al 7 presentan los amplicones correspondientes al exón 5 de 300 pb, en el carril 8 no hubo amplificación y el carril 9 se encuentra el control negativo de la reacción de cadena de la polimerasa. El carril 10 muestra el marcador de tamaño molecular de 100 pb.

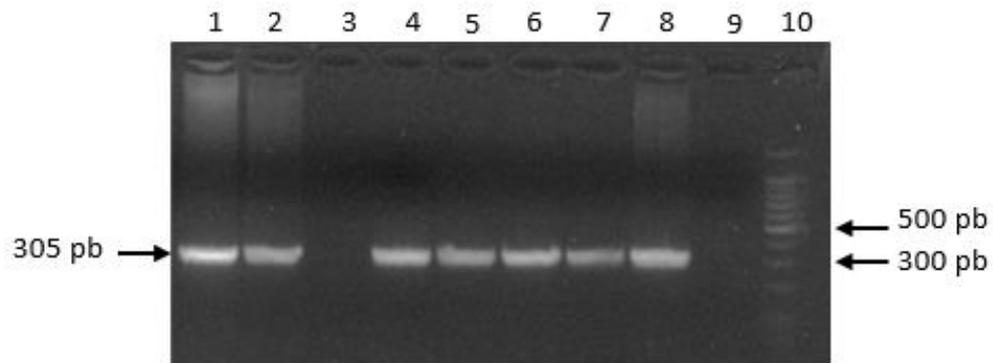


Figura 21. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa de los productos de amplificación del Exón 6 del gen *TP53*. Los carriles 1, 2, 4, 5, 6, 7, y 8 presentan el amplicón correspondiente al exón 6 de 305 pb. En el carril 3 no se observó amplificación de esa muestra, el carril 9 es el control negativo de la reacción de cadena de la polimerasa, el carril 10 muestra el marcador de tamaño molecular de 100 pb.

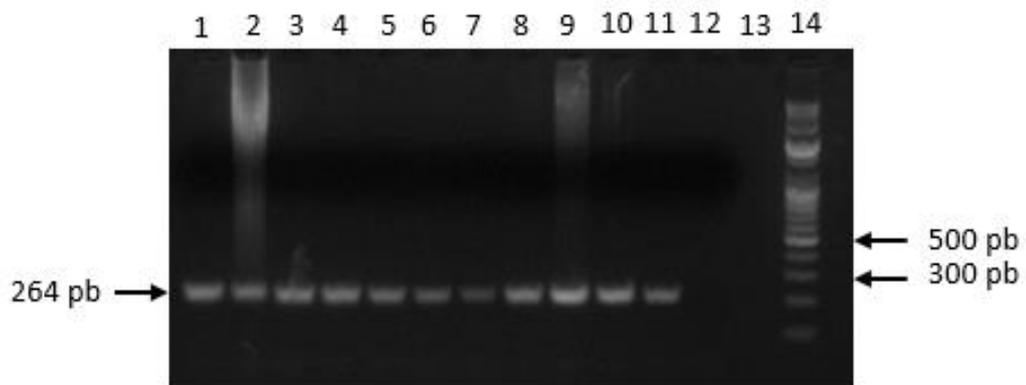


Figura 22. Imagen de electroforesis de gel de agarosa de los productos de amplificación del Exón 7 del gen *TP53*. Los carriles 1 al 11 presentan el producto de amplificación del exón 7 de 264 pb, en el carril 12 se ubicó el control negativo de la reacción de cadena de la polimerasa, el carril 13 no contenía producto de reacción. El carril 14 muestra el marcador de tamaño molecular de 100 pb.

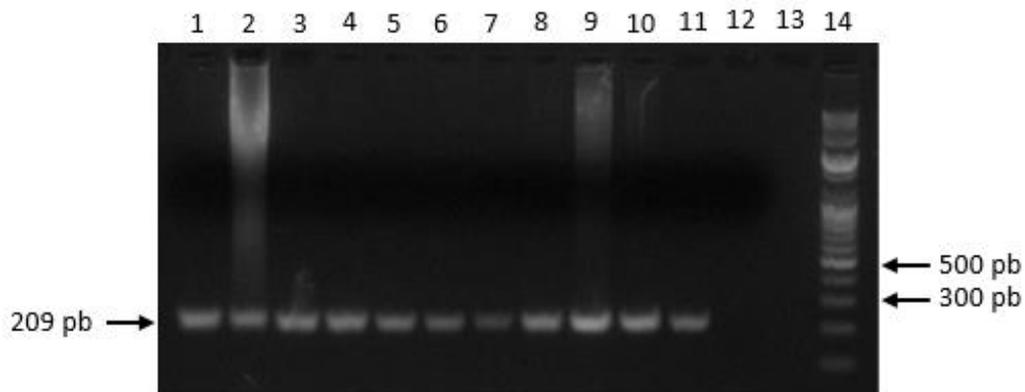


Figura 23. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa de los productos de amplificación del Exón 8 del gen *TP53*. Los carriles 1 al 11 presentan el producto de amplificación del exón 8 de 209 pb, en el carril 12 se ubicó el control negativo de la reacción de cadena de la polimerasa, el carril 13 no contenía producto de reacción. El carril 14 muestra el marcador de tamaño molecular de 100 pb.

Los resultados obtenidos de la secuenciación de productos de PCR de los exones del gen *TP53* fueron analizados utilizando dos software, Geneious Basic 4.8.5 y BioEdit v7.2.5, permitiendo así la alineación de las secuencias de las muestras con las secuencias de referencia del gen *TP53*.

Se encontró la presencia de dos mutaciones en tres pacientes con leucemia, ubicadas en el exón 6 y en el exón 7, correspondientes a los pacientes 7c, 8c, y 16b. Cabe destacar que en la población control no se presentaron mutaciones en los exones analizados.

La mutación c.753_754ins1 fue encontrada en el exón 7 y detectada en los pacientes 7c y 8c diagnosticados con LLA. Ésta es una inserción ubicada en la secuencia de ADN que codifica el codón 252, provocando un cambio del aminoácido leucina a histidina, que se encuentra en la región del dominio de unión al ADN de la proteína p53. En la figura 24, se presenta un electroferograma de la secuencia de ADN analizada del paciente 7c, en la que se puede visualizar la inserción del nucleótido adenina que origina la mutación c. 753_754ins1. Es importante destacar que la evolución clínica de ambos pacientes fue desfavorable, el paciente 7c (14 años, masculino) tuvo una recaída posterior al protocolo de inducción y falleció; el paciente 8c (12 años, masculino) también falleció durante su tratamiento quimioterapéutico.

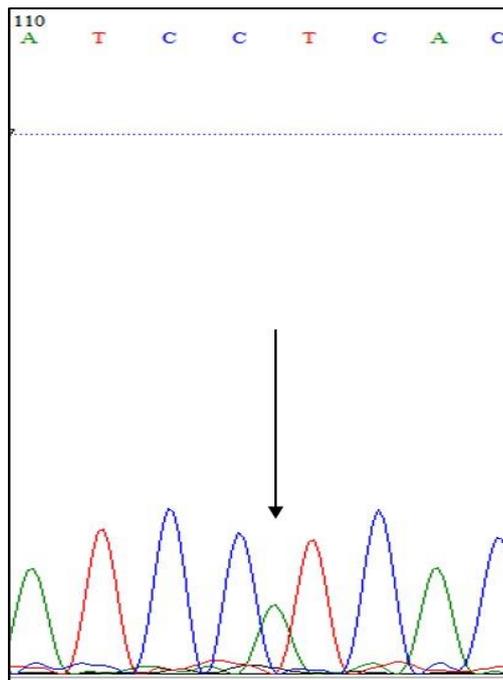


Figura 24. Electroferograma de la secuencia de un paciente con la mutación c.753_754ins en el exón 7 del gen *TP53*. Se visualiza la inserción de adenina que produce la mutación c. 753_754ins1 señalada por la flecha. Secuencia analizada por el software BioEdit Sequence alignment editor.

La mutación c.570T<C ubicada en el exón 6 y detectada en el paciente 16b, es una sustitución de tipo silente (p.P190P) que afecta el codón 190 que codifica el aminoácido prolina. Este paciente de 74 años, masculino diagnosticado con leucemia linfocítica crónica, se encontraba bajo tratamiento quimioterapéutico, sin embargo, no se le pudo seguir su evolución clínica debido a que no asistió más al Servicio de Hematología.

En la figura 25, se presentan dos secuencias del exón 6 con el fin de realizar la comparación entre una secuencia *wild type* de referencia y la secuencia del paciente 16b. En la sección A se presenta una secuencia *wild type* CCT que codifica para el codón 190 (prolina). La mutación c.570T<C del codón 190 encontrada se evidencia en la sección B, señalada por una flecha en el pico donde se visualiza el lugar de la mutación, observándose el heterocigoto T/C.

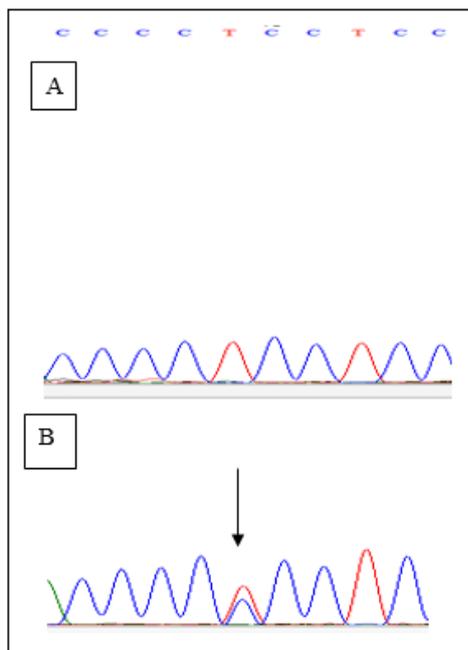


Figura 25. Electroferograma de la secuencia del exón 6 del gen *TP53*. **A**, imagen de electroferograma de una secuencia *wild type*. **B**, imagen de la secuencia mutada correspondiente al paciente 16b que muestra la mutación c.570T<C señalada por la flecha en el pico donde se observan los nucleótidos T/C. Secuencia analizada por el software BioEdit Sequence alignment editor.

A continuación, en la tabla 12 se representan las mutaciones del gen *TP53* encontradas e identificadas en dos pacientes con LLA y un paciente con LLC.

Tabla 12. Mutaciones en el gen *TP53* detectadas en pacientes con leucemia.

Pacientes	Mutación	Mutación de aminoácido	Exón	Tipo de mutación	Nucleótidos mutados	Codón mutado
7c (LLA) 8c (LLA)	c. 753_754ins1	p.L25fs*12	7	Inserción (Frameshift)	CTC>CAT	252
16b (LLC)	c.570T<C	p.P190P	6	Silente	CCT>CCC	190

También se encontraron polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) en el grupo de pacientes y en la población control. En la tabla 13, se muestran los SNPs detectados y su distribución en los pacientes y controles. El SNP rs162589 (174) ubicado en el intron-6, fue el más frecuente en la población estudiada,

detectándose en 14 pacientes y 4 controles. Siguiendo el orden decreciente se encuentra el SNP rs1642786 (90) ubicado en la región intron-7, fue detectado en 7 pacientes con leucemia y el SNP rs12947788 (176) ubicado en la región intron-7 fue detectado en 2 pacientes con leucemia y 2 controles sanos.

Tabla 13. SNPs del gen *TP53* encontrados en pacientes con leucemia y controles sanos.

Ubicación	SNP (RefSNP)	Descripción del ADNc (NM_0000546.5)	Alelos	Muestras
Intron-6	rs1625895	c.672+62A>G	G/A	14 pacientes (63,3%) 4 controles (40%)
Intron-7	rs12947788	c.782+72C>T	C/T	2 pacientes (9%) 2 controles (20%)
Intron- 7	rs1642786	c.782+59T>G	T/G	7 pacientes (31,8%) No detectado en controles (0%)

NM_0000546.5 NCBI Reference Sequence

En la tabla 14, se expresan los SNPs del gen *TP53* encontrados en los pacientes y en los controles, clasificados según el tipo de leucemia y la información de la evolución clínica, con el fin de visualizar si existe alguna relación entre la presencia de estos polimorfismos y la evolución clínica.

El SNP rs1625895 fue detectado en 9 pacientes con LLA, en 3 pacientes con LMA, en un paciente con LMC, en un paciente con LLC y en 4 controles. De acuerdo a la evolución clínica, 6 pacientes fallecieron y 7 se encuentran en remisión completa, manteniendo similitud entre ambos tipos de pronósticos, y se desconoce la evolución de un paciente por no asistir más al servicio. EL SNP rs12947788 se encontró en dos pacientes, uno con LLA y el otro con LLC

fallecidos y en dos controles. El SNP rs1642786 (114) fue detectado en 3 pacientes con LLA, en uno con LMC, en uno con LLC, en uno con LMA y en uno con tricoleucemia, 3 de ellos están fallecidos y los otros 4 se encuentran en estado de remisión completa.

Tabla 14. Distribución de SNPs del gen *TP53* en los pacientes con leucemia.

SNP del gen <i>TP53</i>	Tipo de leucemia	Evolución clínica (n)
rs1625895	LLA	Fallecidos (4) Recaídas (3) Remisión completa (5)
	LLC	Fallecido (1)
	LMC	Respuesta completa (1)
	LMA	Fallecido (1) Remisión completa (1) Desconocido (1)
rs12947788	LLA	Fallecido (1)
	LLC	Fallecido (1)
rs1642786	LLA	Fallecido (2) Remisión completa (1) Recaída (1)
	LLC	Fallecido(1)
	LMA	Remisión completa (1)
	LMC	Respuesta completa (1)
	Tricoleucemia	Remisión completa (1)

n: número de pacientes.

A continuación se muestran las imágenes de los electroferogramas de las secuencias que presentan los SNPs detectados en la población estudiada. Para realizar los análisis se utilizaron las bases de datos de *TP53* www.p53.bii.a-star.edu.sg y dbSNP Short Genetic Variations www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/.

En la figura 26 se puede observar el electroferograma de la secuencia que se corresponde a la región intrónica -7 del gen *TP53*, donde se evidenció la presencia del SNP rs12947788, en pacientes y controles. Se observa el pico con ambos nucleótidos del polimorfismo C/T.

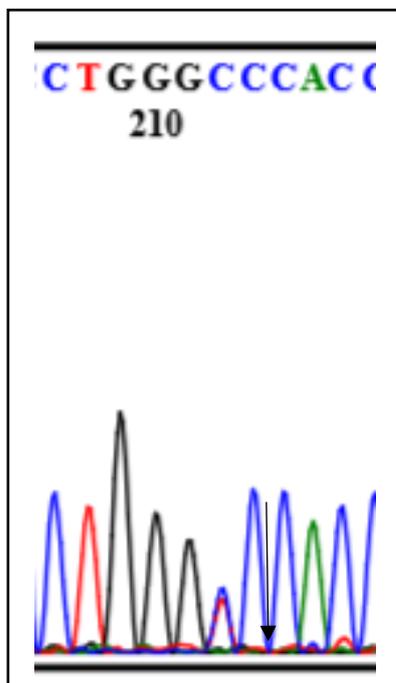


Figura 26. Electroferograma de la secuencia intrónica-7 del gen *TP53*. Se evidencia la presencia de un pico que contiene superpuesto los dos nucleótidos del SNP rs12947788 ubicado en c.782+72C>T, encontrado en pacientes y controles. Secuencia analizada por el software BioEdit Sequence alignment editor

La figura 27 permite observar un análisis de la secuencia consenso, conformado por la secuencia de un paciente con leucemia 12b (C3_003) y la secuencia referencia GenBank NG_017013. Aquí se pudo identificar el polimorfismo rs1625895 ubicado en la región del intron-6 del gen *TP53*. Este polimorfismo A/G fue hallado en pacientes y controles estudiados mencionados en la tabla 15.

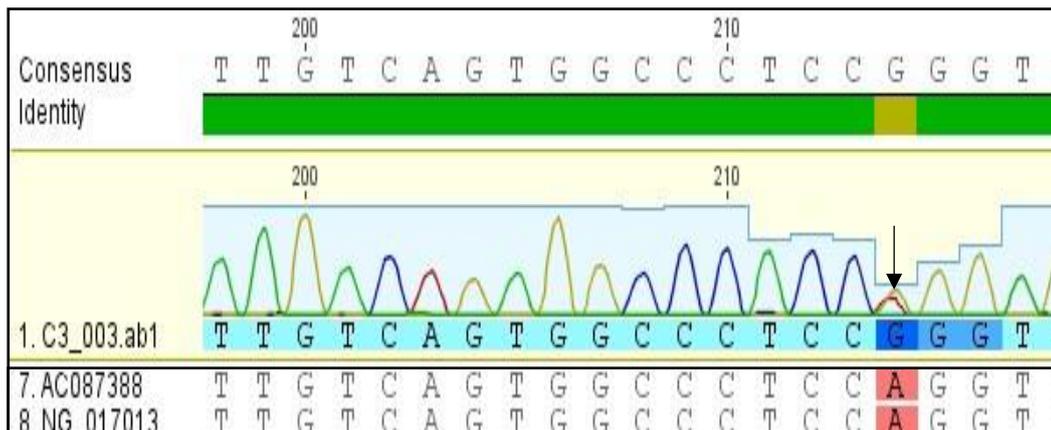


Figura 27. Análisis de electroferograma y secuencia consenso del SNP rs1625895 ubicado en la región intron-6 del gen *TP53*. La flecha indica el pico integrado por los nucleótidos A/G. Software Geneious Basic 4.8.5.

El último polimorfismo encontrado en este estudio está ubicado en la región intron-7 del gen *TP53*, denominado rs1642786. En la figura 28 se observa el electroferograma del análisis de secuencia de ADN y la alineación de la secuencia consenso formado por la secuencia del paciente (30_002) y la de referencia de GenBank U94788. La imagen permite identificar el cambio de nucleótido G/T del polimorfismo c.782+59T>G.

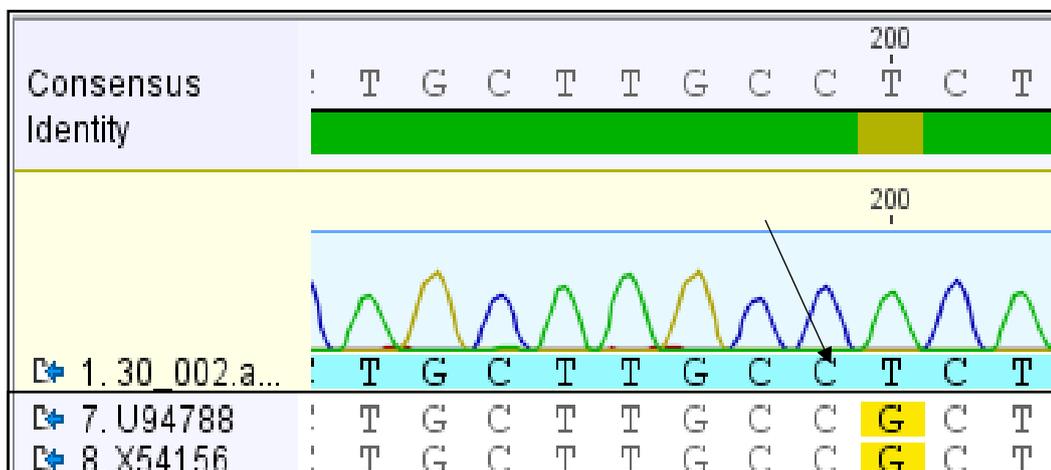


Figura 28. Análisis de electroferograma y secuencia consenso del SNP rs1642786 ubicado en la región intron-7 del gen *TP53*. La flecha indica el pico integrado por los nucleótidos G/T. Software Geneious Basic 4.8.5.

4.4 Análisis de los genes *NRAS* y *KRAS* en pacientes con leucemia

Se estudió la presencia de mutaciones en las regiones que codifican para los codones 12,13 y 61 del gen *NRAS* y para los codones 12 y 61 del gen *KRAS* en 17 pacientes con leucemia.

Debido a las limitaciones presentadas para realizar la secuenciación de ADN en el país, se seleccionó un grupo pequeño de pacientes con diferentes tipos de leucemia: LMA, LLA, LMC y el único paciente con LMMJ, con la finalidad de evaluar el espectro de mutaciones en estos genes de las muestras de pacientes venezolanos. Se realizó la estandarización de la amplificación por PCR de los genes *NRAS* y *KRAS* cuyas regiones incluyeron las secuencias que codifican los codones de interés, con los pares de oligonucleótidos descritos en la metodología.

Con respecto al gen *NRAS*, se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en las figuras 29 y 30, observándose la imagen de la electroforesis en gel de agarosa al 2%, tratado con Bromuro de Etidio y visualizado con luz UV, en el que se aprecian las amplificaciones de PCR correspondientes al amplicón del gen *NRAS* codón 12,13 (116pb) y *NRAS* codón 61 (112 pb), respectivamente.

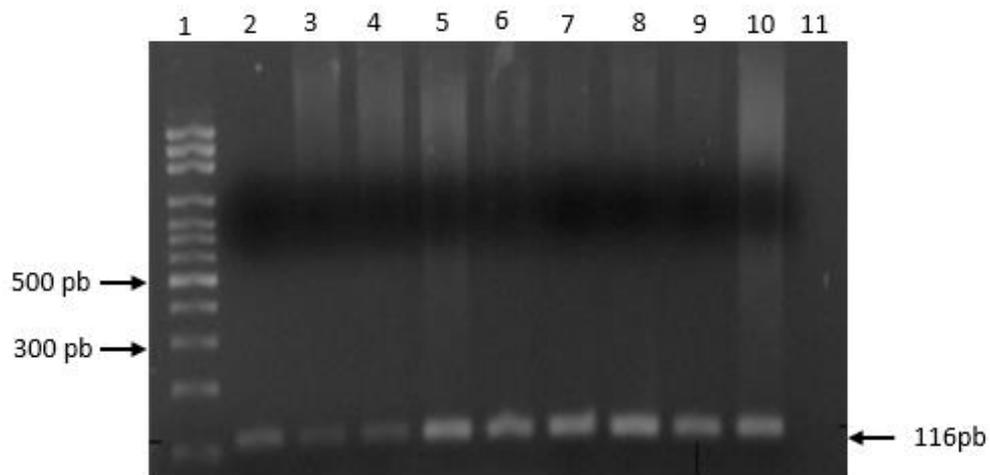


Figura 29. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación del gen *NRAS*. En el carril 1 se observa el marcador de tamaño molecular de 100 pb. En los carriles 2 al 10 se observan la amplificación de los productos de PCR del gen *NRAS*, en la secuencia que codifica para los codones 12,13 en pacientes con leucemia. En el carril 11 se encuentra el control negativo de la reacción de cadena de la polimerasa.

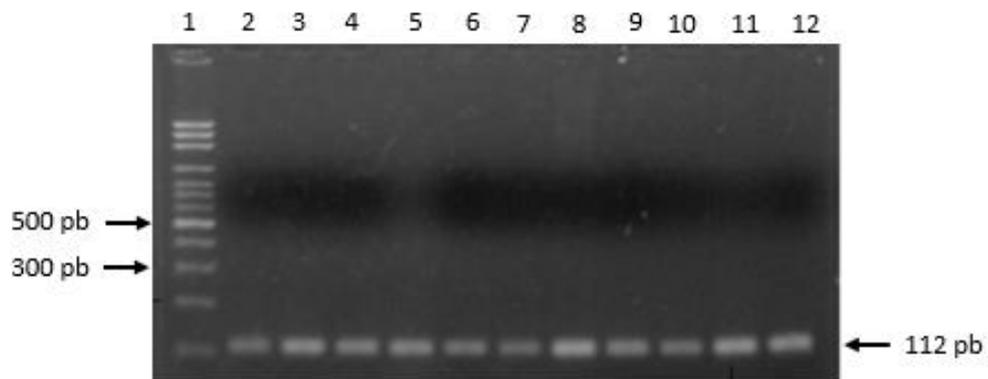


Figura 30. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación del gen *NRAS*. En el carril 1 se observa el marcador de tamaño molecular de 100 pb. En los carriles 2 al 12 se observan la amplificación de los productos de PCR del gen *NRAS*, en la secuencia que codifica para el codón 61 en pacientes con leucemia

Los resultados obtenidos de las amplificaciones de los productos de PCR del gen *KRAS* de los pacientes con leucemia estudiados se presentan en las figuras 31 y 32. Se muestran las electroforesis en gel de agarosa al 2%, tratados con Bromuro de Etidio y visualizados con luz UV de ambas secuencias de interés del gen *KRAS*, es decir, las regiones que codifican para los codones 12 y 61.

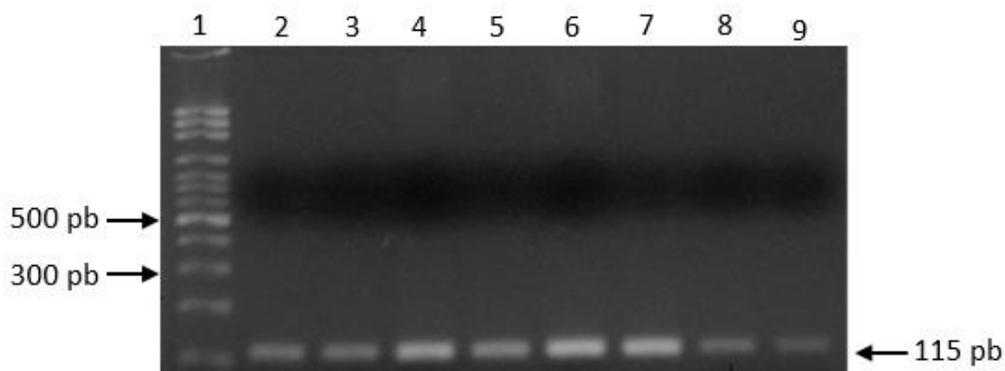


Figura 31. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación del gen *KRAS*. En el carril 1 se observa el marcador de tamaño molecular de 100 pb. En los carriles 2 al 12 se observan la amplificación de los productos de PCR del gen *KRAS*, en la secuencia que codifica para el codón 12 en pacientes con leucemia.

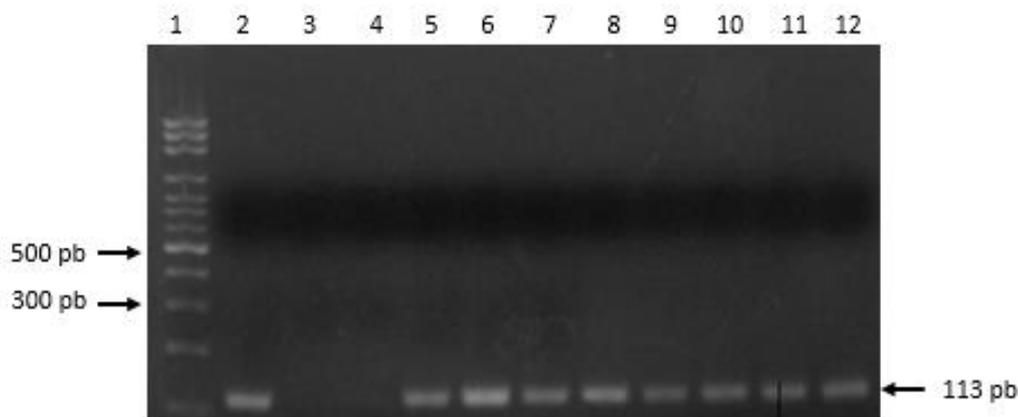


Figura 32. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación del gen *KRAS*. En el carril 1 se observa el marcador de tamaño molecular de 100 pb. En los carriles 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 se observan la amplificación de los productos de PCR del gen *KRAS*, en la secuencia que codifica para el codón 61 en pacientes con leucemia. Los carriles 2 y 3 no presentaron productos de amplificación, estas muestras fueron repetidas posteriormente.

Todos los productos amplificados por la PCR fueron secuenciados con el fin de conocer la presencia de mutaciones en los codones de *NRAS* y *KRAS*. Los resultados del análisis de las secuencias mostraron solamente una mutación en el gen *KRAS* (codón 12), denominada c.36T>G según la base de datos del catálogo de mutaciones somáticas en cáncer “COSMIC”. Esta es una sustitución de tipo silente (GGT>GGG) que afecta el codón p.G12G, hallada en un paciente con LMA (9 años, masculino) cuya evolución clínica fue desfavorable y falleció.

En la figura 33 se presenta la imagen del análisis de la secuencia entre el paciente que presenta la mutación identificado con la nomenclatura 1.180_ Kcd y la secuencia de referencia GenBank AF285779, en la que evidencia la sustitución del nucleótido timina por guanina.

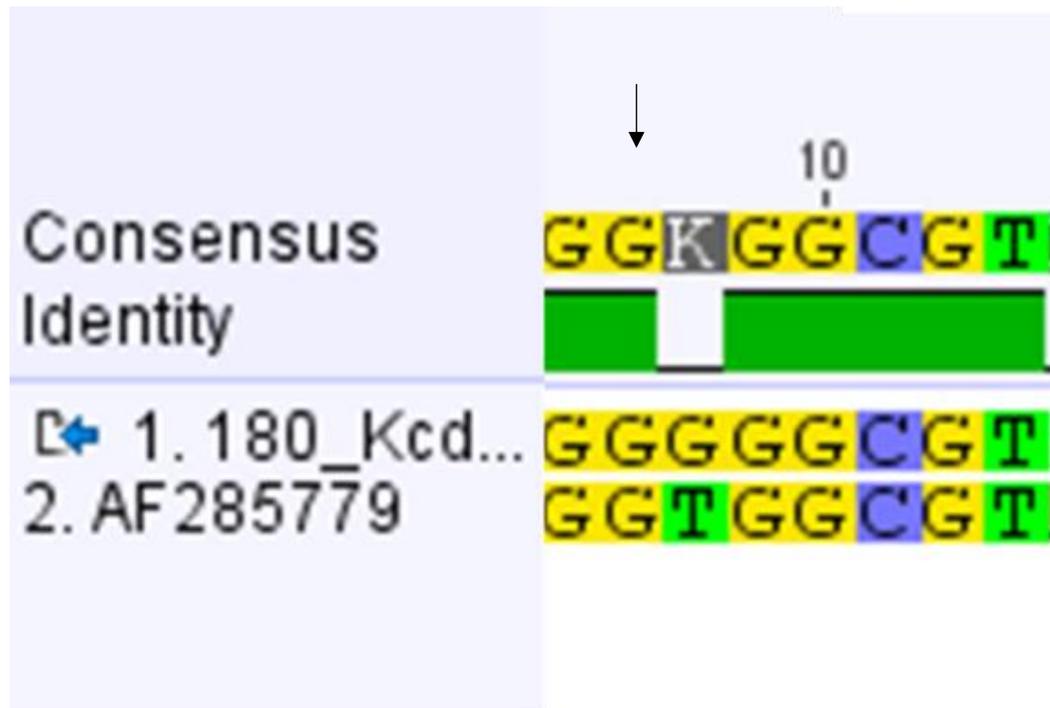


Figura 33. Análisis de la secuencia del gen *KRAS* codificante para el codón 12 de un paciente con LMA (1.180_Kcd). Se evidencia la sustitución de timina por guanina señalada por la flecha. Software Geneious Basic 4.8.5.

Al resto de los pacientes estudiados (16) que corresponde al 94,1% del total, no se les detectó ninguna alteración en sus secuencias de ADN de los genes *NRAS* y *KRAS*. Estos resultados permiten estimar que solo el 5,9% de las muestras estudiadas presentó una mutación en el gen *RAS*.

4.5 Evolución clínica de los pacientes con leucemia

Con el fin de conocer la evolución y la respuesta al tratamiento de los pacientes estudiados, se recolectó la información de las diferentes variables suministrada por los médicos hematólogos tratantes a través de un instrumento de recolección de datos. La información suministrada corresponde a la evolución clínica de los 122 pacientes desde el mes de junio del año 2011 cuando se inició el período de toma de muestra hasta el mes de abril del año 2016.

En la tabla 15 se muestran los datos de la evolución clínica durante el período de estudio, evidenciándose que 74 de los pacientes estudiados se encuentran en remisión completa, 21 pacientes tuvieron recaída post-inducción y

40 de los pacientes fallecieron. Cabe destacar que 7 pacientes se encuentran desaparecidos para la fecha de la última revisión de historias clínicas, por lo que lamentablemente se desconoce su evolución clínica. La remisión completa alcanzada por los pacientes estudiados, se refiere a que respondieron satisfactoriamente a los protocolos quimioterapéuticos. Este estado es determinado por el médico hematólogo a través del monitoreo del análisis de la morfología hematológica, citogenética y molecular de manera periódica.

De los 40 pacientes fallecidos durante el período de estudio, ocho pacientes de este grupo presentaron recaídas post-inducción y dos pacientes manifestaron signos clínicos de toxicidad a la quimioterapia, evidenciándose que estos 10 pacientes manifestaron efectos adversos antes de fallecer, sugiriendo el fracaso terapéutico de los protocolos farmacológicos recibidos.

En cuanto a los episodios de recaída, se pudo conocer que 21 pacientes padecieron recaída post-inducción y posteriormente fueron sometidos a protocolos de rescate. Finalmente, ocho de ellos fallecieron, como fue mencionado anteriormente, tres pacientes entraron en remisión completa, cinco pacientes aún se encuentran en tratamiento, y a dos pacientes se les desconoce su evolución por no asistir más a la consulta.

Debido a las variaciones interindividuales de la respuesta a las drogas administradas en los protocolos quimioterapéuticos, se encontró un grupo de pacientes que presentaron manifestaciones clínicas de toxicidad, teniendo como consecuencia, el ajuste de las dosis y el reemplazo de las drogas en los protocolos. Los 7 casos que presentaron toxicidad en la población estudiada, manifestaron signos clínicos a las siguientes drogas: metotrexato, vincristina, asparaginasa y prednisona. La toxicidad se evidenció con afectación gastrointestinal, renal y del sistema nervioso central (psicosis esteroidea por toxicidad a prednisona). Todos los pacientes que presentaron signos de toxicidad tienen diagnóstico de LLA, dos de ellos fallecieron por los efectos adversos, uno de ellos presentó recaída y consiguiente toxicidad al metotrexato, y el otro paciente manifestó toxicidad a la vincristina. Los otros cuatro pacientes manifestaron toxicidad a la prednisona y a la asparaginasa, los cuales se encuentran en remisión completa actualmente.

Esta información de la evolución clínica fue utilizada para la evaluación de la correlación clínico – molecular entre las mutaciones encontradas en los genes *TP53* y *RAS*, así como para el análisis farmacogenético en conjunto con los resultados de la determinación de los genotipos de *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* y *MTHFR*.

Tabla 15. Evolución clínica de los pacientes con leucemia hasta el período marzo 2016.

Evolución clínica	Pacientes estudiados
1. Remisión completa	74
2. Recaída post-inducción	21
3. Fallecidos	40
4. No determinada	7

*Se desconoce la evolución clínica de 7 pacientes por no asistir a la consulta

4.6 Farmacogenética de polimorfismos de genes que codifican enzimas metabolizadoras de xenobióticos en pacientes con leucemia

4.6.1 Genotipificación del gen Glutatión S- Transferasa

4.6.1.1 GSTM1/GSTT1

Se analizaron 102 muestras de pacientes con leucemia y 322 muestras de controles para conocer los genotipos de los genes *GSTM1* y *GSTT1*, respectivamente. A continuación se muestra en la figura 31 la imagen de la electroforesis en gel de agarosa al 2% tratado con Bromuro de Etidio y visualizado con luz UV.

Como fue descrito en la metodología, se empleó la técnica de PCR-Multiplex para determinar el polimorfismo de estos genes que resulta en la delección de ambos alelos. Los diferentes genotipos obtenidos de los genes *GSTM1* y *GSTT1* se representan de acuerdo a la nomenclatura descrita según la presencia de los alelos o el polimorfismo delecionado. Para el gen *GSTM1*, el genotipo *wild*

type se denomina $GSTM1^+$ y el genotipo deleciónado se denomina $GSTM1^-$. En el gen $GSTT1$ se designan los genotipos de la misma forma, siendo el genotipo *wild type* $GSTT1^+$ y el genotipo deleciónado se denomina $GSTT1^-$.

En la figura 34 se observa la imagen de la electroforesis en gel de agarosa al 2% tratada con Bromuro de Etidio visualizado con luz UV, los productos de amplificación correspondientes a los genes $GSTM1$ (219 pb), $GSTT1$ (480 pb) y *Albúmina* (350 pb). Se empleó el gen de *Albúmina* como control de la PCR-Multiplex.

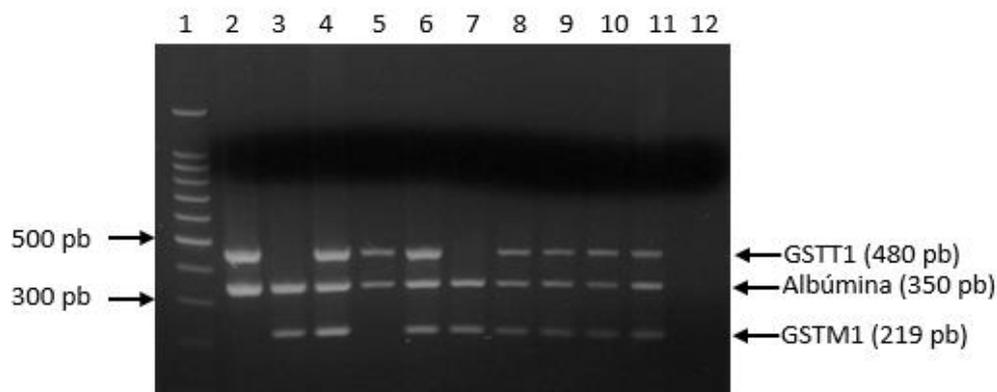


Figura 34. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 2% de los productos amplificados por PCR Multiplex de los genes $GSTM1$, $GSTT1$ y *Albúmina* en pacientes con leucemia. En el carril 1 se observa el marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los carriles 4, 6, 8, 9, 10 y 11 muestran los genotipos $GSTM1^+/GSTT1^+$, los carriles 2 y 5 presentan el genotipo $GSTM1^-/GSTT1^+$, los carriles 3 y 7 presentan el genotipo $GSTM1^+/GSTT1^-$. El carril 12 es el control negativo de la reacción en cadena de la polimerasa.

Así mismo, la representación del genotipo de las muestras estudiadas (pacientes y controles) se representan de acuerdo a los alelos presentes para ambos genes, siendo $GSTM1^+/GSTT1^+$ los homocigotos *wild type* y $GSTM1^-/GSTT1^-$ para el genotipo homocigoto doble nulo.

4.6.1.1.1 Frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos en los genes $GSTM1$ y $GSTT1$ en pacientes con leucemia

A continuación se representan en las tablas 17 y 18 las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en los genes $GSTM1$ y $GSTT1$ respectivamente, dichas frecuencias fueron calculadas sin distinción del tipo de leucemia,

considerando la totalidad de los pacientes estudiados. Los resultados de la población control se expresan en el anexo II. Este método de PCR Multiplex no permite discriminar entre los genotipos *wild type* y heterocigotos, pero es capaz de detectar la delección homocigota de los genes *GSTM1* y *GSTT1*. Por tal motivo, los genotipos son codificados como positivo o presente (*wild type* y delección heterocigota) o, como negativo o nulo (delección homocigota). Esto no permite calcular el equilibrio Hardy Weinberg.

En estos resultados se pudo observar que los alelos nulos *GSTM1*⁻ y *GSTT1*⁻ se presentaron en menor frecuencia (0,343 y 0,284) con respecto a los alelos *wild type* en los pacientes (tabla 16).

Tabla 16. Frecuencia alélica de los genes *GSTM1* y *GSTT1* en los pacientes con leucemia

Alelo	N	Frecuencia	Total
<i>GSTM1</i> ⁺	67	0,657	102
<i>GSTM1</i> ⁻	35	0,343	
<i>GSTT1</i> ⁺	73	0,716	102
<i>GSTT1</i> ⁻	29	0,284	

N: número de pacientes

En cuanto a la distribución de los genotipos combinados de ambos genes, se observó el genotipo homocigoto *wild type* *GSTM1*⁺/*GSTT1*⁺ más frecuente con respecto a los demás 0,470 y el genotipo homocigoto delecionado o doble nulo *GSTM1*⁻/*GSTT1*⁻ se encontró en menor frecuencia 0,099 (tabla 17). El genotipo combinado de ambos genes tuvo una frecuencia de 0,431.

Tabla 17. Frecuencia genotípica de los genes *GSTMI* y *GSTTI* en los pacientes con leucemia

Genotipo	N	Frecuencia
<i>GSTMI</i> ⁺ / <i>GSTTI</i> ⁺	48	0,470
<i>GSTMI</i> ⁻ / <i>GSTTI</i> ⁻	10	0,099
<i>GSTMI</i> ⁺ / <i>GSTTI</i> ⁻	19	0,186
<i>GSTMI</i> ⁻ / <i>GSTTI</i> ⁺	25	0,245
<i>Total</i>	102	

N: número de pacientes

4.6.1.1.2 Distribución poblacional de la frecuencia alélica y genotípica de los genes *GSTMI* y *GSTTI* en base al tipo de leucemia.

Los resultados mostrados en la tabla 18 evidencian que el genotipo *GSTMI*⁺ fue el que predominó en los pacientes con LLA, LMA, LMC y tricoleucemia, a excepción de los pacientes con LLC que presentaron la misma frecuencia de ambos genotipos.

Tabla 18. Distribución poblacional de la frecuencia alélica del gen *GSTMI* en base al tipo de leucemia

	<i>GSTMI</i> ⁺		<i>GSTMI</i> ⁻	
	N	Frecuencia alélica	N	Frecuencia alélica
LLA	30	0,588	21	0,411
LLC	2	0,500	2	0,500
LMA	16	0,640	9	0,360
LMC	17	0,894	2	0,106
TRICOLEUCEMIA	2	0,666	1	0,334

N: número de pacientes

En la tabla 19, se expresan los resultados correspondientes a la distribución de las frecuencias alélicas de *GSTTI* según el tipo de leucemia. Se observó que la

frecuencia del alelo $GSTT1^+$ fue mayor en pacientes con LMC 0,789, mientras el alelo nulo $GSTT1^-$ tuvo una mayor aparición en pacientes con LMA 0,440. Sin embargo, para todos los tipos de leucemia, el alelo $GSTT1^+$ se encontró mas frecuente con respecto al alelo nulo.

Tabla 19. Distribución poblacional de la frecuencia alélica del gen $GSTT1$ en base al tipo de leucemia

	$GSTT1^+$		$GSTT1^-$	
	N	Frecuencia alélica	N	Frecuencia alélica
LLA	38	0,745	13	0,255
LLC	3	0,750	1	0,250
LMA	14	0,560	11	0,440
LMC	15	0,789	4	0,211
TRICOLEUCEMIA	3	1.0	0	0

N: número de pacientes

En las figuras 35 a 39, se muestran las distribuciones genotípicas de los genes $GSTM1$ y $GSTT1$ en base al tipo de leucemia de los pacientes estudiados del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Caracas.

En los pacientes con LLA el genotipo homocigoto *wild type* $GSTM1^+/GSTT1^+$ predominó en este estudio, representando el 43% de este grupo de pacientes. El genotipo homocigoto nulo $GSTM1^-/GSTT1^-$ fue encontrado en 10% de los pacientes, resultando ser el menos frecuente (figura 35).

