



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**POLIMORFISMOS DE LOS GENES DEL RECEPTOR DE
FOLATOS REDUCIDOS Y DIHIDROFOLATO
REDUCTASA ASOCIADOS A LA FARMACOCINÉTICA Y
HEPATOTOXICIDAD DEL METOTREXATO EN
PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

MARTÍN MEDINA SÁNCHEZ

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ARACELI AMAYA CHÁVEZ**

**ASESOR EXTERNO:
DR. ANTONIO SANDOVAL CABRERA**

TOLUCA DE LERDO, MÉXICO 2017

Índice

Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)	9
Etiología y Factores predisponentes	10
Factores pronósticos	11
Tratamiento.....	12
Fármacos antineoplásicos	14
Metotrexato (MTX)	14
Farmacocinética del MTX	16
Toxicidad por altas dosis de metotrexato (HD-MTX)	19
Toxicidad hepática.....	20
Toxicidad renal	21
Transportador de Folatos Reducidos (RFC1).....	22
Dihidrofolato Reductasa (DHFR).....	22
Justificación	24
Hipótesis	25
Objetivo	25
Objetivos particulares	25
Material y métodos	25
• Población de estudio	25
• Criterios de inclusión	26
• Criterios de exclusión.....	26
• Criterios de eliminación	26
Cuantificación de MTX	27
Obtención de los datos farmacocinéticos	28
Extracción de DNA	28
• Prueba para la evaluación de la amplificación del DNA genómico.....	29

• Genotipificación del gen RFC G80A.....	29
• Genotipificación del gen DHFR	31
• Digestión enzimática del amplificado de PCR de la DHFR	31
• Obtención de los datos de riesgo de hepatotoxicidad	32
• Análisis estadístico.....	33
Resultados.....	34
• Pureza y concentración del DNA.....	34
• Prueba de integridad del DNA	34
• Prueba de amplificación del DNA	35
• Genotipificación del gen RFC1.....	36
• Genotipificación del gen de la enzima Dihidrolotoreductasa (DHFR).....	37
• Datos de los parámetros farmacocinéticos de los pacientes.....	39
• Datos de los perfiles hepáticos de los pacientes.....	41
Análisis de estadístico	43
Discusión	50
Conclusiones.....	56
Anexos.....	57
• Anexo 1	57
• Anexo 2	58
• Anexo 3	59
Referencias	60

Lista de abreviaturas

ABC: Transportadores dependientes de la unión a ATP

AINES: Antiinflamatorios no esteroideos

AR: Artritis reumatoide

BFM: Berlín-Frankfurt-Münster

DHFR: Dihidrofolatoreductasa

DNA: Ácido desoxiribonucleico

EMIT: Enzyme Multiplend Inmuno Assay

FPGS: Folilpoliglutamatosintetasa

GGH: γ -glutamil hidrolasa

G6PDH: Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa

HD-MTX: Altas dosis de metotrexato

IV: Intravenosa

LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda

LMA: Leucemia Mieloblástica Aguda

6-MP: 6-mercaptopurina

MTHFR: Metilentetrahidrofolatoreductasa

MTX: Metotrexato

MTXPGs: Poliglutamatos del MTX

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

pb: pares de bases

PCR: Reacción de cadena de polimerasa

RCNA: Registro de Cáncer en Niños y Adolescentes

RFC: Receptor de folatos reducidos

RNA: Ácido ribonucleico

SNC: Sistema nervioso central

TGO: Transaminasa Glutámico Oxalacética;

TGP: Transaminasa Glutámico Pirúvica

TYMS: Timidilatosintetasa

Resumen

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es el tipo de cáncer más frecuente en población pediátrica y una de las principales causas de mortalidad en esta misma (American Cancer Society (ACS). 2014). A pesar de que la sobrevida de los pacientes que presentan LLA ha mejorado con el desarrollo de mejores protocolos de tratamiento (Pui et al., 2011), existen riesgos adicionales que presentan los agentes quimioterapéuticos (Schmiegelow et al., 2014).

Un agente quimioterapéutico esencial de todos los protocolos de tratamiento de LLA es el MTX (Pui et al., 2012). A pesar de su eficacia, la variación en su metabolismo resulta en una exposición sistémica y eficiencia clínica heterogénea así como en toxicidad en los casos más adversos. La estimación de la farmacocinética y monitoreo de los niveles séricos de MTX así como la identificación de polimorfismos genéticos asociados a su metabolismo permite identificar el adecuado establecimiento de las dosis terapéuticas así como identificar aquellos pacientes que corren un alto riesgo de recaída, progresión o generación de toxicidad por deficiencias en su catabolismo (Sharifi et al., 2014, Csordas et al., 2014, Aquerreta et al., 2002).

Por otro lado, existen diferentes genes relacionados con el metabolismo y transporte del MTX, los cuáles han sido asociados a la variabilidad farmacocinética, entre ellos se encuentran el transportador de folatos reducidos (RFC1) y de la Dihidrofolato Reductasa (DHFR).

El presente proyecto se estudió el comportamiento farmacocinético de HD-MTX en una población pediátrica con LLA y fueron comparadas con las variantes genéticas del gen RFC (rs1051266) y del gen de la enzima DHFR del19 (rs70991108), así como con los niveles séricos de las enzimas hepáticas TGO y TGP.