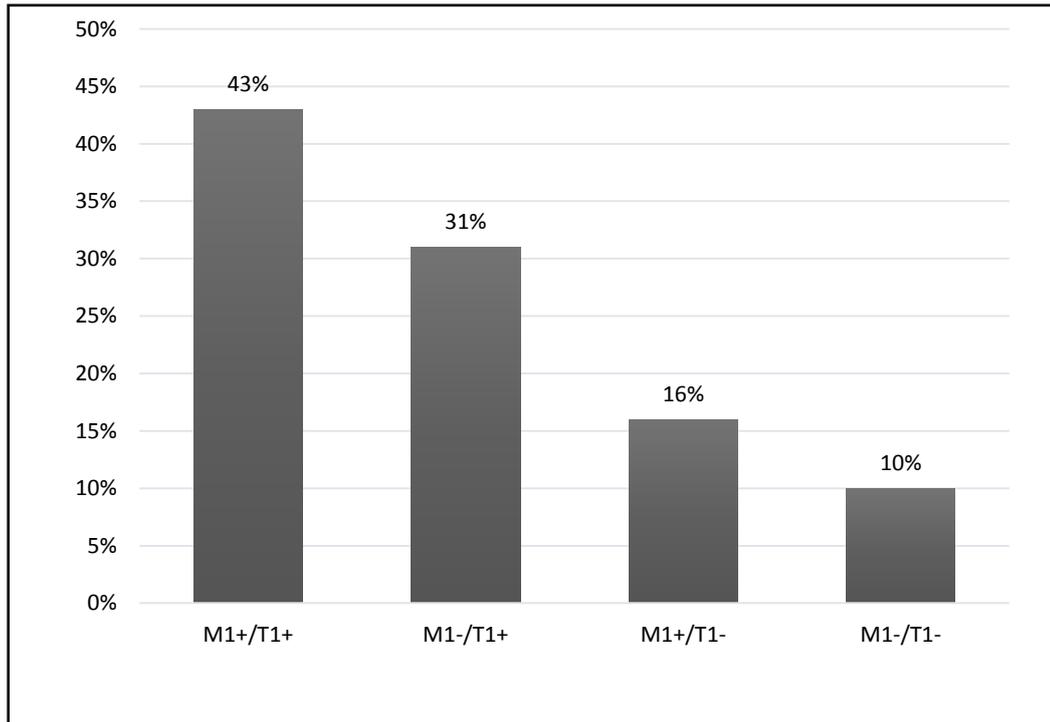


Figura 35. Distribución porcentual de los genotipos de *GSTMI* y *GSTTI* en pacientes con LLA.

En pacientes con LLC, el genotipo que predominó fue el homocigoto *wild type* $GSTMI^+/GSTTI^+$, encontrado en el 50% del grupo estudiado. Es importante destacar que los genotipos combinados $GSTMI^+/GSTTI^-$ no fueron encontrados en ningún paciente con LLC (Figura 36).

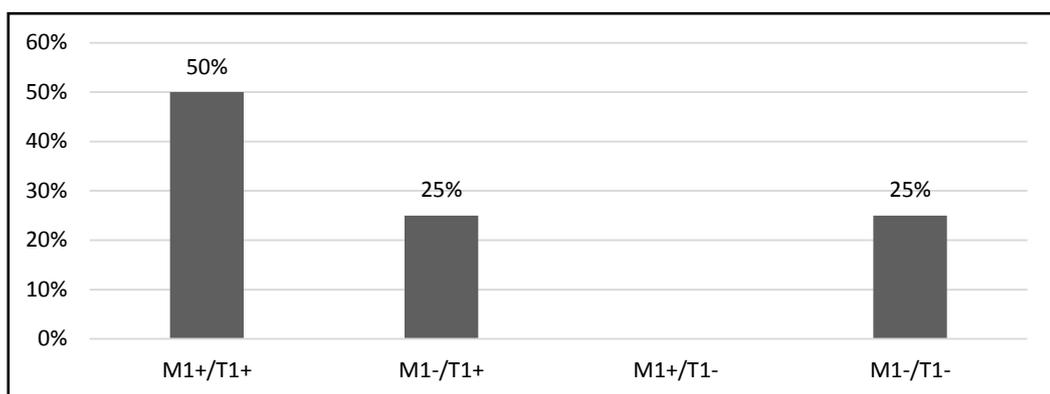


Figura 36. Distribución porcentual de los genotipos de *GSTMI* y *GSTTI* en pacientes con LLC.

En las leucemias de linaje mieloide, el genotipo homocigoto wild type $GSTM1^+/GSTT1^+$ predominó, tanto en pacientes con LMA como con LMC (figura 37 y 38).

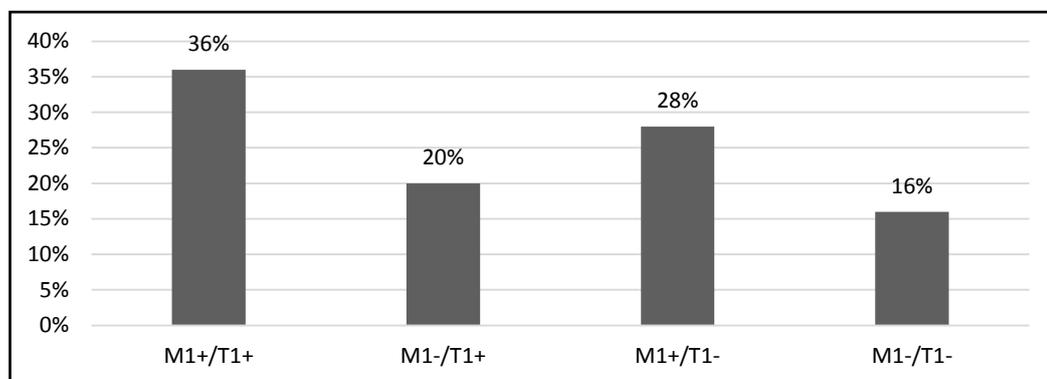


Figura 37. Distribución porcentual de los genotipos de $GSTM1$ y $GSTT1$ en pacientes con LMA.

El genotipo homocigoto nulo $GSTM1^-/GSTT1^-$ no se encontró presente en los pacientes con LMC ni en los pacientes con tricoleucemia (figura 38 y 39).

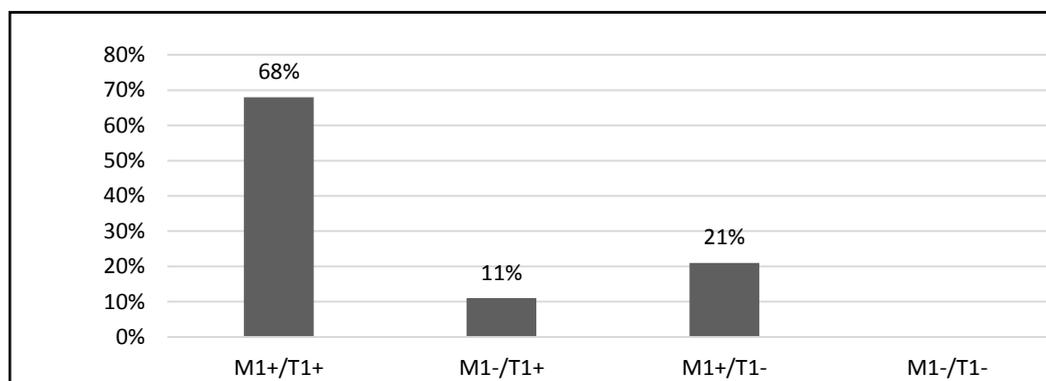


Figura 38. Distribución porcentual de los genotipos de $GSTM1$ y $GSTT1$ en pacientes con LMC.

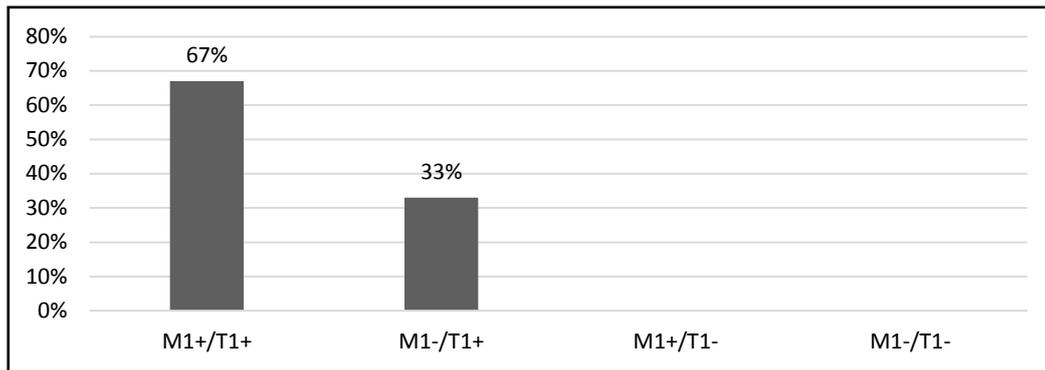


Figura 39. Distribución porcentual de los genotipos de *GSTMI* y *GSTTI* en pacientes con Tricoleucemia.

Se realizó un análisis estadístico de asociación entre los genotipos nulos observados en las poblaciones estudiadas, pacientes con leucemia y controles, con la finalidad de evaluar si existe asociación de los genotipos nulos de *GSTMI* y *GSTTI* con el desarrollo de esta enfermedad, es decir, si pudieran ser considerados un factor de riesgo para padecer leucemia. Se calculó *Odds Ratio* (OR), considerando un IC de 95%.

En la tabla 20, se representan las frecuencias de los alelos nulos de *GSTMI* y *GSTTI* encontrados en los pacientes con leucemia y en los controles. Se observó que la frecuencia de *GSTTI* nulo en los pacientes con leucemia es mayor en comparación con la población control, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa (p value: 0.002) y sugiriendo que este genotipo puede ser considerado un factor de riesgo para el desarrollo de leucemia (OR: 2.2677, 95% IC: 1.337 – 3.8463, p -value; 0,002) estadísticamente significativo. Para el genotipo *GSTMI* nulo no se observaron diferencias significativas en ambos grupos estudiados.

Tabla 20. Distribución de los alelos nulos de *GSTMI* y *GSTTI* en pacientes con leucemia y controles.

Genotipo	Casos N	Control es N	Odds Ratio (OR)	95% IC (intervalo de confianza)	P -value
<i>GSTMI</i> <i>Nulo</i>	35 (0,343)	132 (0,410)	0.7519	0.4722 – 1.1973	0,229
<i>GSTTI</i> <i>Nulo</i>	29 (0,284)	48 (0,150)	2.2677	1.337 - 3.8463	0,002

N: número de individuos. Frecuencias alélicas se encuentran dentro de los paréntesis. *p*-value <0.05: valor significativo.

La distribución de las frecuencias genotípicas de *GSTMI* y *GSTTI* encontradas en los pacientes con leucemia y en los controles se representa en la tabla 21, observándose que presentan similitud entre ambos grupos estudiados. En el anexo II se muestran las frecuencias genotípicas del grupo control. Los análisis no mostraron asociación estadísticamente significativa en las diferentes combinaciones de estos genotipos como factor de riesgo de padecer leucemia.

Tabla 21. Distribución de genotipos de los *GSTMI* y *GSTTI* en pacientes con leucemia y en controles.

Genotipo	Casos	Controles	Odds Ratio (OR)	95%IC (intervalo de confianza)	P value
<i>GSTMI</i> ⁺ / <i>GSTTI</i> ⁺	48	157	1	-	-
<i>GSTMI</i> / <i>GSTTI</i> ⁺	25	94	0.8699	0.5035-1.5030	0,617
<i>GSTMI</i> ⁺ / <i>GSTTI</i> ⁻	19	55	1.1299	0.6117-2.0871	0,696
<i>GSTMI</i> / <i>GSTTI</i> ⁻	10	16	2.0443	0.8705- 4.8005	0,100

P- value <0,05: valor significativo

4.6.1.1.3 Distribución de los alelos de los genes *GSTM1* y *GSTT1* en pacientes con leucemia y su relación con la evolución clínica

Los genotipos homocigotos nulos de *GSTM1*⁻ y *GSTT1*⁻ fueron analizados en los diferentes estadios de evolución clínica de los pacientes con leucemia, con la finalidad de conocer si existe asociación entre los genotipos y la evolución clínica, bien sea de pronóstico favorable o desfavorable.

En la tabla 22, se muestran las frecuencias alélicas de los genes *GSTM1* y *GSTT1* según el tipo de variable comprendida en la evolución clínica: remisión completa, recaídas y fallecidos, de los pacientes con leucemia analizados posteriormente empleando el test exacto de Fisher.

Los resultados permiten evidenciar que el genotipo *wild type GSTT1*⁺ fue predominante en los pacientes con leucemia que se encuentran en estado de remisión completa, mostrando diferencia estadísticamente significativa con el genotipo *GSTT1*⁻ nulo (*p*-value: 0,025). Con respecto a las otras condiciones clínicas, no se observaron diferencias entre ambos genotipos estudiados.

Tabla 22. Análisis de asociación de alelos de los genes *GSTM1* y *GSTT1* según el estado de evolución clínica.

Evolución clínica	M1⁺	M1⁻	<i>P</i>- value	T1⁺	T1⁻	<i>P</i>- value
Remisión Completa	40		16	42	9	0,025
	0,290					
Recaídas	13		9	15	6	1,000
	0,450					
Fallecidos	21		14	24	11	0,643
	0,379					

P-value <0.05: valor significativo

La glutatión *s*- transferasa participa en el metabolismo de varias drogas que se incluyen dentro de los protocolos quimioterapéuticos de LLA y LMA. La disfunción de su actividad enzimática debido a una delección puede estar implicada en la eficacia del tratamiento. Por tal motivo, se analizó la presencia del

polimorfismo nulo de *GSTM1* y *GSTT1* en los grupos de pacientes con LLA y LMA en tratamiento quimioterapéutico y se relacionó con su evolución clínica.

Las tablas 23 y 24 representan las frecuencias alélicas de *GSTM1* y *GSTT1* en pacientes con LLA y LMA, respectivamente; que fueron tratados con quimioterapia y agrupadas según su evolución clínica. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los alelos de *GSTM1/GSTT1* y la respuesta a tratamiento, evidenciado según la evolución clínica, en pacientes con LLA y LMA respectivamente.

Tabla 23. Análisis de asociación de los alelos de los genes *GSTM1* y *GSTT1* en pacientes con LLA.

Evolución clínica	M1⁺	M1⁻	P- value	T1⁺	T1⁻	P- value
Remisión Completa	18	10	0,812	19	9	0,807
Recaídas	5	6	0,211	10	2	1,000
Fallecidos	9	6	0,567	12	3	0,547

P-value <0.05: valor significativo

Tabla 24. Análisis de asociación de los alelos de los genes *GSTM1* y *GSTT1* en pacientes con LMA.

Evolución clínica	M1⁺	M1⁻	P-value	T1⁺	T1⁻	P-value
Remisión Completa	6	1	0,418	4	3	0,396
Recaídas	2	2	0,581	4	0	0,574
Fallecidos	8	7	0,253	10	6	0,373

P- value<0.05: valor significativo

4.6.1.2 *GSTP1*

El estudio del polimorfismo en el gen *GSTP1* se realizó en 75 pacientes con leucemia y en 291 controles. La figura 40 muestra la imagen de la electroforesis

en el gel de agarosa al 2 % tratada con Bromuro de Etidio y visualizada con luz UV, con las bandas correspondientes a los productos de amplificación del gen *GSTP1* de 432 pb, que posteriormente fueron sometidos a RFLP, para determinar e identificar los genotipos.

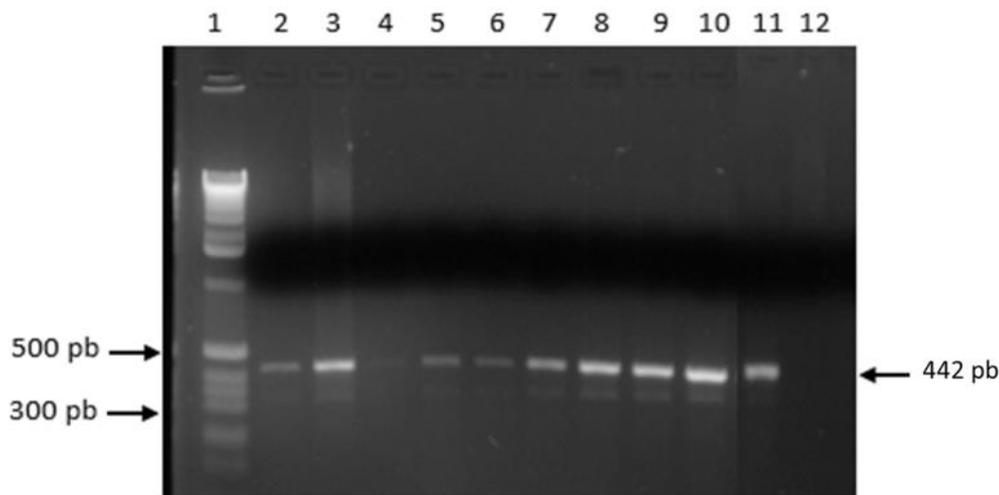


Figura 40. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 2% de los productos amplificados del gen *GSTP1* en pacientes con leucemia. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los carriles 2 al 11 presentan amplificaciones de 442 pb del gen *GSTP1*. El carril 12 es un control negativo de la reacción de cadena de la polimerasa.

Todos los productos de amplificación del gen *GSTP1* de los pacientes y de los controles fueron sometidos a digestión con la enzima de restricción *BsmAI*, lo cual permitió caracterizar e identificar los diferentes genotipos de *GSTP1* en las poblaciones estudiadas. En la figura 41, se puede observar la imagen de electroforesis en gel de agarosa al 3 % con los productos digeridos en RFLP, observando el genotipo homocigoto *wild type* A/A (329 pb y 113 pb), el genotipo heterocigoto A/G (329 pb, 216 pb y 113 pb) y el genotipo homocigoto mutante G/G (216 pb y 113 pb).

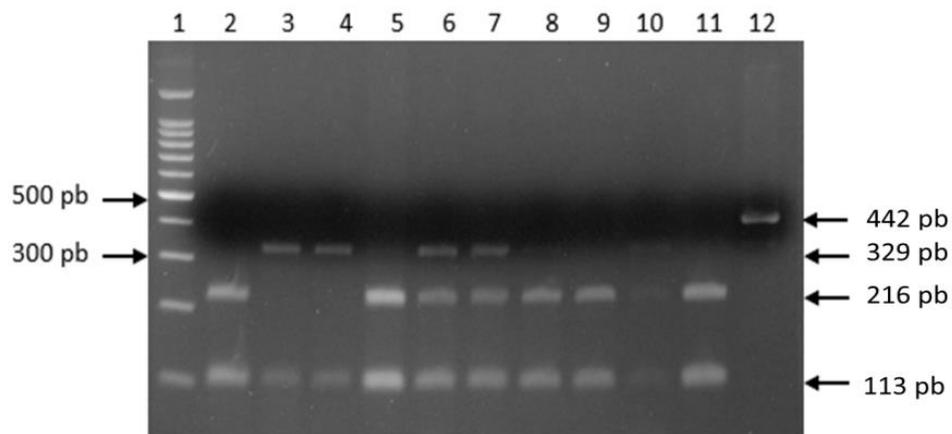


Figura 41. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 3 % de los productos del gen *GSTP1* obtenidos por la técnica de RFLP, digeridos con la enzima de restricción *BsmAI*, en pacientes con leucemia. En el carril 1 se observa el marcador de tamaño molecular de 100 pb. En los carriles 2, 5, 8, 9 y 10 se observan la variante homocigota mutante G/G. En los carriles 3 y 4 se observan el genotipo homocigoto wild type. En los carriles 6 y 7 se encuentran el genotipo heterocigoto del polimorfismo A/G. En el carril 12 se empleó un control de producto de PCR sin digerir.

4.6.1.2.1 Frecuencia genotípica de *GSTP1* en los pacientes con Leucemia

Las frecuencias de las variantes polimórficas de *GSTP1* de los pacientes con leucemia que asisten al Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Caracas y el grupo de individuos control se muestran en la tabla 25. Se determinó este genotipo en 75 pacientes con leucemia y 291 individuos controles. El genotipo con mayor frecuencia 0,413 fue el heterocigoto A/G con respecto al genotipo *wild type* A/A con una frecuencia 0,333, mientras que el genotipo G/G fue el menos frecuente 0,253 en los pacientes estudiados. Al comparar con la población control se observó que las frecuencias genotípicas de A/A de los controles fue 0,337, similar al genotipo A/A de los pacientes con leucemia. Con respecto a los demás genotipos, las frecuencias genotípicas entre ambas poblaciones mostraron diferencias marcadas. La población control se encuentra en equilibrio Hardy - Weinberg para este polimorfismo (anexo XI).

Tabla 25. Frecuencia genotípica de *GSTP1* en los pacientes con leucemia del Hospital Universitario de Caracas y en el grupo control.

Genotipo	Grupo pacientes		Grupo control	
	N	Frecuencia	N	Frecuencia
<i>A/A</i>	25	0,333	98	0,337
<i>A/G</i>	31	0,413	154	0,529
<i>G/G</i>	19	0,253	39	0,134
<i>Total</i>	75		291	

N: número de individuos

4.6.1.2.2 Distribución poblacional de la frecuencia genotípica de *GSTP1* en base al tipo de Leucemia

La distribución de las variantes polimórficas de *GSTP1* *A/G* rs1695 de acuerdo al tipo de Leucemia de los pacientes estudiados, son mostradas en las figuras 42 a la 46. Se puede observar que el polimorfismo heterocigoto *GSTP1* *A/G* fue el más frecuente en los pacientes con LLA, LLC y tricoleucemia, a excepción de los pacientes con LMC, cuyo genotipo más frecuente fue el genotipo homocigoto *wild type* *GSTP1* *A/A* un 50% (Figura 45). Con relación al genotipo homocigoto mutado *GSTP1* *G/G* este fue el segundo en frecuencia en pacientes con LLA en un 34% y en tricoleucemia en un 33%.

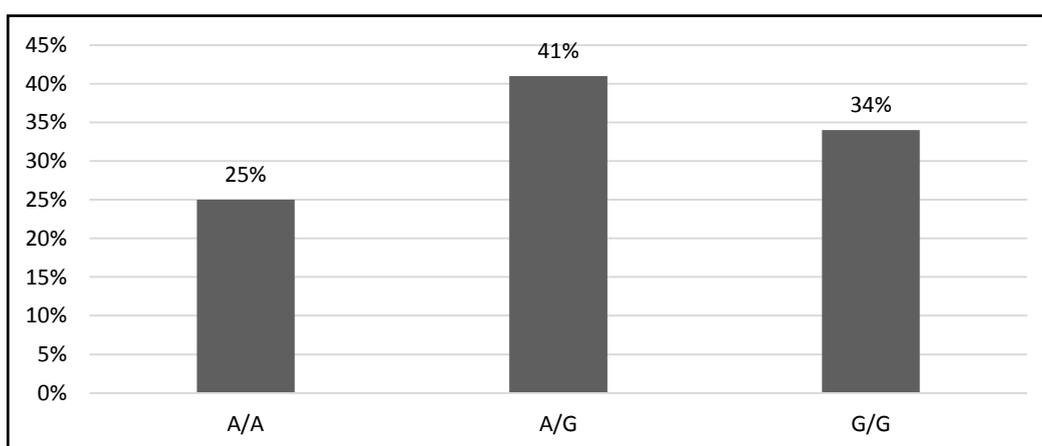


Figura 42. Distribución porcentual de los genotipos de *GSTP1* en pacientes con LLA.

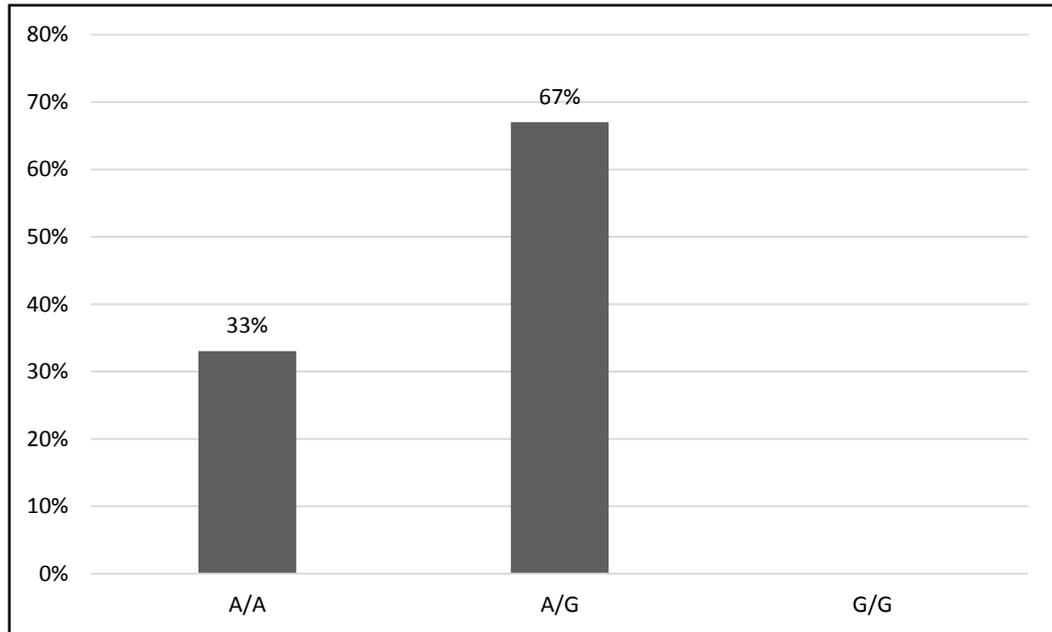


Figura 43. Distribución porcentual de los genotipos de *GSTP1* en pacientes con LLC.

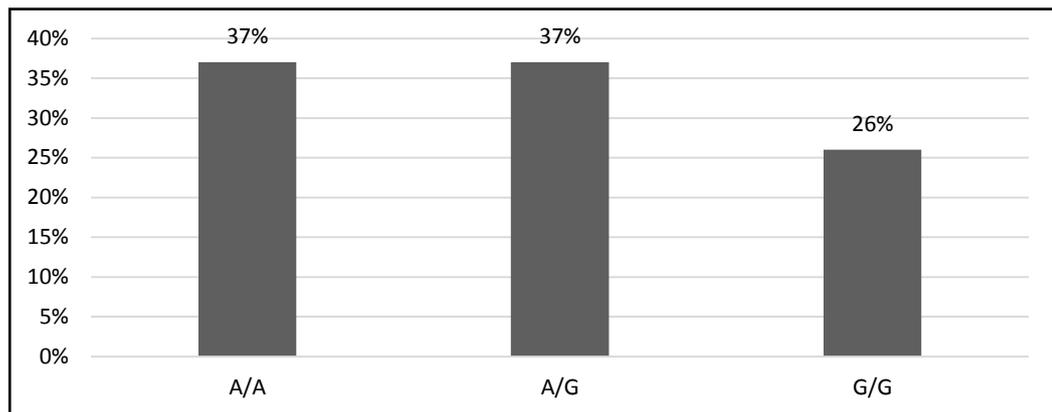


Figura 44. Distribución porcentual de los genotipos *GSTP1* en pacientes con LMA.

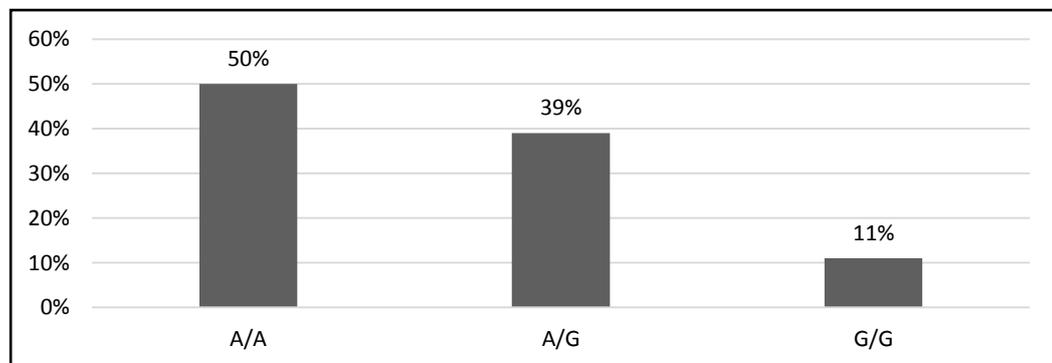


Figura 45. Distribución porcentual de los genotipos de *GSTP1* en pacientes con LMC.

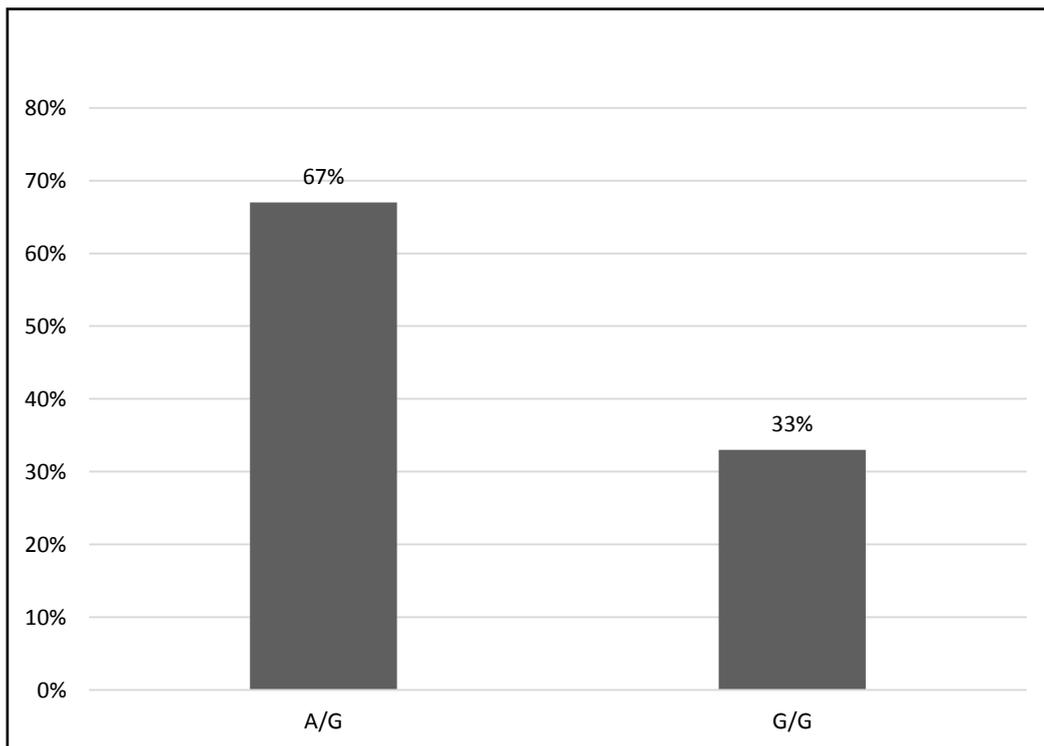


Figura 46. Distribución porcentual de los genotipos de *GSTP1* en pacientes con Tricoleucemia.

Se realizó un análisis estadístico de asociación, calculado por *Odds Ratio* (OR), considerando un IC de 95 %, entre los genotipos heterocigotos y homocigotos mutados observados en los pacientes con leucemia y en los controles, con la finalidad de evaluar si existe asociación de los genotipos de *GSTP1* A/G con el desarrollo de esta enfermedad, es decir, si pudieran ser considerados un factor de riesgo para padecer leucemia.

En la tabla 26, se muestra el análisis de los resultados obtenidos de la genotipificación de *GSTP1* A/G en los pacientes y controles estudiados. Se analizaron varios modelos de herencias según las variantes genómicas para este polimorfismo, considerando el modelo recesivo, el modelo dominante y el modelo aditivo. Los resultados no mostraron ser un factor de riesgo estadísticamente significativo de los genotipos A/G y G/G de este gen para el desarrollo de leucemia de acuerdo a la población venezolana estudiada, (OR: 0.7891; IC= 0,4398 – 1.4158, *p*-value: 0,427 y OR: 1.9097; IC=0.9459 – 3.8555, *p*-value: 0,071, respectivamente).

El modelo de herencia recesivo (G/G Vs. A/G + A/A) del gen *GSTP1* mostró una asociación como factor de riesgo incrementado de la predisposición del desarrollo de leucemia en la población estudiada, de acuerdo al valor de OR: 2.1923; IC= 1.1792 – 4.0758; *p*-value: 0,013. Esto sugiere que el alelo G presente en condición homocigota es capaz de modificar el riesgo de enfermedad. Los modelos de herencia dominante y aditivo no mostraron asociación estadísticamente significativa con el desarrollo de la enfermedad.

Tabla 26. Distribución de genotipos del gen *GSTP1* en pacientes con leucemia y controles.

Genotipo	Casos (n=75)	Controles (n= 291)	Odds Ratio (OR)	95% IC (intervalo de confianza)	P - value
A/A	25	98	1	-	
A/G	31	154	0.7891	0.4398- 1.4158	0,427
G/G	19	39	1.9097	0.9459 – 3.8555	0,071
Alelo A	40	175	1	-	
Alelo G	35	116	1.3200	0.5131 – 1.5648	0,699
Modelo Recesivo G/G Vs. A/G + A/A			2.1923	1.1792 – 4.0758	0,013
Modelo Dominante A/G + G/G Vs. A/A			1.0155	0.5929 – 1.7395	0,955
Modelo Aditivo			1.1659	0.6967 – 1.9510	0,559

P-value <0.05:valor significativo. n: número de individuos

4.6.1.2.3 Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de *GSTP1* en pacientes con leucemia y su relación con la evolución clínica

Los genotipos del gen *GSTP1* A/G fueron relacionados con los diferentes estadios de evolución clínica de los pacientes con leucemia, con la finalidad de conocer si estos genotipos confieren un factor de riesgo, bien sea de pronóstico favorable, o desfavorable, en la evolución clínica de los pacientes con leucemia.

En la tabla 27, se muestran las frecuencias alélicas de *GSTP1* según el tipo de variable considerada en la evolución clínica de los pacientes con leucemia estudiados. El análisis de los genotipos homocigoto *wild type* A/A y el polimorfismo A/G mostraron una significancia estadística en pacientes con leucemia que presentaron recaídas (p -value: 0,047), sugiriendo que ambos genotipos pueden estar asociados a esta variable. Con respecto a los demás estados de evolución clínica, no se encontró relación con los genotipos estudiados del gen *GSTP1*.

Tabla 27. Análisis de asociación de los genotipos de los polimorfismos de *GSTP1* en pacientes con leucemia tratados con quimioterapia.

Evolución Clínica	A/A	A/G	P value	A/A	G/G	P value
Remisión Completa	14	21	0,414	14	10	0,755
Recaída	8	3	0,047	8	4	0,507
Fallecidos	6	12	0,260	6	6	0,735

P- value <0,05: valor significativo

La enzima glutatión S- transferasa participa en el metabolismo de varias drogas que se incluyen dentro de los protocolos quimioterapéuticos de LLA y LMA, la disfunción de su actividad enzimática debido a un polimorfismo puede estar implicada en la eficacia del tratamiento. Por tal motivo, se analizó la presencia de polimorfismos del gen *GSTP1* A/G en los grupos de pacientes con

LLA y LMA en tratamiento quimioterapéutico y su clasificación de evolución clínica actual.

En las tablas 28 y 29 se muestran los análisis de asociación del polimorfismo de *GSTP1* en pacientes con LLA y LMA respectivamente, de acuerdo a sus condiciones de evolución clínica. El análisis de los genotipos homocigotos *wild type* A/A y el polimorfismo A/G mostraron una asociación estadísticamente significativa en pacientes con LLA que presentaron recaídas (*p*-value: 0,039), para los pacientes fallecidos y en remisión completa no se observaron diferencias. Los genotipos homocigotos *wild type* A/A y el genotipo homocigoto mutado G/G mostraron significancia estadística en pacientes con LLA que se encuentran en remisión completa (*p*-value: 0,026), mientras que para las otras condiciones no se observaron diferencias significativas (tabla 28). En los pacientes con LMA, no se observaron asociaciones significativas de los genotipos estudiados con respecto a al estadio de evolución clínica (*p*-value >0,05) (tabla 29).

Tabla 28. Análisis de asociación de genotipos de polimorfismos de *GSTP1* en pacientes con LLA.

Evolución Clínica	A/A	A/G	<i>P</i>-value	A/A	G/G	<i>P</i>-value
Remisión Completa	5	9	1,000	5	3	0,026
Recaída	4	1	0,039	4	5	1,000
Fallecidos	2	3	1,000	2	4	1,000

P-value <0,05: valor significativo

Tabla 29. Análisis de asociación de genotipos de polimorfismos de *GSTP1* en pacientes con LMA.

Evolución Clínica	A/A value	A/G	<i>P</i>	A/A	G/G	<i>P</i> value
Remisión Completa	2	3	1,000	2	2	0,578
Recaída	1	0	1,000	1	0	1,000

Fallecidos	5	4	1,000	5	2	0,578
-------------------	---	---	-------	---	---	-------

P-value < 0,05: valor significativo

4.6.2 Genotipificación del gen Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR)

4.6.2.1 MTHFR 1298

Se determinó el genotipo del gen *MTHFR* 1298 en 102 pacientes y 202 controles, con el fin de evaluar la presencia de los polimorfismos y conocer si confieren riesgo del desarrollo de la enfermedad.

En la figura 47, se observa una imagen de la electroforesis en gel de agarosa al 2% tratada con Bromuro de Etidio y visualizada con luz UV, los productos de amplificación correspondientes al gen *MTHFR* 1298 de 163 pb en los pacientes con leucemia.

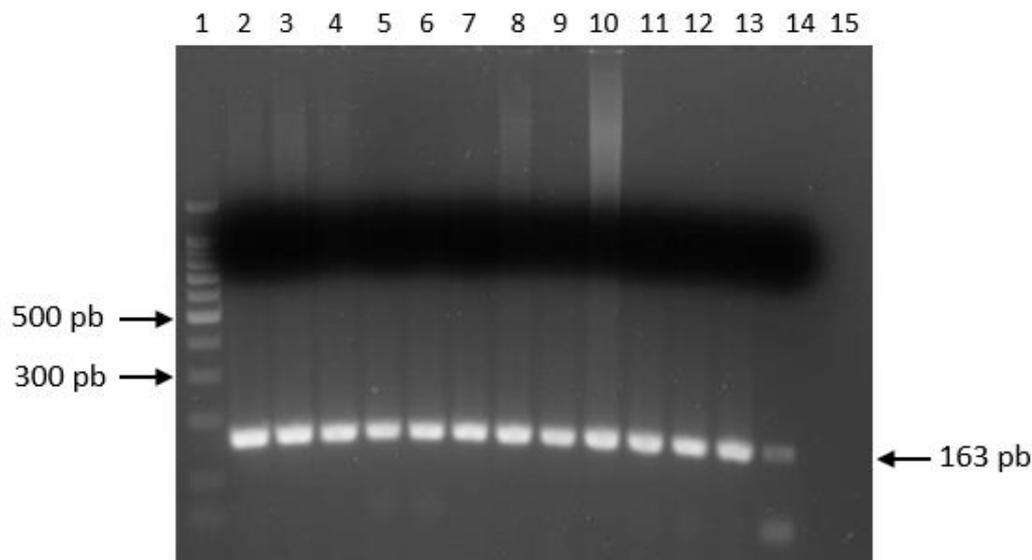


Figura 47. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 2% de los productos amplificados del gen *MTHFR* 1298 en pacientes con leucemia. En el carril 1 se encuentra el marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los carriles 2 al 14 muestran los productos de amplificación del gen *MTHFR* 1298 de 163 pb, de las muestras estudiadas. El carril 15 se encuentra el control negativo de la reacción en cadena de la polimerasa.

Posterior a la amplificación del gen *MTHFR* 1298, se realizó la técnica RFLP empleando la enzima de restricción *MboII* para obtener los fragmentos de digestión que permiten clasificar las muestras de acuerdo al genotipo obtenido. En la figura 48 se muestra la imagen de la electroforesis en gel de agarosa al 4% tratado con Bromuro de Etidio y visualizado con luz UV, de los diferentes fragmentos de restricción obtenidos posterior a la RFLP del gen *MTHFR*. Los genotipos del gen *MTHFR* 1298 se denominan de la siguiente manera de acuerdo al patrón de corte de la enzima de restricción *MboII*: homocigoto *wild type MTHFR* 1298 A/A con 5 fragmentos (56 pb, 31 pb, 30 pb, 28 pb y 18 pb), heterocigoto *MTHFR* 1298 A/C con 5 fragmentos (84 pb, 56 pb, 31 pb, 30 pb y 28 pb) y homocigoto mutado *MTHFR* 1298 C/C con 4 fragmentos (84 pb, 31 pb, 30 pb y 18 pb). Los fragmentos de 28 pb y 18pb en algunos casos se salen del gel durante la corrida electroforética.

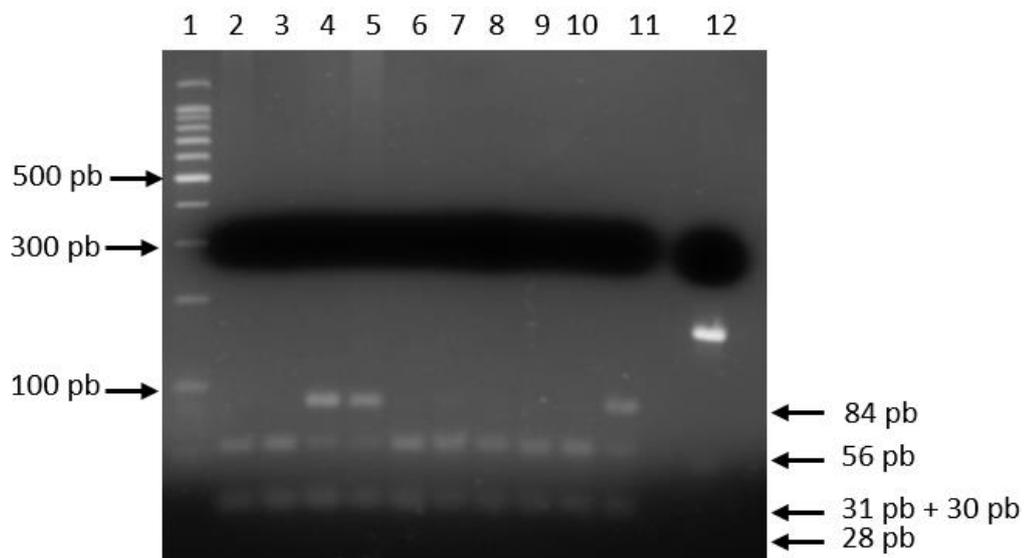


Figura 48. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 4% de los productos del gen *MTHFR* 1298 obtenidos por la técnica de RFLP, digeridos con la enzima de restricción *MboII*, en pacientes con leucemia. El carril 1 presenta el marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los carriles 2,3 6, 7,8, 9 y 10 presentan amplificaciones del genotipo homocigoto *wt MTHFR* 1298 A/A. Los carriles 4, 5 y 11 presentan amplificaciones del genotipo heterocigoto *MTHFR* 1298 A/C. El carril 12 contiene un producto de PCR sin digerir usado como control.

4.6.2.1.1 Frecuencia genotípica de *MTHFR* 1298 en pacientes con leucemia

Las frecuencias genotípicas de las variantes polimórficas del gen *MTHFR* 1298 de los pacientes con leucemia se muestran en la tabla 30. Los resultados obtenidos permiten observar que el genotipo con mayor frecuencia fue el homocigoto *wild type MTHFR* 1298 A/A 0,509, con respecto al genotipo heterocigoto *MTHFR* 1298 A/C con una frecuencia 0,470, mientras que el genotipo homocigoto mutado *MTHFR* 1298 C/C se observó con menor frecuencia en la población de pacientes estudiados 0,019. La población control se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg para este polimorfismo (χ^2 :1.191; *p* value: 0,275) (Anexo XI). En los individuos control el genotipo más frecuente fue el homocigoto *wild type* 0,584, con una frecuencia similar a la encontrada en los pacientes, seguida de los genotipos heterocigoto y homocigoto mutado.

Tabla 30. Frecuencia genotípica del gen *MTHFR* 1298 en pacientes con Leucemia.

Genotipo	Grupo pacientes		Grupo control	
	N	Frecuencia	N	Frecuencia
A/A	52	0,509	118	0,584
A/C	48	0,470	69	0,341
C/C	2	0,019	15	0,074
<i>Total</i>	102		202	

N: número de pacientes

4.6.2.1.2 Distribución poblacional de la frecuencia genotípica de *MTHFR* 1298 en base al tipo de Leucemia

Con la finalidad de conocer la distribución de los genotipos determinados de *MTHFR* 1298, se realizó la distribución de las variantes genotípicas de acuerdo al tipo de leucemia, mostrada en las figuras 49 a la figura 53.

Se puede observar que el genotipo homocigoto *wild type* A/A fue el más frecuente en los pacientes con LLA, LLC, LMA, sin embargo en los pacientes con LMC y tricoleucemia el genotipo más frecuente fue el heterocigoto A/C. Con

relación al genotipo homocigoto mutado C/C solo se encontró presente en 8% de los pacientes con LMA.

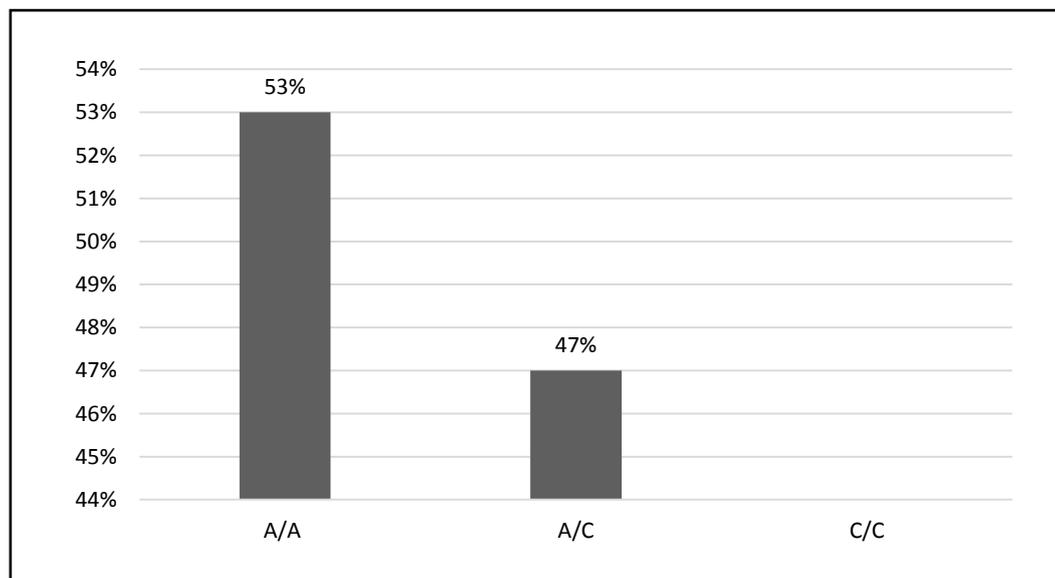


Figura 49. Distribución porcentual de los genotipos de *MTHFR* 1298 en pacientes con LLA.

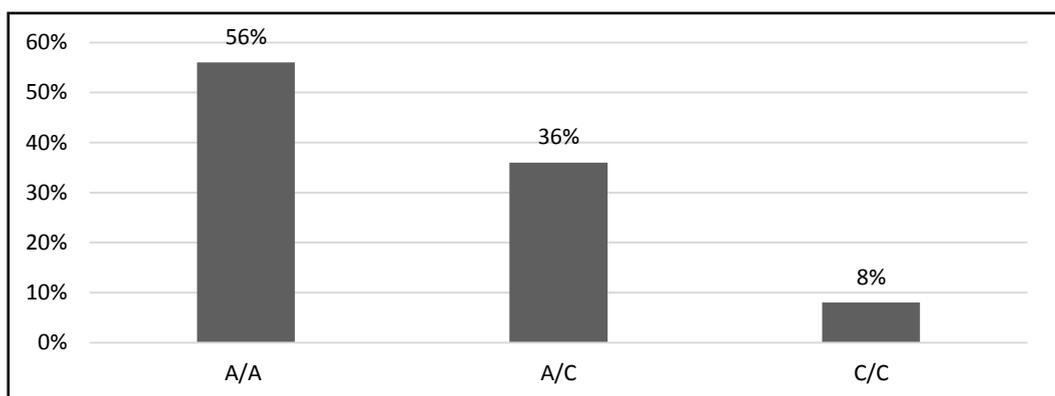


Figura 50. Distribución porcentual de los genotipos de *MTHFR* 1298 en pacientes con LMA.

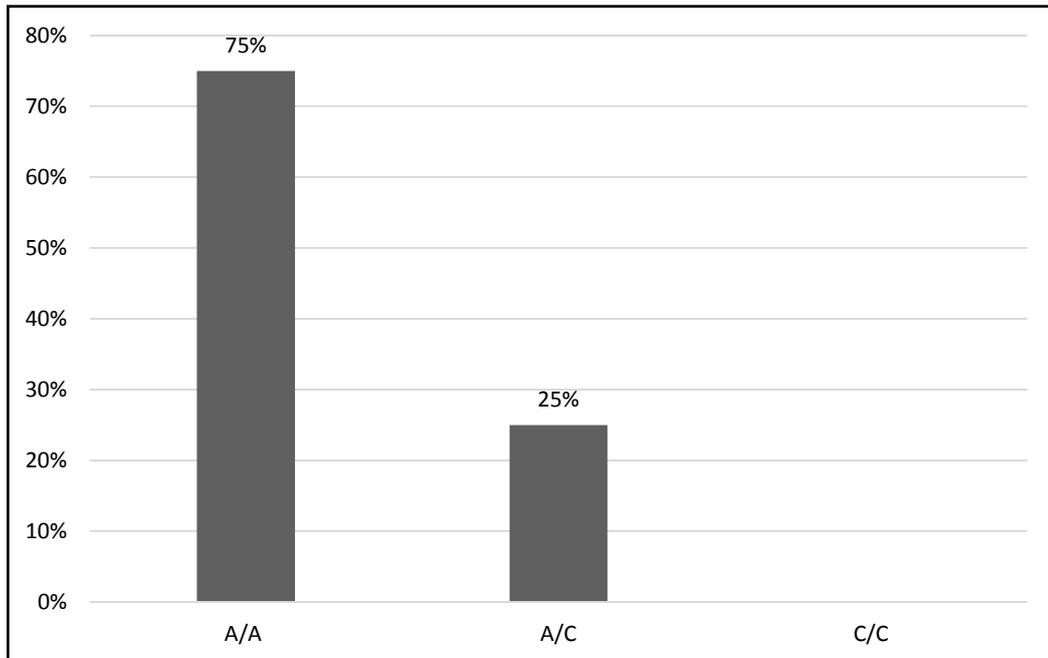


Figura 51. Distribución porcentual de los genotipos de *MTHFR* 1298 en pacientes con LLC.

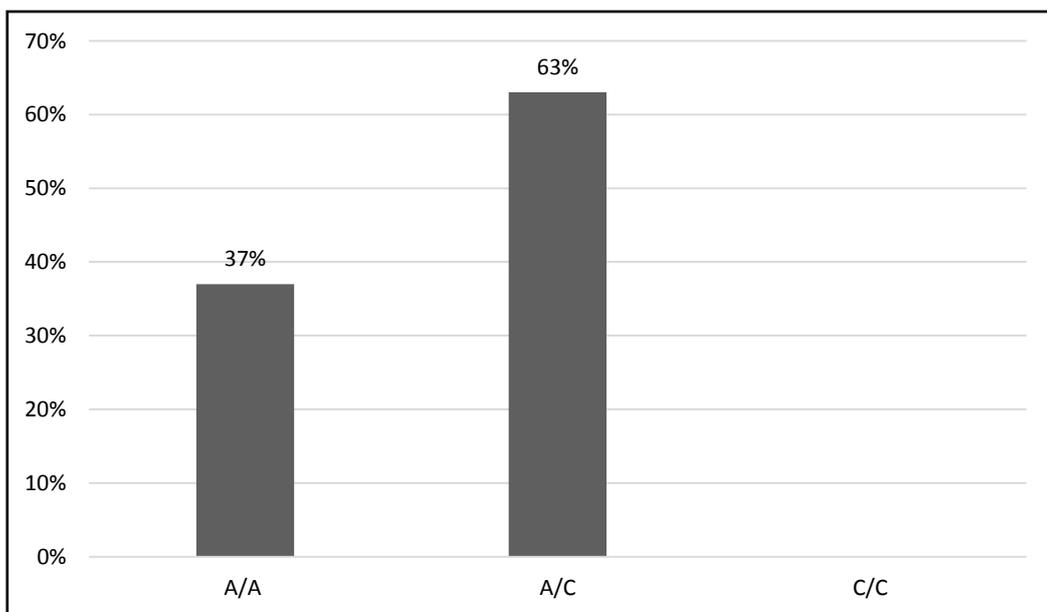


Figura 52. Distribución porcentual de los genotipos de *MTHFR* 1298 en pacientes con LMC.

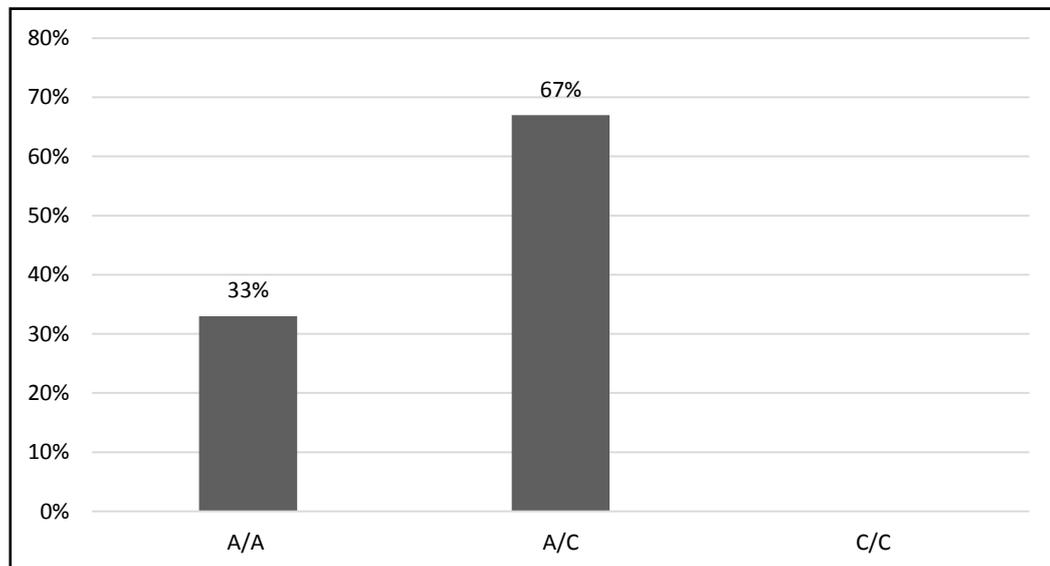


Figura 53. Distribución porcentual de los genotipos de MTHFR 1298 en pacientes con Tricoleucemia.

Se realizó un análisis estadístico de asociación entre los genotipos heterocigotos y homocigotos mutados observados en las poblaciones estudiadas, con la finalidad de evaluar si existe asociación de los genotipos de *MTHFR* 1298 con el desarrollo de esta enfermedad, es decir, si pudieran ser considerados un factor de riesgo para padecer leucemia. El riesgo relativo fue calculado por *Odds Ratio* (OR), considerando un intervalo de confianza (IC) de 95%.

En la tabla 31, se presenta la distribución de los genotipos y alelos del gen *MTHFR* 1298 en la población estudiada. Se observa que el genotipo homocigoto *wild type* A/A predomina en ambos grupos estudiados. Los resultados del análisis estadístico no reveló una asociación estadísticamente significativa del genotipo heterocigoto A/C del modelo de herencia codominante como factor de riesgo del padecimiento de leucemia (OR: 1.2384, IC: 0.7542 – 2.0334; *p*-value: 0,3981). Así mismo, se evaluaron los demás modelos de herencia, encontrando que los modelos Dominante y Aditivo no se comportan como un factor de riesgo para el desarrollo de leucemia. Los resultados obtenidos permiten establecer que el polimorfismo del gen A/C no representa un factor de riesgo de desarrollo de la enfermedad en la población estudiada.

Tabla 31. Distribución de genotipos del gen *MTHFR* 1298 en pacientes con leucemia y controles.

Genotipo	Casos (n=102)	Controles (n= 202)	Odds Ratio (OR)	95% IC (intervalo de confianza)	P value
A/A	58	118	1	-	
A/C	42	69	1.2384	0.7542 – 2.0334	0,3981
C/C	2	15	0.2713	0.0600 – 1.2262	0,0901
Alelo A	75	151	1	-	
Alelo C	27	51	1.0659	0.6196 – 1.8336	0,8177
Modelo recesivo					
C/C Vs A/C + A/A			0.2493	0.0559 – 1.1122	0,220
Modelo dominante					
A/C + C/C Vs A/A			1.0657	0.6584 – 1.7248	0,7957
Modelo aditivo			0.9453	0.5907 – 1.5128	0,8147

P-value <0.05: valor significativo

4.6.2.1.3 Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de *MTHFR* 1298 en pacientes con leucemia y su relación con la evolución clínica

La enzima metilentetrahidrofolato reductasa participa en el metabolismo del folato intracelular y los polimorfismos genéticos del gen *MTHFR* han sido asociados con el mecanismo de acción del fármaco metotrexato, utilizado en los protocolos de quimioterapia en pacientes con LLA: Total XV modificado (125),

BFM 95 (126), Nacional 2005 (127), Hyper CVAD (128), en sus diferentes fases: inducción, consolidación y mantenimiento. Se realizó el análisis farmacogenético de los resultados obtenidos de los polimorfismos genéticos de *MTHFR* 1298 y la evolución clínica de los pacientes con LLA, con el fin de conocer si existe asociación entre ambas variables.

Como se presenta en la tabla 32, no se observó asociación entre el polimorfismo A/C y la evolución clínica, así mismo, estos resultados sugieren que el polimorfismo no afecta la respuesta al tratamiento con Metotrexato en los pacientes con LLA estudiados.

Tabla 32. Análisis de asociación de los genotipos de *MTHFR* 1298 en pacientes con LLA tratados con Metotrexato.

Evolución clínica			A/A vs A/C		
	A/A (n)	A/C (n)	OR	IC	p-value
Remisión completa	14	14	1.7101	0.7698-3.7698	0,1876
Recaída	6	7	1.9952	0.6444-6.1774	0,2310
Toxicidad	3	4	2.8502	0.4956-10.4900	0,2898
Fallecidos	7	9	2.1988	0.7838-6.1678	0,1343

OR: *Odds ratio*. IC: intervalo de confianza de 95%. P-value <0,05: valor significativo. N: número de pacientes

4.6.2.2 *MTHFR* 677

Se determinaron los genotipos de *MTHFR* 677 en 102 pacientes con leucemia y 308 controles. En la figura 54 se presenta la imagen de una electroforesis en gel de agarosa al 2% tratado con Bromuro de Etidio y visualizado con luz UV, donde se evidencian las bandas de amplificación de 198 pb del gen *MTHFR* 677, correspondientes a las muestras analizadas.

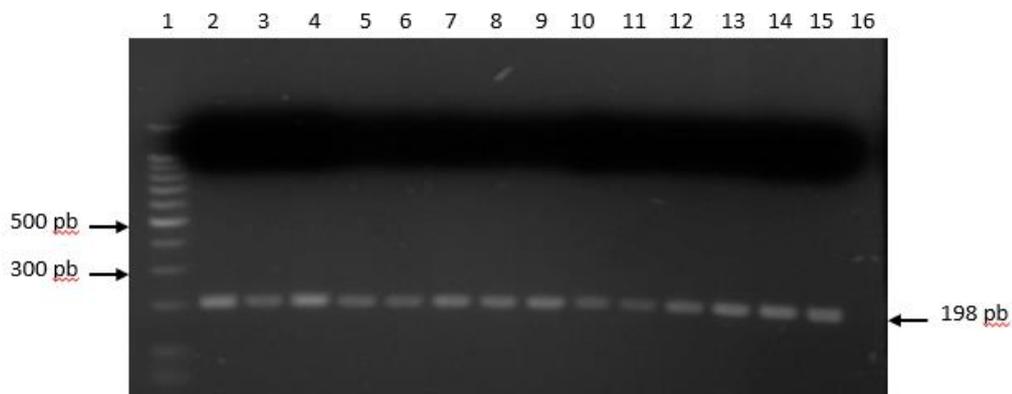


Figura 54. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 2% de los productos amplificados del gen *MTHFR* 677 en pacientes con leucemia. El carril 1 muestra el marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los carriles 2 al 15 permiten observar los productos amplificados por la PCR de 198 pb. El carril 16 contiene el control negativo de la reacción.

Posterior a la amplificación del gen *MTHFR* 677 en muestras de pacientes y controles, se procedió a realizar la digestión enzimática por RFLP empleando la enzima de restricción *HinfI*, y de esta manera, se obtuvo los patrones de restricción que permitieron realizar la genotipificación de las muestras. Los genotipos del gen *MTHFR* 677 identificados son los siguientes: homocigoto *wild type* C/C con una banda de 198pb, heterocigoto C/T con dos bandas (198 pb y 175 pb) y homocigoto mutado T/T con dos bandas (175 pb y 23 pb) (figura 55).

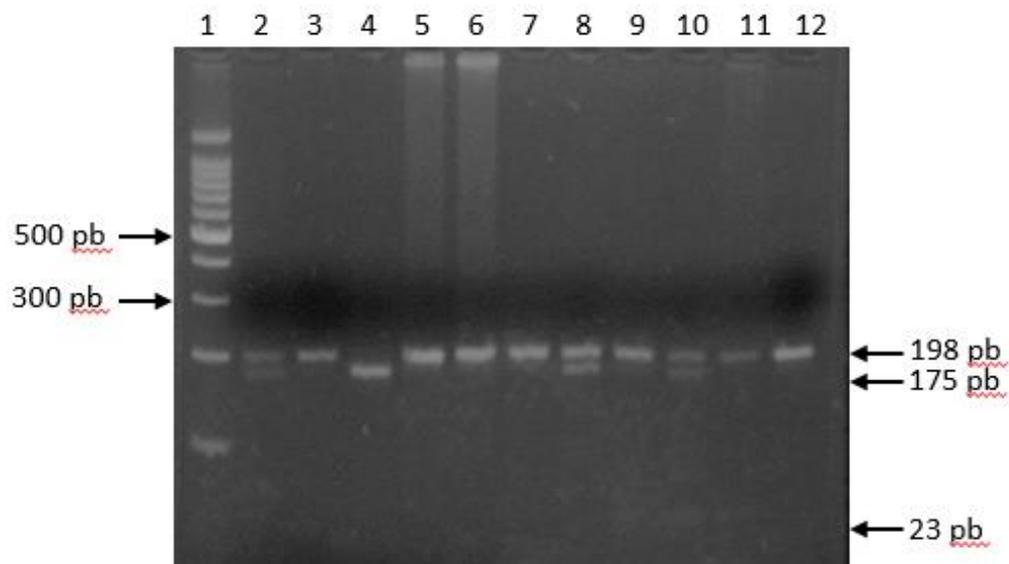


Figura 55. Imagen de la electroforesis de gel de agarosa al 4 % de los productos del gen *MTHFR* 677 obtenidos por la técnica de RFLP, digeridos con la enzima de restricción *HinfI*, en pacientes con leucemia En el carril 1 se observa el marcador de tamaño molecular de 100 pb. El genotipo homocigoto wild type C/C se observa en los carriles 3, 5, 6, 7, 9 y 11. El genotipo heterocigoto C/T se observa en los carriles 2, 8 y 10. El genotipo homocigoto mutado T/T se visualiza en el carril 4. El carril 12 presenta un control negativo de producto de PCR sin digerir.

4.6.2.2.1 Frecuencia genotípica de *MTHFR* 677 en pacientes con Leucemia

Las frecuencias genotípicas de las variantes de *MTHFR* 677 determinadas en los pacientes con leucemia y los individuos controles se muestran en la tabla 33. En estos resultados se pudo observar que el genotipo con mayor frecuencia en el grupo de pacientes fue el heterocigoto C/T con 0,559, así como en los controles con 0,455, seguido del genotipo homocigoto *wild type* C/C con 0,333 y 0,420; para pacientes y controles respectivamente; y por último, el menos frecuente es el genotipo homocigoto mutado T/T con una frecuencia de 0,108 y 0,125 para ambos grupos.

Tabla 33. Frecuencia genotípica del gen *MTHFR* 677 en pacientes con Leucemia.

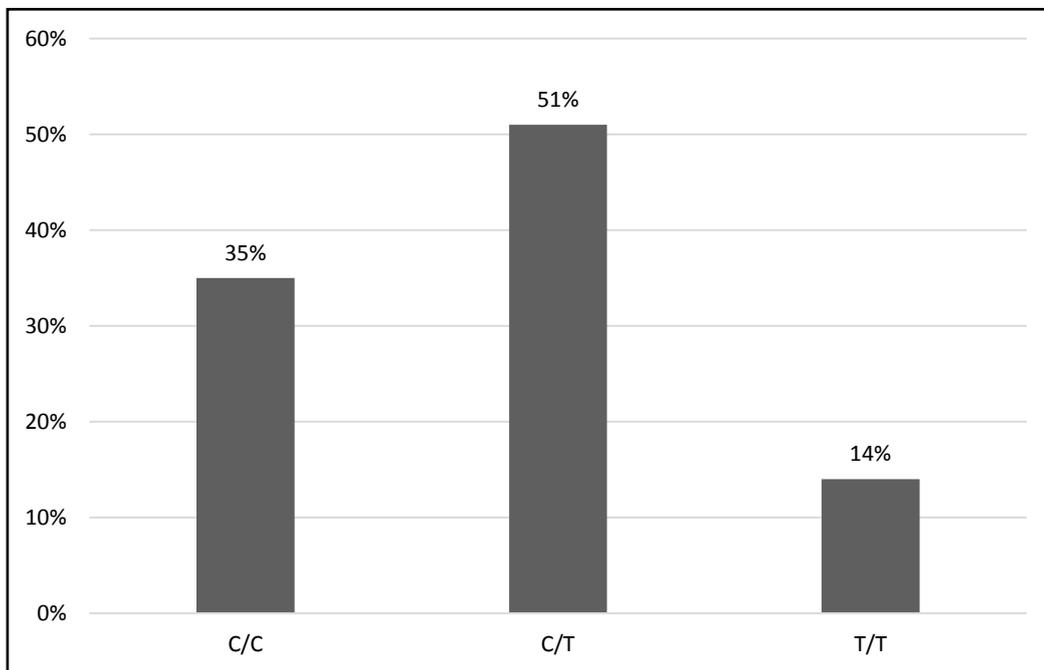
Genotipo	Grupo pacientes		Grupo control	
	N	Frecuencia	N	Frecuencia
<i>C/C</i>	34	0,333	132	0,420
<i>C/T</i>	57	0,559	143	0,455
<i>T/T</i>	11	0,108	39	0,125
<i>Total</i>	102		314	

N: número de pacientes

4.6.2.2.2 Distribución poblacional de la frecuencia genotípica de *MTHFR* 677 en base al tipo de Leucemia

Se realizó la distribución de los genotipos de las variantes polimórficas de *MTHFR* 677 de acuerdo con el tipo de leucemia de los pacientes del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Caracas.

En las figuras 56 a 60 se muestran la distribución porcentual de los genotipos en los pacientes estudiados, se puede observar que el polimorfismo heterocigoto C/T, fue el más frecuente todos los pacientes con leucemia, seguido



del genotipo homocigoto *wild type* C/C y por último el homocigoto mutado T/T, excepto en los pacientes con LLC donde el segundo lugar lo ocupa el tipo homocigoto mutado con un 25% y el tercer lugar el tipo homocigoto normal con un 0% como se muestra en la figura 58.

Figura 56. Distribución porcentual de los polimorfismos genéticos de *MTHFR* 677 en pacientes con LLA.

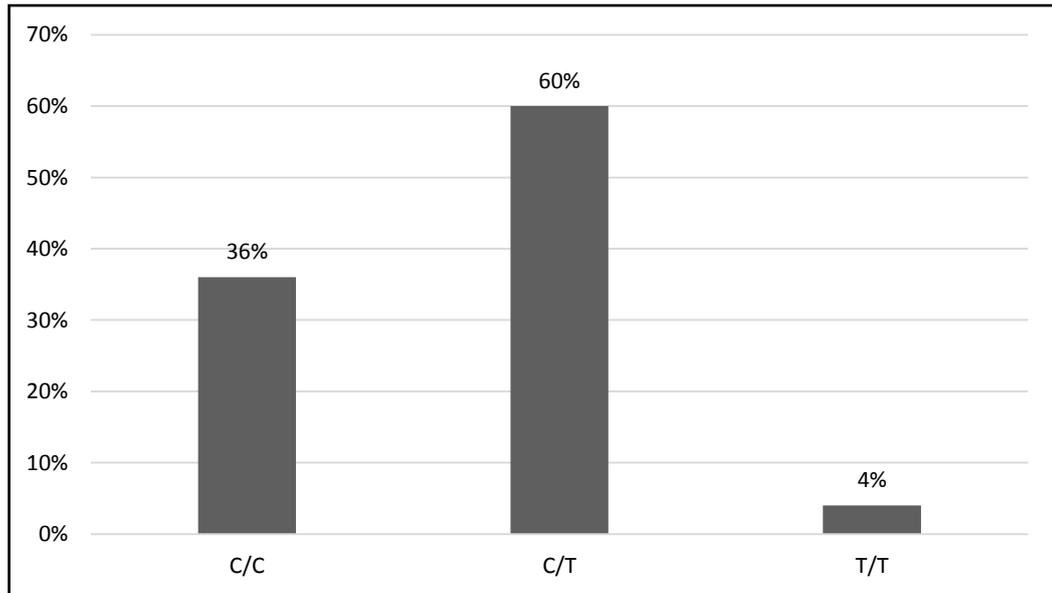


Figura 57. Distribución porcentual de los polimorfismos genéticos de *MTHFR* 677 en pacientes con LMA.

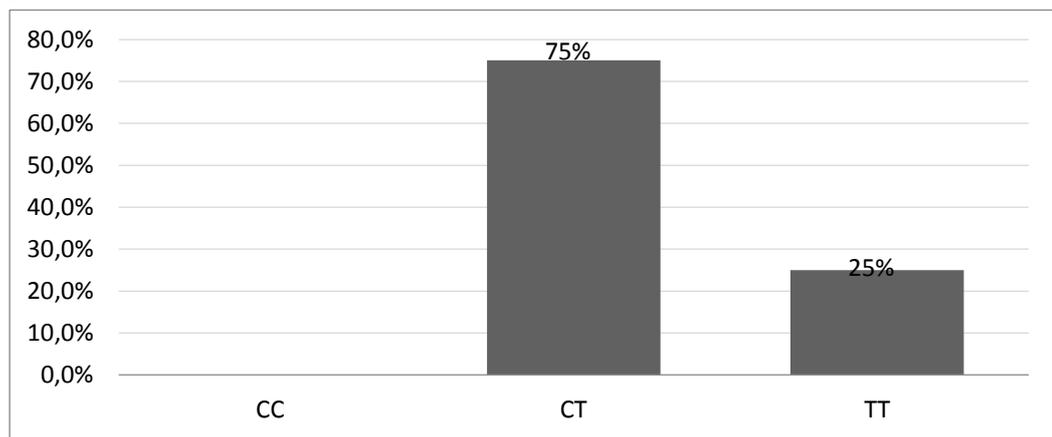


Figura 58. Distribución porcentual de los polimorfismos genéticos de *MTHFR* 677 en pacientes con LLC.

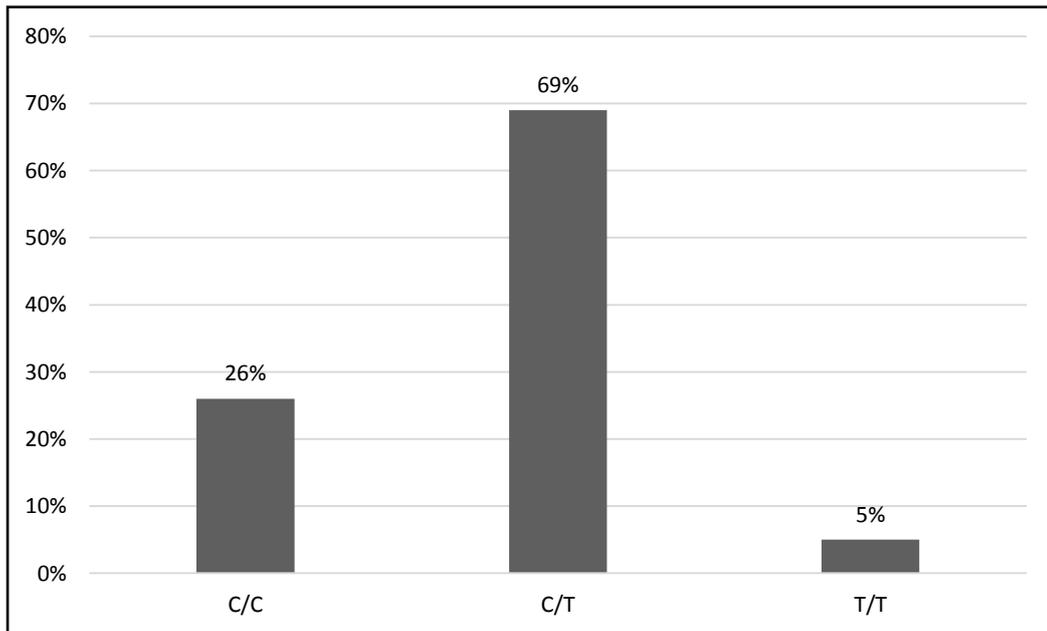


Figura 59. Distribución porcentual de los polimorfismos genéticos de *MTHFR* 677 en pacientes con LMC.

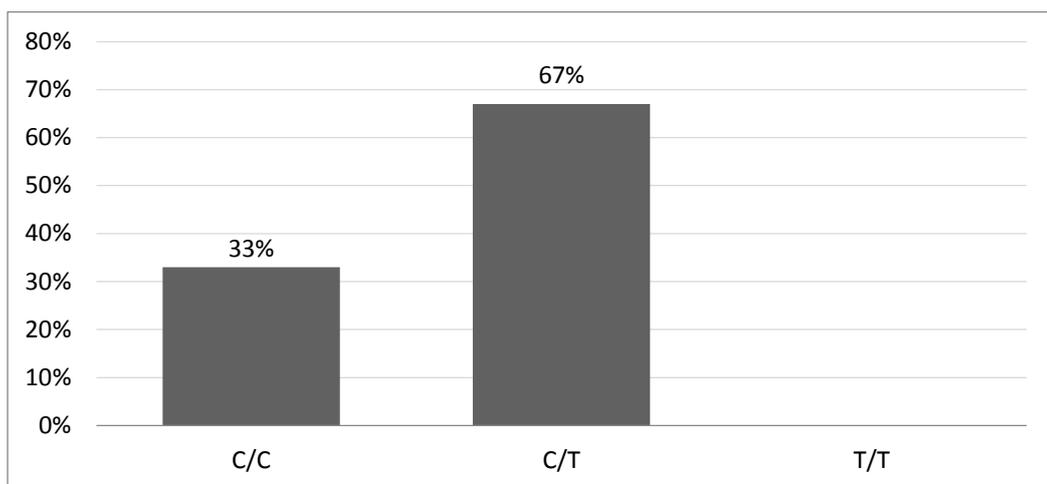


Figura 60. Distribución porcentual de los polimorfismos genéticos de *MTHFR* 677 en pacientes con Tricoleucemia

Se realizó un análisis estadístico de asociación entre el genotipo heterocigoto C/T y homocigotos mutados T/T observados en las poblaciones estudiadas, pacientes con leucemia y controles, con la finalidad de evaluar si existe asociación de los genotipos de *MTHFR* 677 con el desarrollo de esta enfermedad, es decir, si pudieran ser considerados un factor de riesgo para padecer leucemia. El riesgo relativo fue calculado por *Odds Ratio* (OR), considerando un IC de 95%.

En la tabla 34, se presenta la distribución de los genotipos y alelos de *MTHFR* 677 en la población estudiada, pacientes con leucemia y controles. Los resultados no mostraron asociación estadísticamente significativa del genotipo del modelo de herencia codominante de *MTHFR* 677 y el riesgo del padecimiento de leucemia. Para los modelos de herencia recesivo, dominante y aditivo, no se evidenció asociación de los mismos con el desarrollo de la enfermedad. En ambas poblaciones estudiadas se observó que el genotipo más frecuente es el heterocigoto C/T.

Tabla 34. Distribución de los genotipos del gen *MTHFR* 677 en pacientes con leucemia y controles.

Genotipo	Casos (n=102)	Controles (n= 314)	Odds Ratio (OR)	95% IC (intervalo de confianza)	P value
C/C	34	132	1	-	
C/T	57	143	1.5450	0.9517 - 2.5163	0,078
T/T	11	39	1.0950	0.5080 - 2.3603	0,816
Alelo C	62	201	1	-	
Alelo T	40	113	1.1476	0.7248 – 1.8169	0,557
Modelo recesivo					
T/T vs C/T + C/C			0.8524	0.4191 – 1.7335	0,659
Modelo dominante					
C/T + T/T Vs C/C			1.4505	0.9078 – 2.3179	0,119
Modelo aditivo					
			1.3878	0.8795 – 2.1900	0,159

P- value <0.05: valor significativo

4.6.2.2.3 Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de *MTHFR* 677 en pacientes con leucemia y su relación con la evolución clínica

Tomando en cuenta las consideraciones analizadas, para este genotipo *MTHFR* 677 se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos en

pacientes con LLA por recibir metotrexato en sus protocolos quimioterapéuticos con la finalidad de conocer si existe asociación entre los genotipos encontrados en los pacientes con leucemia que fueron estudiados y las diferentes variables de evolución clínica.

Los análisis farmacogenético de C/C y C/T de *MTHFR* 677 no mostraron una asociación estadísticamente significativa con el estadio clínico de los pacientes con LLA. Estos resultados muestran que no existe relación entre los genotipos de *MTHFR* 677 con el progreso de la enfermedad y no se pueden considerar como biomarcadores de respuesta al tratamiento con metotrexato en pacientes con LLA (tabla 35).

Tabla 35. Análisis de asociación de genotipos de polimorfismos de *MTHFR* 677 en pacientes con LLA tratados con Metotrexato.

	C/C vs C/T					C/C vs T/T				
	C/C (n)	C/T (n)	OR value	IC	<i>p</i> -	C/C (n)	T/T (n)	OR value	IC	<i>p</i> -
Remisión completa	9	13	1.1538 0,7243	0.5210-2.5554		9	5	0.8462 0,8033	0.2273-3.1506	
Recaída	7	7	1.2308 0,7075	0.4160-3.6411		7	1	1.1282 0,8854	0.2189-5.8144	
Toxicidad	6	0	0.9231 0,9550	0.0572-14.9079		6	1	1.1181 0,9458	0.0447-27.9942	
Fallecidos	5	9	1.2308 0,7883	0.2704-5.6024		5	2	0.4792 0,6290	0.0242-9.4767	

P-value <0,05: valor significativo. N: número de pacientes

A continuación, se muestra en la tabla 36 los resultados del análisis estadístico de los haplotipos del gen *MTHFR* 677-1298 y su asociación con la evolución clínica de los pacientes con LLA estudiados. No se observó asociación en ninguno de los haplotipos con alguna de las variables de evolución clínica, sugiriendo que los mismos no afectan la evolución de los pacientes con LLA tratados con metotrexato.

Tabla 36. Análisis de asociación de los polimorfismos del gen *MTHFR* 677 y 1298 y los estadios de evolución clínica en pacientes con LLA tratados con Metotrexato.

677	1298	Remisión completa OR(95% IC)	Recaídas OR (95% IC)	Toxicidad OR (95% IC)	Fallecidos OR (05% IC)
CC	AA	-	-	-	-
CC	AC	0.9259 (0.2087 - 4.1077)	2.222 (0.3253 - 15.1806)	1.1111 (0.1285 - 9.6056)	0.7407 (0.0999 - 5.4903)
CT	AA	0.8333 (0.2037 - 3.4093)	1.2500 (0.1732 - 9.0197)	0.4167 (0.0328 - 5.2989)	0.5556 (0.0770 - 4.0087)
CT	AC	0.6667 (0.1667 - 2.6657)	1 (0.1409 - 7.0993)	0.6667 (0.0803 - 5.5377)	1.5556 (0.3231 - 7.4882)
TT	AA	0.8333 (0.1498 - 4.6360)	0.8333 (0.0616 - 11.2778)	0.3231 (0.0133 - 7.8478)	1.1111 (0.1422 - 8.6800)
TT	AC	0.5385 (0.0190-15.2988)	1.400 (0.0429 - 45.6815)	5.0000 (0.2120 - 117.9007)	1 (0.0327- 30.6201)

4.6.3 Tiempo de supervivencia global y libre de evento en pacientes con LLA tratados con MTX de acuerdo al genotipo *MTHFR*

Se estudió la asociación entre las tasas de supervivencia global y libre de evento, y la presencia de los alelos común y mutado para los polimorfismos 677 y 1298 del gen *MTHFR*, mediante el estimador de Kaplan Meier y para contrastar las hipótesis de las curvas de supervivencia se calculó el test Log Rank.

En relación a la supervivencia global asociada al polimorfismo *MTHFR* 677, se encontró que los pacientes que presentaron el alelo común C (genotipo *wild type* C/C) tienen una media de supervivencia global de 85 ± 10 meses; por su parte, los que presentaron al menos un alelo mutado T, es decir, el genotipo heterocigoto C/T y el genotipo homocigoto mutado T/T, la media del tiempo de supervivencia es de 87 ± 11 meses, observándose de esta manera, que los pacientes que presentan al menos un alelo mutado T, tienen una media de supervivencia ligeramente mayor que los del genotipo *wild type* C/C.

En cuanto, a la tasa de supervivencia, en la Figura 61 se presenta el gráfico de Kaplan Meier donde se observa que aquellos que presentaron el alelo común C, tienen un porcentaje de supervivencia global de 46% a los 77 meses y los que tienen al menos un alelo mutado T, un porcentaje de 62% a los 76 meses. Sin

embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (Log Rank: 0,008, p -value: 0,930).

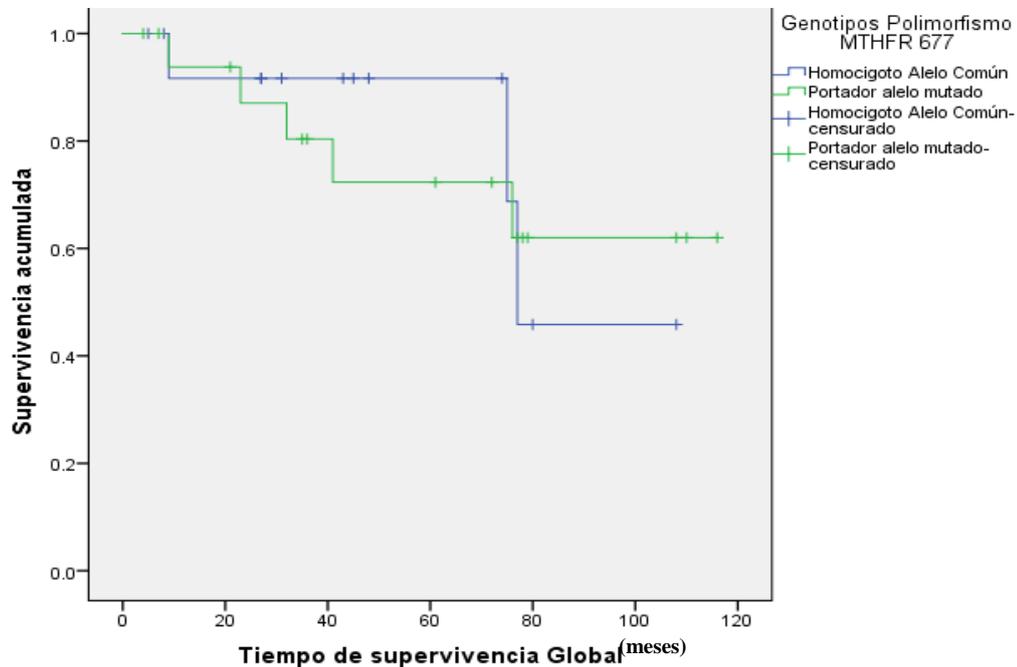


Figura 61. Gráfico de Supervivencia Global respecto al polimorfismo *MTHFR* 677 (Kaplan - Meier). Log Rank: 0,008, p -value: 0,930.

En cuanto al efecto que tiene el polimorfismo *MTHFR* 1298 sobre la supervivencia global de los pacientes con LLA estudiados, se encontró que los pacientes que presentaron el alelo común A (genotipo *wild type* A/A) tienen una media de supervivencia global de 108 ± 7 meses, por su parte, los que presentaron al menos un alelo mutado C, es decir, el genotipo heterocigoto A/C y el genotipo homocigoto mutado C/C, la media del tiempo de supervivencia es de 63 ± 7 meses, evidenciándose que lo pacientes que presentan al menos un alelo mutado C tienen un media de supervivencia menor a los del genotipo *wild type* A/A.

En la Figura 62 se observa el gráfico de Kaplan Meier del cálculo de la tasa de supervivencia global en relación al tiempo en meses, se observa que los pacientes que presentaron en su genotipo el alelo A tienen una tasa de supervivencia de 93% a los 9 meses, mientras que los portadores de al menos un alelo mutado C tienen una tasa de supervivencia de 35% a los 77 meses. Estas variaciones marcadas entre ambos alelos fueron estadísticamente significativas

con un p -value $<0,005$, lo que sugiere que la presencia de al menos un alelo mutado C de *MTHFR* 1298 puede disminuir la supervivencia de los pacientes con LLA (Log Rank: 4,29 y p -value de 0,038).