En este estudio se buscó la relación entre los portadores de la del 19 pb y el riesgo de toxicidad hepática relacionado con el incremento de enzimas hepáticas; con respecto a los portadores heterocigotos y los no portadores (-/+, -/-) contra los portadores heterocigotos (+/+) a la delección y los valores de TGP y TGO en el que se encontraron valores de $p = 0.2987$ y $= 0.3776$ respectivamente. El resultado demuestra que no existe relación entre el polimorfismo de la del 19 pb, ya que ser portador heterocigoto u homocigoto no aumenta el riesgo de toxicidad hepática por el incremento de los valores de TGP y TGO.

Los datos de las prueba estadísticas realizadas para determinar si hay relación entre el genotipo del gen RFC y las concentraciones plasmáticas del metotrexato a las 24 h y 72 h demostraron que no existe relación entre el genotipo de AA y una mayor concentración plasmática del metotrexato. De igual forma se comparó el polimorfismo del gen RFC con los valores de TGO, TGP, Cl y $t_{1/2}$; el resultado obtenido demuestra que no existe relación entre estos resultados y el genotipo. Por otro lado el análisis de χ^2 para la comparación entre en genotipo de RFC y los valores de $t_{1/2}$ demuestra que no existe relación.

Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

La leucemia linfoblástica aguda es una enfermedad hematológica que se caracteriza por una proliferación de células linfoides inmaduras (linfoblastos) en la médula ósea, que se infiltran a sangre periférica y otros órganos. Esta proliferación es el resultado de un proceso de transformación maligno en los progenitores celulares linfoides de los linajes B y T (NCCN, 2014; M. P. Gallegos-Arreola, 2013).

Aún no se conoce la base molecular de la transformación leucémica; sin embargo, se cree que en muchos casos un solo progenitor leucémico con capacidad de autorrenovación indefinida sufre una transformación maligna por una mutación somática espontánea o inducida, ya sea por agentes radioactivos, químicos o infecciosos (virales), dando origen a precursores que han perdido su capacidad de diferenciarse en respuesta a estímulos fisiológicos normales y poco a poco se vuelven predominantes en la médula ósea (Rizzari et al., 2004; M. P. Gallegos-Arreola, 2013).

De acuerdo a los datos epidemiológicos se estima que a nivel mundial existen alrededor de 12 millones de personas que anualmente son diagnosticadas con cáncer, de los cuales el 3% (360,000) son niños. De igual manera el cáncer es la segunda causa de muerte en menores de 20 años a nivel mundial. Por otro lado, del total de casos de leucemias, el 60% de los casos diagnosticados se presenta en menores a 20 años de edad, en donde del 75 al 80% de los casos corresponde a LLA, haciendo de esta leucemia la más común en la niñez (NCCN, 2014; Tirado Gómez and Moha Betancourt, 2007).

En México el Registro de Cáncer de Niños y Adolescentes (RCNA) reportó en el 2011 que las leucemias constituyen el tipo de cáncer más frecuente agrupando el 30% de los casos. De acuerdo a su clasificación, la más común fue la linfoblástica con el 81.3% de los sucesos en la que el grupo de edad más afectado es el de 10 a 14 años con el 51.5%, seguido del grupo de 5 a 9 años con el 18.4%. Los datos indican que el grupo masculino es más afectado por LLA con el 53.74 % de los incidentes (SINAVE, 2011).

En el Estado de México, de acuerdo a los datos del INEGI del año 2008 se presentaron el 12.3% de los acontecimientos de mortalidad por leucemias; lo que representa una tasa de mortalidad del 2.5 por cada 100,000 habitantes (SINAVE, 2011).

Etiología y Factores predisponentes

Para el desarrollo de las leucemias se han sugerido factores que desempeñan una función causal para su desarrollo: 1) susceptibilidad genética; 2) radiación ionizante, 3) químicos y fármacos, 4) infección viral y 5) disfunción inmunitaria.

Susceptibilidad genética

Existe una fuerte evidencia en la que el material genético y los factores hereditarios anormales tienen efectos leucemógenos importantes. Algunas personas que tienen anomalías congénitas vinculadas a alteraciones en el cariotipo, en donde se incluyen translocaciones, inversiones, cromosomas extra y pérdidas que tienen un mayor riesgo de padecer LLA. Algunos de estas anomalías son el síndrome de Down, el síndrome de Li-Fraumeni, el síndrome de Klinefelter y la anemia de Fanconi (Imbach et al., 2014; Rafael et al., 2011; Salud, 2014).

Radiación ionizante

La radiación ionizante puede jugar un gran papel en el desarrollo de leucemia aguda; un hecho de alta incidencia de leucemias fue observado después de la explosión de la bomba atómica en Hiroshima y Nagasaki, siendo la LLA más frecuente en niños y la leucemia mieloblástica aguda (LMA) más común en adultos. Sin embargo, los casos de leucemias atribuidos a la radiación son pocos. Las controversias persisten sobre el riesgo de exposición a radiación ionizante en emisiones provenientes de plantas nucleares o como resultado del polvo radiactivo presente en los muestreos nucleares de la atmósfera; a pesar de esto, los resultados no han sido concluyentes ya que el periodo de tiempo en que se ha evaluado la exposición a la radiación no es suficiente para evaluar su potencial oncogénico (Tirado Gómez y col., 2007; Rafael et al., 2011; Salud, 2014).