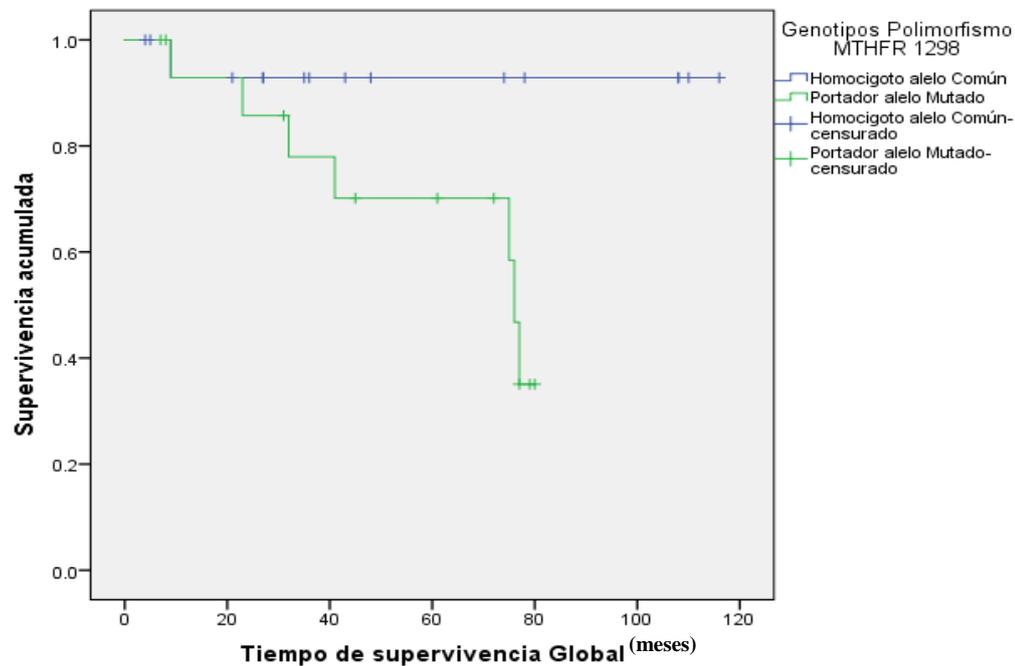
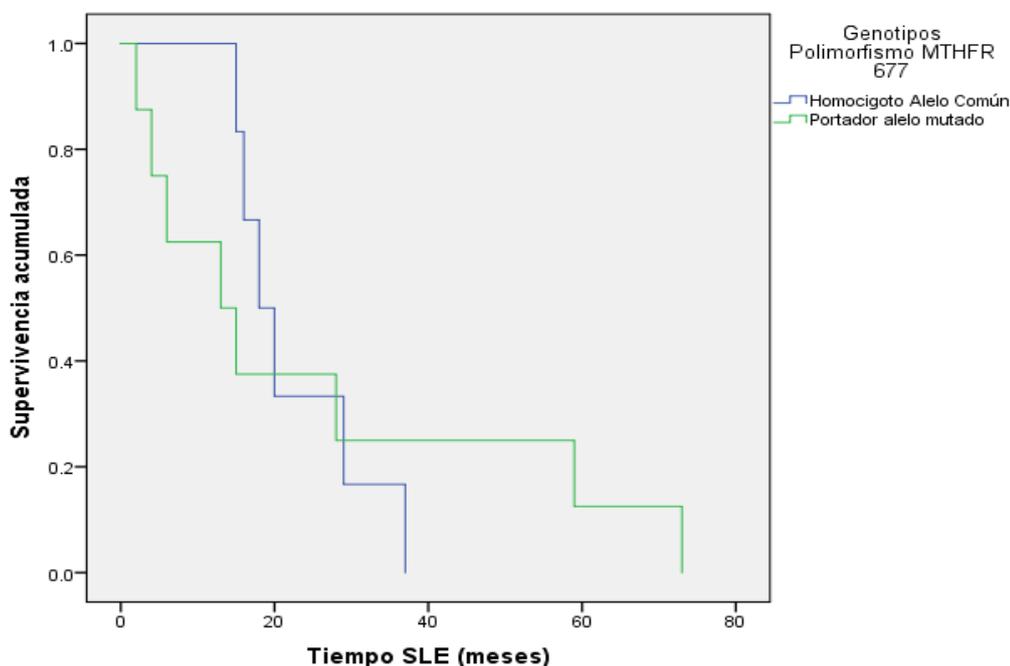


Figura 62. Supervivencia Global respecto al polimorfismo *MTHFR* 1298 (Kaplan - Meier). Log Rank: 4,29 y p -value de 0,038.

En referencia a la supervivencia libre de evento asociada al polimorfismo *MTHFR* 677, los pacientes que presentaron el alelo común C (genotipo *wild type* C/C) mostraron una media de supervivencia libre de evento de 23 ± 4 meses; por su parte, los que tienen al menos un alelo mutado T, es decir, el genotipo heterocigoto C/T y genotipo homocigoto mutado T/T, la media del tiempo de supervivencia es de 25 ± 9 meses, de tal modo se puede observar que a pesar de que los pacientes que presentan al menos un alelo mutado T, tienen un media de supervivencia libre de eventos mayor a los del genotipo *wild type* C/C con una mínima variación entre ambas. Adicionalmente, la tasa de supervivencia libre para los pacientes portadores del alelo común C, es de 17% a los 29 meses y los que tienen al menos un alelo mutado T, un porcentaje de 13% a los 59 meses. Sin embargo, no se encontró asociación significativa entre este polimorfismo y la

supervivencia libre de evento (Log Rank: 0,001, p -value: 0,96) tal como se muestra en la figura 63.



Fuente: Base de Datos de la Investigación. Instrumento de Recolección de Datos. 2017

Figura 63. Supervivencia libre de evento respecto al polimorfismo *MTHFR* 677 (Kaplan Meier). Log Rank: 0,001, p -value: 0,96

De igual manera, en aquellos pacientes con el polimorfismo *MTHFR* 1298 se encontró que los que portaban el alelo común A (genotipo *wild type* A/A) presentan una media de supervivencia libre de evento de 57 ± 8 meses, mientras que, los que tienen al menos un alelo mutado C, es decir, el genotipo heterocigoto A/C y el genotipo homocigoto C/C, la media del tiempo de supervivencia es de 42 ± 7 meses, estos resultados evidencian que lo pacientes que presentan al menos un alelo mutado C tienen un media de tiempo entre la remisión completa y la aparición de una recaída menor a los del genotipo *wild type* A/A. Como se puede observar en la Figura 64, el gráfico Kaplan- Meier muestra la tasa de supervivencia libre de evento de los pacientes que presentan en su genotipo el alelo común A de 44% a los 73 meses, mientras que los portadores de al menos un alelo mutado C presentan una tasa de SLE de 33% en 59 meses. A pesar, de que en estos resultados se puede evidenciar una diferencia entre los que portaban el alelo mutado con respecto a los que tenían el alelo común, no se encontró

asociación estadísticamente significativa entre ambos grupos con respecto a la supervivencia libre de evento de los pacientes estudiados (Log Rank: 1,42 y p -value: 0,234).

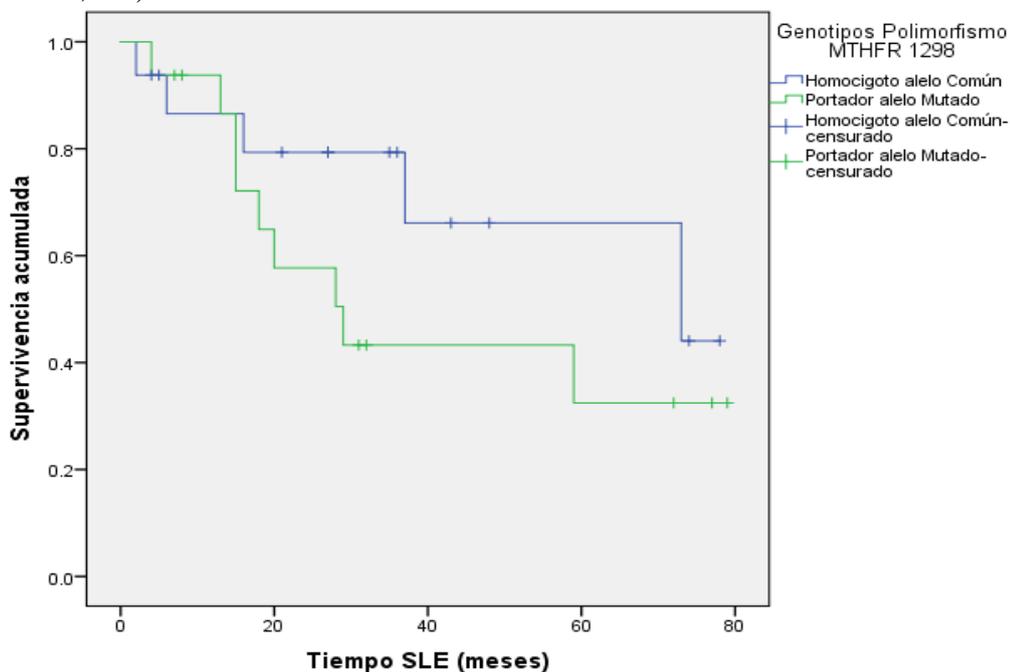


Figura 64. Supervivencia libre de evento respecto al polimorfismo *MTHFR* 1298 (Kaplan – Meier).Log Rank: 1,42 y p -value: 0,234

Para finalizar, los marcadores moleculares encontrados en estudio útiles para el diagnóstico, pronóstico de evolución clínica y de riesgo de susceptibilidad de padecer leucemia se muestran en las figuras 65 y 66.

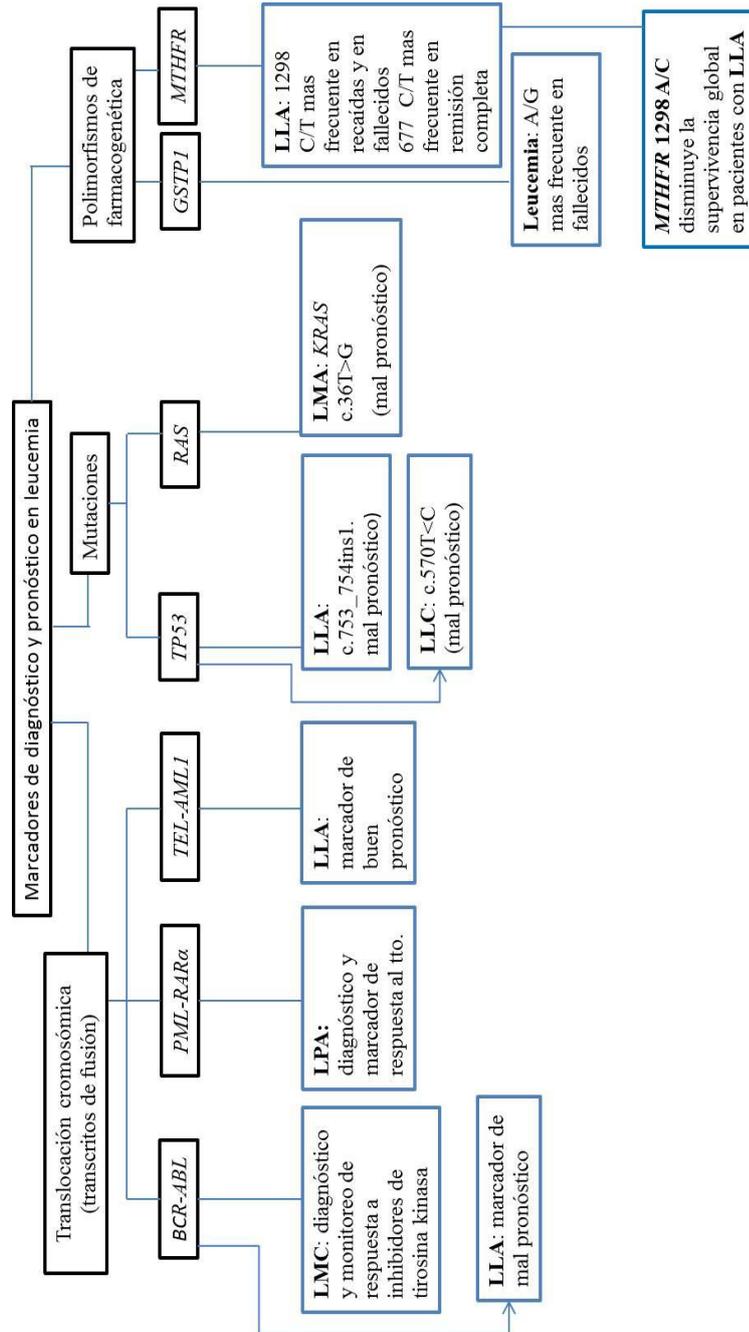


Figura 65. Marcadores moleculares para el diagnóstico y el pronóstico de la evolución clínica en leucemia.

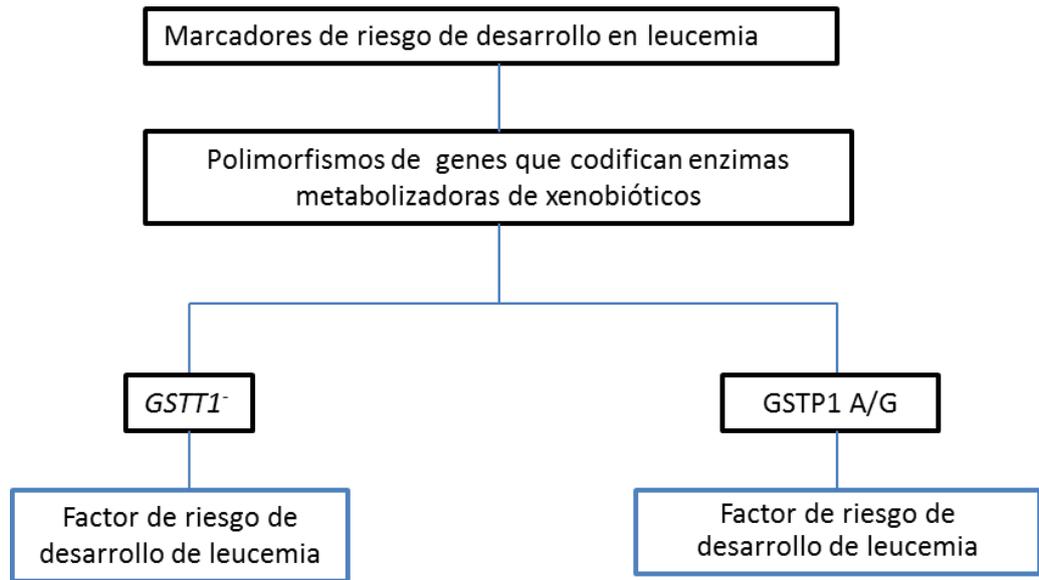


Figura 66. Marcadores moleculares de riesgo de susceptibilidad a desarrollar leucemia.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

El avance científico del estudio de los mecanismos moleculares de la hematopoyesis anormal que conduce al desarrollo de las diferentes neoplasias hematológicas, ha sido esencial para el conocimiento de las alteraciones moleculares en genes que controlan la diferenciación celular, como los oncogenes y genes de supresión tumoral, que derivan en la pérdida del control de la homeostasis del tejido hematopoyético promoviendo la aparición de la leucemia (129).

Cabe destacar que cada tipo de leucemia difiere en su etiología, que son aquellos mecanismos leucemogénicos que conducen al desarrollo de la enfermedad, así como en su evolución. Las leucemias agudas se caracterizan por un bloqueo en los estadios de diferenciación, resultando una masiva acumulación de células inmaduras o blastos. En contraste, las leucemias crónicas son consecuencia de la proliferación no regulada, encontrándose un amplio espectro de células diferenciadas. Las células leucémicas pueden distinguirse de las células progenitoras hematopoyéticas en base a propiedades morfológicas y citoquímicas, anormalidades cariotípicas o citogenéticas, reordenamientos génicos de antígeno-receptor, inmunofenotipos y mutaciones génicas (130).

En la última década se ha observado una disminución de la mortalidad de alrededor del 2% (en población estadounidense)(131), gracias a las medidas de prevención, diagnóstico precoz y a la contribución del desarrollo de nuevas terapias farmacológicas. En la región de las Américas según el último boletín de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el año 2012 fallecieron aproximadamente 53mil personas por causa de la leucemia, solo mil personas menos que en el año 2000.

En Venezuela, según los datos estadísticos del año 2006, la incidencia de casos de cáncer en niños y jóvenes menores de 15 años es dominada por las leucemias con más de 600 casos, representando aproximadamente un 40% del

total. En la población adulta, las leucemias eran el noveno tipo de cáncer en ambos sexos, con una incidencia estimada de 1491 casos para la fecha del boletín, y 865 muertes estimadas (29). Para el último anuario epidemiológico reportado en el año 2012 (132), se registraron 42.046 casos de cáncer (incluyendo niños, adolescentes, adultos y ancianos), entre ellos, 1754 casos de leucemia, observándose un aumento con respecto al boletín anterior. La leucemia ocupa la quinta posición de incidencia en hombres, con 914 casos, representando el 4,59%, y en mujeres ocupa la séptima posición con un total de 840 casos, constituyendo el 3,80%. Con respecto a la población infantil y juvenil, se estimaron en 651 casos y 189 las defunciones registradas en menores de 15 años; las leucemias continúan dominando ampliamente sobre las otras localizaciones de cáncer, representando el 45% del total. Estos datos indican que la leucemia refleja un importante problema de salud pública, que obliga al desarrollo de estrategias multidisciplinarias que faciliten el conocimiento a través de la caracterización de las alteraciones genéticas implicadas en la aparición y evolución de la leucemia en la población venezolana, para así, establecer la evaluación de posibles factores de riesgo para el desarrollo de la leucemia y factores asociados a la evolución clínica, con la finalidad de reducir los índices de morbi- mortalidad y garantizar una mejor calidad de vida.

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten conocer la presencia de mutaciones en los genes estudiados y los polimorfismos en genes implicados en estudios farmacogenéticos, en conjunto con la evolución clínica de la respuesta a los tratamientos de pacientes con distintos tipos de leucemia diagnosticados en el Hospital Universitario de Caracas, así como la estimación de la supervivencia global y libre de evento.

Se analizaron 122 muestras de sangre periférica y/o médula ósea de pacientes con leucemia y 310 individuos controles provenientes de los diferentes grupos étnicos venezolanos, tomando en cuenta la diversidad y heterogeneidad étnica de la población.

En el grupo de pacientes estudiados, se encontró que la LLA fue la más frecuente con un 47,5%, seguida de la LMA con un 24,5%, la LMC en un 18,8% y en menor frecuencia la LLC en un 4,9%, tricoleucemia en un 3,3% y un solo

caso de LMMJ que representó el 0,8%. Estos dos últimos tipos de leucemias son muy poco comunes dentro de la población venezolana y en general en la población mundial (133). El rango de edad de la población fue muy amplio, desde 11 meses hasta 76 años de vida, en la población infanto-juvenil prevalecieron los casos de LLA y LMA, reportado del mismo modo por Insausti *et al.*, (134), en contraste con la población adulta, donde predominaron las LMC, LLC y LMA, así mismo, el sexo masculino tuvo una mayor prevalencia con respecto al sexo femenino. El 72% de los pacientes estudiados padecen de leucemias agudas, siendo éstas las más frecuentes. Estos resultados son similares a los reportados en estudios con otras poblaciones, donde la predominancia de la enfermedad recae en el sexo masculino; con respecto a la edad, a excepción de LLA, típicamente el riesgo de padecer leucemia aumenta con la edad (131) (*Cancer Treatment Centers of America*, 2014). La leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) clasificada actualmente por la OMS dentro del grupo de neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas, es poco frecuente y representa aproximadamente 2% de las leucemias en la población infantil, en este estudio solo se obtuvo la muestra de un paciente de este tipo de leucemia.

En Latinoamérica la epidemiología de las leucemias presenta una tendencia similar a la encontrada en los resultados de este trabajo. En Bolivia, Chile, Argentina, México y Cuba, los reportes señalan a la leucemia como la neoplasia más frecuente en la población infantil y juvenil (133)(135)(136). La prevalencia de la LLA seguido de la LMA en población infantil, así como la LMC y la LMA en adultos, y el predominio en el sexo masculino, han sido reportados (137)(138)(139).

En relación a la estandarización del protocolo de extracción de ARNt, se empleó el método de Trizol y la resuspensión del ARNt en agua con DEPC 0,1%, encontrándose resultados satisfactorios en ambos tipos de muestras, para las determinaciones posteriores de los transcritos de *BCR-ABL*, *PML-RAR α* y *TEL-AML1* a través del método RT-PCR, como lo reportado por otros autores (141)(142)(143)(144). Los inconvenientes que se presentaron en algunos casos ocurrieron en muestras de pacientes bajo protocolos de inducción recientes de quimioterapia, en el cual ocurre una disminución abrupta de células

hematopoyéticas que se conoce con el término “barrido de médula”, trayendo como consecuencia la dificultad del aislamiento de ácidos nucleicos, tanto de ARN como de ADN.

Detección de t(9;22) con fusión génica de BCR-ABL

Con respecto a la detección del transcrito quimérico del oncogén *BCR-ABL*, se realizó la determinación en los pacientes diagnosticados con LMC, identificándose la presencia de las variantes b2a2 y b3a2. Se detectó la variante b2a2 en 4 pacientes y b3a2 en 3 pacientes, representando 30% de los pacientes con LMC. Estos resultados no concuerdan con reportes de otros grupos, (128)(129)(130)(131) debido a que presentan una frecuencia superior de 95% en pacientes recién diagnosticados con LMC. Otro estudio realizado en nuestro país, destacó la presencia del transcrito *BCR-ABL* en 67,3% de los pacientes diagnosticados con LMC (145), siendo una frecuencia que igualmente se encuentra por debajo de lo reportado por otros autores.

De acuerdo a la frecuencia detectada del transcrito *BCR-ABL*, es de suponerse que el estadio del paciente al momento del estudio es crucial para el resultado, ya que al iniciarse el protocolo de quimioterapia con el inhibidor de tirosina cinasa STI571 (imatinib), la expresión del transcrito disminuye considerablemente logrando en la mayoría de los casos una remisión hematológica completa (96 %) al cabo de unos 12 meses, considerada como un pronóstico favorable (146). Los pacientes analizados en este estudio ya habían iniciado tratamiento con quimioterapia y posiblemente ya se habría reducido completamente la expresión del oncogén, lo que trae como consecuencia un resultado negativo, lo cual explicaría la baja frecuencia obtenida. Así mismo, un estudio del grupo IRIS (*International Randomized Study of Interferon vs STI571*), dedicado a la evaluación de eficacia de respuesta de protocolos de tratamiento para LMC, realizaron las cuantificaciones de los transcritos *BCR-ABL* por el método RQ-PCR, para estimar la respuesta molecular mayor, debido a que es el método que cuenta con más sensibilidad, obteniendo una reducción de 2-log a los 12 meses de tratamiento con imatinib al compararlo con el valor de base previo al inicio del tratamiento; en este contexto, IRIS define un estado de respuesta

molecular mayor cuando existe una disminución de ≥ 3 -log de transcrito *BCR-ABL* en comparación con el nivel previo (147)(148). Druker *et al.*, expone que después de 1 año los transcritos de *BCR-ABL* descendieron por al menos 3-log en 53% de los pacientes con LMC y en 4 años descendieron en 80% de los pacientes; obteniendo una media de reducción de 3.08 -log en 1 año y 3,78-log en 4 años de transcritos *BCR-ABL* (149).

El grupo de investigación de *European Leukemia Net* (ELN) (150) planteó la actualización de los protocolos de tratamiento para la LMC, así como la modificación de los términos que definen los estadios de respuesta a los fármacos. El término “respuesta molecular completa o mayor” debe ser evitado y sustituido por el término “leucemia molecularmente indetectable”, con especificación del número de las copias de transcritos cuantificados por RQ-PCR. La incorporación de nuevas drogas de primera línea de inhibidores de tirosina cinasa (TKI) de segunda generación: nilotinib, dasatinib, y bosutinib, para tratar aquellos casos de fracaso terapéutico a imatinib, inducidos por mecanismos de resistencia, como la mutación del gen MDR (*multidrug resistance*), y la mutación más conocida T315I, que es frecuente encontrarla en estadios avanzados de la enfermedad, originando resistencia a este fármaco, impidiendo la acción del inhibidor sobre la enzima (146)(151). La importancia de estos avances radica en un mejor control de la LMC, gracias a protocolos estandarizados de monitoreo y la detección de enfermedad mínima residual que permiten orientar el esquema terapéutico de estos pacientes.

En referencia a las evidencias planteadas previamente, la baja frecuencia de pacientes positivos para el transcrito *BCR-ABL* en pacientes con LMC pudo deberse a la condición de los pacientes, ya que todos recibían tratamiento de imatinib (Gleevec®, Novartis). Sin embargo, es necesario considerar y recomendar que el paciente deba ser estudiado inicialmente, es decir, deba estar recién diagnosticado para conocer el valor basal a través de la cuantificación por RQ-PCR porque ofrece una mayor sensibilidad al ser el método de referencia “gold standard”. El desarrollo de variantes de la técnica de RQ-PCR para la detección de *BCR-ABL* como la reciente adaptación denominada transcripción reversa digital -RQ-PCR (*reverse-transcription digital PCR*, RT-dPCR), busca

simplificar la técnica por no emplear el uso de curva de calibración, con el fin de mejorar la precisión de la medición de los transcritos de ARN (45). Sin embargo, esta nueva adaptación aún no alcanza el óptimo nivel de sensibilidad validado y estandarizado de la RQ-PCR.

En cuanto a los tipos de transcritos *BCR-ABL* encontrados en pacientes con LMC, estos corresponden a la región mayor (M-bcr) ubicada en un área de 5.8 kb entre los exones 12 y 16 del gen *BCR*, donde resultan los transcritos b3a2 y b2a2 que codifican una proteína de 210KDa. El más frecuente fue b2a2 seguido de b3a2, coincidiendo con lo reportado por Carreño (145) en un estudio donde encontró 43,5% para b2a2 y 39,5% para b3a2, adicionalmente también reportó 3,5% para la variante e1a2 que codifica para la proteína 190KDa, que en este estudio no fue detectado en ningún paciente. Otros estudios con mayor población reportan una mayor frecuencia de b2a2, en México y Colombia y en Japón (142)(152)(153)(154). Un estudio de 30 pacientes con LMC del Estado Zulia realizado por Cañizales (155), reportó una mayor frecuencia del transcrito b3a2, similar a otros estudios, como en Cuba (156), Corea del Sur (157) y Europa (32)(158).

La identificación del transcrito quimérico *BCR-ABL* en pacientes con LMC tiene importancia en la epidemiología molecular de la enfermedad, por su variación según la constitución étnica de la población. También, se ha descrito la correlación de la presencia de los transcritos con la evolución de la enfermedad. Algunos investigadores han reportado que el transcrito b3a2 está asociado con niveles de plaquetas más altos en comparación con los demás transcritos, sugiriendo una mayor actividad trombopoyética (152)(159). Otros trabajos han reportado que no observan diferencias estadísticamente significativas entre las manifestaciones clínicas, así como la evolución de la enfermedad y los transcritos *BCR-ABL* (160)(161)(162).

La oncoproteína BCR-ABL promueve la transformación leucémica de las células progenitoras hematopoyéticas a través de su actividad tirosina cinasa desregulada, esta actividad es esencial para la captación y activación de múltiples vías de transducción de señales que conllevan a la reducción de la apoptosis y al

aumento del potencial proliferativo típico de las células que expresan *BCR-ABL* (163).

Las diferencias en el tipo de leucemia están relacionadas con la naturaleza de la célula en la que se produce la proteína de fusión. En la LMC, se cree que la fusión ocurre en las células progenitoras hematopoyéticas, con propiedades de auto-renovación y la producción ulterior de células que se diferencian en células sanguíneas. Existen evidencias que sugieren que en la LLA la fusión ocurre en células progenitoras linfoides que expresan los marcadores CD 34⁺, CD19⁻ (164)(165).

A todos los pacientes diagnosticados con LLA en este estudio se les realizó la determinación del transcrito *BCR-ABL* por RT-PCR, detectando 6 pacientes positivos para el transcrito b2a2 que codifica para la proteína 210 KDa. Se evidenció el transcrito en 4 pacientes infanto-juveniles y en 2 adultos, representando el 8% y el 17% de los pacientes con LLA según el grupo etario estudiados, respectivamente. En la actualidad, 2 pacientes (un adulto y un niño) con LLA Ph⁺ fallecieron, debido a recaídas post-tratamiento de inducción, un paciente adulto está en recaída y los otros 3 niños se encuentran en remisión completa. La frecuencia de este transcrito así como el tipo de proteína Bcr-Abl expresada, al parecer tiene una variación según la composición étnica de la población. Maurer *et al.*, reportaron un estudio realizado en 314 pacientes alemanes con LLA, encontrando un 55% de adultos Ph⁺ y 6% niños Ph⁺ (166). Mitterbauer *et al.*, estudiaron la presencia de *BCR-ABL* en 74 pacientes británicos con LLA de 16 a 84 años, detectando el transcrito *BCR-ABL* en 20 pacientes (27%), de los cuales 11 expresaron la proteína m-*bcr* (190 KDa) y 9 la proteína M-*bcr* (210 KDa) (167), resultados similares reportaron Soverini *et al.*, en 15 pacientes italianos con LLA, donde se detectaron ambas proteínas de Bcr-Abl con una proporción semejante al estudio anterior, donde 8 pacientes expresaron la proteína 190 KDa y 7 la de 210 KDa (168). En el presente estudio 6 pacientes Ph⁺ expresaron el transcrito b2a2 que codifica para la proteína M-*bcr* y no se detectó ningún paciente positivo para m-*bcr*.

Es conocido que la incidencia de LLA disminuye con la edad, y en este estudio que comprendió 46 niños- jóvenes y 12 adultos, la media de la edad fue

16,8 años de vida (1 a 74 años), encontrándose dentro de esa tendencia. Cabe destacar, que este tipo de leucemia representa aproximadamente el 30% de los cánceres de la infancia, el 6% en adolescentes y tiene una baja frecuencia en el adulto mayor (169). Secker *et al.*, evaluaron la frecuencia de detección de *BCR-ABL* en pacientes adultos con LLA, encontrando la menor frecuencia en adolescentes de 15- 20 años (10,3 %); en adultos de 21 a 50 años (21,8%) y para adultos mayores de 50 años se obtuvo una mayor frecuencia (43,8%), sugiriendo una diferencia importante entre la genética de la LLA a través de la expresión de *BCR-ABL* de los adultos mayores y en los jóvenes, pudiendo dar una explicación en parte del creciente riesgo de pronóstico desfavorable con el aumento de edad (170).

La importancia de la detección de la presencia del transcrito de fusión *BCR-ABL* radica en la información que puede aportar acerca del estadio clínico del paciente, el manejo terapéutico adecuado y la estimación de pronóstico de supervivencia. Siguiendo los lineamientos de la clasificación de pacientes de LLA por el grupo FAB y médicos hematólogos del HUC, se dividieron los pacientes en dos categorías según la edad, cifras de glóbulos blancos, la presencia o ausencia de la enfermedad en el SNC y la presencia o ausencia de la translocación 9; 22 (Ph+) en: bajo riesgo y alto riesgo. Toda la información de historia clínica fue obtenida a través de comunicación personal de las Dra. Carina Araujo y la Dra. Yehey Calderón, hematólogos del HUC.

Los pacientes estudiados con LLA de bajo riesgo fueron 24 y de alto riesgo 34, evidenciándose una diferencia notoria en la cantidad de fallecidos, 12 fallecidos (35 %) de alto riesgo y 6 fallecidos (25 %) de bajo riesgo, de los cuales los 2 pacientes Ph+ fallecidos se encuentran en el grupo de alto riesgo. Con respecto a la remisión completa, para la fecha actual, 54 % de los pacientes de bajo riesgo y 53 % de los pacientes de alto riesgo se encuentran en remisión completa; 20 % de los pacientes de bajo riesgo y 18 % de alto riesgo tuvieron recaídas frente a los protocolos quimioterapéuticos. Como se menciona en la presentación de los resultados, lamentablemente no se dispone de la información de la evolución clínica de algunos pacientes por no continuar asistiendo a la consulta del Servicio de Hematología.

En un estudio realizado en 34 niños con LLA del HUC (125), clasificados en 17 pacientes de bajo riesgo y 18 pacientes de alto riesgo se reportaron frecuencias de remisión completa superiores en los pacientes de alto riesgo posterior a cada fase del protocolo, sin embargo, se obtuvieron bajas tasas de supervivencia global (SG) y de supervivencia libre de enfermedad (SLE) en comparación con otros estudios internacionales. Kantarjian *et al.*, realizaron un estudio en pacientes adultos con LLA Ph+ con la finalidad de conocer si la evolución de la enfermedad varía de acuerdo al tipo de proteína de fusión p210 y p190, encontrando que no existían diferencias significativas en varios signos, como grado de organomegalia, leucocitosis, trombocitopenia, anormalidades cariotípicas y en la tasa de remisión completa (171).

Los resultados obtenidos en este estudio, muestran un espectro preliminar del comportamiento de los pacientes con LLA Ph+ del HUC, observándose que 3 pacientes se encuentran en remisión completa, 2 fallecieron post- recaídas y uno actualmente se encuentra en recaída, sugiriendo que la presencia del transcrito *BCR-ABL* condiciona un pronóstico desfavorable en la evolución clínica de los pacientes con LLA, por lo que se recomienda la continuación de este estudio para abarcar un mayor grupo de pacientes. La detección oportuna de la enfermedad mínima residual en los pacientes con LLA es importante para pronosticar recaídas y es indispensable, previo a un protocolo de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, para disminuir el riesgo de recidiva post-trasplante a largo plazo (172).

Detección de la presencia de t(15;17) con fusión génica PML-RAR α

La leucemia promielocítica aguda (LPA) constituye el subtipo M3 en la clasificación de las leucemias mieloides agudas por la FAB. Ha sido caracterizada a nivel clínico, morfológico, inmunofenotípico y genético. Esta variedad es caracterizada por la presencia de promielocitos atípicos en sangre periférica y en médula ósea, por presentar una alteración citogenética, la translocación 15;17, resultando el transcrito quimérico de fusión *PML-RAR α* que tiene un rol importante en la leucemogénesis. Esta proteína oncogénica inhibe la diferenciación celular al producir un bloqueo en la maduración en la etapa de

promielocito y además es capaz de unir y reprimir constitutivamente a los promotores diana del ácido retinoico (173).

La determinación del transcrito *PML-RAR α* fue realizada a través del método RT-PCR anidada, que consiste en dos PCR consecutivas con un par de cebadores externos y otro par interno, que abarcan la región donde ocurre la fusión de los genes *PML* y *RAR α* , así como las variantes de los transcritos que se pueden formar por corte y empalme, denominados bcr1, bcr2 y bcr3. Esta técnica tiene una sensibilidad superior (10^{-4}), por lo que es considerada apta para la detección del transcrito *PML-RAR α* para el diagnóstico, monitoreo y detección de enfermedad mínima residual de LPA (32)(174). Actualmente, la técnica “*droplet digital PCR*” (ddPCR), una adaptación de la PCR, se emplea para la detección de transcritos de *PML-RAR α* para el monitoreo de EMR en pacientes con LPA. Al ser comparada con las técnicas RT-PCR anidada y RQ-PCR mostró una óptima linealidad y eficiencia, cuyo límite inferior de detección es similar a estos métodos, demostrando ser una herramienta novedosa para la detección de transcritos de fusión que pronostican un fracaso terapéutico y el riesgo de recaída (175).

En este estudio participaron 9 pacientes con LPA, de ambos sexos, con predominio del sexo femenino, y representaron el 30 % del total de los pacientes con LMA. El rango de edad fue de 5 a 57 años de edad, comprendiendo 2 niños y 7 adultos, de los cuales solo un paciente se encontraba recién diagnosticado, otro estaba en remisión y los demás ya estaban bajo tratamiento quimioterapéutico.

De Salvo *et al.*, reportó en un estudio realizado entre los años 1982 y 1987 en el estado Zulia una incidencia de 27,88 % de pacientes niños y adultos con LPA (176); esta frecuencia es similar a la encontrada en este estudio. Douer *et al.*, reportaron en un estudio realizado en poblaciones latinoamericanas y no latinoamericanas en Estados Unidos, una alta incidencia de LPA en población latinoamericana, afirmando que obtuvieron 24 % de pacientes diagnosticados con LPA con respecto a la población total de LMA, en comparación con la frecuencia de no latinoamericanos que rondaba en un rango de 5 % a 15 %. Estas diferencias estadísticamente significativas las asociaron a una posible predisposición genética al padecimiento de LPA o a la influencia medioambiental (177). Otros

investigadores encontraron igualmente diferencias marcadas en ambas poblaciones, sugiriendo que la población latinoamericana tiene una mayor proporción de LPA dentro del grupo de LMA, la cual tiene una frecuencia de 37,5 % en contraste con un 6,4 % de la población no latinoamericana, esto debido a que no es una etnia específica, lo que hace más complejo caracterizar esa población, tomando en cuenta los orígenes europeos de España, Portugal e Italia, africanos y de diferentes grupos amerindios (178). En Cuba, un estudio reportó una frecuencia de 15,3 % de pacientes con LPA, siendo la más baja en Latinoamérica (179).

Se realizó la determinación del transcrito *PML-RAR α* por RT-PCR anidada a los 9 pacientes con LPA, obteniendo la detección de la variante *bcr1* solamente en un paciente. Este paciente femenino de 37 años de edad se encontraba recién diagnosticado, sin haber recibido el protocolo quimioterapéutico de inducción. De acuerdo a la evolución clínica de los pacientes con LPA hasta la fecha, 2 adultos fallecieron y los otros 7 se encuentran en estado de remisión completa. Ninguno presentó recaídas ni manifestaciones clínicas de toxicidad.

Varios autores han reportado la incidencia de los transcritos de *PML-RAR α* en diferentes poblaciones, siendo la más frecuente la variante *bcr1* en Perú (62 %), México (63 %) y China (67 %) (180)(181)(182); en contraste, en la India, el subtipo más frecuente es el *bcr3* (64 %) vs *bcr1* (36 %) (183). Los autores coinciden en que no se ha encontrado correlación entre la presentación clínico-hematológica y la respuesta a tratamiento con el subtipo de transcrito *PML-RAR α* .

Los resultados de la determinación del oncogén *PML-RAR α* en los pacientes analizados en este estudio no son suficientes para un análisis epidemiológico por ser una muestra pequeña y con la mayoría de los pacientes en tratamiento; sin embargo, la ausencia del transcrito en estos pacientes sugiere un resultado negativo para enfermedad mínima residual, que corresponde con la evolución clínica que han tenido. Con base a lo expuesto anteriormente, se recomienda la ampliación del muestreo para poder establecer la epidemiología de este oncogén en pacientes venezolanos con LPA. La realización del diagnóstico de enfermedad mínima residual por la detección del transcrito de fusión *PML-RAR α* a través de

RT-PCR anidada permite reconocer a la brevedad si existe riesgo de recaídas y adoptar cambios de estrategias farmacológicas adaptadas a esos riesgos.

Es importante resaltar el avance de las terapias quimioterapéuticas enfocadas en el ataque directo a proteínas dianas como lo hace el ácido trans retinoico (ATRA), que promueve la diferenciación de las células promielocíticas, obteniéndose tasas de remisión más altas, debido a una disminución de las complicaciones que comprometen la vida del paciente con LPA como hipoplasia medular y alteraciones hemostáticas (50).

Detección de la presencia de t(12;21) con fusión génica de TEL-AML1

La leucemia linfoblástica aguda (LLA), es la neoplasia maligna más frecuente en la infancia. La progresión de la enfermedad de estos niños es difícil de predecir muchas veces ya que se considera como una respuesta individual a la terapia farmacológica. Esta heterogeneidad clínica es reflejo de los diversos procesos que están involucrados en la leucemogénesis. Los esfuerzos por identificar las bases moleculares de la LLA han ido logrando una mejor comprensión de los eventos que causan la enfermedad. Desde el descubrimiento del cromosoma Philadelphia por la translocación 9;22 que forma el gen quimérico *BCR-ABL*, continuaron las investigaciones para la búsqueda de alteraciones cromosómicas y genéticas que se vinculan con el desarrollo de LLA. Aproximadamente 60 % - 75 % de los pacientes con LLA presentan anormalidades genéticas numéricas, como la hiper o hipodiploidía, estructurales como translocaciones cromosómicas, que conllevan a la formación de genes de fusión y la desregulación de la expresión génica e inactivación de genes supresores de tumores (184).

Las translocaciones cromosómicas más frecuentes en la LLA infantil son: t(12;21)(p12;q22), t(1;19)(q23;p13), t(4;11)(q21;q23) y t(9;22)(q34;q11).

Siguiendo con el análisis de los transcritos de fusión quiméricos que actúan como oncogenes en la leucemia, se realizó la determinación del transcrito *TEL-AML1* formado por la translocación (12;21)(p12;q22) en pacientes diagnosticados con LLA de células B a través de la RT-PCR anidada, en el grupo etario de 1 año

a 14 años, con la finalidad de conocer la frecuencia del mismo. Los resultados obtenidos en este estudio revelan una frecuencia de 18,2 % de pacientes positivos para el oncogén positivo. Todos los pacientes que presentaron dicho transcrito se encuentran actualmente en estado de remisión completa.

Del grupo estudiado, 9 pacientes fallecieron y 17 se encuentran en remisión completa, solo 8 pacientes presentaron recaídas post- inducción, un paciente se encuentra positivo para enfermedad mínima residual y de 4 pacientes no se dispone de información de la evolución clínica por no asistir a la consulta del servicio de hematología.

En Venezuela no se han reportado registros de la frecuencia de los transcritos *TEL-AML1* en pacientes con LLA, siendo los encontrados en este estudio los pioneros en la población infantil. Comparando con otros estudios, se puede observar que la frecuencia observada en nuestra población es similar a las reportadas en Japón (19 %), Estados Unidos (18,8 %), y el Reino Unido (19 %) (185)(186)(187). Otros estudios reportan frecuencias inferiores en niños con LLA de células B de Corea (13,4 %) (188), así como ningún caso detectado en un estudio publicado de la población Española (0 %) (189). Frecuencias superiores de *TEL-AML1* fueron reportadas en Francia (22,8 %) (190), en un estudio de pacientes con LLA del St. Jude Children's Research Hospital (22 %) (191), y en Latinoamérica en estudios realizados en Brasil, Chile y Cuba, los cuales reportaron frecuencias de 20 %, 23,2 % y 25 % respectivamente (192)(184)(193). De acuerdo a la variabilidad de las frecuencias entre los diferentes estudios, se sugiere la existencia de una variación en la expresión del transcrito de fusión *TEL-AML1* en niños con LLA según la región geográfica y la raza.

La presencia del transcrito de fusión *TEL-AML1* ha sido descrita como un marcador de buen pronóstico frecuente en niños con LLA de células B (48). En este estudio los 6 pacientes con LLA positivos para *TEL-AML1* se encuentran en remisión completa hasta la actualidad, y no han presentado recaídas, sugiriendo que la presencia de este transcrito en pacientes con LLA pudiera estar asociada con un pronóstico favorable de evolución de la enfermedad. Esta relación varía en diferentes estudios en otras poblaciones y para realizar una comparación se debe tomar en cuenta, primero, los diferentes protocolos de quimioterapia que se

aplican para así poder comparar adecuadamente la incidencia de recaídas y el cálculo de supervivencia libre de eventos en los pacientes tratados; segundo, es importante conocer la presencia de otros reordenamientos cromosómicos que produzcan transcritos de fusión y los inmunofenotipos que ubiquen al paciente con LLA en alto riesgo o bajo riesgo, y que indudablemente podrían influenciar en la evolución clínica.

Mosad *et al.*, en una evaluación de la presencia de *TEL-AML1* y su rol como factor pronóstico reportaron que el 67% de los pacientes positivos se encontraban en remisión completa, indicando un buen pronóstico (194). Rubnitz *et al.*, describieron un alto índice de supervivencia en pacientes infantiles positivos para LLA *TEL-AML1*, indicando que a los 5 años de seguimiento clínico la supervivencia fue de $91 \pm 5\%$ (195). Artigas *et al.*, estimaron en pacientes con LLA infantiles chilenos *TEL-AML1* positivos que la supervivencia libre de eventos (SLE) fue de 63 % a los 40 meses, y de 54 % en pacientes *TEL-AML1* negativo; a pesar de ser diferentes no fueron estadísticamente significativos. Con respecto al estado de remisión completa, reportaron que 61,5 % de los pacientes *TEL-AML1* positivos se encontraban en ese estado hasta los 41 meses (184). Loh *et al.*, determinaron el transcrito *TEL-AML1* en pacientes infanto-juveniles con LLA que se encontraban en recaída, encontrando solamente 1 paciente positivo de un total de 32 estudiados, sugiriendo que es un factor pronóstico favorable pero no se debe dejar a un lado la efectividad del protocolo quimioterapéutico empleado y que son variables que deben estudiarse con mayor profundidad y con un mayor número de pacientes (196).

El transcrito de fusión *TEL-ABL* es muy poco frecuente, puede coexistir junto con *TEL-AML1*, siendo detectado por RQ-PCR. Es de suma importancia para la identificación y diagnóstico correcto necesario para la elección del protocolo quimioterapéutico adecuado (197).

Los resultados obtenidos ofrecen un panorama de la incidencia de este transcrito de fusión en nuestros pacientes infantiles con LLA, sugiriendo que la positividad del oncogén *TEL-AML1* es de muy buen pronóstico, debido a que todos se encuentran en remisión completa, similar a lo reportado por otros autores.

Análisis de mutaciones y polimorfismos (SNPs) detectados en el gen TP53 en pacientes con leucemia

El gen supresor de tumores *TP53* (antiguamente denominado p53) cumple una función muy importante dentro del mantenimiento de la estabilidad genómica, en la regulación de la proliferación celular principalmente a través de la inducción de la detención del crecimiento o apoptosis. La función de la proteína p53 puede verse alterada por mutaciones genómicas que desencadenan eventos en la génesis de tumores asociados al descontrol del ciclo celular, inestabilidad genómica y resistencia a quimioterapias.

En este estudio se realizó la amplificación de 4 exones del gen *TP53* a través de la reacción en cadena de la polimerasa y la posterior secuenciación de los ácidos nucleicos en 22 pacientes con leucemia y 10 controles, con el fin de evaluar la presencia de anomalías génicas y la existencia de la correlación clínico-molecular con la evolución de la enfermedad. Se seleccionaron los exones 5, 6, 7 y 8 para este estudio, debido a que se ubican en las regiones asociadas a mayor cantidad de mutaciones en enfermedades oncológicas. Se logró la estandarización de los protocolos de la PCR para cada exón, y los amplicones obtenidos fueron secuenciados en el Centro de Secuenciación de Ácidos Nucleicos (CeSAAn) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y en el Laboratorio de Biología y Genética de Peces del Instituto de Biociências de la Universidad Estadual de Sao Paulo (UNESP) Brazil.

Los resultados obtenidos permitieron observar la presencia de 2 mutaciones génicas en 3 pacientes y 3 polimorfismos génicos (SNPs) distribuidos en pacientes y controles como lo refleja la tabla 13.

El gen *TP53* es el más frecuentemente mutado entre los tumores sólidos, diversos estudios reportan frecuencias alrededor de 50 % (198). La prevalencia de mutaciones en el *TP53* es alta en cáncer de ovarios (43,6 %), seguido de cáncer colorrectal (43,6 %), cáncer esofágico (42,6 %), cáncer de cabeza y cuello (41,5 %) y cáncer de pulmón (38,4 %) (199). En contraste a la mayoría de los tumores sólidos, el impacto de mutaciones en el gen *TP53* en pacientes con neoplasias hematológicas es poco frecuente de 5 % a 15 %, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) reporta una frecuencia de 14,2 % (200)(201). La

deleción de *TP53* (detectado por Fish, 17p13) se ha encontrado en un >10 % de las neoplasias hematológicas y con una mayor frecuencia >50 % en LPA y en la leucemia de células plasmáticas primaria; en conjunto con las mutaciones, estas anomalías del gen *TP53* están asociadas con LLA de células B, con LLC, con leucemia prolinfocítica de células B y con mieloma múltiple, sugiriendo una particular inactivación de las vías de p53 (202).

La frecuencia de mutaciones encontradas en este estudio fue de 13 %, presente en 2 pacientes con LLA de células B y en un paciente con LLC. Los dos pacientes con LLA fallecieron, uno de ellos tuvo una recaída previa, y el paciente con LLC no asistió más al servicio, sin embargo, por su edad (74 años) y condición clínica previa, los médicos hematólogos presumen que podría haber fallecido. En la población control no se detectó ninguna mutación en el gen *TP53*. Estos resultados son comparables con los reportados en otros estudios de otros países, Hof *et al.*, evidenciaron mutaciones en el gen *TP53* en 11,3 % de los pacientes alemanes con LLA y 12,4 % en pacientes con LLA de células B que se encontraban en recaída (203). Zenz *et al.*, reportaron 8,5 % de incidencia de mutaciones en pacientes austríacos con LLC, asociado también a un pronóstico desfavorable de evolución al tratamiento farmacológico (204). El espectro de mutaciones de *TP53* varía de acuerdo al tipo de neoplasia hematológica, encontrándose frecuencias de 15 % en la LMA, 5 % en síndromes mielodisplásicos, 20% a 30% en la LMC en crisis blásticas y es muy raro encontrar en la fase crónica, 15 % en la LLC, 3 % en la LLA y 5 % en mieloma múltiple, así como variaciones de significancia clínica según el tipo de patología (64).

En Latinoamérica la mayoría de los estudios de mutaciones somáticas en el gen *TP53* han sido dirigidos a los tipos de cáncer en tumores sólidos, debido a que tienen una mayor frecuencia. Brasil es el país que tiene más estudios de este gen en todos los tipos de cáncer, así como las mutaciones germinales del síndrome de Fanconi. En la anemia de Fanconi, la proteína p53 es clave en la reparación del ADN y regulando la función de otras proteínas vinculadas en el desarrollo de la enfermedad, así mismo, siendo considerada un blanco de tratamiento (205). En el Hospital Universitario de Caracas, Guevara J y Arends A, realizaron un estudio en

pacientes con anemia de Fanconi, encontrando aberraciones cromosómicas debido a la ruptura de cromátides y endorreduplicaciones (206). Estas anomalías cromosómicas ocurren posiblemente por influencia en la falla de la activación de p53.

Melo *et al.*, estudiaron 34 pacientes brasileños con LMA y detectaron una frecuencia de 14,3% de mutaciones en el gen *TP53*, similar a la observada en otros países (207). Moura *et al.*, realizaron un análisis epidemiológico de las mutaciones en el gen *TP53*, señalando su rol como biomarcador en diferentes tipos de cáncer en la región latinoamericana, refiriendo que la incidencia en neoplasias hematológicas es similar a las reportadas en otros países del mundo (208).

Las mutaciones en el gen *TP53* encontradas en este estudio están localizadas en los exones 6 y 7, que codifican para el dominio de unión al ADN (*DNA binding*), no se detectaron mutaciones en los exones 5 y 8.

Dos de los pacientes diagnosticados con LLA de células B, presentaron una mutación en el exón 7 de tipo inserción (*frameshift*) ubicada en el codón 252, e identificada como c.753_754insN. El codón 252 codifica el aminoácido leucina, que se altera por efecto del desplazamiento del marco de lectura produciendo el codón mutado p.L25fs*12. Esta mutación ha sido reportada en la base de datos de *TP53* (www.p53.bii.a-star.edu.sg) y en el catálogo de mutaciones somáticas en cáncer (COSMIC) <http://cancer.sanger.ac.uk>, en un estudio de carcinoma de células escamosas en cabeza y cuello (209).

Las mutaciones descritas en el codón 252 han sido distribuidas según su incidencia, siendo las más frecuentes las sustituciones, seguidas de inserciones y deleciones. La mutación c.753_754insN descrita en un estudio por Calbегuenne *et al.*,(209) produce pérdida de heterocigosidad (LOH: *Loss Of Heterozygosity*) en el brazo corto del cromosoma 17. De acuerdo a la evolución clínica, el paciente tuvo una buena respuesta al protocolo de quimioterapia, es decir, que esta mutación no ocasionó resistencia a fármacos. Las mutaciones en el gen *TP53* son frecuentemente seguidas por la pérdida de heterocigosidad durante la progresión del cáncer. Esto se observa en el caso de los genes supresores de tumores, donde,

en un locus heterocigoto particular para un alelo mutante y uno *wild type*, posteriormente el alelo *wt* se elimina o se altera (64)(210).

Los dos pacientes infantiles (12 años y 14 años) con LLA que presentaron esta mutación fallecieron, y uno de ellos tuvo un episodio de recaída antes de fallecer, sugiriendo que esta alteración molecular puede tener un posible pronóstico desfavorable lo cual es similar a lo reportado. Las mutaciones tipo *frameshift* en los exones 5, 6 y 7 del gen *TP53* en pacientes infantiles con LLA también han sido asociadas por otros autores con evoluciones clínicas desfavorables y a múltiples mutaciones sensibles a apoptosis mediadas por Fas (8)(211).

Otra de las mutaciones detectadas se ubica en el exón 6, es una mutación transicional A:T>G:C de efecto silente, denominada c.570T>C. El codón afectado por esta sustitución es el 190 (CCT>CCC) p.P190P, en un paciente con LLC. Esta mutación no ha sido reportada en otros pacientes con LLC; sin embargo, ha sido descrita en pacientes con cáncer colorrectal, en conjunto con otras mutaciones ubicadas en los demás exones. König *et al.*, reportaron esta mutación en un estudio de pacientes rumanos y húngaros con cáncer colorectal, resultando un paciente portador de esta mutación silente del codón 190, masculino de 56 años, cuyo pronóstico de evolución fue desfavorable, con recidivas de la enfermedad (212). Ibrahim *et al.*, encontraron también esta mutación en 3 pacientes sudaneses con cáncer oral consumidores de tabaco masticable (toombak), así mismo, el 93% de este grupo de pacientes presentaron mutaciones en el gen *TP53*, en comparación con el grupo que no consumía esta sustancia (57%), sugiriendo el consumo de esta sustancia nociva es un factor de riesgo de mutaciones en el gen *TP53* (213).

Ha sido sugerido que las mutaciones múltiples y silentes en el gen *TP53* indican una relación en procesos de hipermutabilidad de otros genes durante la generación y el desarrollo de tumores (214).

En la LLC, la incidencia de mutaciones en el gen *TP53* es aproximadamente 10 %, pero esto puede verse incrementado a 30 % en pacientes que progresan de manera agresiva a un linfoma difuso de células grandes, conocido como el síndrome de Richter (215)(216). Con respecto a la evolución clínica y a la

respuesta al tratamiento de los pacientes con LLC con detección de mutaciones en el gen *TP53*, hay varios estudios que sustentan la existencia de una correlación entre la presencia de mutaciones en este gen y la respuesta a la quimioterapia (215); así mismo, la relación del fenotipo expresado asociado a una enfermedad más agresiva, considerando que son un factor pronóstico desfavorable independiente (217)(218). La resistencia a quimioterapia en casos mutados de LLC ha sido reportada para las drogas empleadas, incluyendo clorambucil, fludarabina y para las drogas del protocolo CHOP (rituximab, ciclofosfamida, clorhidrato de doxorubicina (hidroxidaunorubicina), sulfato de vincristina (Oncovin) y prednisona) (215).

Cabe destacar que en la población control estudiada no se detectó la presencia de mutaciones en el gen *TP53*, al ser individuos aparentemente sanos, se esperaba no encontrar mutaciones, sin embargo, por ser este estudio el primero que comprende la población con leucemia en Venezuela era necesario tener un grupo control sano para comparar los resultados entre ambas poblaciones.

Siguiendo el análisis de los resultados obtenidos del estudio de anomalías en el gen *TP53*, se detectaron 3 polimorfismos genéticos: rs1642786 (posición 14168) en el intrón-7, rs12947788 en el intrón-7 (posición 14181) y rs165895 en el intrón-6 (posición 13494). La distribución de los SNPs se observan en la tabla 16, pudiéndose observar que el SNP rs1625895 fue el más frecuente en pacientes y controles sanos, 63,6 % y 40 % respectivamente.

El SNP rs1625895 (IVS6+62A>G) cuyos alelos son G/A, ha sido detectado en varios estudios poblacionales. Los pacientes con leucemia presentaron el alelo G con mayor frecuencia (63,6 %), este alelo también predomina en otras poblaciones, por ejemplo, caucásica alelo G: 96,6 % y alelo A: 3,4 %, japonesa G: 100 %, africana G: 69,8 % y A: 30,2 %, y estadounidenses G: 94% y A: 6 %, cabe destacar que los resultados pueden variar levemente según el tipo de estudio realizado (219). Los resultados obtenidos en los pacientes con leucemia tienen una frecuencia alélica similar a la población africana, correlacionándose con uno de los orígenes étnicos de nuestra población (220). Este SNP afecta el nivel de la proteína p53, en el caso del alelo G, p53 es más eficiente induciendo reparación de ADN y apoptosis, y por tanto, el mantenimiento de la estabilidad del genoma

en comparación con el alelo A (221) y ha sido reportado en pacientes con linfoma de células B y con cáncer de pulmón (222).

Con respecto al SNP rs12947788 C/T, éste se encontró en dos pacientes, cuya evolución clínica fue fatal y en dos controles sanos. El alelo C estuvo presente en los 4 individuos, presentando una baja frecuencia en comparación a otras poblaciones (223). Sin embargo, lo recomendable es aumentar el número de individuos en el estudio, para realizar un análisis estadístico significativo y considerar que este polimorfismo se encuentra en el intrón-7, que a veces puede resultar complicado amplificar a través de PCR. Bilous *et al.*, detectaron éste SNP en un estudio del gen *TP53* en pacientes con LLC; sin embargo, no fue asociado como un factor de riesgo de susceptibilidad de desarrollo de leucemia (222).

Por último, el SNP rs1642786 G/T fue detectado en 7 pacientes con leucemia, en todos sus tipos, y ausente en la población control. Según la base de datos de dbSNP y IARC *TP53 database*, este polimorfismo aún se encuentra en validación en la actualidad. Ha sido reportado en neoplasias de glándulas salivales, presente en el ADN de línea germinal, sin embargo, no fue asociado como factor pronóstico de respuesta (224). En cuanto a la evolución clínica, 4 de los pacientes con el alelo T se encuentran en remisión completa y 3 fallecieron.

Alrededor de 80 polimorfismos han sido identificados y validados en diferentes poblaciones (IARC *TP53 Database*). La mayoría (90 %) están localizados en intrones, en sitios de splice, o en exones no codificantes (225). Algunos investigadores han asociado la presencia de polimorfismos en la región intrónica del gen *TP53* con un rol importante en la génesis del cáncer. Peller *et al.*, reportaron un polimorfismo en el intrón 6 altamente frecuente en pacientes con tumores gastrointestinales y en cáncer de mama, en comparación con la población sana (226). Avigad *et al.*, realizaron un estudio de tamizaje de mutaciones en el gen *TP53*, en los exones 5 a 8 en pacientes pediátricos con cáncer e individuos controles, detectaron e identificaron una mutación en el intrón 6 asociada al síndrome de Li Fraumeni en la mayoría de los pacientes y en un solo control (227). Graf *et al.*, estudiaron la presencia de SNPs en pacientes con LMA y en controles sanos, observando que los polimorfismos intrónicos encontrados (que también fueron detectados en este estudio rs12947788 y rs1642786), estaban

presentes en frecuencias similares en ambas poblaciones, sugiriendo que no están asociados con el riesgo de desarrollar la enfermedad (228).

El polimorfismo del gen *TP53* más investigado está ubicado en el codón 72 del exón 4 y codifica para la región de dominio rico en prolina, el cual es esencial para la inducción de apoptosis. Ambas variantes del polimorfismo Arg72 y Pro72 han sido asociadas con un rol importante en la respuesta terapéutica en varios tipos de cáncer *in vivo* e *in vitro* (229).

Estos resultados impulsan la necesidad de continuar la investigación de polimorfismos y mutaciones del gen TP53 en nuestra población, con la finalidad de definir si pueden ser biomarcadores predictivos de respuesta a los tratamientos y pronóstico de evolución de la leucemia.

Análisis del espectro de mutaciones en el gen RAS en pacientes con leucemia

La familia de oncogenes *RAS* comprende 3 isoformas: *H-RAS*, *K-RAS* y *N-RAS*, localizados en diferentes cromosomas. Los productos génicos de *RAS* son proteínas pequeñas que tienen una alta homología entre sí y están implicadas en procesos patológicos como el cáncer, y en el control riguroso de los mecanismos fisiológicos como la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular.

Los alelos mutantes de las isoformas de *RAS* han sido asociados a numerosos tipos de tumores, incluyendo cáncer de pulmón, piel, tiroides, vejiga, mama, páncreas, tracto gastrointestinal y riñón, así como a los diferentes tipos de leucemia (230). Múltiples estudios en diferentes tipos de tumores a lo largo de 30 años han identificado 2 regiones altamente variables, denominadas puntos calientes “hot spots”, localizadas en los codones 12 y 61 de las regiones codificantes altamente conservadas (5). Así, en la proteína K-Ras, el dúo Glicina-12 Glicina-13 (G12-G13) cuenta con alrededor de 99% de las mutaciones detectadas (86% y 13%, respectivamente), mientras que las mutaciones que afectan el Ácido Glutámico 61 (Q61), el otro punto caliente principal de las proteínas Ras, representan el 1% restante (231).

La activación constitutiva de la proteína Ras juega un rol importante en el desarrollo de malignidades en las células cancerígenas. Las mutaciones en este gen producen la supresión de la actividad normal GTPasa de la proteína Ras. Esto ha sido descrito con frecuencia en las malignidades hematológicas como leucemias mieloides y mieloma múltiple. Cerca de 1/3 de los síndromes mielodisplásicos (SMD) y LMA, los genes *RAS* están activados por mutaciones (232).

Otro de los objetivos comprendidos en este estudio fue la determinación de mutaciones del oncogén *RAS* en pacientes con leucemia. Se analizaron las secuencias amplificadas por la técnica de la PCR y posteriormente secuenciadas, correspondientes a los exones que codifican los codones 12, 13 y 61 del gen *KRAS* y del gen *NRAS*, en 16 pacientes con diagnóstico de diferentes tipos de leucemia. Se observó una mutación que codifica para el codón 12 del gen *KRAS* en un paciente masculino de 9 años de edad, con diagnóstico de LMA, representando el 5,9% de la población estudiada. La mutación c.36T>G, es una sustitución de tipo silente (GGT>GGG), que provoca el codón mutado p.G12G. Se incluyó en el grupo analizado, la muestra de un paciente de 1 año de edad con leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), por ser un tipo de leucemia que generalmente cursa con una alta frecuencia de mutaciones en el gen *NRAS* (61), pero nuestro paciente no presentó tal anormalidad y falleció al corto tiempo del diagnóstico.

La mutación c.36T>G ha sido descrita en cáncer pancreático (233), de colon y de pulmón, (230) en hígado, de ovario y de endometrio (234). Otras mutaciones en esta misma región han sido reportadas en pacientes con LMA, ya que para este tipo de leucemia son más frecuentes las mutaciones en el gen *NRAS* (235). Las mutaciones en el codón 61 del gen *RAS* afecta la hidrólisis del GTP, debido a que la Glutamina es esencial para esta actividad, de igual manera, el reemplazo de Glicina en el codón 12 por otro aminoácido excepto Prolina mantiene activada a Ras de manera permanente (59).

El paciente con LMA que presentó la mutación c.36T>G tuvo una evolución clínica desfavorable, falleciendo posterior a una recaída. La presencia de las mutaciones en pacientes con LMA y en otras neoplasias hematológicas, han sido

referencia para discutir el papel que juegan las mismas dentro de la evolución clínica. Algunos autores indican que la correlación entre la presencia de las mutaciones en el gen *RAS* y el pronóstico en neoplasias hematológicas es bastante incierto y depende fundamentalmente del tipo de cáncer en estudio (5), Kiaris *et al.*, sugieren que no existe asociación particular entre las mutaciones en el gen *RAS* y las características patológicas de los pacientes, sin embargo, los pacientes que presentan clones de células mutadas de *RAS*, muestran una mayor resistencia a la quimioterapia en comparación a los clones de células normales (234).

En Venezuela, las mutaciones en el gen *RAS* han sido estudiadas en pacientes con cáncer en las vías digestivas. En un trabajo realizado por Mastromatteo *et al.*, se evaluó la presencia de mutaciones en el codón 12 del *KRAS* en biopsias de pacientes infectados por *Helicobacter Pylori*, reportando la presencia de sustituciones simples y combinadas con mayor frecuencia en pacientes con gastritis crónica activa, sugiriendo que la determinación de estas mutaciones pudieran ser empleadas como marcador tumoral (236). Estrada *et al.*, estudiaron la presencia de mutaciones en el gen *RAS* en muestras de biopsias de adenocarcinomas de colon o recto, encontrando una alta incidencia de mutaciones en los codones 12 y 13 en adenocarcinomas bien diferenciados (57,14 %), sugiriendo que este oncogén participa en la progresión tumoral en estadios tempranos del desarrollo de cáncer colorrectal, además encontraron asociación con la evolución clínica, en función de cambios histopatológicos y grados de diferenciación (237).

Para las neoplasias hematológicas en especial las leucemias, es importante la continuación de este tipo de estudio que permitan conocer el espectro de mutaciones en el gen *RAS* en pacientes con diferentes tipos de leucemia, realizar un seguimiento clínico exhaustivo y evaluar la posible utilidad pronóstica de este oncogén.

Análisis farmacogenético de polimorfismos genéticos de Glutación-S-Transferasa: GSTM1 y GSTT1, en pacientes venezolanos con leucemia

La etiología de los tipos de cáncer que aparecen con más frecuencia no puede explicarse por la variabilidad alélica en un solo locus. La mayor carga del cáncer en la población general probablemente es el resultado de la compleja interacción de múltiples factores genéticos y ambientales. La comprensión de la interacción de las exposiciones a xenobióticos, su metabolismo endógeno, y la variabilidad genética en múltiples loci facilitará el conocimiento sobre la etiología del cáncer y la identificación de las personas que están en mayor riesgo de desarrollar cáncer. Se han hecho intentos para estudiar diversos factores hereditarios que pueden predisponer al individuo a desarrollar un tipo particular de malignidad.

Diversos estudios de epidemiología molecular indican que los individuos que carecen de los genes *GSTM1* y *GSTT1* son más propensos a desarrollar cáncer que los que tienen estos genes (238). Esto está asociado a una delección polimórfica en estos genes que puede influir en la actividad de la enzima que codifican, y finalmente, una mayor vulnerabilidad al daño genotóxico (239)(240)(241).

Considerando estos postulados, se llevó a cabo este estudio para evaluar si los polimorfismos encontrados de los genes *GSTM1* y *GSTT1* de la superfamilia de Glutatión S- Transferasa podían considerarse un factor de riesgo para el desarrollo de leucemia en individuos venezolanos. Tomando en cuenta la alta heterogeneidad de los polimorfismos en los genes *GSTM1* y *GSTT1* que ha sido reportada en estudios poblacionales clasificados por región geográfica y grupos étnicos en diferentes tipos de leucemia (242)(243)(244)(245)(246), era necesario el conocimiento de la presencia y la estimación de las frecuencias de estos polimorfismos en los pacientes con leucemia, debido a que la población actual de Venezuela es el producto de una población amerindia original la cual ha recibido genes europeos y africanos en distinta proporción, de acuerdo al área geográfica que se considere (247).

Los resultados obtenidos de la genotipificación de *GSTM1* en pacientes con leucemia mostraron para el alelo *GSTM1*⁻ nulo, una frecuencia alélica de 0.343 y 0.410 en controles, observándose que la delección de este alelo es más frecuente en la población control venezolana, y no se encontró una asociación estadísticamente

significativa de este alelo como factor de riesgo para el padecimiento de leucemia (OR=0,7519; IC= 0,4722 – 1,1973, p -value: 0,229). *GSTM1* nulo fue más frecuente en pacientes con LLA y LLC (41% y 50%, respectivamente), este hallazgo es semejante al encontrado en otros estudios (228), en el cual este genotipo es más frecuente en pacientes infantiles con LLA. Sin embargo, no es considerado como factor de riesgo para el desarrollo de la LLA en los pacientes estudiados, en coincidencia con otros estudios (248)(249)(250)(251), así como para la LMC (239) y la LMA (252). Otras investigaciones han determinado una asociación significativa del genotipo *GSTM1* nulo como factor de riesgo incrementado para el desarrollo de leucemia, en pacientes con LLA del norte de Portugal (86), y otro estudio de meta-análisis de diferentes poblaciones con leucemias agudas (10).

La determinación de polimorfismos de *GSTT1* nulo en pacientes con leucemia analizados en este estudio arrojó un predominio estadísticamente significativo con respecto a los controles sanos (0,284 vs 0,150), además indicó la existencia de riesgo relativo incrementado de este genotipo para el padecimiento de leucemia (OR= 2.267, 95% IC= 1.337 – 3.843, p -value: 0,002). De acuerdo a la distribución de *GSTT1* nulo en los diferentes tipos de leucemias, se observó más frecuente en pacientes con LMA (44%). En otras poblaciones, estudios del genotipo *GSTT1* nulo lo han considerado como factor de riesgo para el desarrollo de LMA en pacientes chinos (252), coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio. En este sentido, un estudio en Italia por D' Alo *et al.*, (253) reportó una frecuencia de 29% de *GSTT1* nulo en pacientes con LMA y de 19% de *GSTT1* nulo en el grupo control, refiere a su vez que este tipo de delección confiere un aumento de 1,7 veces el riesgo de desarrollar LMA, e indica una posible acumulación de intermediarios reactivos en los individuos con supresión de la actividad enzimática de *GSTT1*, aumentando así, el riesgo de daño en el ADN y contribuir a la leucemogénesis.

Así mismo, otras investigaciones han encontrado una asociación positiva considerando este genotipo *GSTT1* nulo un factor de riesgo para el desarrollo de LMC (239)(254) en otros casos este genotipo no representa un factor de riesgo para pacientes con LLA (10)(86)(248)(251), descartando su asociación en la

leucemogénesis. Un estudio en leucemia aguda no linfocítica (LANL) encontró que la presencia de *GSTT1*⁻ nulo puede conferir protección, reduciendo el riesgo a padecer ese tipo de leucemia (249).

Los genotipos combinados de *GSTM1/GSTT1* se determinaron en pacientes y controles con el fin de conocer si existía una asociación considerada como un factor de riesgo para el desarrollo de leucemia. Los resultados obtenidos en este estudio no reflejaron una relación estadísticamente significativa con el padecimiento de la enfermedad y fueron similares entre ambos grupos estudiados, como se aprecia en la tabla 22. Los genotipos *GSTM1/GSTT1* no representan un factor de riesgo de desarrollo de leucemia en la población estudiada (OR= 2,0444; 95%IC= 0.8705 4.8005, *p*-value: 0,100). Los tipos de leucemias con mayores frecuencias de genotipos dobles nulos fueron LLC y LMA en comparación con las demás.

En contraste con los resultados obtenidos en este estudio, la asociación de genotipos *GSTM1*⁻ y *GSTT1*⁻ nulos combinados han sido considerados un factor de riesgo para el desarrollo de la LLA (239)(259) y de la LMA (255). Rollinson *et al.*, reportaron en pacientes de Gran Bretaña, una asociación entre el genotipo doble nulo de *GSTM1/GSTT1* con el riesgo de padecer LMA, citando que los riesgos para ambos polimorfismos están igualmente elevados en los pacientes con LMA *de novo*, lo que sugiere un aumento del riesgo de desarrollar una leucemia mieloide aguda *per se* (256).

Un estudio en la India (254), demostró que no hubo diferencias significativas entre las frecuencias génicas de *GSTM1* y los genotipos doble nulos para *GSTM1/GSTT1* entre pacientes y controles, y por el contrario refieren que las frecuencias génicas de *GSTT1* son estadísticamente más representativas en comparación con los controles, 20 % y 8,5 %, respectivamente. Martin *et al.*,(257) sugieren que solo el genotipo doble nulo *GSTM1/GSTT1* confiere un riesgo mayor para el desarrollo de LLC, cuando se asocia también al genotipo mutado de *GSTP1 G/G*.

En el caso de la LLC y la Tricoleucemia o leucemia de células peludas, debido a la baja frecuencia de aparición que tuvieron en este estudio, sus resultados no son representativos estadísticamente. En los pacientes con

Tricoleucemia, 100 % presentaron el alelo *GSTT1*⁺ mientras que la delección de *GSTM1*⁻ se observó en un 25 % de los pacientes, por tanto pareciera no existir una relación entre *GSTT1*⁻ nulo y la Tricoleucemia, sin embargo, se requerirán más estudios que permitan corroborar si existe o no tal asociación

Cabe destacar que la importancia del conocimiento de la presencia de los polimorfismos de *GSTM1*⁻ y *GSTT1*⁻ nulos en leucemia, es la relación de estos con pronósticos de evolución y respuesta a los fármacos en los protocolos de tratamiento. Las formas activas de las enzimas GSTM1 y GSTT1 son necesarias para una óptima protección del sistema hematopoyético contra los tóxicos ambientales que pudieran inducir el desarrollo de leucemia.

La ausencia de las enzimas de glutatión S- transferasa puede conducir a estrés oxidativo y daño al ADN, debido a la incapacidad de desintoxicación de compuestos electrofílicos, lo que resulta en la inestabilidad genómica, uno de los causantes del proceso de leucemogénesis (258). Por lo tanto, la presencia de los genotipos *GSTM1* y *GSTT1* nulos traen como consecuencia la reducción de la actividad enzimática, relacionándolos causalmente en las neoplasias hematológicas (259). La deficiencia en la actividad de las enzimas GST también puede resultar en niveles elevados de glutatión, debido a la reducción del consumo del mismo. Esto, a su vez, podría afectar la proliferación celular y la apoptosis. Por ejemplo, la inhibición de la apoptosis y el aumento de proliferación de los linfocitos T podrían resultar por los niveles elevados de glutatión (260).

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten conocer la susceptibilidad incrementada a desarrollar leucemia debido a la presencia del polimorfismo genético *GSTT1*⁻ nulo y representan un primer paso por comprender los factores genéticos que condicionen la susceptibilidad de padecer leucemia en la población venezolana.

Con los datos de la evolución clínica suministrados por los médicos hematólogos tratantes a través del instrumento descrito en la metodología, se analizaron los genotipos encontrados de acuerdo a la progresión de la enfermedad (tabla 22). El análisis de los genotipos *GSTM1* y *GSTT1* en pacientes con leucemia permiten observar una mayor frecuencia del genotipo nulo *GSTT1*⁻ en pacientes que se encuentran en remisión completa, mostrando una significancia

estadísticamente significativa (p -value: 0,025). El hallazgo de los alelos nulos de *GSTMI* y *GSTTI* en los pacientes estudiados no reveló una asociación con el desarrollo de un pronóstico desfavorable, así como, con el fallecimiento.

En el caso de los pacientes que presentaron recaídas, las frecuencias de *GSTMI*⁺ y *GSTMI*⁻ son similares; sin embargo, la delección de este gen no mostró una diferencia estadísticamente significativa. Todos los resultados obtenidos refieren a la ausencia de una asociación significativa entre la presencia de los genotipos nulos de *GSTMI* y *GSTTI*, y la evolución clínica de los pacientes estudiados, a excepción de *GSTTI*⁻ en pacientes con remisión completa.

En vista de que los mayores grupos de pacientes muestreados y cuyos fármacos administrados son metabolizados por esta superfamilia de enzimas, se seleccionaron los pacientes con LLA y LMA para analizar la relación entre los genotipos encontrados y su evolución clínica (tabla 23 y 24 de resultados). En relación a la LMC, es necesario recordar que las enzimas involucradas en el metabolismo de los fármacos aplicado al tratamiento de este tipo leucemia, son enzimas de Fase I, de la familia de las citocromo P450. El mesilato de Imatinib, que es el fármaco comúnmente utilizado para el tratamiento de estos pacientes, es primeramente metabolizado por CYP3A4 (261).

En la tabla 24, se presentan los genotipos de *GSTMI* y *GSTTI* de acuerdo a la evolución clínica de los pacientes con LLA. Se observa que 15 pacientes fallecieron y que presentan una mayor frecuencia en los genotipos *GSTMI*⁺ y *GSTTI*⁺ con respecto a los nulos. Estos hallazgos sugieren que los genotipos nulos no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los genotipos *wild type*. Los 28 pacientes con LLA que se encuentran en remisión completa presentaron una mayor frecuencia de los genotipos *GSTMI*⁺ y *GSTTI*⁺. Estos resultados demuestran que los genotipos nulos no poseen diferencias estadísticamente significativas que permitan sugerir ser un factor pronóstico favorecedor en la progresión clínica y que conlleve al alcance de una remisión completa en los pacientes con LLA tratados con quimioterapia. Con respecto a las recaídas post- tratamiento de inducción, 12 pacientes presentaron este evento, cuyo genotipo de *GSTMI* tuvo la misma frecuencia alélica, tanto el *wild type* y el nulo, sin evidenciar diferencias significativas, es decir, que este genotipo no

guardó asociación con el riesgo de recaída post-tratamiento. Para el genotipo *GSTT1* hubo una mayor frecuencia de *GSTT1*⁺, y a pesar de que no presenta una asociación estadísticamente significativa, el genotipo *GSTT1*⁺ presenta una tendencia sugerente a ser un factor asociado a recaídas y lo recomendable para este caso es aumentar el número de individuos para observar si varía esta tendencia.

Zareifar *et al.*, describieron en un estudio de pacientes Iraníes con LLA, que los genotipos nulos de *GSTMI* y *GSTT1*, así como los dobles nulos, no presentan significancia estadística como factor de riesgo de recaídas, sugiriendo que la delección de estos genes no comprometen la eficacia de la respuesta a los fármacos (262). Chen *et al.*, en un estudio de pacientes del St Jude Children Hospital no encontraron asociación entre los genotipos nulos de *GSTMI*, *GSTT1* y los dobles nulos, como un factor pronóstico de supervivencia libre de enfermedad o de remisión hematológica. Las recaídas en sistema nervioso central, tienden a ser menos común en pacientes con LLA con genotipo *GSTMI*⁺ (248). Del mismo modo, Davies *et al.*, tampoco encontraron relación estadísticamente significativa de la detección de los genotipos nulos de *GSTMI* y *GSTT1* en pacientes con LLA y el pronóstico de supervivencia libre de enfermedad en estos pacientes (251).

Franca *et al.*, reportaron resultados interesantes de su estudio en pacientes italianos con LLA con respecto a la respuesta al tratamiento de estos pacientes y sus genotipos de *GST*. Encontraron una asociación del genotipo *GSTMI*⁻ con un mejor pronóstico clínico dentro del grupo de pacientes metabolizadores pobres de prednisona, en contraste, el genotipo *GSTT1*⁻ se reportó asociado con un pronóstico desfavorable en pacientes clasificados en riesgo estándar y en pacientes que responden bien a prednisona, observándose que ambos genotipos delecionados tienen pronósticos diferentes en los pacientes con LLA analizados (263). Tsvirenko *et al.*, en su estudio de población infantil con LLA reportaron que ambos genotipos nulos *GSTMI* y *GSTT1* se asocian a pronósticos clínicos favorables, a altos niveles de supervivencia libre de eventos y bajas tasas de recaídas, en comparación con los genotipos *wild type*. La presencia de los alelos nulos de estos genes juegan un rol de pronóstico favorable en este grupo de pacientes (264).

De los pacientes con LLA analizados en este estudio, 7 (13,4%) presentaron signos clínicos de toxicidad, según la información clínica suministrada. Los resultados obtenidos de la genotipificación de *GSTMI* y *GSTTI* revelan que 2 pacientes presentaron el genotipo doble nulo (*GSTMI*⁻/*GSTTI*⁻), 3 presentaron el genotipo *wild type* y 2 pacientes presentaron la delección de uno de los genes (genotipo combinado, *GSTMI*⁺/*GSTTI*⁻ y *GSTMI*⁻/*GSTTI*⁺). Solo en 4 pacientes se pudo conocer cuál fue la droga recibida en el protocolo de quimioterapia que indujo la toxicidad. El metotrexato, la vincristina, la prednisona, y la L-asparaginasa, produjeron signos de toxicidad gastrointestinal, renal, hepática y en el sistema nervioso central (psicosis esteroidea por prednisona). La incidencia de los genotipos encontrados no sugiere una relación entre la presencia o delección de *GSTMI* y *GSTTI*, y el desarrollo de eventos de toxicidad, debido a la heterogeneidad de los resultados; sin embargo, se evidenció que los genotipos normales fueron los más frecuentes en 3 pacientes con toxicidad. Estos resultados son comparables con un estudio que reporta la baja asociación de los polimorfismos de *GSTMI* y *GSTTI* con el desarrollo de toxicidad (251). En contraste, se ha reportado la susceptibilidad de desarrollar toxicidad gastrointestinal e hiperbilirrubinemia en pacientes con genotipo *GSTTI*⁻, durante el protocolo de inducción y mantenimiento (265), y el genotipo *GSTMI*⁺ como factor predisponente para hepatotoxicidad (266).

Los resultados expuestos anteriormente sugieren que los genotipos nulos *GSTMI*⁻ y *GSTTI*⁻, no presentan relación con el desarrollo de toxicidad a fármacos quimioterapéuticos en pacientes venezolanos con LLA.

Se realizó un análisis de la frecuencia de los genotipos de *GSTMI* y *GSTTI* en pacientes con LMA, de acuerdo a su evolución clínica, para conocer si existe una asociación entre los polimorfismos encontrados y el pronóstico de la enfermedad. Se encontró que el pronóstico es desfavorable en los pacientes con LMA, 15 (60 %) pacientes fallecieron, y de acuerdo a los genotipos encontrados no mostraron una diferencia estadísticamente significativa de la presencia entre *GSTMI*⁻ y *GSTTI*⁻ con el riesgo de mortalidad. En los pacientes que se encuentran en remisión completa (28 %), predominaron las frecuencias de los genotipos *wild type*, al igual que en el caso anterior, sin encontrar diferencias estadísticamente

significativas. Por último, los pacientes que tuvieron recaídas (16 %) presentaron una frecuencia similar de genotipos *GSTMI*⁺ y *GSTMI*⁻, sin evidenciarse diferencias estadísticamente significativas; con respecto a *GSTTI*, el genotipo *GSTTI*⁺ fue el único detectado en estos pacientes.

Estos resultados pioneros ofrecen una visión de la farmacogenética y su asociación con la evolución clínica de acuerdo a la respuesta a los fármacos en pacientes estudiados con LMA en Venezuela, mostrando que los genotipos nulos de *GSTMI* y *GSTTI* no representan un factor de riesgo relacionado al pronóstico evolutivo.

Otras investigaciones presentaron resultados similares a los de este estudio, refiriendo que los genotipos nulos de *GSTMI*⁻ y *GSTTI*⁻ no estuvieron asociados con los índices de supervivencia libre de eventos y toxicidad (267), así como la ausencia de asociación del genotipo *GSTTI*⁻ con las recaídas de pacientes con LMA adultos (88)(89). En contraste, Voso *et al.*, demostraron una disminución de la respuesta en los pacientes adultos con LMA que presentaron genotipos nulos *GSTMI*⁻ y *GSTTI*⁻, sugiriendo que podrían representar un factor de riesgo de pronóstico desfavorable (259).

Análisis farmacogenético de polimorfismos genéticos de Glutación-S-Transferasa: GSTP1 A/G (rs1695) en pacientes con leucemia

GSTP1 participa en el ciclo celular y en la regulación de la apoptosis. Esta es una enzima sumamente importante en el metabolismo de agentes quimioterapéuticos, metabolitos como clorambucil, busulfán, ciclofosfamida. En este sentido, las variantes polimórficas A/G y G/G pueden mostrar especificidades de sustrato, e inclusive afectar la estabilidad térmica de la proteína, en comparación con el genotipo normal A/A (268)(269). Estudios bioquímicos demostraron una menor estabilidad térmica de la enzima GSTP1 (Val-105) en comparación con la GSTP1 con el alelo A (Ile-105) y también una menor actividad de conjugación para el caso de la variante mutada de GSTP1 G/G en comparación con el genotipo normal A/A, mientras que los heterocigotos A/G muestran actividad intermedia (270).

Con respecto a los resultados obtenidos en este estudio en la población con leucemia, se observó que los heterocigotos A/G del gen *GSTP1* tuvieron una mayor frecuencia de aparición 0,413; seguida del genotipo normal A/A 0,333 y del genotipo G/G 0,253; lo que quiere decir que un 67% de la población estudiada presentó polimorfismos para esta enzima. La población control presentó una frecuencia del genotipo A/A similar al grupo de pacientes 0,337 y el genotipo más frecuente fue A/G 0,529, con un valor superior al del grupo de pacientes. En la tabla 27, se presenta la distribución de los genotipos de *GSTP1* determinados en pacientes con leucemia y grupo control, encontrándose que el genotipo heterocigoto A/G y el homocigoto mutado G/G no representan un factor de riesgo para el padecimiento de leucemia, debido a que no muestran una asociación estadísticamente significativa (OR= 0.7891; IC= 0.4398 – 1.4158, *p*-value: 0,427 y OR= 1.9097; IC= 0.9459 – 3.8555, *p*-value: 0,071 respectivamente), así como el modelo de herencia dominante, no muestra una relación en cuanto al desarrollo de la enfermedad (OR= 1.0155; IC= 0.5929 – 1.7395, *p*-value: 0,955). La presencia del alelo mutado G no representa un factor predisponente para el desarrollo de leucemia en los pacientes estudiados (OR= 1.3200; IC= 0.5131 – 1.5648, *p*-value: 0,699).

Al realizar el análisis de los modelos de herencia para este polimorfismo se encontró que el modelo recesivo de *GSTP1* A/G se comporta como un factor de riesgo de 2,1 veces mayor para el desarrollo de leucemia (OR= 2.1923; IC=1.1792 – 4.0758, *p*-value: 0,013), esto ocurre a través de la presencia de dos copias del alelo variante G, determinante para modificar el riesgo del padecimiento de la enfermedad, comprometiéndose el rol supresor de tumores de este gen, debido a que *GSTP1* no solo participa como una enzima importante de fase II del metabolismo de fármacos, sino también está involucrada en la regulación del ciclo celular y apoptosis (82)(271).

Con respecto a los resultados de acuerdo al tipo de leucemia, se observó que tanto el genotipo homocigoto mutado (G/G) como el genotipo heterocigoto (A/G) tuvieron una mayor frecuencia de aparición en los pacientes con LLA, representando un 34 % y 41 %, respectivamente, lo que quiere decir que un 75 % de los pacientes presentaron polimorfismos para este gen.

En este sentido, Krajinovic *et al.*, evaluaron la asociación entre los polimorfismos de *GSTP1* A/G y la susceptibilidad a desarrollar LLA, mediante el estudio de 278 niños franco-canadienses, y encontraron que solo la variante G se asocia con un riesgo de 1,5 veces de padecer LLA, a su vez refieren que el riesgo es 2,1 veces mayor cuando se combina con el genotipo nulo de *GSTM1* (272). Estos hallazgos sugieren que las variantes de *GSTP1* (sola o combinadas con otros polimorfismos de GST) parecen ser determinantes genéticos importantes en la LLA infantil. Por otro lado, Gatedee *et al.*,(273) en Tailandia encontraron que no hay una diferencia significativa entre los polimorfismos de *GSTP1* A/G y el grupo control, por tanto sugieren que no hay asociación entre el riesgo de sufrir LLA y las variantes polimórficas de *GSTP1*.

En la LMA, los resultados de este trabajo permiten observar que un 62% de los pacientes presentaron polimorfismos en el gen *GSTP1* (A/G 37 % y G/G 26 %), y el genotipo homocigoto normal A/A se encontró en la misma proporción que el heterocigoto (37 %). En general, la distribución de los polimorfismos es similar, lo que impide sugerir una posible asociación como factor de riesgo para desarrollar LMA.

Diversos estudios han asociado el polimorfismo del gen *GSTP1* A/G con la susceptibilidad de padecer leucemia inducida por la quimioterapia, por ejemplo, James M. *et al.*,(274) refieren que los individuos con al menos un alelo G (A/G o G/G) en el codón 105, tienen un riesgo de 2,66 veces de sufrir LMA después de estar expuestos a quimioterapia, en especial aquellos que estén expuestos a sustratos de la enzima *GSTP1*, como por ejemplo; ciclofosfamida, clorambucil, adriamicina, etopósido y derivados de cisplatino, los cuales tienen un riesgo de 4,34 veces mayor de sufrir LMA. Estos agentes quimioterapéuticos son aplicados en el tratamiento de numerosas neoplasias, incluyendo cáncer linfático, de vejiga, de mama, de ovario, de pulmón y cáncer de testículo. Por tanto, sugieren que si el polimorfismo *GSTP1* A/G puede identificarse en aquellos individuos con en alto riesgo de desarrollar un segundo cáncer relacionado con el tratamiento, entonces puede ser posible minimizar el riesgo de desarrollar LMA en estos pacientes.