Sustancias químicas y fármacos

El papel de la exposición a sustancias químicas tóxicas como el benceno en el desarrollo de LLA aún se cuestiona, debido a que se ha visto que la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato- oxidoreductasa (NADPH-oxidoreductasa) una de las enzimas implicadas en el metabolismo del benceno y de sus derivados, tiene mutaciones que disminuyen su actividad enzimática que ha sido ligada al desarrollo de LLA y LMA en adultos. Otros factores que pueden estar involucrados en el desarrollo de LLA son: el consumo paterno de cigarro, la exposición paterna a plaguicidas; el consumo materno

de alcohol, anticonceptivos y dietilestibestrol; la exposición casera a Radón y el consumo de aguas subterráneas contaminadas. La relación causal de estas sustancias como factores para el desarrollo de LLA en niños no ha sido demostrada (Rizzari et al., 2004, Rafael et al., 2011).

Infección viral

Existe una correlación entre los virus y el desarrollo de leucemias que ha sido observada especialmente en virus de RNA en ratones, gatos, pollos y vacas después de la infección. El papel que juegan las infecciones virales en la patogenia de las leucemias humanas ha sido estudiado intensamente. Esto se ha reflejado en el hecho de la distribución de LLA por edades corresponde con el mismo tiempo en que el sistema inmune se está desarrollando y quizás es más vulnerable a los efectos oncogénicos de algunos virus. Se ha sugerido el incremento en el riesgo de padecer LLA en niños que nacieron de madres que fueron infectadas con influenza, varicela u otros virus, pero la relación no es definitiva debido a que la exposición prenatal a virus y su relación con las leucemias no ha sido confirmada. Los únicos vínculos encontrados entre virus y leucemias son el retrovirus de leucemia de células T humanas (HTLV-1) que ha demostrado su relación con la el linfoma de células T en adultos y el virus Epstein-Barr (EBV) relacionado con casos de endémicos de leucemia-linfoma de Burkitt. (Rizzari et al., 2004; Rafael et al., 2011).

Disfunción inmunitaria

Se ha observado un incremento en la incidencia le LLA en trastornos inmunitarios congénitos como adquiridos. Estos trastornos incluyen enfermedades hereditarias como la hipogammaglobulinemia y el síndrome de Wiskott-Aldrich. También se ha observado el vínculo en pacientes con tratamientos prolongados con inmunosupresores (Imbach et al., 2014).

Factores pronósticos

Varias enfermedades relacionadas y factores específicos del paciente pueden tener significancia pronóstica en pacientes con LLA. En particular, la edad del paciente, conteo de glóbulos blancos, inmunofenotipo, subtipo citogenético y respuesta a la terapia de inducción han sido identificados como factores importantes de riesgo y la evaluación pronóstica tanto en adultos como en niños, mismos que se resumen en la Tabla 1 (NCCN, 2014; Imbach et al., 2014).

Tabla 1. Evaluación clásica de los factores pronósticos.

Factor pronóstico	Favorable	Desfavorable
Conteo de glóbulos blancos	< 10x10 ⁹ /l	>50 x10 ⁹ /l
Edad (años)	2-7	<2 y >10
Género	Femenino	Masculino
Respuesta al tratamiento con esteroides	+	-
Respuesta al tratamiento	< 4 semanas	>4 semanas
Enfermedad residual mínima	Negativa en el día 15	Positiva el día 33
Tiempo de recaída después del término del tratamiento	>6 meses	<6 meses
Marcadores de superficie	LLA con precursores de células B	LLA con células T/B
Caracterización citogenética	Hiperploidia	Hipoploidia
Estructura		11q23/MLL_LLA Ph+
FAB	L1	L2/L3
Agrandamiento del mediastino	-	+
Visceromegalia	+ a ++	+++
LDH	Moderada	Alta
Grupo racial	Blanco	Negro

Fuente: Imbach et al., 2014.

Tratamiento

El tratamiento para combatir la LLA es uno de los más complejos e intensivos, los regímenes de tratamiento incluyen modificaciones o variaciones de los diversos agentes quimioterapéuticos. Existen distintos protocolos de quimioterapia, originalmente desarrollados por el Grupo Berlín-Frankfurt-Münster (BFM) para pacientes pediátricos (NCCN, 2014).

En general las fases del tratamiento consisten en distintas etapas: inducción, consolidación/reinducción y mantenimiento, además todas las etapas incluyen terapia preventiva del sistema nervioso central (SNC). (NCCN, 2014; Salud, 2014).

Inducción. La terapia de inducción tiene como fin reducir los signos y síntomas de la enfermedad y restablecer la función normal de la hematopoyesis. Se alcanza el objetivo del tratamiento cuando hay una remisión completa, en donde no se aprecia evidencia física de leucemia, conteo normal de células en sangre y regeneración de la medula ósea (menos del 5% de linfoblastos). La información sobre el estatus de remisión completa incluye la ausencia de enfermedad extramedular y del SNC en la evaluación física y de fluido cerebroespinal (Rizzari et al., 2004; Salud, 2014).