En contraste, otro estudio informó que los polimorfismos de *GSTP1* A/G del codón 105 no son considerados un factor de riesgo para desarrollar LMA *de novo*

(256). Por tanto, sería interesante proponer un estudio en pacientes bajo tratamiento quimioterapéutico, especialmente con aquellos a los cuáles se les administre fármacos sustratos de la enzima GSTP1, y de ésta forma poder vincular si las variantes polimórficas de *GSTP1* G (Val 105) están relacionadas con la respuesta al tratamiento y al pronóstico de la enfermedad.

Con relación a la LLC y la tricoleucemia, los resultados obtenidos en este estudio, no son representativos por el bajo número de casos, sin embargo, se observó que el genotipo heterocigoto A/G fue el más frecuente en ambos grupos de pacientes. Por lo tanto, podría sugerirse una tendencia entre este genotipo heterocigoto y el riesgo de desarrollo de LLC y tricoleucemia, sin embargo para el caso de la Tricoleucemia, no existen estudios previos que relacionen los polimorfismos de la *GSTP1* A/G con este tipo de enfermedad, lo cual puede explicarse ya que los fármacos aplicados al tratamiento de esta enfermedad son metabolizados por las enzimas de fase I.

Son pocos los estudios que relacionan las variantes polimórficas de *GSTP1* y la susceptibilidad a desarrollar LLC, por ejemplo, Martin *et al.*,(257) observaron que hubo una diferencia significativa entre el genotipo heterocigoto A/G en comparación con el grupo control, de 38 % y 10 %, respectivamente y a su vez analizaron el riesgo de padecer esta enfermedad con los tres genotipos de *GST* de alto riesgo (*GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo y *GSTP1* Val 105) e informaron un aumento de 2,8 veces el riesgo de LLC, sugiriendo que el estado hereditario de *GST* podría influir en el riesgo de desarrollar LLC.

En cuanto a los resultados obtenidos en los pacientes con LMC de este estudio, el genotipo homocigoto normal A/A se presentó en un 50 % de los pacientes, la variante heterocigota A/G en 39 %, y la variante homocigota mutada G/G en un 11 %. No existen estudios previos que relacionen este polimorfismo con el riesgo de desarrollar LMC, quizás, debido a que el Mesilato de Imatinib, como se mencionó anteriormente es metabolizado por enzimas de fase I, y las enzimas estudiadas en este trabajo son enzimas de fase II.

Se realizó un análisis estadístico de los polimorfismos de *GSTP1* A/G y los estadios de evolución clínica de los pacientes, como se representa en la tabla 28. Los resultados permiten observar en los pacientes fallecidos una frecuencia de

heterocigoto A/G superior al homocigoto A/A, y una frecuencia idéntica entre A/A y G/G, en ambos casos no se visualizan diferencias estadísticamente significativas en la susceptibilidad de los polimorfismos con un pronóstico desfavorable. En pacientes que están en remisión completa no se observó diferencias entre la presencia de los polimorfismos A/G y G/G del gen *GSTP1*; sin embargo, en los pacientes que presentaron recaídas los genotipos homocigotos *wild type* A/A y el polimorfismo A/G mostraron diferencias estadísticamente significativas (p -value: 0,047), sugiriendo la significancia del genotipo A/G con fallas en la respuesta terapéutica. Cinco pacientes con LLA presentaron toxicidad gastrointestinal, renal y del sistema nervioso central. Los genotipos detectados en esos pacientes fueron los siguientes, un paciente presentó el genotipo *wild type* A/A, 2 tuvieron el polimorfismo A/G y 2 el polimorfismo G/G; estos resultados muestran una tendencia que permite proponer que los polimorfismos del gen *GSTP1* A/G pueden conferir susceptibilidad a eventos de toxicidad, sin embargo, no cumplen con una asociación estadísticamente significativa.

Sobre la influencia de este genotipo en pacientes con LLA, Gatedee *et al.*, sugieren en su estudio que la recaída en pacientes con LLA que presentaron la variante A/G del gen *GSTP1*, puede ser debida a que la región polimórfica en el codón 105 es el sitio activo de la propiedad catalítica de la enzima, por lo que podría alterarse la expresión de *GSTP1*, y de esta manera influir en el metabolismo de los agentes quimioterapéuticos (273). Kishi *et al.*, reportaron la asociación entre el polimorfismo homocigoto mutado G/G y el riesgo de toxicidad en el sistema nervioso central en pacientes con LLA en fase de mantenimiento (265). En este estudio, los pacientes con LLA que presentaron recaídas mostraron que el genotipo homocigoto *wild type* A/A y el polimorfismo A/G poseen diferencias estadísticamente significativas (p -value: 0,039). En los pacientes que se encuentran en remisión completa, el genotipo homocigoto mutado G/G mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al genotipo A/A (p -value: 0,026).

Cabe destacar que la influencia de estos genotipos sobre la evolución clínica en los pacientes con LLA presenta diferencias, según sea el origen étnico de los individuos estudiados, por lo que se justifica la continuación de este tipo de

estudios en pacientes venezolanos. Stanulla *et al.*, reportaron en un estudio del polimorfismo *GSTP1* A/G en pacientes infantiles con LLA en población caucásica-nórdica, la ausencia de asociación del alelo G con el riesgo de recaída en pacientes tratados bajo el protocolo de quimioterapia ALL-BFM 86-90 (OR: 0.33; IC= 0.09-1.23; *p*-value: 0,099) (123). En contraste, un estudio realizado recientemente en Argentina por Leonardi *et al.*, encontraron que el genotipo G/G de *GSTP1* incrementa el riesgo de recaídas y disminuye la supervivencia libre de recurrencia en niños con LLA (275).

Ante todo lo expuesto anteriormente, se puede sugerir que los polimorfismos del gen *GSTP1* A/G mostraron una asociación significativa, con el genotipo *wild type*, en pacientes con LLA que presentaron recaídas post tratamiento de inducción y en pacientes en remisión completa.

Análisis farmacogenético de los polimorfismos genéticos en el gen Metilentetrahidrofolato Reductasa en pacientes con leucemia

MTHFR 1298

Los resultados obtenidos para los polimorfismos genéticos de la enzima Metilentetrahidrofolato Reductasa en su variante *MTHFR* 1298 A/C, permiten observar de manera general que en los pacientes con leucemia estudiados se presentó con mayor frecuencia el tipo homocigoto A/A (*wild type*) 0,509; seguido del tipo heterocigoto A/C 0,470 y con una frecuencia baja de 0,019 para el genotipo homocigoto C/C (mutado). Es importante destacar que en la muestra estudiada, un total del 49% presenta polimorfismos de esta variante en forma heterocigota A/C y homocigota mutada C/C. Con respecto a la población control estudiada, se observó una alta frecuencia del genotipo homocigoto A/A 0,706; del genotipo heterocigoto A/C con una frecuencia de 0,245 y 0,049 para el genotipo homocigoto mutado C/C.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la genotipificación, se pudo observar que el polimorfismo heterocigoto A/C no estuvo asociado como un factor de riesgo que confiera susceptibilidad de desarrollar leucemia (OR=

1.2384; IC: 0,7542 – 2.0334; *p*-value: 0,3981), así como el polimorfismo homocigoto mutado C/C (OR= 0.2713; IC: 0.0600 – 1.2262; *p*-value: 0,0901), por no mostrar una asociación estadísticamente significativa. Adicionalmente se evaluaron los modelos de herencia para este polimorfismo, resultando una ausencia de relación de algún modelo como factor de riesgo o de protección del desarrollo de leucemia en los pacientes estudiados. En el caso de la variante alélica C, ésta se observó menos frecuente que la variante *wild type* A en ambas poblaciones estudiadas, sin representar asociación como factor de riesgo para la leucemogénesis (OR= 1.0659; IC: 0.6196 – 1.8336; *p*-value: 0,8177).

La distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo A/C según el tipo de leucemia fue diversa, encontrándose el genotipo homocigoto mutado C/C en una frecuencia baja en pacientes con LMA, a diferencia de los genotipos normales A/A que fueron más frecuentes en LLA, LMA y LLC.

El polimorfismo *MTHFR* 1298 A/C ha sido menos caracterizado que la variante 677 C/T, pero también ha sido menos asociado con el riesgo de desarrollo de leucemia en niños (276), ya que al encontrarse en el dominio regulador de la enzima (277), puede estar implicado en la estabilización de proteínas (278). Por lo que es posible que el polimorfismo 1298 A/C pueda de alguna manera alterar el metabolismo de un carbono dentro de una célula, potencialmente, bajo condiciones de estrés de folato, como el embarazo, para evitar que los patrones de metilación aberrante conduzcan a la inestabilidad cromosómica.

Los estudios caso-control realizados con este polimorfismo en diferentes poblaciones de pacientes con leucemia difieren en sus resultados, siendo en muchos casos inconsistentes. Así como las discrepancias observadas cuando se comparan las frecuencias del genotipo heterocigoto A/C entre los individuos controles caracterizados en distintas regiones geográficas, siendo 34 % la encontrada en este estudio, en comparación a las frecuencias de la población control usada en estudios de Irán (40,65 %), Asia (17 % – 19%), Europa (27 % – 36 %), y de países latinoamericanos como Brasil (41 %) y México (27,7 %); sugiriendo que esta variación de frecuencia genotípica se encuentra influenciada por el componente étnico (279)(280)(281).

En este estudio no se encontró que el genotipo heterocigoto del polimorfismo *MTHFR* 1298 A/C esté asociado estadísticamente como factor de riesgo o de protección para el desarrollo de LLA (OR= 1.5269; IC: 0.8249 – 2.8263; *p*- value: 0,1779) en la población de pacientes venezolanos analizados. Investigaciones realizadas en otras poblaciones de diferente origen étnico concuerdan con los resultados encontrados en este estudio. Atashrazm *et al.*,(264) reportaron en un estudio realizado en niños iraníes con LLA, una ausencia de asociación estadísticamente significativa de los polimorfismos del gen *MTHFR* 1298 A/C y C/C con el desarrollo de LLA (OR= 0.57; IC= 0.57-1.95 y OR= 0.96; IC= 0.37-2.45, respectivamente), indicando que las frecuencias de los genotipos encontradas eran similares entre los individuos controles y pacientes con LLA. Otro estudio realizado en población infantil diagnosticada con LLA de origen egipcio determinó que tampoco existe asociación de los genotipos heterocigoto y homocigoto mutado de *MTHFR* 1298 como factor de susceptibilidad para el desarrollo de LLA (282).

En otras poblaciones, como es el caso de pacientes con LLA del norte de la India, Nikbakht *et al.*, (283) analizaron los polimorfismos de varios genes involucrados en el metabolismo del folato, reportando que el SNP *MTHFR* 1298 A/C no está asociado como factor de riesgo para LLA en esa población, proponiendo la participación de otros mecanismos moleculares como el silenciamiento de genes por hipermetilación que pueden desempeñar un papel importante en la etiología de LLA. Adicionalmente, sugieren el análisis exhaustivo de factores epigenéticos que puedan afectar la expresión del polimorfismo, como son los niveles de folato séricos, las concentraciones de suplementación de folato en el embarazo y la dieta. Un estudio recientemente publicado comprendió el meta-análisis de los polimorfismos del gen *MTHFR* y el riesgo de desarrollo de leucemia en niños y adultos de diferentes poblaciones, las cuales fueron de origen europeo, asiático, americano y africano. Para el polimorfismo 1298 A/C se encontró una asociación estadísticamente significativa como factor de protección contra el desarrollo de leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloide aguda en niños de poblaciones europeas, de igual manera el polimorfismo heterocigoto se comporta como un factor de protección leucemia

mieloide crónica en adultos de la población americana (284). Del mismo modo, Xia *et al.*, (285) presentó resultados similares en los que encontraron que el genotipo heterocigoto A/C se comporta como factor protector de la susceptibilidad de desarrollar LLA en pacientes infantiles de China (OR= 0.70, IC: 0.53 – 0.92); así como el modelo dominante AC+CC, que también reportaron como factor de protección para el desarrollo de LLA (OR= 0.68, IC: 0.50- 0.96).

Como ha sido comentado anteriormente, existen discrepancias en cuanto a la consideración del polimorfismo *MTHFR* 1298 A/C y su rol en la leucemogénesis. Li *et al.*, (286) describieron en su estudio con infantes de origen chino con LLA, la susceptibilidad de padecer leucemia asociada al polimorfismo *MTHFR* A1298C y los genotipos combinados A/C+C/C, en conjunto con el alelo C (OR= 2.084; IC: 1.131 – 3.851 y OR= 2.100; IC: 1.149 – 3.837, respectivamente), sugiriendo que estos genotipos confieren riesgos de padecimiento de LLA en su población, considerando este SNP como un importante biomarcador de riesgo para la enfermedad en la población china. En ese mismo sentido, Gutiérrez-Álvarez *et al.*, (281) reportaron la asociación del polimorfismo homocigoto mutado *MTHFR* 1298 C/C como factor de riesgo de desarrollo de LLA, según su estudio realizado en pacientes mexicanos, en el que encontraron una asociación estadísticamente significativa (OR= 6.48; IC: 1.26 – 33.2), con un valor de *Odds ratio* muy superior en comparación a lo descrito en otras poblaciones.

Con respecto a los otros tipos de leucemia, en el caso de la LMA, en este estudio no se encontró asociación del polimorfismo *MTHFR* 1298 A/C y el homocigoto C/C como factor de riesgo para la leucemia mieloide aguda (OR= 1.0523; IC: 0.4154 – 2.6659, *p*-value: 0,9142 y OR= 1.2103; IC: 0.2486 – 5.8917, *p*-value: 0,8132, respectivamente) en los pacientes venezolanos analizados. En concordancia con estos resultados, Qin *et al.*,(287) a través de un estudio de meta-análisis, indicaron que en varias poblaciones asiáticas, caucásicas y brasileras no se encontró una asociación de los polimorfismos de *MTHFR* 1298 A/C como factor de riesgo o protección para el desarrollo de leucemia mieloide aguda. Otro estudio de genotipaje del polimorfismo del gen *MTHFR* 1298 A/C en población adulta con LMA en Irán por Vahid *et al.*, encontraron que los genotipos

heterocigotos y homocigotos mutados no se comportan como factores de riesgo o de protección del desarrollo de LMA (OR= 1.33; IC: 0.7 – 2.5 y OR= 0.75; IC: 0.34 – 1.6, respectivamente); del mismo modo, Skibola *et al.*, no encontraron asociación del polimorfismo *MTHFR* 1298 A/C como factor de riesgo en pacientes adultos con LMA del Reino Unido (288) (289).

En los pacientes con leucemia mieloide crónica incluidos en este estudio se encontró que el genotipo heterocigoto A/C fue el más frecuente 0,65, observándose incrementado con respecto al genotipo heterocigoto de la población control 0,341; seguido del genotipo homocigoto *wild type* A/A con una frecuencia de 0,35; encontrándose ausente el genotipo homocigoto mutado C/C. Moon *et al.*, realizaron un estudio similar en pacientes con LMC en población sur coreana; sin embargo, el genotipo asociado como factor de riesgo de susceptibilidad de desarrollar LMC en esa población fue el homocigoto mutado *MTHFR* 1298 C/C, con una alta significancia estadística (OR= 5.12; IC: 1.75 – 14.9, p value: 0,03) (290). En contraposición a estos resultados, en un estudio de Banescu *et al.*, (291) no encontraron asociación de los polimorfismos de *MTHFR* 1298 A/C y C/C, con el desarrollo de LMC en la población rumana. El estudio citado anteriormente, también incluyó la población de pacientes adultos iraníes y el polimorfismo A/C no se comporta como un factor de riesgo para el desarrollo de este tipo de leucemia (288). Lordelo *et al.*, (280) reportaron en LMC una asociación del genotipo *wild type* A/A como factor de riesgo, en los diferentes grupos étnicos de Brasil.

Es interesante observar las variaciones de las frecuencias genotípicas y alélicas de *MTHFR* según el grupo étnico de pacientes así como la distribución geográfica, y esto es lo que persigue la disciplina de farmacogenética, el poder conocer los genotipos en conjunto con la influencia que tengan para el desarrollo de una enfermedad, así como la predicción de la evolución frente a la administración de medicamentos.

Uno de los fármacos administrados en los protocolos quimioterapéuticos (inducción, consolidación y mantenimiento) de pacientes con LLA incluidos en este estudio y que es metabolizado por la enzima *MTHFR* es el Metotrexato. Ocasionalmente, la terapia con este fármaco antifolato está asociada con varios

efectos adversos que incluyen toxicidad hepática, renal, pulmonar, hematológica y neurológica, que pueden conllevar en muchos casos a la suspensión del tratamiento.

Por este motivo, se decidió analizar las frecuencias genotípicas encontradas del *MTHFR* 1298 (SNP rs1801131) en cada uno de las variables de evolución clínica que han sido descritas previamente, para conocer su distribución en la población de pacientes con LLA estudiados, y de esta manera establecer ajustes que permitan optimizar e individualizar tratamientos con el fin de minimizar los riesgos mencionados anteriormente.

Los pacientes con LLA en el estadio de remisión completa, presentaron una distribución de los genotipos similar, con ausencia de la relación de estos como un marcador de buen pronóstico. Con respecto a los pacientes que presentaron recaídas y a los que fallecieron, mostraron una frecuencia mayor del polimorfismo A/C con respecto al genotipo *wild type* A/A, sin embargo, la presencia de A/C no representa un factor asociado a mal pronóstico, sugiriendo que no afecta la respuesta al tratamiento con Metotrexato en los pacientes con LLA, (OR=1.9952, IC:0.644-6.1774; *p*-value: 0,2310 y OR= 2.1988, IC: 0.7838-6.1678; *p*-value: 0,1343, respectivamente). Los 8 casos en este estudio que manifestaron toxicidad a nivel gastrointestinal, renal y del sistema nervioso central presentaron una mayor frecuencia del polimorfismo A/C, en comparación con el genotipo A/A, sólo uno de los pacientes desarrolló toxicidad a Metotrexato, cuyo genotipo fue A/A. Estos resultados muestran la distribución de los genotipos en el gen *MTHFR* 1298 en pacientes con diagnóstico de LLA que presentaron una evolución clínica desfavorable, encontrándose que no están relacionados con la respuesta al metotrexato.

Un estudio reciente de Fukushima *et al.*, (12) reportaron que los polimorfismos *MTHFR* 1298 A/C y C/C en pacientes japoneses con LLA no se encontraban asociados con riesgo de recaídas o muerte, en concordancia con lo descrito en este trabajo. Ongaro *et al.*, (292) no encontraron asociación de los polimorfismos del gen *MTHFR* 1298 A/C y C/C con la aparición de toxicidad (leucopenia), en pacientes con LLA de origen italiano; sin embargo, el modelo dominante de variación genética para este polimorfismo mostró ser un factor de

protección de aparición de leucopenia. En el caso de hepatotoxicidad, encontraron que el genotipo heterocigoto A/C participa como un factor de protección de riesgo para la toxicidad con respecto al genotipo *wild type* A/A. Otros estudios han reportado la asociación del genotipo A/C con la enfermedad mínima residual y con una reducida supervivencia libre de enfermedad (293).

La variación de los resultados de la evolución clínica en diferentes estudios, incluyendo éste, se atribuye probablemente a la dosis de metotrexato, protocolo de tratamiento, tolerabilidad del fármaco, el origen étnico y el número de individuos estudiados.

MTHFR 677

Se observó que un 67 % de los pacientes presentan polimorfismos, de los cuales, 11 % son homocigotos T/T y el 56 % heterocigoto C/T, representando una frecuencia genotípica de 0,108 y 0,559 respectivamente. Con respecto a la población control, el genotipo más frecuente fue el heterocigoto C/T 0,455; inferior en comparación a la población de pacientes con leucemia, seguido del homocigoto *wild type* C/C 0,420 y homocigoto mutado T/T 0,125.

Según los diferentes tipos de leucemia comprendidos en este estudio, los pacientes con LLA, LMA y LMC presentaron frecuencias mayores del polimorfismo *MTHFR 677 C/T*, seguidas del genotipo normal *677 C/C* y del genotipo mutado *677 T/T*.

Así como fue mencionado para el polimorfismo *MTHFR 1298 A/C*, las variaciones entre las frecuencias alélicas y genotípicas de *MTHFR 677 C/T* parecen, estar influenciadas por el origen étnico, niveles de folato, entre otros factores epigenéticos de las poblaciones de pacientes y controles que se incluyen en los estudios. La distribución de los genotipos en la población control utilizada en este estudio mostró frecuencias similares entre el genotipo homocigoto *wild type* y el heterocigoto C/T, siendo 0,420 y 0,455 respectivamente. Al comparar las frecuencias genotípicas de *MTHFR 677 C/T* de individuos controles de otras regiones geográficas tenemos, en Rumania 0,38 (291), en Iran 0,23 – 0,29 (294)(279), en China 0,401 (285), en India 0,49 (283), encontrándose con mayor

similitud en poblaciones latinoamericanas; en Brasil 0,447 (280) y en México 0,473 (281).

Se analizaron los genotipos del gen *MTHFR* 677 (rs1801133) para conocer si pueden ser considerados como biomarcadores de riesgo o de protección de desarrollo de leucemia (tabla 35). Se encontró que el genotipo heterocigoto C/T y el homocigoto mutado T/T, no representan una asociación estadísticamente significativa de ser un factor de riesgo para el desarrollo de leucemia (OR= 1.545; IC: 0.9517 – 2.5163, *p*-value: 0,078 y OR= 1.0950; IC: 0.5080 – 2.3603, *p*-value: 0,81; respectivamente). El alelo variante T, presentó una menor frecuencia con respecto al alelo C, y no fue considerado estadísticamente un factor de riesgo para leucemia en los pacientes venezolanos (OR= 1.1476; IC= 0.7248 – 1.8169, *p*-value: 0,557). Los modelos de herencia genéticos recesivo, dominante y aditivo no mostraron asociación como factor predisponente o de protección de leucemogénesis.

En varios estudios sobre la LLA se ha descrito una menor incidencia de estos polimorfismos en los pacientes con respecto a los controles, confiriendo una reducción en el riesgo de LLA. En este estudio, la frecuencia del genotipo heterocigoto C/T de *MTHFR* 677 en los pacientes con LLA fue superior al de la población control, 0,509 vs 0,455. Al analizar las frecuencias genotípicas encontradas en los pacientes con LLA para conocer si el polimorfismo se comporta como un biomarcador de riesgo o de protección de la enfermedad, se encontró que el genotipo heterocigoto C/T y el homocigoto mutado T/T no muestran asociación con el desarrollo de LLA en la población venezolana estudiada (OR= 1.3117; IC: 0.6968 – 2.4698, *p*-value: 0,4006 y OR= 1.2470; IC: 0.4884 – 3.1837, *p*-value: 0,664; respectivamente). En concordancia con los resultados de este trabajo, otros autores han reportado que los polimorfismos de *MTHFR* 677 no representan un factor de susceptibilidad de desarrollar leucemia de tipo LLA en poblaciones de Irán, China, India y México (279)(286)(287)(283)(281).

Tong *et al.*, describen en un estudio de meta – análisis basado en 28 trabajos publicados, la asociación del genotipo homocigoto mutado del gen *MTHFR* 677 T/T como factor protector de desarrollo de LLA infantil en población caucásica

(OR= 0.68; IC: 0.51 – 0.90; *p*- value: 0,01), y del modelo dominante también como factor protector de LLA en la misma etnia (OR= 0.79; IC: 0.67 – 0.93; *p*- value: 0,01), sugiriendo que la presencia de una copia del alelo variante T o ser portador de los dos alelos es suficiente para reducir el riesgo en la población caucásica (295). Otro estudio realizado en pacientes con LLA en China (285), reportaron la asociación de los genotipos heterocigoto C/T y homocigoto mutado T/T del gen *MTHFR* 677 como marcadores de protección para el desarrollo de LLA en esa población. El modelo dominante en esta población también se comporta como un factor de protección de LLA en población China. Lien *et al.*, (284) realizaron un estudio de meta-predicción de los genotipos de *MTHFR* 677 en pacientes infantiles y adultos con LLA, encontrando que el genotipo homocigoto mutado T/T se comporta como factor de protección de susceptibilidad a desarrollar LLA en pacientes infantiles de origen Americano, a diferencia de las otras poblaciones y grupos etarios analizados.

Otros estudios de LLA en población infantil, han reportado que el polimorfismo *MTHFR* 677 C/T o su combinación con el polimorfismo 1298 A/C confiere un papel protector contra el desarrollo de LLA (296) de modo que al estar presentes estos polimorfismos, el folato no puede pasar a su forma activa que es necesaria para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos.

Schnakenberg *et al.*, realizaron una evaluación de los polimorfismos en el gen *MTHFR* 677 y 1298 combinados en pacientes alemanes con LLA, cuyos resultados revelaron que no existe una asociación estadísticamente significativa entre los diferentes polimorfismos de *MTHFR* como factores de riesgo para desarrollar LLA (297). Skibola *et al.*, describieron en un estudio la asociación de los genotipos de *MTHFR* en el desarrollo de leucemia, el genotipo 677 T/T y el polimorfismo 1298 A/C fueron asociados como factor protector del desarrollo de leucemias agudas en adultos (289).

En cuanto a la leucemia mieloide aguda, los resultados en los pacientes de este estudio no revelan asociación de riesgo de desarrollo de la enfermedad por la presencia de los genotipos C/T y T/T de *MTHFR* 677. Un estudio de meta – análisis reporta una tendencia similar, en varias poblaciones de pacientes con LMA, caucásicas, asiáticas y brasilera, sin encontrar asociación del polimorfismo

MTHFR 677 C/T y el genotipo homocigoto T/T, así como el modelo dominante y recesivo para esta variante, con el desarrollo de LMA, concluyendo que el SNP rs1801133 no puede ser considerado un biomarcador de riesgo o protección (287). Vahid *et al.*, (288) estudiaron en pacientes con LMA de Irán para establecer si existía asociación del polimorfismo del gen *MTHFR* 677 C/T con el desarrollo de la enfermedad. Sus resultados no mostraron asociación como factor de riesgo de susceptibilidad de los genotipos heterocigoto C/T y homocigoto mutado T/T del gen *MTHFR* 677 (OR= 1.33; IC: 0.7 – 2.5 y OR= 0.75; IC: 0.34 – 1.6; respectivamente).

Como se ha manifestado anteriormente, existen estudios que difieren en sus reportes de resultados, como es el caso de un estudio realizado en población infantil con LMA del Reino Unido, que revela la asociación del polimorfismo *MTHFR* 677 C/T como factor de protección de aparición de LMA (OR= 0.51; IC: 0.30 – 0.87) (289). Interesantemente, el modelo dominante también fue propuesto como un factor de protección de desarrollo de LMA en esa población, sugiriendo que la presencia de un alelo T o ser portador de ambos es suficiente para disminuir el riesgo de desarrollo de la enfermedad.

En este estudio no se encontró asociación del polimorfismo *MTHFR* 677 C/T y el genotipo T/T como factor de riesgo de desarrollo de leucemia mieloide crónica, de acuerdo a los resultados analizados. Similarmente fue reportado en un estudio de pacientes con LMC de Serbia, que las variantes del gen *MTHFR* 677 no tienen influencia significativa sobre la susceptibilidad a LMC en la población Serbia (298). Lordelo *et al.*, tampoco encontraron asociación de este polimorfismo *MTHFR* 677 C/T con el desarrollo de LMC en población brasilera, a diferencia de *MTHFR* 1298 A/C. Los autores plantean que la discrepancia observada en el desarrollo de LMC donde el genotipo *MTHFR* 1298 A/C es un factor de riesgo asociado y el polimorfismo 677 C/T no lo sea, puede ser debido a que ambos loci se encuentren en desequilibrio de ligamiento. Probablemente los alelos de ambos loci no se heredan de manera independiente, pero ciertas combinaciones de ellos ocurren con mas frecuencia de lo esperado por segregación aleatoria (280). Otro estudio realizado en pacientes iraníes adultos con LMC por Vahid *et al.*, no encontraron asociación entre el polimorfismo *MTHFR* 677 C/T y el desarrollo de

LMC en la población (OR= 0.7; IC: 0.3 – 1.6) (288). En contraste a lo encontrado en este estudio, resultados diferentes fueron hallados en el estudio de Banescu *et al.*, en el que reportaron la existencia de asociación del polimorfismo C/T como factor de riesgo para el desarrollo de LMC en población rumana, así como el genotipo homocigoto T/T y el modelo dominante, sugiriendo que el alelo variante T es un factor de riesgo determinante para la leucemogénesis de LMC (291).

De manera global, se puede apreciar en este estudio las variaciones y efectos que tienen ambos polimorfismos en el gen *MTHFR* 1298 y 677 en los pacientes estudiados y de acuerdo a cada tipo de leucemia. Estos resultados sirven de base para otros estudios que permitan abordar factores que intervienen en la interacción gen-ambiente, considerando que la leucemia es una patología multifactorial y que *MTHFR* es solo uno de las enzimas que participa en el metabolismo del folato.

Se han reportado estudios que sugieren que estos polimorfismos traen como consecuencia una reducción del 61% de la actividad de la enzima (299), por ende existe una producción inadecuada de la cantidad de folato intracelular para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, aunque no parece ser suficiente para afectar la homocisteína plasmática (300)(301), por lo que es sorprendente el efecto protector de la variante 1298 A/C en comparación con la 677 C/T, lo que sugiere que la variante 1298 A/C puede actuar a través de un mecanismo diferente (301), el cual puede deberse a que la sustitución Glu429Ala reside dentro del dominio c-terminal SAM (S-adenosil-metionina) regulador de la enzima, dando lugar a una prevención del patrón de metilación aberrante. La posibilidad de que la forma Ala429 es menos dependiente de la inhibición de la SAM, también puede explicar la ausencia de la hiperhomocisteinemia en los individuos con el genotipo 1298 C/C (302).

Se ha evidenciado en los diferentes estudios publicados que el riesgo de desarrollo de leucemia puede ser modificado por las dos variantes genéticas descritas en el gen *MTHFR* y que influyen entre sí para establecer o no un riesgo asociado a desencadenar la enfermedad. Así mismo, se ha planteado que la enzima *MTHFR* con menor actividad enzimática (677 T/T y 1298 C/C) favorece una mayor disponibilidad de la forma no metilada de folato (5,10-MeTHF) para la síntesis de ADN y disminución de los niveles de 5-MeTHF para la metilación del

ADN; es decir, la disminución de la actividad de MTHFR altera la distribución intracelular normal de sustratos de folato a favor de precursores para la síntesis de nucleótidos. Por lo tanto, si se dispone de niveles adecuados de folato, incluso si la actividad de MTHFR es baja, existe suficiente conversión de 5-MeTHF para la metilación del ADN mientras se sigue derivando 5,10-MeTHF hacia la síntesis de desoxiuridina monofosfato a desoxitimidina monofosfato y por tanto se evita la incorporación de uracilo y el daño cromosómico. Esto sugiere que las diferencias en la disponibilidad de folato en el individuo pueden influir en los efectos funcionales de los polimorfismos MTHFR, lo que posiblemente podría explicar los diferentes hallazgos entre los estudios.

En el contexto de la interacción entre los genes y el medio ambiente, vale la pena señalar que los polimorfismos del gen *MTHFR*, también pueden tener un impacto en el resultado de la modulación del efecto del tratamiento antifolato, específicamente sobre el metotrexato (MTX). Este fármaco puede estar asociado a diversos casos de toxicidad en LLA (277). Varios estudios han descrito que la toxicidad a drogas anti cancerígenas puede verse influenciada por polimorfismos de genes que codifican enzimas encargadas del metabolismo. Los polimorfismos de los genes *MTHFR* 677 C/T y 1298 A/C que codifican a la enzima metabolizadora de folato *MTHFR* pueden influenciar en la efectividad y en los efectos tóxicos del MTX (91)(300).

En este sentido, se analizaron las frecuencias de los polimorfismos de *MTHFR* 677 de acuerdo a la evolución clínica de los pacientes con LLA (tabla 35 de los resultados). El polimorfismo C/T se presentó con mayor frecuencia en pacientes en remisión completa y en fallecidos. Los pacientes que presentaron recaídas post-inducción mostraron similitud entre el genotipo *wild type* y el heterocigoto. El genotipo homocigoto mutado *MTHFR* 677 T/T tuvo una menor frecuencia en los diferentes estadios de los pacientes estudiados con respecto a C/C. Estos resultados no representan una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del polimorfismo heterocigoto C/T, así como, del genotipo T/T, con la evolución clínica, por lo que no es posible considerarlos biomarcadores de riesgo del pronóstico de la respuesta al metotrexato en los pacientes con LLA.

En este estudio se observaron los genotipos de *MTHFR* 677 en los 7 pacientes con LLA que presentaron toxicidad, como se explicó anteriormente, uno de los pacientes tuvo toxicidad determinada a metotrexato, y su genotipo fue 677 T/T, los otros 6 pacientes presentaron el genotipo C/C. Estos resultados a pesar de representar a un grupo pequeño de pacientes, son interesantes y concuerdan con los postulados acerca de los polimorfismos de este gen y la respuesta a este fármaco. Ongaro *et al.*, realizaron un análisis de asociación de los genotipos de *MTHFR* 677 con los diferentes eventos adversos de toxicidad en pacientes con LLA tratados con metotrexato, observando que no existe asociación entre la presencia del polimorfismo de *MTHFR* 677 C/T con el riesgo de toxicidad hepática y gastrointestinal (292). En los últimos años varias investigaciones se han enfocado en evaluar la relación entre los polimorfismos de *MTHFR* y la toxicidad durante el tratamiento con MTX en pacientes pediátricos con LLA, y se ha reportado una tasa más baja de episodios de toxicidad en los pacientes portadores del alelo 677 C/T (303)(304). Fukushima *et al.*, encontraron asociación significativa entre los genotipos *MTHFR* 677 C/T y T/T, a un incremento de enzimas hepáticas (ALT) en el suero durante el período de tratamiento con altas dosis de MTX. (12)

Finalmente, se realizó un análisis de ambos polimorfismos 677 y 1298 de *MTHFR* de acuerdo a los diferentes estadios clínicos para analizar si existe una posible asociación con la evolución de la enfermedad en los pacientes con LLA tratados con metotrexato.

En la tabla 36, se puede evidenciar la distribución de los diferentes genotipos en los pacientes con LLA agrupados por sus pares *MTHFR* 677/1298. El más frecuente fue el doble heterocigoto para ambos genotipos CT/AC, seguido del CT/AA. Los polimorfismos más frecuentes en pacientes fallecidos fue el CT/AC, sugiriendo que los pacientes que presentaron LLA con genotipos heterocigotos de los SNPs 677 y 1298 del gen *MTHFR* tienen una tendencia a tener un pronóstico desfavorable; sin embargo, al realizar los análisis de asociación de riesgo no se encontró una asociación estadísticamente significativa de que este haplotipo sea un factor de riesgo relacionado con el fallecimiento en pacientes con LLA tratados con metotrexato (OR= 1.556; IC:0.3231 – 7.4882; *p*-

value: 0,5816). Se realizó el mismo análisis en pacientes que presentaron eventos de toxicidad, y no se encontró asociación de riesgo de los mismos con el desarrollo de toxicidad en pacientes con LLA tratados con metotrexato. Así mismo, se observó que el haplotipo CC/AC tuvo mayor incidencia en pacientes que presentaron recaídas post-tratamiento de inducción con respecto a los demás genotipos; sin embargo, no se halló una asociación de la presencia de este haplotipo con el riesgo de recaídas en LLA (OR= 2.222; IC= 0.3253 – 15.1806; *p*-value: 0,4154).

En cuanto al estadio de remisión completa, éste de buen pronóstico, los resultados mostraron que el doble homocigoto *wild type* CC/AA se encontró en un 60 % de los pacientes con LLA, en comparación con los dobles heterocigotos CT/AC, donde un 40 % de ellos permanecen en remisión completa en la actualidad. Estos resultados sugieren una tendencia positiva que favorece el alcance de la remisión completa en los pacientes con LLA cuando está presente el haplotipo *wild type* CC/AA del gen *MTHFR* 677/1298. Esto se puede deber posiblemente al funcionamiento óptimo de la enzima MTHFR en el metabolismo del folato, sugiriendo una respuesta eficaz al tratamiento con metotrexato. Cabe destacar que en este estudio no se encontró ambos genotipos TT/CC homocigotos mutados en pacientes con LLA, como también ha sido descrito en otras poblaciones (305).

Kaluzna *et al.*, (305) reportaron en un estudio de polimorfismos de *MTHFR* 677 C/T y 1298 A/C en pacientes con LLA tratados con dosis altas y bajas de metotrexato, que pacientes con los genotipos 677T-1298A tienen una alta concentración de MTX plasmático con una mayor frecuencia de eventos adversos durante la quimioterapia con este fármaco, comparados con aquellos que poseen los genotipos 677T-1298C. También encontraron que la presencia de los haplotipos 677CT/1298AC y 677TT/1298AA fue asociada significativamente con una eliminación prolongada de metotrexato y con niveles altos de toxicidad durante el tratamiento quimioterapéutico en los pacientes con LLA, en contraste, esto no fue observado en pacientes con haplotipos CT/AA.

Los análisis de los genotipos del gen *MTHFR* 677-1298 pueden dar una visión de orientación al clínico sobre el manejo y ajuste de dosis de metotrexato

en protocolos de quimioterapia en pacientes con LLA, que permitan un abordaje personalizado farmacogenético con el fin de minimizar o evitar eventos adversos de toxicidad, recaídas y fallecimiento. Los resultados obtenidos en este estudio pionero en Venezuela sirven de base para la continuación de análisis que comprendan estudios bioquímicos del metabolismo del folato y dosificación plasmática de metotrexato, con el fin de lograr un mayor alcance del conocimiento de la influencia de estos polimorfismos en los pacientes con LLA venezolanos.

Supervivencia global y libre de evento en pacientes con LLA tratados con metotrexato y su asociación con los polimorfismos de MTHFR 677 y 1298

Para conocer el tiempo de ocurrencia de un evento específico de interés durante la evolución clínica del paciente, es necesario evaluar la respuesta de estos a un determinado tratamiento, por lo que se realizan análisis de supervivencia global, que permite conocer el comportamiento de una población con respecto al desenlace de la enfermedad, para así determinar la eficacia que pueda tener dicho tratamiento (103)(104).

A pesar de los avances que se han conseguido a nivel mundial en relación a la evolución de los pacientes con LLA, tras la aplicación de diferentes protocolos de quimioterapia, sigue observándose pacientes que no responden de manera favorable al tratamiento. Desde hace varios años se sabe que los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) son algunas de las variaciones genéticas de la población que afectan y modifican la actividad normal de las enzimas implicadas en el metabolismo de los fármacos utilizados en la quimioterapia, por lo que juegan un papel importante en el resultado y la supervivencia de los pacientes con LLA bajo tratamiento (108).

En este estudio se evaluó la influencia de las variantes genéticas de *MTHFR* en la respuesta al tratamiento con metotrexato, prescrito en los protocolos de quimioterapia en pacientes con LLA, a través de la estimación de la supervivencia global y libre de evento. El metotrexato es un antimetabolito que afecta el metabolismo del folato, inhibiendo la dihidrofolato reductasa y la

timidilato sintetasa. Esto impide la conversión de los cofactores dihidrofolatos a tetrahidrofolatos, incrementando la homocisteína sérica, disminuyendo los niveles de folato afectando el pool de folato intracelular; por lo tanto, también influye en la actividad de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), trayendo como consecuencia la disminución de la síntesis de precursores del ADN (306).

Los resultados observados en la supervivencia global no mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes que tenían el alelo común C y los que presentaron al menos un alelo mutado T en el gen *MTHFR* 677 (Log Rank *p*-value: 0,930). En la gráfica de Kaplan - Meier se encontró una diferencia entre la tasa de supervivencia de los pacientes con el alelo común con respecto a los pacientes que portaron al menos un alelo mutado T, de aproximadamente el 20 % entre uno y otro, teniendo una menor tasa los portadores del alelo común. Sin embargo, la media de sobrevivida para ambos grupos fue muy similar con diferencia de dos meses. Estas diferencias pueden deberse a la frecuencia genotípica propia de los pacientes fallecidos incluidos en el gráfico de supervivencia.

De Deus *et al.*, estudiaron la supervivencia global asociada a los polimorfismos en el gen *MTHFR* 677 en niños brasileños con LLA, donde encontraron resultados similares a este estudio en cuanto a la tasa de supervivencia para el alelo C y el alelo T de *MTHFR* 677, siendo estas de 62 % y 80 % respectivamente. Sin embargo, en este caso si hubo una diferencia significativa entre ambos grupos (Log Rank *p*-value 0,011) (307). Ohja *et al.*, sugieren en la revisión realizada, que los pacientes portadores del genotipo 677 C/T pueden tener un alto riesgo relativo de mortalidad, considerando necesaria la genotipificación de este polimorfismo al momento del diagnóstico, ya que puede ser útil para la individualización de la terapia con el fin de reducir la mortalidad en pacientes con LLA (109).

Con respecto al polimorfismo en el gen *MTHFR* 1298, se evidenció en comparación con el polimorfismo anterior, una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes portadores del alelo común A y los que portaban al menos un alelo mutado C (Log Rank *p*-value: 0,038), en donde estos últimos presentaron una tasa de supervivencia global menor, 35 % a los 77 meses, con

respecto, a los que tenían el alelo común A, cuyo porcentaje fue de 93 % a los 9 meses. Esta diferencia se observó de manera similar en las medias de supervivencia, donde los que portaban al menos un alelo mutado C sobreviven menos tiempo. Estos resultados confirman la hipótesis de que la disminución de la actividad de la enzima MTHFR producida por los polimorfismos del gen que la codifica, afecta la respuesta al tratamiento con metotrexato, alterando así la sensibilidad de los linfoblastos al medicamento, trayendo como consecuencia la falla terapéutica que se evidencia con un menor tiempo de supervivencia en los pacientes que presentan al menos un alelo mutado C del polimorfismo en el gen *MTHFR* 1298.

En contraste con lo hallado en este estudio, De Deus *et al.*, no encontraron diferencias significativas entre ambos alelos en relación a la supervivencia global para el polimorfismo en el gen *MTHFR* 1298 en pacientes con LLA, a diferencia del *MTHFR* 677 donde sí encontraron. Ellos hallaron un porcentaje de supervivencia global de 68 % para el alelo A y 74 % para el alelo C, evidenciando una menor supervivencia de los pacientes portadores del alelo común A; sin embargo, el genotipo heterocigoto A/C presentó la menor tasa de supervivencia (80 %) con respecto a los demás genotipos, A/A fue de 85 % y C/C fue de 93 % (307). Umerez *et al.*, sugieren que el genotipo *MTHFR* 1298 A/C no es un buen predictor de respuesta al metotrexato en pacientes con LLA que participaron en los estudios revisados (308).

Los diferentes resultados encontrados por otros autores en este tipo de estudios pueden atribuirse a diversos factores: el componente racial producto del mestizaje de las etnias caucásicas, africanas y amerindias, conduciendo a variabilidades genéticas para cada población, el estado nutricional de los pacientes estudiados, el protocolo de quimioterapia y las dosis de metotrexato empleadas en cada uno.

Para estimar el espacio de tiempo que media entre la remisión completa y la aparición de la recaída, fue necesario realizar los cálculos de supervivencia libre de evento, el cual, para este grupo de pacientes estudiados mostró no tener asociación significativa entre la presencia de los polimorfismos en el gen *MTHFR* 677 y 1298 con dicha supervivencia.