Los regímenes de inducción se basan en una combinación con vincristina, antraciclinas (ej. daunorubicina, doxorubicina) y corticosteroides (ej. prednisona, dexametasona) con o sin L-asparaginasa y ciclofosfamida. Adicionalmente se emplean algunos

antimetabolitos como metotrexato (MTX), citarabina y 6-mercaptopurina (6-MP), que son incluidos en la terapia de inducción primaria para la profilaxis del SNC (NCCN, 2014; Salud, 2014).

Convencionalmente la quimioterapia sistémica tiene una duración de 4-6 semanas y permiten hasta una tasa de remisión de $\geq 95\%$. Sin embargo, algunos pacientes ($<5\%$ de la población en general) no logrará una remisión completa a causa de muerte (aproximadamente 2%) o por enfermedad persistente (cerca del 2-3 %) (Rizzari et al., 2004).

Consolidación. La terapia de consolidación o reinducción se define como uno o más periodos de intensificación del tratamiento administrado después de la inducción y es considerado como un componente relevante de muchos protocolos de quimioterapia, particularmente en pacientes de alto riesgo. La meta de la terapia de consolidación es eliminar cualquier célula remanente potencialmente leucémica después de la terapia de inducción, promoviendo la erradicación de la enfermedad residual (Rizzari et al., 2004; Salud, 2014).

La combinación de fármacos y la duración de la terapia de consolidación varían ampliamente entre estudios y poblaciones de pacientes, pero puede comprender combinaciones de fármacos similares a los usados durante la fase de inducción. Altas dosis de metotrexato (HD-MTX), citarabina, 6-MP y L-asparaginasa son incorporadas frecuentemente dentro de los regímenes de consolidación/intensificación (NCCN, 2014; Salud, 2014).

Mantenimiento. El fin de la terapia de mantenimiento es prevenir una recaída de la enfermedad después de la terapia de inducción y consolidación. Los fármacos efectivos como agentes de inducción no se usan en esta fase. La mayoría de los regímenes de mantenimiento se basan en 6-MP diaria y MTX semanal. La dosificación de los fármacos usados en esta fase tiene un papel clave como determinante de la eficacia del tratamiento. La duración de la terapia no ha sido definida completamente, esta puede tener una duración de 2-3 años (Rizzari et al., 2004; NCCN, 2014).

Terapia Preventiva del Sistema Nerviosos Central. El objetivo de la profilaxis o tratamiento es prevenir la enfermedad en el SNC o recaída por células leucémicas que pudieran proliferar debido a que los agentes antileucémicos no pueden penetrar la barrera hematoencefálica (NCCN, 2014).

La terapia dirigida al SNC puede incluir irradiación intracraneal, quimioterapia intratecal (ej. metotrexato, citarabina, corticosteroides) y altas dosis de quimioterapia

sistémica (ej. metotrexato, citarabina, 6-MP, L-asparaginasa). La profilaxis del SNC se da a todos los pacientes en el curso de la terapia para el tratamiento de LLA, es decir en las fases de inducción, consolidación y mantenimiento (NCCN, 2014; Salud, 2014).

Fármacos antineoplásicos

Durante el tratamiento de LLA se utilizan distintos tipos de fármacos, entre ellos los antimetabolitos, los cuales son compuestos que tienen afinidad por las enzimas implicadas en la biosíntesis de ácidos nucleicos, estos pueden ser incorporados dentro de la célula en forma de polímeros y actúan como falsos monómeros para la síntesis de las macromoléculas. Este tipo de fármacos comprometen la síntesis de DNA y RNA en células sanas y transformadas de la misma manera. Ejercen su acción principalmente en células que se encuentran en la fase S del ciclo celular, especialmente sobre células con rápido crecimiento y alta tasa de proliferación (Guilman and Goodman, 2003; Velázquez, 2008).

Metotrexato (MTX)

El metotrexato (ácido 4-amino-N-metilpteroilglutámico), es uno de los fármacos más utilizados durante todas las fases del tratamiento. Se trata de un análogo del ácido fólico, el cual se une competitivamente y de manera reversible inhibiendo la enzima Dihidrofolato reductasa (DHFR), la afinidad del metotrexato por la DHFR es 1000 veces mayor que la del ácido fólico; lo que resulta en la supresión en la síntesis de timidilato y purinas, que posteriormente resulta en la inhibición de la síntesis de DNA (Hess and Khasawneh, 2015).

Los antifolatos como el MTX son inhibidores competitivos de las enzimas dependientes de folatos y son ampliamente usados en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluyendo LLA. Los folatos y la mayoría de los antifolatos existen intracelularmente, como derivados activos de poliglutamatos (Cheng et al., 2006).

El metabolismo intracelular del MTX consiste en la entrada al citoplasma de la célula mediante transporte activo a través del receptor de folatos reducidos (RFC). Este es expulsado de la célula por diversos transportadores dependientes de la unión a ATP (ABC), especialmente ABCC1-5 y ABCG2. Una vez dentro de la célula, el MTX sufre poliglutamación por la adición de 2 a 7 grupos de ácido glutámico. Este proceso es catalizado por la enzima folilpoliglutamatosintetasa (FPGS). Las formas poliglutamizadas no son fácilmente transportadas a través de la membrana celular, por lo que la vida media del MTX intracelular se incrementa. Este proceso de

poliglutamación es revertido por la enzima γ -glutamil hidrolasa (GGH), la cual remueve los grupos de ácido glutámico (Hider et al., 2007).

Los poliglutamatos del MTX (MTXPGs) actúan sobre diversas enzimas clave incluyendo la dihidrofolatoreductasa (DHFR) y timidilatosintetasa (TYMS), la cual está involucrada en la síntesis de pirimidina. Diversos estudios sugieren que el MTX es un pro-fármaco, y las formas poliglutamizadas son mucho más activas que el propio MTX, las cuáles son responsables de su eficacia en tratamiento de artritis reumatoide (AR). De esta manera se ha sugerido que los defectos en la poliglutamación representan un potencial mecanismo de falta de respuesta al MTX. Adicionalmente, el MTX tiene influencia en la actividad de la enzima metilentetrahidrofolatoreductasa (MTHFR), a través de sus efectos en el metabolismo intracelular de los folatos (Hider et al., 2007).

Sin embargo, la reacción enzimática que potencialmente se inhibe más por las formas poliglutamizadas del MTX es la conversión de 5-aminoimidazol-4-carboximida ribonucleotido (AICAR) a folmil-AICAR (FAICAR), que es mediado por la enzima AICAR transformilasa (ATIC). La acumulación de AICAR y sus metabolitos tiene un efecto inhibitorio directo en otras enzimas dentro de la vía de la adenosina, incluyendo adenosina deaminasa y adenosina monofosfatodeaminasa (AMPD1). El resultado neto es la liberación de adenosina, un potente mediador antiinflamatorio y posible mecanismo del éxito en el tratamiento de AR (Hider et al., 2007).

Este mecanismo de acción se encuentra representado en la Figura 1.

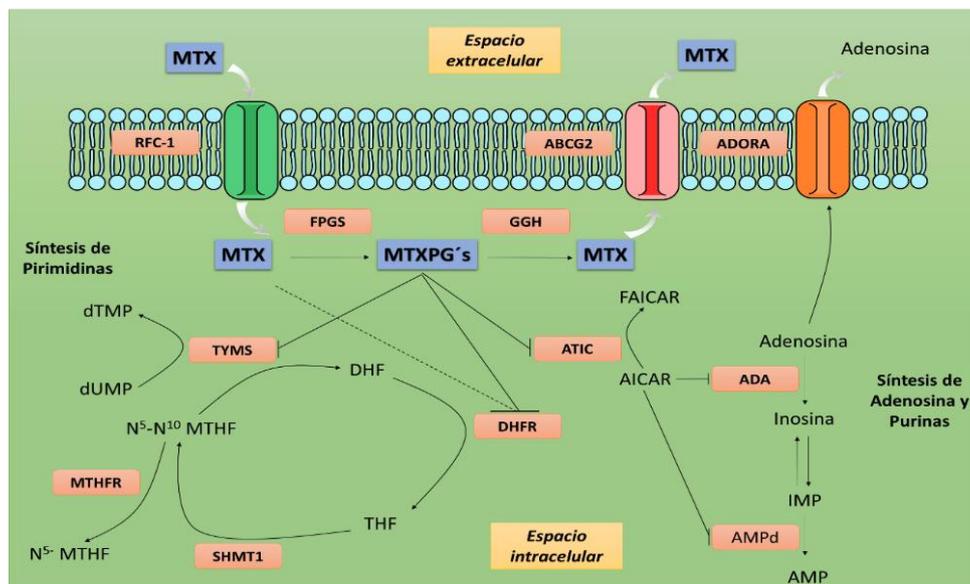


Figura 1. Esquema del mecanismo de acción del MTX adaptado de (Hider et al., 2007).

Farmacocinética del MTX

La farmacocinética del MTX esta descrita en la literatura, especialmente en adultos. El volumen de distribución es del 18 % del peso corporal. Estos volúmenes de distribución se aproximan a los del espacio extracelular y del agua corporal respectivamente (Bleyer, 1978).

Después de la inyección intravenosa, el MTX desaparece del plasma en una forma trifásica, la vida media inicial es de 0.75 ± 0.11 h, la segunda vida media se ha reportado como 2.06 ± 0.16 , 3.49 ± 0.55 y 2.0 ± 3.4 h, mientras que la vida media terminal es de 10.4 ± 1.8 h. Inicia con una concentración plasmática del antifolato de 10^{-7} M, aproximadamente a las 6 – 24 h después de una inyección de dosis convencional y de 30 – 48 h después de un tratamiento de altas dosis (Bleyer, 1978).