La supervivencia libre de evento de acuerdo al polimorfismo en el gen *MTHFR* 677 en este estudio, mostró una media menor en los pacientes portadores de al menos un alelo común C, sugiriendo que tienen mayor probabilidad de presentar un evento de recaída post remisión completa en un menor período de tiempo (23 ± 4 meses), pero con una mayor tasa de supervivencia libre de recaída (17 %), con respecto a los portadores de al menos un alelo mutado T; sin embargo, no se encontró asociación significativa (Log Rank: 0,001; *p*-value: 0,96). Un estudio realizado en pacientes con LLA de Turquía que fueron tratados con altas dosis de metotrexato (HD-MTX: 5g/m^2), encontraron que los pacientes que contenían el genotipo C/C, presentaron el menor tiempo de aparición de recaída (800 días aprox.), seguidos de los pacientes con los genotipos T/T y C/T, respectivamente, aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos (*p*-value: 0,59) (309). Leonardi *et al.*, estimaron la supervivencia libre de evento en pacientes con LLA argentinos, encontrando que el genotipo *wild type* C/C tiene una menor tasa de supervivencia libre de evento (70% aproximadamente) con respecto a los demás genotipos; sin embargo, el genotipo T/T fue el que presentó el menor período de tiempo para sufrir una recaída, siendo de aproximadamente 50 meses y no mostró asociación estadísticamente significativa (*p*-value: 0,721) (275).

Cabe destacar, que el resultado obtenido en este estudio para el gen *MTHFR* 1298 no mostró diferencia significativa entre las medias de supervivencia libre de evento de los pacientes que presentaron el alelo común A y los que portaban al menos un alelo mutado C (*p*-value: 0,234), siendo la variación entre ambos de 15 meses, evidenciándose un menor tiempo entre la remisión completa y la aparición de recaída en aquellos que presentaron al menos un alelo mutado C (59 meses). En cuanto a la tasa de supervivencia libre de recaída, los portadores de al menos un alelo mutado C tienen una tasa 33 %, siendo menor con respecto a la supervivencia libre de evento de los que presentan al menos un alelo *wild type* A (44 %). El grupo BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) ha considerado al genotipo *MTHFR* 1298 A/A como un candidato biomarcador en pacientes con riesgo estándar e intermedio, por presentar una mejor tasa de supervivencia libre de eventos, siendo similar a lo encontrado en este estudio en población venezolana.

Radtke *et al.*, estudiaron la influencia de los polimorfismos en el gen *MTHFR* y en otros genes involucrados en el metabolismo del metotrexato, con el fin de poder conocer la supervivencia libre de eventos de recaídas y toxicidad en pacientes con LLA, así como, en la farmacocinética del metotrexato. Su estudio mostró que los pacientes que presentaron el genotipo *MTHFR* 1298 A/A tienen mejores tasas de supervivencia libre de evento (aproximadamente de 90 %) y el genotipo homocigoto mutado C/C mostró un *Hazard ratio* (HR) significativo (HR: 3.1; IC: 1.2-7.7; *p*: 0,015), asociado a un menor período de tiempo para la aparición del evento de recaída con una menor tasa de SLE, destacando que estos pacientes con LLA fueron tratados con el protocolo de quimioterapia BFM-2000 (111).

Similar a lo encontrado en esta investigación, Hoang *et al.*, en su estudio realizado en 94 niños caucásicos y 141 Vietnamitas tratados con el protocolo FRALLE 2000, donde determinaron la prevalencia de 7 polimorfismos genéticos, incluyendo *MTHFR* 677 y 1298, y evaluaron el impacto de dichos polimorfismos sobre la supervivencia libre de evento, no encontraron asociación entre los polimorfismos del *MTHFR* y dicha supervivencia (310). Sin embargo, a pesar de que no encontraron asociación, ellos consideraron que tanto el genotipo *MTHFR* 677 C/T y T/T, como el 1298 A/C y C/C eran considerados factores de riesgo para los pacientes con LLA caucásicos y vietnamitas.

A pesar de que estos polimorfismos se han visto relacionados con alteraciones en la terapia con metotrexato, debido a que disminuyen la actividad enzimática de la *MTHFR*, para éste grupo de pacientes con LLA estudiados, los genotipos *MTHFR* 677 y 1298 no afectan significativamente el tiempo entre la remisión completa y la reaparición de la enfermedad por la recaída; por lo tanto, la supervivencia libre de evento es independiente del componente o variantes genéticas de *MTHFR* por sí solas, según el modelo univariado evaluado.

Para concluir, este estudio realizado sobre los polimorfismos de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *MTHFR*1298, *MTHFR*677) en pacientes venezolanos con leucemia, servirá de referencia para futuras investigaciones, que permitan los ajustes en la estandarización de protocolos quimioterapéuticos adaptados al genotipo del paciente en riesgo de

pronósticos desfavorables en su evolución clínica. La farmacogenética ha cobrado una alta importancia debido a que proporciona la posibilidad de predecir una respuesta, así como la toxicidad potencialmente letal en pacientes que reciben quimioterapia, permitiendo el uso individualizado de estos medicamentos, que tienen un índice terapéutico estrecho.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

El tipo de leucemia más frecuente en la población estudiada fue la LLA representando un 47,5%, seguidamente la LMA con un 24,5%, la LMC en un 18,8% y en menor frecuencia la LLC en un 4,9%, la tricoleucemia en un 3,3% y un solo caso de LMMJ que representó el 0,8%

BCR-ABL b2a2 fue el transcrito más frecuente en los pacientes Ph+ diagnosticados con LMC (57,1%)

En pacientes diagnosticados con LLA, se detectó el transcrito *BCR-ABL* b2a2 en 8% de los pacientes infanto- juveniles y en 17% en pacientes adultos

El oncogén *BCR-ABL* detectado en pacientes con LLA de alto riesgo, mostró una frecuencia de 16,6%, los cuales fallecieron todos, sin observarse su presencia en los pacientes de bajo riesgo, sugiriendo que la presencia de este oncogén puede condicionar un pronóstico desfavorable en pacientes con LLA.

Se detectó la presencia del transcrito Bcr1 del oncogén *PML-RAR α* en una paciente con LPA, representando 11,1% de los pacientes estudiados

En pacientes con LLA infanto-juveniles se encontró la presencia del transcrito Tel/Aml1 del oncogén *TEL-AML1*. Los pacientes positivos permanecen en remisión completa, sugiriendo la correlación de este transcrito con la evolución clínica favorable en pacientes diagnosticados con LLA

Se encontraron mutaciones en el gen *TP53*, representando el 13% de los pacientes analizados

Se detectaron 3 polimorfismos en el gen *TP53*: rs1642786 del intron-7, rs12947788 del intron-7 y rs165895 del intrón-6, en pacientes con leucemia y en controles sanos. Estos SNPs no fueron asociados como marcadores pronósticos de evolución clínica

Se observó la presencia de la mutación de tipo silente c.36T>G en el gen *KRAS* en un paciente de 9 años con diagnóstico de LMA, cuyo pronóstico fue desfavorable, falleciendo posteriormente

El genotipo *GSTMI*⁻ no fue considerado un factor de riesgo para el padecimiento de leucemia de acuerdo a la población estudiada

El genotipo *GSTTI*⁻ es un biomarcador de riesgo para el desarrollo de leucemia

No se encontró relación entre los genes *GSTMI*⁻ y *GSTTI*⁻ en pacientes con LLA y LMA, con las recaídas post-tratamiento de inducción y eventos de toxicidad, sugiriendo que ambos genotipos nulos no deben ser considerados como un marcador de respuesta a fármacos

El análisis farmacogenético del polimorfismo en el gen *GSTP1* en los pacientes estudiados, refiere que el modelo de herencia recesivo es un biomarcador de riesgo para el desarrollo de leucemia

El estudio farmacogenético asociado a la respuesta a fármacos metabolizados por la enzima GSTP1, mostró diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos A/A y el polimorfismo A/G en pacientes con leucemia que presentaron recaídas post tratamiento de inducción (*p*-value: 0,047)

El gen *MTHFR* estudiado los pacientes de este estudio refiere que los polimorfismos 677 C/T y 1298 A/C no representan un factor de riesgo de susceptibilidad de padecer leucemia

El polimorfismo del gen *MTHFR* 1298 A/C no es considerado un biomarcador de pronóstico de evolución clínica y de respuesta al fármaco metotrexato en pacientes con LLA

El genotipo *MTHFR* 677 T/T mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al homocigoto wild type en pacientes con LLA que presentaron recaídas post-inducción (*p*-value: 0,004)

El haplotipo doble homocigoto *wild type* CC/AA en el gen *MTHFR* 677/1298 fue el mas frecuente en pacientes con LLA que se encuentran en

remisión completa (60%), sugiriendo una tendencia positiva que favorece el alcance de la remisión completa en la LLA cuando están presentes ambos genotipos

El polimorfismo *MTHFR* 677 no mostró asociación con la tasa de supervivencia global en pacientes con LLA

La presencia de al menos un alelo mutado C del polimorfismo *MTHFR* 1298 en los pacientes con LLA reveló una tasa de supervivencia global menor con respecto a aquellos con el genotipo *wild type* A/A.

La estimación de la supervivencia libre de evento no mostró asociación con respecto a los polimorfismos en el gen *MTHFR* 677 y 1298, tampoco se observaron diferencias significativas respecto a las medias de SLE entre los dos grupos de pacientes. Lo que indica que para estos, el genotipo no tiene influencia por sí solo en la tasa de supervivencia libre de evento

RECOMENDACIONES

- Se recomienda la continuación del estudio para aumentar la población de pacientes y su seguimiento
- Debido a que este es el primer trabajo realizado en Venezuela para asociar la supervivencia y la evolución clínica con la farmacogenética de los pacientes con LLA, se sugiere la continuación de trabajos de investigación en esta área, que incluyan otros polimorfismos que también puedan estar implicados en las fallas terapéuticas, no solo del metotrexato sino de los demás agentes químicos utilizados en la quimioterapia de estos pacientes
- Se sugiere la detección de los oncogenes y demás estudios genéticos al momento del diagnóstico de la enfermedad

VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McKenzie S. Hematología clínica. 2da edición. Moderno M, editor. México; 2000. 431-443 p.
2. Merino A. Clasificación de las leucemias agudas mieloides. *Rev del Lab Clin.* 2010;3(3):139–147.
3. Irons RD, Stillman WS. The process of leukemogenesis. *Environ Health Perspect.* 1996;104(SUPPL. 6):1239–46.
4. Reuter CW, Morgan MA, Bergmann L. Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood.* 2000;96(5):1655–1669.
5. Fernández-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer.* 2011 Mar;2(3):344–358.
6. Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel B, Dervite I, et al. P53 Mutations Are Associated With Resistance To Chemotherapy and Short Survival in Hematologic Malignancies. *Blood.* 1994;84(9):3148–57.
7. Cordone I, Masi S, Mauro FR, Soddu S, Morsilli O, Valentini T, et al. p53 Expression in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: A Marker of Disease Progression and Poor Prognosis. *Blood.* 1998;91(11):4342–9.
8. Peller S, Rotter V. TP53 in hematological cancer: low incidence of mutations with significant clinical relevance. *Hum Mutat.* 2003 Mar;21(3):277–84.
9. Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:269–96.
10. Tang Q, Li J, Zhang S, Yuan B, Sun H, Wu D, et al. GSTM1 and GSTT1 null polymorphisms and childhood acute leukemia risk: evidence from 26 case-control studies. *PLoS One.* 2013;8(10):e78810.
11. Wang H, Wang J, Zhao L, Liu X, Mi W. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of acute lymphoblastic leukemia-evidence from an updated meta-analysis including 35 studies. *BMC Med Genet.* 2012 Jan;13(1):77.
12. Fukushima H, Fukushima T, Sakai A, Suzuki R, Nakajima-yamaguchi R, Kobayashi C, et al. Polymorphisms of MTHFR Associated with Higher Relapse/Death Ratio and Delayed Weekly MTX Administration in Pediatric Lymphoid Malignancies. *Leukemia Research Treatment.* 2013;2013:328258
13. Capote Negrín, L. Resumen de las estadísticas de cáncer en el año 2012. *Revista Venezolana de Oncología.* 2015;(27)4:256-268.
14. Huang SR, Ratain MJ. Pharmacogenetics and Pharmacogenomics of anticancer agents. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(1):42–55.
15. Brockmöller J, Tzvetkov M V. Pharmacogenetics : data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008. 64;133–57.

16. Arrieta - Bolaños, E. Revisión Farmacogenética: hacia la individualización de la terapia farmacológica en Costa Rica. *Acta Médica Costaricense*. 2012; 54(4);207–16.
17. Soler J. Contribució del estudis immunocitoquímics i immunogenotípics al diagnòstic i classificació de les leucèmies agudes. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. 1989.
18. Rebollo A, Martínez C. Ras proteins: recent advances and new functions. *Blood*. 1999. Nov1;94(9):2971–80.
19. Rodríguez M, Cardona AF, Enciso L, Ruíz G, Yepes A, Ospina V, et al. Leucemia mieloide crónica en crisis blástica: bases moleculares y diagnóstico. *Rev Venez Oncol*. 2007;19(4):287–296.
20. MacKenzie KL, Dolnikov A, Millington M, Shounan Y, Symonds G. Mutant N-ras induces myeloproliferative disorders and apoptosis in bone marrow repopulated mice. *Blood*. 1999;93(6):2043–56.
21. J. Sans-Sabrafen, C. Besses Raebel JLVC. *Hematología Clínica*. 5ta edición. El Sevier, editor. 2006.
22. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451–8.
23. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 1985;103(3):460–2.
24. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Annals of Oncology*. 1999;10(12): 1419-1432.
25. Vardiman JW, Thiele J, Arber D, Brunning R, Borowitz M, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937–52.
26. Zweidler-McKay P, Hilden JM. The ABCs of infant leukemia. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2008 Mar;38(3):78–94.
27. Isaacs H. Fetal and neonatal leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003 May;25(5):348–61.
28. Stirewalt D, Kopecky K, Meshinchi S, Applebaum F, Slovak M, Willman C, Radich J. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001 Jun;97(11):3589–95.
29. Capote Negrín. L. Frecuencia del cáncer en Venezuela. *Fundación Badan*. 2008;3–6.
30. Guevara J.M, de Insausti C, de Lara D, Arends A. Leucemia linfoblástica aguda en niños. Evaluación del protocolo nacional 80 (P.N. 80). *Rev Fac Med*. 1988;1:58-64.

31. Fernández L, Rodríguez A, Barbella R, Lakatos M. Revisión anatomopatológica de leucemias meloide y linfoide crónicas en un Hospital General de Caracas. *Salus militiae*. 2001;26(2):10–17.
32. van Dongen JJ, Macintyre E a, Gabert J a, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999 Dec;13(12):1901–1928.
33. Paietta E. Assessing minimal residual disease (MRD) in leukemia: a changing definition and concept?. *Bone Marrow Transplant*. 2002;29:459–65.
34. Dongen JJM Van, Velden VHJ Van Der, Br M. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive , fast , and standardized technologies. *Blood*. 2015;125(26):3996–4010.
35. Goldman JM, Melo J V. Chronic Myeloid Leukemia — Advances in Biology and New Approaches to Treatment. *N Engl J Med*. 2003;349:1451–64.
36. Byun JM, Koh Y, Shin DY, Kim I, Yoon S, Lee J, et al. BCR-ABL translocation as a favorable prognostic factor in elderly acute lymphoblastic leukemia patients in potent tyrosine kinase era. *Haematologica*. 2017;102:xxx.
37. Hermans A, Heisterkamp N, von Linderm M, van Baal S, Meijer D, van der Plas D, et al. Unique Fusion of bcr and c-abl Genes in Philadelphia Chromosome Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cell*. 1987;51:33–40.
38. Artigas C, Melo A, Roa J, Roa I, Quijada I, Vittini C et al. Transcritos de fusión del gen BCR-ABL en pacientes con leucemia meloide crónica. *Int. J. Morphol.*. 2003;21(3):205-209.
39. Shah NP, Tran C, Lee, Francis, Chen P, Norris D, Sawyers C. Overriding Imatinib Resistance with a Novel ABL Kinase Inhibitor. *Science*. 2004;305:399–401.
40. Jabbour E, El Ahdab S, Cortes J, Kantarjian H. Nilotinib : a novel Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor for the treatment of leukemias. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008;17(7):1127–36
41. Zheng X, Oancea C, Henschler R, Moore M, Ruthardt M. Reciprocal t(9;22) ABL/BCR fusion proteins: leukemogenic potential and effects on B cell commitment. *PLoS One*. 2009 Jan;4(10):e7661.
42. Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(5):345–56.
43. Delage R, Soiffer R, Dear K, Ritz J. Clinical significance of bcr-abl gene rearrangement detected by polymerase chain reaction after allogeneic bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1991;78(10):2759-2767.

44. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood*. 1995;85(6):1416–34.
45. Alikian M, Whale AS, Akiki S, Piechocki K, Torrado C, Myint T, et al. RT-qPCR and RT-Digital PCR: A Comparison of Different Platforms for the Evaluation of Residual Disease in Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Chem*. 2017;63(2):525–31.
46. Zelent A, Greaves M, Enver T. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene*. 2004;23(24):4275–83.
47. Cayuela JM, Baruchel A, Orange C, Madani A, Auclerc MF, Daniel MT, et al. TEL-AML1 fusion RNA as a new target to detect minimal residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1996 Jul 1;88(1):302–8.
48. Harbott J, Viehmann S, Borkhardt a, Henze G, Lampert F. Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. *Blood*. 1997 Dec 15;90(12):4933–7.
49. Laurentiis A De, Hiscott J, Alcalay M. The TEL-AML1 fusion protein of acute lymphoblastic leukemia modulates IRF3 activity during early B-cell differentiation. *Oncogene*. 2015;34(49):2018–28
50. Imaizumi M, Suzuki H, Yoshinari M et al. Mutations in the E-Domain of RAR α Portion of the PML/RAR α Chimeric Gene May Confer Clinical Resistance to All- trans Retinoic Acid in Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood*. 1998;92(2):374–82.
51. Nguyen LA, Pandolfi PP, Aikawa Y, Tagata Y, Ohki M, Kitabayashi I. Physical and functional link of the leukemia-associated factors AML1 and PML. *Blood*. 2005;105(1):292–300.
52. Salomoni P, Pandolfi PP. The role of PML in tumor suppression. *Cell*. 2002 Jan 25;108(2):165–70.
53. Zhou G, Zhao W, Wang Z, Chen S, Chen Z. Retinoic Acid and Arsenic for Treating Acute Promyelocytic Leukemia. *PLoS Medicine*. 2005;2(1):e3-e12
54. Jurcic JG. Prognostic significance of minimal residual disease detection and PML/RAR-alpha isoform type: long-term follow-up in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2001 Nov 1;98(9):2651–6.
55. Biondi A, Rambaldi A, Pandolfi PP, Rossi V, Giudici G, Alcalay M, et al. Molecular monitoring of the myl/retinoic acid receptor-alpha fusion gene in acute promyelocytic leukemia by polymerase chain reaction. *Blood*. 1992 Jul 15;80(2):492–7.
56. Neubauer A, Dodge R, George S, Davey F, Silver R, Schiffer C, et al. Prognostic importance of mutations in the ras proto-oncogenes in de novo acute myeloid leukemia. *Blood*. 1994 Mar 15;83(6):1603–11.
57. Bowen D, Groves M, Burnett K, Patel Y, Allen C, Green C, et al. TP53 gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype, and is associated with very poor prognosis. *Leukemia*. 2009 Jan;23(1):203–6.

58. Crespo P, León J. Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell Mol Life Sci.* 2000 Oct;57(11):1613–36.
59. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007 Jul;7(7):295–308.
60. Bowen DT, Frew ME, Hills R, Gale RE, Wheatley K, Groves MJ, et al. RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood.* 2005 Sep 15;106(6):2113–9.
61. Miyauchi J, Asada M, Sasaki M, Tsunematsu Y, Kojima S, Mizutani S. Mutations of the N-ras gene in juvenile chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 1994;83(8):2248–54.
62. Bai L, Zhu W. p53 : Structure, Function and Therapeutic Applications. *J Cancer Mol.* 2006;2(4):141–53.
63. Rangel-López A, Piña-Sánchez P, Salcedo M. Variaciones genéticas del gen supresor de tumores TP53 : relevancia y estrategias de análisis. *Rev. invest. clín.* 2006 Jun;58(3):254–64.
64. Imamura J, Miyoshi I, Koefler HP. p53 in hematologic malignancies. *Blood.* 1994;84(8):2412–21.
65. Hollstein M, Hainaut P. Massively regulated genes : the example of TP53. *J Pathol.* 2010;220:164–73.
66. Lane DP, Benchimol S. P53: Oncogene or Anti-Oncogene? *Genes Dev.* 1990 Jan 1;4(1):1–8.
67. Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Nakao A, Patten N, Wu L, et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia.* 2009 Jan 23(1):117–24.
68. Mini E, Nobili S. Pharmacogenetics: implementing personalized medicine. *Clinical Cases in Mineral Bone Metabolism.* 2009 Jan;6(1):17–24.
69. Cheok MH, Pottier N, Kager L, Evans WE. Pharmacogenetics in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Seminars in Hematology.* 2009;46(1):39–51.
70. Aydin-Sayitogiu M, Hatirnaz O, Erensoy N, Ozbek U. Role of CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1, GSTT1, and GSTM1 genes in the susceptibility to acute leukemias. *Am J Hematol.* 2006;81(3):162–70.
71. Board PG, Webb GC, Coggan M. Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. *Annals of Human Genetics.* 1989;53:205–13.
72. Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology.* 1997;10(1):2–18.
73. Nebert DW, Vasiliou V. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Hum Genomics.* 2004;1(6):460–4.
74. Thom R, Cummins I, Dixon DP, Edwards R, Cole DJ, Laphorn AJ. Structure of a tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. *Biochemistry.* 2002;41(22):7008–20.

75. Dirr H, Reinemer P, Huber R. X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *European Journal of Biochemistry*. 1994;220:645–61.
76. Mannervik B, Awasthi YC, Broard PG, Hayes JD, Di Ilio C, Ketterer B, et al. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochemical Journal*. 1992;282:305–8.
77. Seidegård J, Pero RW, Markowitz MM, Roush G, Miller DG, Beattie EJ. Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class Mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study. *Carcinogenesis*. 1990 Jan;11(1):33–6.
78. Teixeira LDF, Quinhones Pires Lopes M, Suffys PN, Santos AR. Tuberculosis Pharmacogenetics: State of The Art. *Tuberculosis Current Issues Diagnosis and Management*. 2013;105–26.
79. Andonova IE, Sarueva RB, Horvath AD, Simeonov VA, Dimitrov PS, Petropoulos EA, et al. Balkan endemic nephropathy and genetic variants of glutathione S-transferases. *J Nephrol*. 2004;17:390–8.
80. Board PG, Coggan M, Wilce MC, Parker MW. Evidence for an essential serine residue in the active site of the Theta class glutathione transferases. *Biochem J*. 1995;311(Pt 1):247–50.
81. Bosch TM, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JHM. Genetic polymorphisms of drug-metabolising enzymes and drug transporters in the chemotherapeutic treatment of cancer. *Clinical Pharmacokinetics*. 2006;45(3):253–85.
82. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GCW, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*. 1997;18(4):641–4.
83. Ali-osman F, Akande O, Antoun G, Mao J, Buolamwini J. Molecular Cloning, Characterization, and Expression in *Escherichia coli* of Full-length cDNAs of Three Human Glutathione S-Transferase Pi Gene Variants. *J Biol Chem*. 1997;272(15):10004–10012.
84. Egan KM, Cai Q, Shu XO, Jin F, Zhu TL, Dai Q, et al. Genetic Polymorphisms in GSTM1, GSTP1, and GSTT1 and the Risk for Breast Cancer: Results from the Shanghai Breast Cancer Study and Meta-Analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(2):197–204.
85. Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85(14):1159–64.
86. Alves S, Amorim A, Ferreira F, Norton J, Prata MJ. The GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in children from north Portugal. *Leukemia*. 2002;16(8):1565-7.
87. Sweeney C, Nazar-Stewart V, Stapleton PL, Eaton DL, Vaughan TL. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and survival

- among lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12(6):527–33.
88. Davies SM, Robison LL, Buckley JD, Tjoa T, Woods WG, Radloff GA, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and outcome of chemotherapy in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2001;19(5):1279–87.
 89. Naoe T, Tagawa Y, Kiyoi H, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, et al. Prognostic significance of the null genotype of glutathione S-transferase-T1 in patients with acute myeloid leukemia: increased early death after chemotherapy. *Leukemia.* 2002;16(2):203-8.
 90. Aubard Y, Darodes N, Cantaloube M. Hyperhomocysteinemia and pregnancy--review of our present understanding and therapeutic implications. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000;93(2):157–65.
 91. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics.* 1995;10(1): 111-3.
 92. Guba SC, Fonseca V, Fink LM. Hyperhomocysteinemia and thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 1999;25(3):291–309.
 93. Bodó A, Bakos É, Szeri F, Váradi A, Sarkadi B. The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity. *Toxicology Letters.* 2003;140-151:133–43.
 94. Relton CL, Wilding CS, Pearce MS, Laffling AJ, Jonas PA, Lynch SA, et al. Gene-gene interaction in folate-related genes and risk of neural tube defects in a UK population. *J Med Genet.* 2004;41(4):256–60.
 95. Kaltsonoudis E, Papagoras C, Drosos A. Current and future role of methotrexate in the therapeutic armamentarium for rheumatoid arthritis. *Int J Clin Rheumatol.* 2012;7(2):179–89.
 96. Boyles AL, Hammock P, Speer MC. Candidate gene analysis in human neural tube defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2005;135C(1):9–23.
 97. Ranganathan P, Eisen S, Yokoyama WM, McLeod HL. Will pharmacogenetics allow better prediction of methotrexate toxicity and efficacy in patients with rheumatoid arthritis?. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2003;62(1):4–9.
 98. Van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink J a, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?. *Am J Hum Genet.* 1998 May;62(5):1044–51.
 99. Kapusta L, Haagmans ML, Steegers EA, Cuypers MH, Blom HJ, Eskes TK. Congenital heart defects and maternal derangement of homocysteine metabolism. *J Pediatr.* 1999;135(6):773–4.
 100. Kim SK, Jun JB, El-Sohemy A, Bae SC. Cost-effectiveness analysis of MTHFR polymorphism screening by polymerase chain reaction in Korean patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *J Rheumatol.* 2006;33(7):1266–74.
 101. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms

- and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. PNAS. 2001;98(7):4004–9.
102. Schwahn B, Rozen R. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences. Am J Pharmacogenomics. 2001;1(3):189–201.
 103. Arribalzaga E. Interpretación de las curvas de supervivencia. Rev Chil Cirugía. 2007; 59(1):75–83.
 104. Murgia D, Cordiés N, Cordiés R. Intervalo libre de enfermedad (ILE) en tumores malignos de partes blandas. Rev Cuba Oncol. 1997;13(2):76–83.
 105. Kleinbaum D, Klein M. Survival Analysis. 2da edición. New York: Springer; 2005
 106. Pita S. Análisis de supervivencia. Cad Aten Primaria. 1995; 2:130–5.
 107. Perera A, Navarro C, Landolfi C, Inaty J, Guevara J, *et al.* Resultados del tratamiento a largo plazo de 209 niños con leucemia linfoblástica aguda: experiencia de un grupo multicéntrico en Venezuela. Rev Oncol. 2003;5(8):450-7
 108. Organista J, Gómez Y, Illades B, Leyva M. Survival of Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. A: Mejía- Arangure. Clinical Epidemiology of Acute Lymphoblastic Leukemia – From the Molecules to the Clinic. Mexico: InTech; 2013. 237–63
 109. Ojha R, Gurney J. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and overall survival in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a systematic review. Leukemia & lymphoma. 2014; 55(1):67-73.
 110. Tantawy A El-bostany E, Adly A, El Asrar M, El-ghouroury E, Abdulghaffar E. Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphism in Egyptian children with acute lymphoblastic leukemia. Blood Coagul Fibrinolysis. 2010; 21(1): 28–34
 111. Radtke S, Zolk O, Renner B, Paulides M, Zimmermann M, Anja M, *et al.* Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2016; 121(26): 5145–54.
 112. Zaruma F, Lares I, Reyes A, Loera V, Almanza H, Arias M. Impacto de polimorfismos genéticos de la vía metabólica del Metotrexato sobre la sobrevida de niños mexicanos con leucemia linfoblástica aguda (LLA). Vitae. 2015; 22(3):177–87.
 113. Mongini, C. y Waldner, C. 1996. Metodología para la evaluación de las células mononucleares. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
 114. Welsh K, Bunce M. Molecular typing for the MHC with PCR-SSP. Rev Immunogenet. 1999;1(2):157–76.
 115. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988;16(3):1215.
 116. Chomczyński P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987;162(1):156–9.
 117. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature. 1970;226(5252):1211–3

118. Chng WJ, Price-Troska T, Gonzalez-Paz N, Van Wier S, Jacobus S, Blood E, et al. Clinical significance of TP53 mutation in myeloma. *Leukemia*. 2007;21(3):582–4.
119. Neri A, Knowles DM, Greco A, McCormick F, Dalla-Favera R. Analysis of RAS oncogene mutations in human lymphoid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Dec;85(23):9268–72.
120. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975;94(3):441–6.
121. Arand M, Mühlbauer R, Hengstler J, Jäger E, Fuchs J, Winkler L, et al. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Anal Biochem*. 1996 Apr 5;236(1):184–6.
122. Casson AG, Zheng Z, Porter GA, Guernsey DL. Genetic polymorphisms of microsomal epoxide hydroxylase and glutathione S-transferases M1, T1 and P1, interactions with smoking, and risk for esophageal (Barrett) adenocarcinoma. *Cancer Detect Prev*. 2006;30(5):423–31.
123. Stanulla M, Schrappe M, Brechlin a M, Zimmermann M, Welte K. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood*. 2000 Mar 15;95(4):1222–8.
124. Mosaad Y, Abousamra N, Elashery R, Fawzy I, Eldein O, Sherief D, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in a cohort of Egyptian children. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(9): 2699-705.
125. Chona Z, Inaty J, Montero E. Leucemia linfoblástica aguda: Evaluación clínico terapéutica del protocolo total XV modificado. Hospital Universitario de Caracas 2003- 2007. *Arch Venez Pueric Pediatr*. 2010;73(2):18–28.
126. Grupo cooperativo hemato - oncológico multidisciplinario pediátrico venezolano (G.H.O.M.P.V.). Estudio BFM-95 Modificado COG. Fundación Badan. 2006;agosto:1-40.
127. Landolfi C, Perera A, Navarro C, Marcano MG, González L et al. Resultados del Protocolo 2005 del Grupo Cooperativo Nacional para el Tratamiento de la Leucemia linfoblástica Aguda en Niños y Adolescentes. Sociedad Venezolana de Hematología. URL: [http://C:/Users/Usuario/Downloads/MH21%20-%20%20Protocolo%202005%20LLA%20\(1\).pdf](http://C:/Users/Usuario/Downloads/MH21%20-%20%20Protocolo%202005%20LLA%20(1).pdf).
128. Combariza JF, Casas C, Rodriguez M, Cardona A, Ospina E, Grajales M. Supervivencia en adultos con leucemia linfoide aguda de novo tratados con el esquema HyperCVAD en el Instituto Nacional de Cancerología (Colombia), entre enero de 2001 y junio de 2005. *Rev Colomb Cancerol*. 2007;11(2):92-100.
129. Graf T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood*. 2002;99(9):3089–3101.

130. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood*. 1995;85(6):1416–34.
131. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer Statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):9–29.
132. Capote Negrín L. Resumen de las Estadísticas de Cáncer en el año 2012. *Rev Venez Oncol*. 2015; 27(4): 256-68.
133. Fajardo-Gutiérrez A, Mejía-Aranguré JM, Hernández-Cruz L, Mendoza-Sánchez HF, Garduño-Espinosa J, Martínez-García MDC. Epidemiología descriptiva de las neoplasias malignas en niños. *Rev Panam Salud Pública*. 1999;6(5):75–88.
134. Insausti CL, Auxiliadora M, Alvarado S, Eugenia M, Vázquez N. Leucemia mieloide aguda : evaluación clínico terapéutica en niños del hospital universitario de Caracas. (Periodo1995-2004). *Archivos venezolanos de puericultura y pediatría*.2007;70(1):7–15.
135. Greenberg RS, Shuster JL. Epidemiology of cancer in children. *Epidemiol Rev*. 1985;7:22–48.
136. Kaatsch P. Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2010 Jun;36(4):277–85.
137. Amaru R, Torres G, Peñaloza R, Miguez H, Velarde J. Epidemiología de las leucemias en Bolivia : 1473 casos Enero 1999 a mayo de 2012. *Rev. Med, La Paz*. 2012;18(1):9–19.
138. Roco A, Squicciarini V, Miranda C, Sasso J, Agúndez J, Cáceres D, García E, Saavedra I, Quiñones L. Polimorfismos genéticos y su influencia en la efectividad del tratamiento quimioterapéutico de pacientes leucémicos. *Cuad. Méd Soc (Chile)*. 2010;50(4):288-95.
139. Rocha H, Martínez O, Guevara E, Lopera T. Epidemiología de las leucemias en la infancia y la adolescencia. *Acta Méd Colomb*. 1999;24(1):19–24.
140. Guo JQ, Lin H, Kantarjian H, Talpaz M, Champlin R, Andreeff M, et al. Comparison of competitive-nested PCR and real-time PCR in detecting BCR-ABL fusion transcripts in chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 2002 Dec;16(12):2447–53.
141. Guo JQ, Lin H, Kantarjian H, Talpaz M, Champlin R, Andreeff M, et al. Comparison of competitive-nested PCR and real-time PCR in detecting BCR-ABL fusion transcripts in chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 2002 Dec;16(12):2447–53.
142. Botero Garcés J H, Vásquez Palacio G, Muñetón C M, Aya Bonilla C A, Domingo Torres J, Muskus C E, Cuervo Sierra J, Artigas A et al. Frecuencia de los transcritos p190BCR-ABL y p210BCR-ABL en una población colombiana con leucemia mieloide crónica (LMC) usando RT-PCR cualitativa. *Iatreia*. 2014;27(4):398-409.
143. Branford S, Cross NCP, Hochhaus A, Radich J, Saglio G, Kaeda J, et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2006;20:1925–30.
144. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and

- residual disease detection in leukemic patients using “real-time” quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)- a Europe against cancer program. *Leukemia*. 2003;17(12):2474–86.
145. Carreño F. Pacientes venezolanos con Leucemia Mieloide Crónica. Tesis Doctoral. Universidad Simón Bolívar, Caracas. 2008.
 146. Cilloni D, Saglio G. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clin Cancer Res*. 2012;18(4):930–7.
 147. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, Rudzki Z, Hochhaus A, Hensley ML, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 2003;349:1423-1432.
 148. Hochhaus A, O’Brien SG, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Foroni L, et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009;23(6):1054–61.
 149. Druker BJ, Guilhot F, Stephen G, Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006;355(23):2408–17.
 150. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122(6):872–84.
 151. Mian AA, Metodieva A, Badura S, Khateb M, Ruimi N, Najajreh Y, et al. Allosteric inhibition enhances the efficacy of ABL kinase inhibitors to target unmutated BCR-ABL and BCR-ABL-T315I. *BMC Cancer*. 2012;12:411.
 152. Rosas-Cabral A, Martínez-Mancilla M, Ayala-Sánchez M, Vela-Ojeda J, Bahena-Reséndiz P, Vadillo-Buenfil M, et al. Análisis del Tipo de Transcrito bcr-abl y su Relación con la Cuenta Plaquetaria en Pacientes Mexicanos con Leucemia Mieloide Crónica. *Gac Méd Méx*. 2003;139(6):553–9.
 153. Ohsaka A, Shiina S, Kobayashi M, Kudo H, Kawaguchi R. Philadelphia chromosome-positive Chronic Myeloid. *Intern Med*. 2002;41(12):1183–7.
 154. Arana-Trejo RM, Ruíz Sánchez E, Ignacio-Ibarra G, De La Báez Fuente E, Garces O, Gómez Morales E, et al. BCR/ABL p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukaemia (CML). *Clin Lab Haematol*. 2002;24(3):145–50.
 155. Cañizales J. Transcritos del gen BCR-ABL en pacientes con leucemia mieloide crónica en Venezuela. Tesis de Magister Scientiarum. Universidad del Zulia, Maracaibo. 2012.
 156. Casanueva-Calero K, Pantaleón-Florido G, Ruiz-Noa Y, Mato-Luis J, Quesada-Dorta M, Carnot-Uria J. Estudio del reordenamiento molecular BCR-ABL en pacientes cubanos con diagnóstico presuntivo de leucemia mieloide crónica. *Rev Hematol Mex*. 2011;12(4):243–8.
 157. Goh HG, Hwang JY, Kim SH, Lee YH, Kim YL, Kim DW. Comprehensive analysis of BCR-ABL transcript types in Korean CML

- patients using a newly developed multiplex RT-PCR. *Transl Res.* 2006;148(5):249–56.
158. Hochhaus a, Weisser a, La Rosée P, Emig M, Müller MC, Saussele S, et al. Detection and quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia.* 2000 Jun;14(6):998–1005.
159. Bennour A, Ouahchi I, Achour B, Zaier M, Youssef Y Ben, Khelif A, et al. Analysis of the clinico-hematological relevance of the breakpoint location within M-BCR in chronic myeloid leukemia. *Med Oncol.* 2013;30:348-353.
160. Jaubert J, Martiat P, Dowding C, Ifrah N, Goldman JM. The position of the M-BCR breakpoint does not predict the duration of chronic phase or survival in chronic myeloid leukemia. *Br J Haematol.* 1990;74(1):30–5.
161. Zaccaria A, Martinelli G, Buzzi M, Zuffa E, Zamagni MD, Testoni N, et al. M-BCR breakpoint location does not predict survival in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Haematologica.* 1992;77(1):16–20.
162. Fioretos T, Nilsson PG, Aman P, Heim S, Kristoffersson U, Malm C, et al. Clinical impact of breakpoint position within M-bcr in chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 1993;7(8):1225–1231.
163. Perrotti D, Calabretta B. Translational regulation by the p210 BCR/ABL oncoprotein. *Oncogene.* 2004;23:3222–9.
164. Hotfilder M, Röttgers S, Rosemann A, Schrauder A, Schrappe M, Pieters R, et al. Leukemic stem cells in childhood high-risk ALL/t(9;22) and t(4;11) are present in primitive lymphoid-restricted CD34+CD19- cells. *Cancer Res.* 2005;65(4):1442–9.
165. Jones LK, Saha V. Philadelphia positive acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *Br J Haematol.* 2005;130(4):489–500.
166. Maurer J, Janssen JW, Thiel E, van Denderen J, Ludwig WD, Aydemir U, et al. Detection of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukaemia by the polymerase chain reaction. *Lancet.* 1991;337(8749):1055-1058.
167. Mitterbauer G, Nemeth P, Wacha S, Cross NC, Schwarzinger I, Jaeger U, et al. Quantification of minimal residual disease in patients with BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukaemia using quantitative competitive polymerase chain reaction. *Br J Haematol.* 1999;106(3):634–43.
168. Soverini S, Vitale A, Poerio A, Gnani A, Colarossi S, Iacobucci I, et al. Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia patients already harbor BCR-ABL kinase domain mutations at low levels at the time of diagnosis. *Haematologica.* 2011;96(4):552–7.
169. Ribera J, Tormo M, Ortega J. Leucemia linfoblástica aguda en adolescentes y adultos jóvenes. *Med Clín.* 2007;129(Supl 1):36–9.
170. Secker-Walker LM, Craig JM, Hawkins JM, Hoffbrand A V. Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia in adults: age distribution, BCR breakpoint and prognostic significance. *Leukemia.* 1991;5(3):196–9.

171. Kantarjian HM, Talpaz M, Dhingra K, Estey E, Keating MJ, Ku S et al. Significance of the p210 versus p190 molecular abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute. *Blood*. 1991;78:2411–8.
172. Lussana F, Intermesoli T, Gianni A, Boschini C, Masciulli A et al. Achieving molecular remission before allogeneic stem cell transplantation in adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: impact on relapse and long-term outcome. *Biol blood marrow Transplant*. 2016;22(11):1983–7.
173. Hughes T, Branford S. Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. *Blood Review*. 2006;20(1):29–41.
174. Ong FS, Das K, Wang J, Vakil H, Kuo JZ, Blackwell B, et al. Personalized medicine and pharmacogenetic biomarkers: progress in molecular oncology testing. *Expert Rev Mol Diagn*. 2012;12(6):593–602.
175. Brunetti C, Anelli L, Zagaria A, Minervini A, Casieri P, Coccaro N, et al. Droplet digital PCR is a reliable tool for monitoring minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia. *J Mol Diagnostic*. 2017;19(3):437–44.
176. De Salvo L, Weir J, Gómez O, de Baena ES, de Ramos BU, Guevara J, et al. Acute promyelocytic leukemia in the west of Venezuela. *Sangre (Barc)*. 1989;34(5):329–31.
177. Douer D, Preston S, Chang E, Nichols P, Watkins K, Levine A. High frequency of acute promyelocytic leukemia among Latinos with acute myeloid leukemia. *Blood*. 1996;87(1):308–13.
178. Rego EM, Jácomo RH. Epidemiology and treatment of acute promyelocytic leukemia in latin america. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2011;3(1):e2011049.
179. Roldán MT, Hernandez P, Guerchicoff E, Martínez G, Ballester J. Frecuencia de la leucemia promielocítica en Cuba. *Rev Cubana Hematol Inmunol y Hemoter*. 2001;17(1):49–54.
180. Carmen Castro-Mujica M, Sullcahuamán-Allende Y. Subtipos moleculares de PML/RAR α en pacientes con leucemia promielocítica aguda. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2013;30(1):37–40.
181. Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Reyes-Núñez V, Gómez-Rangel JD, Ruiz-Delgado GJ. More on geographic hematology: the breakpoint cluster regions of the PML/RAR α fusion gene in Mexican Mestizo patients with promyelocytic leukemia are different from those in Caucasians. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(7):1365–8.
182. Dong S, Geng JP, Tong JH, Wu Y, Cai JR, Sun GL, et al. Breakpoint clusters of the PML gene in acute promyelocytic leukemia: primary structure of the reciprocal products of the PML-RARA gene in a patient with t(15;17). *Genes Chromosomes Cancer*. 1993;6(3):133–9.
183. Sazawal S, Hasan SK, Dutta P, Kumar B, Kumar R, Kumar L, et al. Over-representation of bcr3 subtype of PML/RAR α fusion gene in APL in Indian patients. *Ann Hematol*. 2005;84(12):781–4.