El MTX tiene una unión del 34% a albumina en el plasma. Siguiendo las dosis intravenosas el MTX es eliminado entre el 60-90% sin modificaciones por la orina, del 10-30% es eliminado a través de la bilis y del 1-9% es metabolizado por la aldehído-oxidasa en su metabolito 7-hidroxilo. Cuando la filtración glomerular es la ruta dominante para la eliminación renal del MTX, la secreción y la reabsorción juega un papel significativo (Ogungbenro and Aarons, 2014).

La aplicación de infusiones intravenosas (IV) de HD-MTX logran concentraciones efectivas terapéuticas, en el caso del MTX se encuentran en un estado estacionario de 1×10^{-2} - 1×10^{-4} mol/L. Un cambio en las dosis o la duración de las infusiones se enfocan en disminuir las diferencias individuales en la acumulación de MTX, en donde los efectos citotóxicos del MTX dependen de la concentración y de la duración de la exposición al fármaco (Popović et al., 2015; Luyckx et al., 1985).

Adicionalmente el monitoreo terapéutico del fármaco y los ajustes de dosis se basan en datos farmacocinéticos poblacionales que han provisto de valores para la optimización, eficacia y seguridad de los fármacos de estrecho índice terapéutico en poblaciones especiales. Estos modelos se han descrito en pacientes con distintas enfermedades, incluido el cáncer (Nader et al., 2016).

Cuando HD-MTX son aplicadas, el monitoreo terapéutico del fármaco es un estándar en la práctica para la aplicación de los rescates de leucovorina, especialmente en pacientes con aclaramiento de MTX reducido u otros riesgos relacionados con la exposición prolongada al fármaco, daño renal y hepático o retención de líquidos (Popović et al., 2015).

Sin embargo, se conocen otros factores que contribuyen a la gran variabilidad farmacocinética del MTX en diferentes tipos de cáncer y otras enfermedades; además de otros factores que tienen influencia como: fertilidad, la coadministración de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) o ciprofloxacino, subtipo molecular, actividad de las enzimas del ciclo de los folatos. La asociación entre un pH de orina bajo y altas concentraciones de MTX está bien documentado. Generalmente las dosis estándar de MTX introducen concentraciones de hasta 7 veces más en pacientes con el mismo pH (Nader et al., 2016; Popović et al., 2015).

Esta combinación de gran variabilidad en la farmacocinética del MTX puede llevar a incrementar el uso de la monitorización terapéutica de los fármacos para identificar a los pacientes con alto riesgo de toxicidad y optimizar los resultados clínicos. El modelado y simulación han sido usados ampliamente como una herramienta para entender la variabilidad, optimizar los regímenes de dosificación e individualizar las dosis en farmacocinética. Usualmente estos modelos farmacocinéticos se basan en modelos de dos o tres compartimentos que han sido desarrollados especialmente para el MTX con el fin de optimizar las dosis (Ogungbenro and Aarons, 2014).

En pacientes con una disfunción renal importante, el aclaramiento de MTX se encuentra retrasado, resultando en una exposición prolongada al fármaco, lo que puede dar lugar a un gran riesgo de toxicidad. En pacientes con fluidos extravasculares incrementados, particularmente la presencia de líquido pleural o ascitis, el fármaco puede ser retenido, retrasándose la eliminación y aumentando el riesgo de toxicidad (Thompson et al., 2007).

Los agentes antineoplásicos como el MTX dependen de la función renal para su eliminación que puede ser aclarado más lentamente en los infantes, lo que resultaría en un incremento de los efectos terapéuticos y de forma negativa de la toxicidad. Adicionalmente a la madurez de la función renal, la composición corporal de los infantes puede afectar la farmacocinética del MTX. Esto se debe principalmente al contenido de agua corporal de los infantes, es decir la fracción que corresponde al contenido total de agua y la fracción de agua extracelular pueden afectar el aclaramiento del MTX en los pacientes pediátricos de la misma manera que la acumulación de líquido extravascular que prolongan la vida media del MTX (Thompson et al., 2007).

Existe poca información disponible del comportamiento farmacocinético de los agentes antineoplásicos en niños. Es por ello que tiene una gran importancia terapéutica el MTX en el tratamiento de LLA infantil, debido a su potencial de toxicidad y el posible impacto en la fisiología tras su disposición. Los datos farmacocinéticos en niños tienen amplia importancia clínica para proveer de seguridad y eficacia del tratamiento a esta población vulnerable (Thompson et al., 2007).

Los análisis farmacocinéticos y la individualización de las dosis pueden ser aprovechados para la optimización de la farmacoterapia del paciente. La recolección rutinaria de la información de los datos del monitoreo terapéutico del MTX es una herramienta importante para una mejor comprensión de la farmacocinética del MTX, lo que resulta en la optimización de los regímenes de dosificación en los pacientes con LLA (Nader et al., 2016).

Toxicidad por altas dosis de metotrexato (HD-MTX)

Desafortunadamente el MTX está relacionado con toxicidad clínica durante el tratamiento. Altas dosis de MTX se requieren para inducir la inhibición completa de la DHFR celular y a menudo está asociado con el incremento, frecuencia y severidad de los efectos adversos. Usualmente el ácido folínico o leucovorina se usa para rescatar las células con toxicidad por MTX y evitar el bloqueo de DHFR en las células (Hess and Khasawneh, 2015).

Altas dosis de metotrexato (HD-MTX) representan una parte importante de la terapia que se proporciona a los niños con LLA con el fin de reducir el riesgo de recaídas sistémica y extramedular. HD-MTX se refieren a dosis entre 0.5-8 g/m² o más y es muy común que se administren con 6-mercaptopurina (6-MP). Sin embargo HD-MTX han sido asociadas con toxicidad severa, la introducción de hidratación como medida pretratamiento, además de la alcalinización urinaria, monitoreo de rutina de las concentraciones de MTX en suero y la incorporación de leucovorina como rescate han disminuido su incidencia (Pauley et al., 2013).

Altas concentraciones de MTX en plasma están asociadas con el incremento en la toxicidad que puede retrasar los siguientes cursos de quimioterapia. HD-MTX suelen tener serios efectos tóxicos como dermatitis, elevación de las transaminasas, mucositis, mielosupresión debido a la toxicidad del MTX, que trae consigo el riesgo de infecciones y la necesidad de transfusiones. Esta mielosupresión puede provocar la interrupción y reducción de las dosis afectando la tasa de curación (Levinsen et al., 2015, Hess and Khasawneh, 2015).

Algunos estudios mencionan que los pacientes con recaídas de LLA muestran que la individualización de las dosis disminuyó la variabilidad inter-paciente y se evitaron las concentraciones potencialmente tóxicas. Sin embargo, el ajuste de HD-MTX durante una infusión requiere un procesamiento rápido para el análisis de las concentraciones de MTX en plasma, la estimación de los parámetros farmacocinéticos y la implementación de los ajustes de dosis (Wall et al., 2000).

Toxicidad hepática

Los fármacos citotóxicos pueden dañar el hepatocito de forma directa (radicales libres, intermediarios metabólicos), o indirecta (atacando la membrana celular, bloqueando vías bioquímicas, etc.). Estas lesiones pueden inducir necrosis celular y citólisis, colestasis al dañar los conductos biliares, alterar la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos dando lugar a esteatosis o bien inhibir la síntesis de proteínas. Por tanto, la quimioterapia puede reproducir cualquier patrón conocido de daño hepático:

- Necrosis hepatocelular
- Esteatosis o infiltración grasa
- Fibrosis
- Colestasis intrahepática
- Daño vascular hepático

El hígado es un órgano que cumple multitud de funciones metabólicas; sin embargo, no existen marcadores cuantitativos suficientemente fiables para determinar con exactitud la función hepática. El daño hepático se infiere del análisis de determinados parámetros bioquímicos que no representan sino una estimación indirecta de la lesión hepática. En la Tabla 2 se pueden identificar los criterios comunes de toxicidad hepática del National Cancer Institute (Camps Carlos, 2004; Marrow, 1999).

Tabla 2. Common Toxicity Criteria de daño hepático.

Grado					
Evento adverso	0	1	2	3	4
Bilirrubina	N	1-1.5 x N	1.5- 3.0 x N	3.0-10.0 x N	> 10 x N
Fosfatasa alcalina	N	N < 2.5 x N	2.5-5.0 x N	5.0-20.0 x N	> 20 x N
TGO	N	N < 2.5 x N	2.5-5.0 x N	5.0-20.0 x N	> 20 x N
TGP	N	N <2.5 x N	2.5-5.0 x N	5.0-20.0 x N	> 20 x N

TGO: Transaminasa Glutámico Oxalacética; **TGP:** Transaminasa Glutámico Pirúvica; **N:** Normal. Valores normales: Bilirrubina total = 0 – 1 mg/dL, Fosfatasa alcalina 50 – 300 UI/L, TGO = 10 - 42 UI/L, TGP = 10 - 42 UI/L.

Fuente: Marrow, 1999.

La administración de HD-MTX provoca diferentes grados de toxicidad hepática dependiendo del modo de administración; suele ocasionar la elevación transitoria de transaminasas y bilirrubina en hasta el 14% de los pacientes cuando se emplea a altas dosis. Por otro lado, cuando se usa a bajas dosis en el tratamiento de mantenimiento en

niños con LLA puede inducir cirrosis hepática y fibrosis (Camps Carlos, 2004; Toscano et al., 2010).

Toxicidad renal

El MTX y su metabolito activo 7-hidroxi metotrexato son eliminados en un 80-90% por filtración a nivel del glomérulo y por secreción activa en el túbulo renal, durante las primeras 24 horas. Ambos fármacos se eliminan en su forma ionizada, que es soluble.

Cuando aumenta su concentración en la orina, y especialmente si el pH se acidifica, ambos preparados se vuelven menos solubles y pueden precipitar causando necrosis tubular y una reducción del filtrado glomerular (Camps Carlos, 2004).

La precipitación del metotrexato se observa habitualmente con dosis superiores a 1 g/m^2 , aunque puede darse con dosis más bajas si disminuye su aclaramiento por una disfunción renal previa o porque se administran simultáneamente fármacos que retrasan la eliminación del MTX, como cisplatino, antiinflamatorios no esteroideos, sulfamidas, salicilatos, ciclosporina, probenecid e incluso penicilinas y omeprazol (Camps Carlos, 2004).