184. Artigas C, Cabrera M, Melo A, et al. Frecuencia de los genes de fusión TEL/AML1 y BCR/ABL en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. *Rev Méd Chile*. 2006;134(11):1367–76.
185. Endo C, Oda M, Nishiuchi R, Seino Y. Persistence of TEL-AML1 transcript in acute lymphoblastic leukemia in long-term remission. *Pediatr Int*. 2003;45(3):275–80.
186. Uckun FM, Pallisgaard N, Hokland P, Navara C, Narla R, Gaynon PS, et al. Expression of TEL-AML1 Fusion Transcripts and Response to Induction Therapy in Standard Risk Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2001;42(1-2):41–56.
187. Hann I, Vora A, Harrison G et al. Determinants of outcome after intensified therapy of childhood lymphoblastic leukaemia: results from Medical Research Council United Kingdom acute lymphoblastic. *British Journal of Haematology*. 2001;113(1):103–14.
188. Park KU, She CJ, Shin HY, Ahn HS, Kim CJ, Cho BK, et al. Low incidence of TEL/AML1 fusion and TEL deletion in Korean childhood acute leukemia by extra-signal fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenetics*. 2001;126(1):73–7.
189. García-Sanz R, Alaejos I, Orfao A, Rasillo A, et al. Low frequency of the TEL / AML1 fusion gene in acute lymphoblastic leukaemia in Spain. *British Journal of Haematology*. 1999;107(3):667–669.
190. Cayuela JM, Baruchel A, Orange C, Madani A, Auclerc MF, Daniel MT, et al. TEL-AML1 fusion RNA as a new target to detect minimal residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1996;88(1):302–8.
191. Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, Rubnitz JE, Raimondi SC, Hancock ML, et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*. 1995;9(12):1985–9.
192. Magalhães IQ, Pombo-De-Oliveira MS, Bennett CA, Cordoba JC, Dobbin J, Ford AM, et al. TEL-AML1 fusion gene frequency in paediatric acute lymphoblastic leukaemia in Brazil. *Br J Haematol*. 2000;111(1):204–7.
193. Cayado N, Muñoz A, Gonzalez A, Svarch E, Martinez G. Estudio Del Reordenamiento Molecular De Los Genes TEL/AML1 en la leucemia linfocítica aguda. Resultados preliminares. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2000;16(3):206–10.
194. Mosad E, Hamed HB, Bakry RM, Ezz-Eldin AM, Khalifa NM. Persistence of TEL-AML1 fusion gene as minimal residual disease has no additive prognostic value in CD 10 positive B-acute lymphoblastic leukemia: a FISH study. *J Hematol Oncol*. 2008;1:17.
195. Rubnitz JE, Behm FG, Wichlan D, Ryan C, Sandlund JT, Ribeiro RC, et al. Low frequency of TEL-AML1 in relapsed acute lymphoblastic leukemia supports a favorable prognosis for this genetic subgroup. *Leukemia*. 1999;13(1):19–21.
196. Loh ML, Silverman LB, Young ML, Neuberg D, Golub TR, Sallan SE, et al. Incidence of TEL/AML1 fusion in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1998;92(12):4792-4797.

197. Zhang J et al.. Detection of concurrent TEL-AML1/TEL-ABL fusion genes in a patient with B-acute lymphoblastic leukemia using a multi-fusion gene qRT-PCR screening method. *Pathol Int.* 2016;66(8):475–7
198. Krypuy M, Ahmed AA, Etemadmoghadam D, Hyland SJ, DeFazio A, Fox SB, et al. High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5-8. *BMC Cancer.* 2007;7:168.
199. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian S V., Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: Lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat.* 2007;28(6):622–9.
200. Robles AI, Harris CC. Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2010;2(3):a001016.
201. Cheung KJ, Horsman DE, Gascoyne RD. The significance of TP53 in lymphoid malignancies: Mutation prevalence, regulation, prognostic impact and potential as a therapeutic target. *British Journal of Haematology.* 2009;156(3):257-69.
202. Tessoulin B, Eveillard M, Lok A, Chiron D, Moreau P, Amiot M, et al. p53 dysregulation in B-cell malignancies : More than a single gene in the pathway to hell. *Blood Rev.* 2017;31(4):251-259.
203. Hof J, Krentz S, van Schewick C, Körner G, Shalapour S, Rhein P, et al. Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2011;29(23):3185–93.
204. Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, Smardova J, Benner A, Soussi T, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia.* 2010;24(12):2072–9.
205. Jaber S, Toufektchan E, Lejour V, Bardot B, Toledo F. p53 downregulates the Fanconi anaemia DNA repair pathway. *Nature Communications.* 2016;7. Número de artículo 11091.
206. Guevara Iribarren, J. M; Velazquez de Lara, D; Arends Merino, A; Hernandez, P. Anemia de Fanconi: reporte de seis casos, encontrándose tres en una familia. *Arch. venez. pueric. Pediatr.* 1984; 47(1/2):44-8.
207. Melo MB, Ahmad NN, Lima CSP, Pagnano KBB, Bordin S, Lorand-Metze I, et al. Mutations in the p53 gene in acute myeloid leukemia patients correlate with poor prognosis. *Hematology.* 2002;7(1):13–9.
208. de Moura Gallo CV, Azevedo E Silva Mendonça G, de Moraes E, Olivier M, Hainaut P. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. *Mutat Res.* 2005;589(3):192–207.
209. Cabelguenne BA, Blons H, de Waziers I, Carmot F, Houllier A, Soussi T, Brasnu D, Beaune P, Laccourreye O, et al. P53 Alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and Squamous Cell Carcinoma: A Prospective Series. *Journal of Clinical Oncology.* 2000;18(7):1465-1473

210. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer*. 2011;2(4):466–74.
211. Zhou M, Gu L, Yeager AM, Findley HW. Sensitivity to Fas-mediated apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with a mutant p53 phenotype and absence of Bcl-2 expression. *Leukemia*. 1998;12(11):1756–63.
212. König EA, Köves I, Raşinariu A, Popp AR, Kusser WC, Soyonki K, Kovács A, Glickman BW, Jeney A, Marcsek ZL. Alterations of K-ras and p53 mutations in colorectal cancer patients in Central Europe. *J Toxicol Environ Health A*. 2001 Mar 9;62(5):333-47.
213. Ibrahim SO, Vasstrand EN, Johannessen AC, Idris AM, Magnusson B, Nilsen R, et al. Mutations of the p53 gene in oral squamous-cell carcinoma from sudanese dippers of nitrosamine-rich toombak and non-snuff-dippers from the Sudan and Scandinavia. *Int J Cancer*. 1999;81(4):527–34.
214. Strauss BS. Silent and multiple mutations in p53 and the question of the hypermutability of tumors. *Carcinogenesis*. 1997;18(8):1445–52.
215. Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 1995;85(5):1580–9.
216. Cheung K, Horsman DE, Gascoyne RD. The significance of TP53 in lymphoid malignancies: mutation prevalence, regulation, prognostic impact and potential as a therapeutic target. *Br J Haematol*. 2009 Aug;146(3):257–69.
217. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Dohner H et al. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia*. 2002;16(6):993–1007.
218. Malcikova J, Pavlova S, Kozubik KS, Pospisilova S. TP53 mutation analysis in clinical practice: lessons from chronic lymphocytic leukemia. *Hum Mutat*. 2014;35(6):663–71.
219. National Center for Biotechnology Information. Bethesda MA, USA. dbSNP Short Genetic Variations Cluster Report rs1625895. Disponible en:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1625895.
220. Bravo-urquiola M, González M, Montilla S, Chacín M, Velásquez D, García G, Arends A. Significación de los haplotipos del gen de Beta globina en el origen de las hemoglobinopatías en Venezuela. *Interciencia*. 2012;37(8):572–6.
221. Voropaeva EN, Voevoda MI, Pospelova TI, Maksimov VN. Linkage disequilibrium and haplotypes of rs1042522, rs1625895 and rs17878362 gene TP53 markers in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Mol Biol (Mosk)*. 2014;48(5):763–70.
222. Bilous N, Abramenko I, Saenko V, Chumak A, Dyagil I, Martina Z, et al. Clinical relevance of TP53 polymorphic genetic variations in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2017; Jul;58:1-8.

223. National Center for Biotechnology Information. dbSNP Short Genetic Variation rs12947788. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ss.cgi?subsnp_id=48297304.
224. Gomes CC, Diniz MG, Orsine LA, Duarte AP, Fonseca-Silva T, Conn BI, et al. Assessment of TP53 mutations in benign and malignant salivary gland neoplasms. *PLoS One*. 2012;7(7):e41261.
225. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Jan;2(1):a001008.
226. Peller S, Kopilova Y, Slutzki S, Halevy A, Kvitko K, Rotter V. A novel polymorphism in intron 6 of the human p53 gene: a possible association with cancer predisposition and susceptibility. *DNA Cell Biol*. 1995;14(12):983–90.
227. Avigad S, Barel D, Blau O, Malka A, Zoldan M, Mor C, et al. A novel germ line p53 mutation in intron 6 in diverse childhood malignancies. *Oncogene*. 1997;14(13):1541–5.
228. Graf J, Merk B, Maurer U, Müller E, Bergmann L. Identification of novel polymorphisms in intron 7 of the human p53 gene in acute myeloid leukemia and healthy donors. *Leuk Lymphoma*. 2001;41(5-6):655–8.
229. Lin HY, Huang CH, Wu WJ, Chang LC, Lung FW. TP53 codon 72 gene polymorphism paradox in associated with various carcinoma incidences, invasiveness and chemotherapy responses. *Int J Biomed Sci*. 2008;4(4):248–54.
230. Bos JL. Ras Oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Research*. 1989;49(17):4682–9.
231. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D, et al. COSMIC: Mining complete cancer genomes in the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(Database issue):D945-D950.
232. Hirsch-Ginsberg C, LeMaistre AC, Kantarjian H, Talpaz M, Cork A, Freireich EJ, et al. RAS mutations are rare events in Philadelphia chromosome-negative/bcr gene rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia, but are prevalent in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 1990;76(6):1214–9.
233. Biankin A V., Waddell N, Kassahn KS, Gingras M-C, Muthuswamy LB, Johns AL, et al. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*. 2012;491:399-405
234. Kiaris H, Spandidos DA. Mutations of ras genes in human tumors (Review). *Int J Oncol*. 1995;7(13):413–21.
235. Bos JL, Verlaan-de Vries M, van der Eb AJ, Janssen JW, Delwel R, Löwenberg B, et al. Mutations in N-ras predominate in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1987 Apr;69(4):1237–41.
236. Mastromatteo L, Correnti M, Cavazza M, Perrone M, Tombazzi C, Ruiz M. Evaluación de las mutaciones del oncogen K-ras 12 en pacientes venezolanos infectados con *Helicobacter pylory*. *Invest Clín*. 2005;46(4):337-345.

237. Estrada P, Rojas-Atencio A, Zabala W, Borjas L, Soca L, Urdaneta K, et al. Frecuencia y asociación clínicopatológico de las mutaciones del oncogen K-ras en pacientes venezolanos con cáncer colorectal. *Invest Clín.* 2009;50(1):55–63.
238. Basu T, Gale RE, Langabeer S, Linch DC. Glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1) gene defect in myelodysplasia and acute myeloid leukaemia. *Lancet.* 1997;349(9063):1450.
239. He HR, Zhang XX, Sun JY, Hu S, Ma Y, Dong Y, et al. Glutathione S-transferase gene polymorphisms and susceptibility to chronic myeloid leukemia. *Tumour Biol.* 2014;35(6):6119–25.
240. Sinnett D, Krajcinovic M, Labuda D. Genetic Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2000;38(5-6):447–62.
241. Gao L-B, Pan X-M, Li L-J, Liang W-B, Bai P, Rao L, et al. Null genotypes of GSTM1 and GSTT1 contribute to risk of cervical neoplasia: an evidence-based meta-analysis. *PLoS One.* 2011 Jan;6(5):e20157.
242. Bolufer P, Barragan E, Collado M, Cervera J, López J-A, Sanz M a. Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression. *Leuk Res.* 2006 Dec;30(12):1471–91.
243. Karathanasis N, Choumerianou D, Kalmanti M. Gene Polymorphisms in Childhood ALL. *Pediatric Blood & Cancer.* 2008;52(3):318–23.
244. Vijayakrishnan J, Houlston RS. Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Haematologica.* 2010 Aug;95(8):1405–14.
245. Zintzaras E. Glutathione S-transferase M1 and T1 genes and susceptibility to chronic myeloid leukemia: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2009;13(6):791–7.
246. Das P, Shaik AP, Bammidi VK. Meta-analysis study of glutathione-s-transferases (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) gene polymorphisms and risk of acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2009;50(8):1345–51.
247. Larralde ÁR, Guerra DC De, Coira MG, Morales J. Frecuencia génica y porcentaje de mezcla en diferentes áreas geográficas de Venezuela, de acuerdo a los grupos RH y ABO. *Interciencia.* 2001;26(1):8-15.
248. Chen CL, Liu Q, Pui CH, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro R, et al. Higher frequency of glutathione S-transferase deletions in black children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1997;89(5):1701–7.
249. Balta G, Yuksek N, Ozyurek E, Ertem U, Hicsonmez G, Altay C, et al. Characterization of MTHFR, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes in childhood acute leukemia. *Am J Hematol.* 2003 Jul;73(3):154–60.
250. Canalle R, Burim RV, Tone LG, Takahashi CS. Genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Environ Mol Mutagen.* 2004 Jan;43(2):100–9.
251. Davies SM, Bhatia S, Ross J a, Kiffmeyer WR, Gaynon PS, Radloff GA, et al. Glutathione S-transferase genotypes, genetic susceptibility,

- and outcome of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002 Jul 1;100(1):67–71.
252. Zhou L, Zhu YY, Zhang XD, Li Y, Liu ZG. Risk effects of GST gene polymorphisms in patients with acute myeloid leukemia: a prospective study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013 Jan;14(6):3861–4.
253. D'Alo F, Voso MT, Guidi F, Massini G, Scardocci A, Sica S, et al. Polymorphisms of CYP1A1 and glutathione S-transferase and susceptibility to adult acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2004;89(6):664–70.
254. Bajpai P, Tripathi AK, Agrawal D. Increased frequencies of glutathione-S-transferase (GSTM1 and GSTT1) null genotypes in Indian patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2007;31(10):1359–63.
255. Arruda VR, Lima CS, Crignoli CR, de Melo MB, et al. Increased risk for acute myeloid leukaemia in individuals with glutathione S – transferase mu 1 (GSTM1) and theta 1 (GSTT1) gene defects. *Eur J Haematol*. 2001;66(6):383–8.
256. Rollinson S, Roddam P, Kane E, Roman E, Cartwright R, Jack A, et al. Polymorphic variation within the glutathione S -transferase genes and risk of adult acute leukaemia. *Carcinogenesis*. 2000;21(1):43–7.
257. Yuille M, Condie A, Hudson C, Kote-jarai Z, Stone E, Eeles R, et al. Relationship between glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99(11):4216–8.
258. Dunna NR, Vure S, Sailaja K, Surekha D, Raghunadharao D, Rajappa S, et al. Deletion of GSTM1 and T1 genes as a risk factor for development of acute leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(4):2221–4.
259. Voso MT, D'Alo' F, Putzulu R, Mele L, Scardocci A, Chiusolo P, et al. Negative prognostic value of glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) deletions in adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2002;100(8):2703–7.
260. Özten N, Sunguroğlu A, Bosland MC. Variations in glutathione-S-transferase genes influence risk of chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol*. 2012 Sep;30(3):150–5.
261. Frye RF, Fitzgerald SM, Lagattuta TF, Hruska MW, Egorin MJ. Effect of St John's wort on imatinib mesylate pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*. 2004;76(4):323–9.
262. Zareifar S, Monabati A, Saeed A, Fakhraee F, Cohan N. The association of glutathione S-transferase gene mutations (including GSTT1 and GSTM1) with the prognostic factors and relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2013;30(6):568–73.
263. Franca R, Rebora P, Basso G, Biondi A, Cazzaniga G, Crovella S, et al. Glutathione S-transferase homozygous deletions and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: a novel study design in a large Italian AIEOP cohort. *Pharmacogenomics*. 2012;13(16):1905–16.

264. Tsvirenko S V, Tsauro GA. Genetic polymorphism of glutathione-S-transferase M1 and T1 in children with acute lymphoblastic leukemia. *Klin Lab Diagn.* 2006;23-4, 33-4.
265. Kishi S, Cheng C, French D, Pei D, Das S, Cook EH, et al. Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood.* 2007;109(10):4151-7.
266. Imanishi H, Okamura N, Yagi M, Noro Y, Moriya Y, Nakamura T, et al. Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. *J Hum Genet.* 2007;52(2):166-71.
267. Mossallam GI, Abdel Hamid TM, Samra M. Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in adult acute myeloid leukemia; its impact on toxicity and response to chemotherapy. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2006;18(3):264-73.
268. Zimniak P, Nanduri B, Piłkuła S, Bandorowicz-Piłkuła J, Singhal SS, Srivastava SK, et al. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem.* 1994;224(3):893-9.
269. Pandya U, Srivastava SK, Singhal SS, Pal A, Awasthi S, Zimniak P, et al. Activity of allelic variants of Pi class human glutathione S-transferase toward chlorambucil. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;278(1):258-62.
270. Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: Relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis.* 1998;19(2):275-80.
271. Weich N, Nuñez MC, Galimberti G, Elena G, Acevedo S, Larripa I, et al. GSTP1 genes in childhood acute leukemias: A preliminary study in Argentina. *Hematology.* 2015;20(9):511-6.
272. Krajcinovic M, Labuda D, Mathonnet G, Labuda M, Moghrabi A, Champagne J, et al. Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2002;8(3):802-10.
273. Gatedee J, Pakakassama S, Muangman S, Pongstaporn W. Glutathione S-transferase P1 genotypes, genetic susceptibility and outcome of therapy in Thai childhood acute lymphoblastic leukemia. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2007;8(2):294-6.
274. Allan JM, Wild CP, Rollinson S, Willett E V, Moorman A V, Dovey GJ, et al. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(20):11592-7.
275. Leonardi DB, Abbate M, Riccheri MC, Nuñez M, Alfonso G, Gueron G, et al. Improving risk stratification of patients with childhood acute lymphoblastic leukemia: Glutathione-S-Transferases polymorphisms are associated with increased risk of relapse. *Oncotarget.* 2016;8(1):110-117.

276. Nathan O. Hematology of infancy and childhood. 5a. Sanders E, editor. USA; 1998. 1147-1182.
277. Matthews RG, Vanoni MA, Hainfeld JF, Wall J. Methylenetetrahydrofolate reductase. Evidence for spatially distinct subunit domains obtained by scanning transmission electron microscopy and limited proteolysis. *J Biol Chem.* 1984;259(19):11647–50.
278. Shan X, Wang L, Hoffmaster R, Kruger WD. Functional characterization of human methylenetetrahydrofolate reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 1999;274(46):32613–8.
279. Atashrazm F, Zaker F, Aghaeipour M, Pazhakh V. Polymorphisms of the Methylene Tetrahydrofolate Reductase and Susceptibility to Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *Lab Med.* 2011;42(5):275–9.
280. Lordelo GS, Miranda-Vilela AL, Akimoto AK, Alves PCZ, Hiragi CO, Nonino A., et al. Association between methylene tetrahydrofolate reductase and glutathione S-transferase M1 gene polymorphisms and chronic myeloid leukemia in a Brazilian population. *Genet Mol Res.* 2012;11(2):1013–26.
281. Gutiérrez-Álvarez O, Lares-Asseff I, Galaviz-Hernández C, Reyes-Espinoza EA, Almanza-Reyes H, Sosa-Macías M, et al. Involvement of MTHFR and TPMT genes in susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) in Mexicans. *Drug Metab Pers Ther.* 2016;31(1):41–6.
282. Mosaad YM, Abousamra NK, Elashery R, Fawzy IM, Eldein OA, Sherief DM, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in a cohort of Egyptian children. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(9):2699–705.
283. Nikbakht M, MalekZadeh K, Kumar Jha A, Askari M, Marwaha RK, Kaul D, et al. Polymorphisms of MTHFR and MTR genes are not related to susceptibility to childhood all in North India. *Exp Oncol.* 2012;34(1):43–8.
284. Lien SA, Young L, Gau B, Shiao SPK. Meta-prediction of MTHFR gene polymorphism-mutations, air pollution, and risks of leukemia among world populations. *Oncotarget.* 2017;8(3):4387-4398.
285. Xia X, Duan Y, Cui J, Jiang J, Lin L, Peng X, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene–gene interaction and haplotype with susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Chinese children. *Leuk Lymphoma.* 2017;58(8):1887-1892.
286. Li X, Liao Q, Zhang S, Chen M. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms with the susceptibility of childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL) in Chinese population. *European Journal of Medical Research.* 2014;19(5):1-5.
287. Qin Y-T, Zhang Y, Wu F, Su Y, Lu G-N, Wang R-S. Association between MTHFR polymorphisms and acute myeloid leukemia risk: a Meta-Analysis. *PLoS One.* 2014;9(2):e88823.

288. Vahid P, Farnaz R, Zaker F, Farzaneh a., Parisa R. Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms and Risk of Myeloid Leukemia. *Lab Med*. 2010;41(8):490–494.
289. Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright R a., et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96(22):12810–12815.
290. Moon H, Kim T, Oh BR, Min H, Cho H, Bang S, et al. MTHFR 677CC/1298CC genotypes are highly associated with chronic myelogenous leukemia: a case-control study in Korea. *Leuk Res*. 2007;31(9):1213–1217.
291. Banescu C, Iancu M, Trifa AP, Macarie I, Dima D, Dobreanu M. The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677 C>T polymorphism increases the risk of developing chronic myeloid leukemia: a case-control study. *Tumor Biol*. 2015;36(4):3101–3107.
292. Ongaro A, De Mattei M, Della Porta MG, Rigolin G, Ambrosio C, et al. Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia : effects on methotrexate-related toxicity and survival. *Haematologica*. 2009;94(10):1391–1398.
293. Mei L, Ontiveros EP, Griffiths EA, Thompson JE, Wang ES, Wetsler M. Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy. *Blood Rev*. 2015;29(4):243-9.
294. Bahari G, Hashemi M, Naderi M, Taheri M. Association between Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) gene polymorphisms increased the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in an Iranian population. *Int J Hematol Oncol Stem Cells Res*. 2016;10(3):130-137.
295. Tong N, Sheng X, Wang M, Fang Y, Shi D, Zhang Z, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia risk: a meta-analysis based on 28 case-control studies. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(10):1949–1960.
296. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(7):4004–4009.
297. Schnakenberg E, Mehles A, Cario G, Rehe K, Seidemann K, Schlegelberger B, et al. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and susceptibility to pediatric acute lymphoblastic leukemia in a German study population. *BMC Med Genet*. 2005;6:23.
298. Jakovljevic K, Malisic E, Cavic M, S R, Jankovic R. Association between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and risk of chronic myeloid leukemia in Serbian population. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(7):1327–30.
299. Candelaria M, Taja-Chayeb L, Vidal-Millán S, Gutiérrez O, Serrano-Olvera A, Arce-Salinas C, Dueñas-González A. Importancia de la Determinación de Variantes Genéticas que Influyen en la Eficacia y Toxicidad Farmacológica en Oncología. *Cancerología*. 2006;1:57-70.

300. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab.* 1998;64(3):169–72.
301. Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, Ben-Yehuda A, Selhub J, Babaey S, et al. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr.* 1999;129(9):1656–1661.
302. Krajinovic M, Lamothe S, Labuda D, Lemieux-Blanchard E, Theoret Y, Moghrabi A, et al. Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2004;103(1):252–7.
303. Costea I, Moghrabi A, Laverdiere C, Graziani A, Krajinovic M. Folate cycle gene variants and chemotherapy toxicity in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2006;91(8):1113–6.
304. Shimasaki N, Mori T, Torii C, Sato R, Shimada H, Tanigawara Y, et al. Influence of MTHFR and RFC1 polymorphisms on toxicities during maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia or lymphoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2008;30(5):347–352.
305. Kaluzna E, Strauss E, Zajac-Spychala O, Gowin E, Swiatek-Koscielna B, Nowak J, et al. Functional variants of gene encoding folate metabolizing enzyme and methotrexate-related toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Pharmacol.* 2015;769:93–99.
306. Longo-Sorbello GS, Bertino JR. Current understanding of methotrexate pharmacology and efficacy in acute leukemias. Use of newer antifolates in clinical trials. *Haematologica* 2001; 86:121-7.
307. De Deus DV, de Lima E, Seabra Silva R, Leite E, & Cartaxo Muniz M. Influence of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T, A1298C, and G80A Polymorphisms on the Survival of Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leuk Res Treatment.* 2012; 2012:1–6.
308. Umerez M, Gutierrez A, Muñoz C, Martin I, Garcia A. MTHFR polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia : influence on methotrexate therapy. *Pharmacogenomics Pers Med.* 2017; 10: 69–78.
309. Yazıcıoğlu B, Kaya Z, Güntekin Ergun S, et al. Influence of Folate-Related Gene Polymorphisms on High-Dose Methotrexate-Related Toxicity and Prognosis in Turkish Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Turkish Journal of Hematology.* 2017; 34(2):143-150.
310. Hoang P, Ambroise J, Dekairelle A, Durant J, Butoescu V, Chi Dang V, et al. Comparative pharmacogenetic analysis of risk polymorphisms in Caucasian and Vietnamese children with acute lymphoblastic leukemia: prediction of therapeutic outcome. *Br J Clin Pharmacol.* 2014; 79(3): 429–40.

VIII FINANCIAMIENTO

Este trabajo avalado por fue realizado en el LIHA (Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas anormales) y financiado por Fonacit Proyectos: MC-200700166, MC-2008001053, Centro de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV) proyecto: PI0987122013, ECOS-NORD: PI-2005000758 y PEII 2012001275,

IX ANEXOS**ANEXO I****CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN****TÍTULO: ESTUDIO DE ANOMALÍAS GÉNICAS Y CROMOSÓMICAS
EN PACIENTES CON NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS Y SU
CORRELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD Y LA
RESPUESTA AL TRATAMIENTO.**

Investigadores: Dra. Anabel Arends, Dra Martha Bravo, Br. María del Carmen Rincones, Lic. Silvia Montilla, Lic. Sabrina Ferraz, Dra. María Gabriela Marcano.

Nombre del participante:

Fecha:

OBJETIVO: Detectar la presencia de mutaciones relacionadas al origen y evolución de neoplasias hematológicas en pacientes afectados. Es importante determinar marcadores genéticos que permiten realizar un pronóstico que brinde un mejor enfoque terapéutico y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

TOMA DE LA MUESTRA: Para realizar este estudio se tomará 1ml de una muestra de aspirado de médula ósea y/o 5 ml de una muestra de sangre periférica, según la enfermedad que padezca el paciente. El aspirado medular se obtendrá por punción y extracción de sangre de la cresta ilíaca postero-superior, después de limpiar, desinfectar y anestésiar la piel, tejidos subyacentes y periostio de la zona. En el momento de la aspiración el paciente puede sentir algo de dolor o molestia en el lugar de la punción y también puede quedar un pequeño hematoma pasajero. La muestra de sangre periférica será tomada del antebrazo y el paciente solo sentirá un leve pinchazo en la zona. Este procedimiento tiene muy

pocos riesgos físicos, incomodidad o experiencias emocionales desagradables. Durante el procedimiento siempre estará acompañado por un personal de salud y cualquier pregunta o molestia le será atendida.

USO DE LA MUESTRA: La muestra que le será extraída será utilizada para identificar la(s) mutación(es) responsables de su cuadro clínico. Usted no estará bajo riesgo de pérdida de la salud durante la realización de la toma de muestra antes referida, además de estar debidamente informado de la finalidad del estudio. Para su estudio, su muestra será identificada por código, así su nombre no será reconocido. Cualquier tipo de información que se derive del estudio del material genético del donante, será manejado de manera CONFIDENCIAL.

¿Desea usted que su muestra de médula ósea y/o sangre participe en investigaciones futuras?

SI NO

¿Desea usted que su muestra de médula ósea y/o sangre sea destruida luego de finalizar este proyecto?

SI NO

Esta planilla debe ser leída con calma, meditada y a su regreso debe traerla para el día de la toma de muestra. Usted puede interrumpir su participación y retirarse del este estudio en cualquier momento.

Su beneficio será para el determinar la etiología responsable de su cuadro clínico lo que se traduce en avances para entender, prevenir, diagnosticar y curar enfermedades. Los datos obtenidos serán publicados al término de la investigación y serán de mucho beneficio para otros pacientes o sus descendientes que tengan esta misma enfermedad.

MUCHAS GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

**DECLARACIÓN DEL REPRESENTANTE
(PACIENTES MENORES DE 12 AÑOS)**

El propósito y procedimientos de este proyecto me han sido explicados y los he comprendido bien. Estoy de acuerdo que mi representado participe como individuo en este proyecto.

Nombre del voluntario:

Fecha:

Firma del representante:

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR

Yo le he explicado a la persona arriba nombrada la naturaleza y objetivos de la presente investigación. Le he preguntado si tenía alguna duda sobre los procedimientos y he contestado dichas preguntas con mi mayor capacidad.

Firma del Investigador:

Telefono de Contacto Laboratorio de Investigacion de Hemoglobinas Anormales:

0212-3450871

Fecha:

Testigo:

Testigo:

*Basada en el Código de ética para la vida.

ANEXO II

Frecuencia alélica de los genes *GSTM1* y *GSTT1* en la población control

Alelo	Número de individuos (%)	Frecuencia	Total
GSTM1⁺	190 (59)	0,590	322
GSTM1⁻	132 (41)	0,410	
GSTT1⁺	274 (85)	0,850	322
GSTT1⁻	48 (15)	0,150	

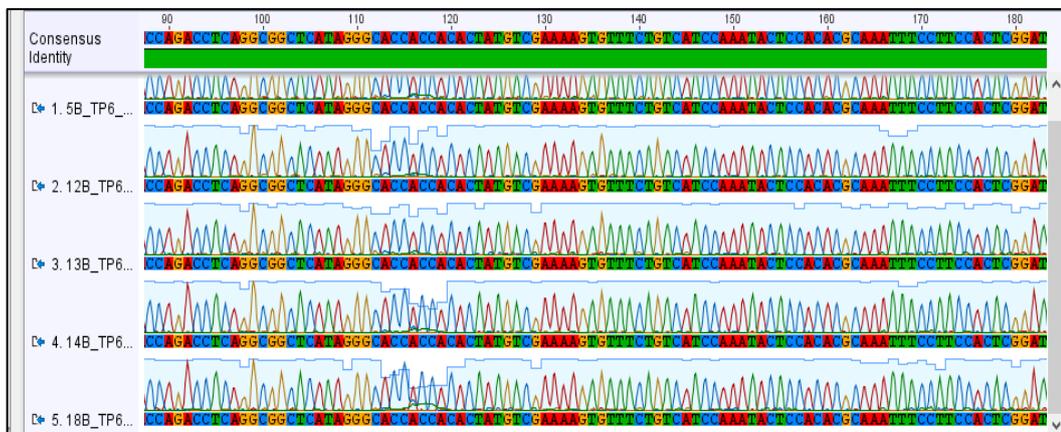
Frecuencia genotípica de los genes *GSTM1* y *GSTT1* en la población control

Genotipo	Número de individuos (%)	Frecuencia
GSTM1⁺/T1⁺	157 (49)	0,460
GSTM1⁻/T1⁺	94 (29)	0,390
GSTM1⁺/T1⁻	55 (17)	0,100
GSTM1⁻/T1⁻	16 (5)	0,050
Total	322	

ANEXO III

Alineamiento de secuencias del exón 6 en el gen *TP53* de pacientes con leucemia.

A través de la herramienta bioinformática del Software Geneious se alinearon las secuencias de algunos pacientes con leucemia que no presentaron mutaciones ni polimorfismos (5B, 12B, 13B, 14B y 18B) del exón 6 en el gen *TP53* para crear la secuencia consenso como se observa en la figura.



ANEXO IV

Análisis de secuencia consenso del exón 6 del *TP53*, en pacientes con leucemia

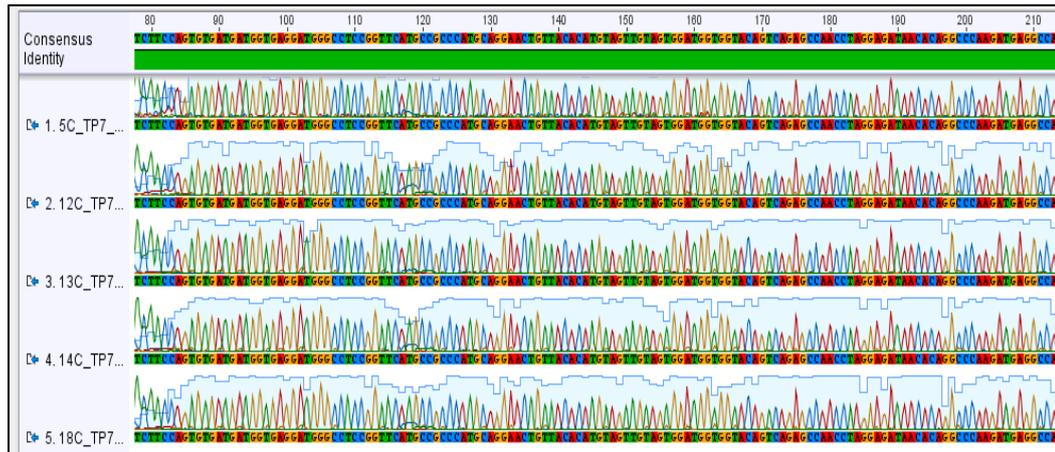
Se representa el alineamiento de la secuencia consenso de muestras del exón 6 del gen *TP53* con la secuencia de referencia GenBank U94788 del gen *TP53*. Analizado usando el software Geneious.



ANEXO V

Alineamiento de secuencias del exón 7 en el gen *TP53* de pacientes con leucemia.

A través de la herramienta bioinformática del Software Geneious se alinearon las secuencias de algunos pacientes con leucemia que no presentaron mutaciones ni polimorfismos (5C, 12C, 13C, 14C y 18C) del exón 7 del gen *TP53* para crear la secuencia consenso como se observa en la figura.



ANEXO VI

Análisis de secuencia consenso del exón 7 del *TP53*, en pacientes con leucemia

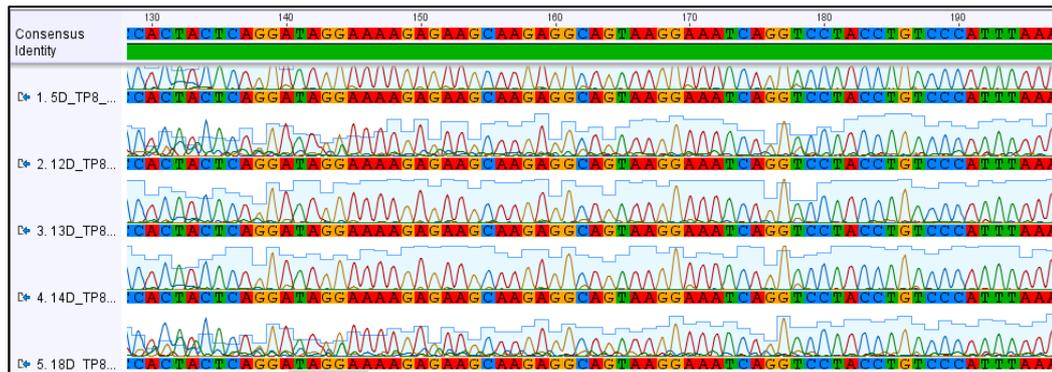
Se representa el alineamiento de la secuencia consenso de muestras del exón 7 del gen *TP53* con la secuencia de referencia GenBank U94788 del gen *TP53*. Analizado usando el software Geneious.



ANEXO VII

Alineamiento de secuencias del exón 8 del gen *TP53* de pacientes con leucemia.

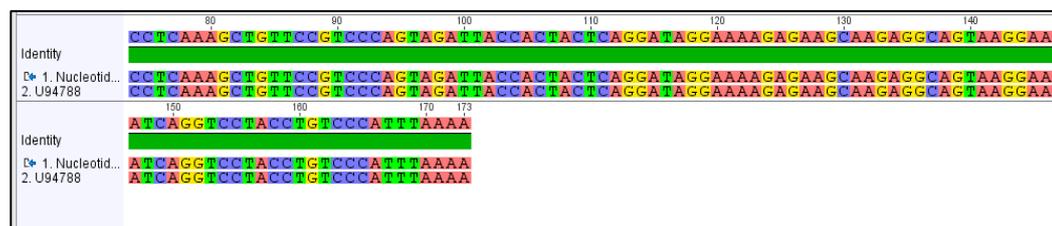
A través de la herramienta bioinformática del Software Geneious se alinearon las secuencias de algunos pacientes con leucemia que no presentaron mutaciones ni polimorfismos (5D, 12D, 13D, 14D y 18D) del exón 8 del gen *TP53* para crear la secuencia consenso como se observa en la figura



ANEXO VIII

Análisis de secuencia consenso del exón 8 del *TP53*, en pacientes con leucemia

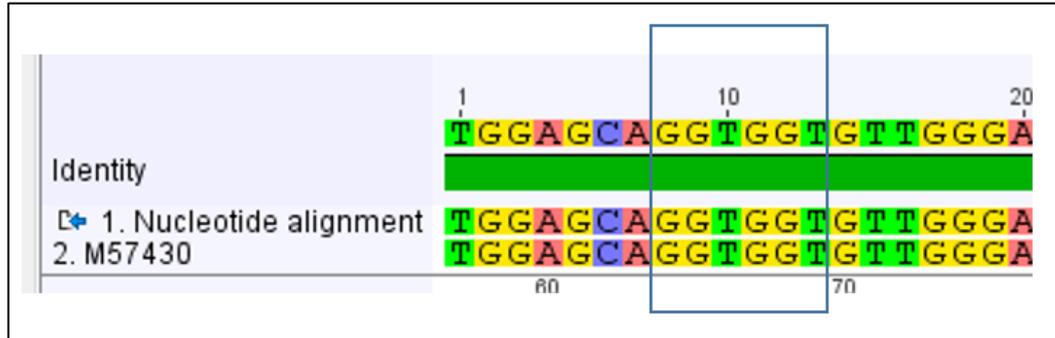
Se representa el alineamiento de la secuencia consenso de muestras del exón 8 del gen *TP53* con la secuencia de referencia GenBank U94788 del gen *TP53*. Analizado usando el software Geneious.



ANEXO IX

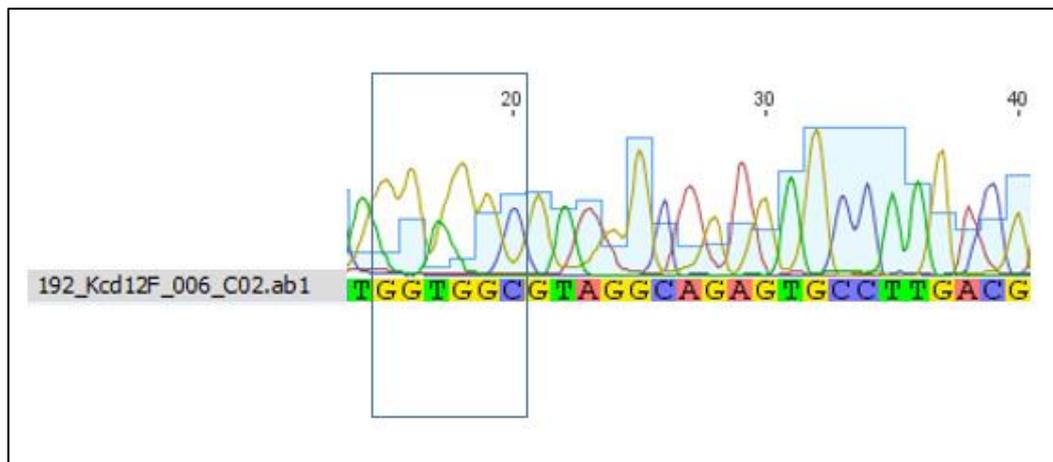
Análisis de secuencia consenso del exón 2 del gen *NRAS* que codifica para el codón 12 y 13

Los resultados obtenidos evidencian la ausencia de mutación en las secuencias (GGTGGT) de nucleótidos que codifican para los codones 12 y 13 del gen NRAS, que se encuentran dentro del cuadro marcado.



ANEXO X

Análisis de secuencia del gen *KRAS* que codifica para codon 12 y 13 en paciente (12F) sin presencia de mutación en la secuencia de interés (dentro del cuadro).



ANEXO XI

Determinación del Equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) para los polimorfismos estudiados en los genes *GSTP1*, *MTHFR 1298*, *MTHFR 677*

Se calculó el equilibrio Hardy-Weinberg empleando el test chi cuadrado, con un grado de libertad.

Polimorfismo	Grupo Control		Grupo pacientes	
	X ²	p(1.gl)	X ²	p(1.gl)
<i>GSTP1</i> A/G	3.135	p>0,05	2.117	p>0,05
<i>MTHFR 677</i> C/T	0,001	p>0,05	3.214	p>0,05
<i>MTHFR 1298</i> A/C	1.191	p>0,05	3.263	p>0,05

X² crítico (1 gl: 3,84). P< 0,05: valor significativo



PREMIO SOCIEDAD VENEZOLANA DE BIOANALISTAS ESPECIALISTAS 2014
ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE GLUTATIÓN S-TRANSFERASA:
GSTM1 Y GSTT1, EN PACIENTES VENEZOLANOS CON LEUCEMIA

Sabrina Ferraz^{1,2}, Marycarmen Chacín¹, Johana Angulo¹, Verónica Araujo¹, Martha Bravo¹ y Anabel Arends¹

¹Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales, Instituto Anatómico "Dr. José Izquierdo", ²Cátedra de Bioquímica "B", Escuela de Bioanalistas, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

Recibido para publicación el 15 septiembre 2014. Aprobado para publicación el 15 noviembre 2014.

RESUMEN:

Las Glutación S-Transferasa (GSTs) son una familia de enzimas de fase II involucradas en la desintoxicación de un amplio rango de agentes químicos xenobióticos, incluyendo carcinógenos ambientales, así como fármacos quimioterapéuticos. Variaciones interindividuales en los loci de GSTM1 y GSTT1 han sido asociadas a diversos tipos de cáncer, incluyendo leucemias. Previa aprobación del consentimiento informado, se estudiaron 102 pacientes con diagnóstico de diferentes tipos de leucemia (LLA, LLC, LMA, LMC y tricoleucemia) y 322 controles sanos. Se realizó el genotipaje de GSTM1 y GSTT1 por la técnica PCR Multiplex. La frecuencia de polimorfismos genéticos determinados en GSTM1 nulo en pacientes con leucemia fue de 34.3% en comparación con los controles 41% (OR: 0.7519, 95% IC: 0.4722 - 1.1972, P value: 0.2296), para GSTT1 nulo los pacientes tuvieron una frecuencia de 28.4% y los controles 15% (OR: 2.1895, 95% IC: 1.2851 - 3.7302, P value: 0.0039). Se encontró una asociación estadísticamente significativa del genotipo nulo de GSTT1 como un factor de riesgo incrementado para desarrollar leucemia, el genotipo GSTM1 nulo no presentó dicha asociación. El genotipo combinado GSTM1-/GSTT1- no representó una relación como factor predisponente a leucemia. Los tipos de leucemia con mayor frecuencia del genotipo GSTM1 nulo fueron LLC y LLA, y para el genotipo GSTT1 nulo la más frecuente fue LMA. Los resultados obtenidos en este estudio permitieron conocer la susceptibilidad incrementada a desarrollar leucemia debido a la presencia del polimorfismo genético GSTT1 nulo en la población venezolana.

Palabras claves: Polimorfismos, Glutación S-transferasa, leucemia.

Solicitar copia a: Sabrina Ferraz. (e-mail: Sabrina.ferraz28@gmail.com)

Acta Científica de la Sociedad Venezolana
de Bioanalistas Especialistas. 2014; Vol 17(2): 44-50.



POLICLINICA METROPOLITANA
RIF: J-008888-8

CONGRESO CIENTÍFICO
LABORATORIO METROPOLITANO
FUNDACION METROPOLITANA

DEL 20 AL 23 DE NOVIEMBRE DEL 2013
HOTEL EUROBUILDING CARACAS

Autor: M. Rincones
Coautores: S. Ferraz; M. Bravo; A. Arends

OTORGAN EL PRESENTE CERTIFICADO A

"DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN SUPRESOR DE TUMORES TP53 EN PACIENTES CON LEUCEMIA"

POR SU PARTICIPACION EN CALIDAD DE

PREMIO LABORATORIO METROPOLITANO

FUNDACIÓN METROPOLITANA
CONGRESO CIENTÍFICO
LAB. METROPOLITANO
RIF: J-31063306-6

LIC. MARGARITA ITURRIZA
PRESIDENTE COMITE ORGANIZADOR

DR. GERMÁN MILLÁN
PRESIDENTE POLICLINICA METROPOLITANA