La precipitación del MTX provoca una rápida insuficiencia renal, que puede llegar incluso a la anuria. La insuficiencia renal es casi siempre reversible, ocasionando una elevación de la creatinina durante la primera semana y una posterior normalización en el plazo de 1 a 3 semanas. Sin embargo las consecuencias pueden ser muy graves, incluso letales, al posibilitar la permanencia de dosis altas de MTX en el organismo, lo cual incrementa de forma marcada su toxicidad hematológica y mucosa (Camps Carlos, 2004).

Monitorización de la función renal y niveles de metotrexato

Para asegurar una correcta eliminación del fármaco y evitar una toxicidad severa es necesario determinar diariamente la creatinina y los iones séricos. Si la creatinina obtenida a las 20- 24 horas del inicio del MTX se ha incrementado $>50\%$ con respecto a la basal, aumentar el leucovorin a 100 mg/m^2 cada 6 horas hasta que los niveles de MTX sean $< 5 \times 10^{-8} \text{ M}$ ($5 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ o bien $0,05 \text{ }\mu\text{M}$).

Los niveles séricos de metotrexato deben determinarse también en caso de dosis altas o en caso de insuficiencia renal (aclaramiento de creatinina $<60 \text{ mL/min}$) (Camps Carlos, 2004).

Transportador de Folatos Reducidos (RFC1)

El RFC1 tiene como función transportar al interior de la célula los folatos reducidos, este es expresado en todo el cuerpo. El MTX es un sustrato para el RFC1 y la distribución de este fármaco a los tejidos esta mediada por este transportador. Una de las variantes más estudiadas de este gen es G80A. Se trata de un polimorfismo común no sinónimo en el exón 2, el cual resulta en la sustitución de histidina por arginina en el residuo 27 de la secuencia de la proteína. El impacto del cambio de aminoácidos en la función de la proteína no es claro, probablemente esta proteína transportadora tiene menos afinidad por las formas reducidas de los folatos, incluyendo el metotrexato (Lin and Scott, 2012; Niedzielska et al., 2013).

Se estima que la frecuencia de los genotipos entre caucásicos puede encontrarse entre: GG = 0.29, GA = 0.473, AA = 0.237. La frecuencia del alelo A es de 0.473 en caucásicos, 0.564 en africanos americanos y 0.472 en hispanos(Lin and Scott, 2012).

El polimorfismo de RFC1 G80A está asociado con los resultados del tratamiento en LLA y últimamente ha sido asociado con las concentraciones plasmáticas de MTX en pacientes con LLA (Imanishi et al., 2007).

Diversos estudios clínicos han tratado de demostrar si existe alguna asociación entre esta variante con los niveles plasmáticos de MTX y los resultados en niños con LLA. Los resultados encontrados muestran que los niños con genotipo AA tienen mayor cantidad de eventos adversos y un peor pronóstico que los pacientes con el genotipo GG. Adicionalmente se ha determinado que los pacientes portadores del genotipo AA presentan niveles más altos de metotrexato en plasma que los pacientes con los genotipos GG y GA (Laverdière et al., 2002; Lin and Scott, 2012).

Otro estudio fue realizado en pacientes tratados semanalmente con bajas dosis de MTX para Artritis Reumatoide. Los resultados muestran que el genotipo AA está asociado con niveles más altos de poliglutamatos del MTX (metabolitos activos del MTX) comparado con los genotipos GG y GA (Lin and Scott, 2012).

Dihidrofolato Reductasa (DHFR)

Uno de los principales blancos del MTX es la inhibición de la DHFR; se trata de una oxidoreductasa que se encarga de reducir el ácido dihidrofólico a ácido tetrahidrofólico. El mecanismo de acción del MTX se basa en la inhibición de la DHFR la cual resulta en la disminución de las formas reducidas del tetrahidrofolato, lo que contribuye a la

inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y favoreciendo la muerte celular (Hess and Khasawneh, 2015).

Desafortunadamente el uso clínico del MTX está asociado a toxicidad. HD-MTX son requeridas para inducir la inhibición celular completa de la DHFR, como consecuencia de esto se incrementa la frecuencia y severidad de estos efectos (Hess and Khasawneh, 2015).

Una parte de los pacientes desarrollan resistencia al MTX o efectos adversos que pueden impedir la eficacia del tratamiento, lo que ocasiona la reducción de las dosis del fármaco o la retirada del mismo (Dulucq et al., 2011).

La DHFR juega un papel importante en la resistencia al MTX. En ensayos experimentales y clínicos se han encontrado niveles alterados de DHFR o la disminución de la formación de los complejos MTX-DHFR, los cuales se han encontrado en pacientes con recaídas y en células que manifiestan un fenotipo de resistencia al MTX. Los cambios en los niveles de expresión de la DHFR y sensibilidad al MTX pueden deberse a polimorfismos genéticos particularmente aquellos localizados en elementos reguladores (Dulucq et al., 2011).

Existen diversos polimorfismos identificados en la DHFR relacionados con su actividad, sin embargo uno de los polimorfismos menos estudiados es el de la delección de 19 pares de bases (del 19 pb), esta se localiza en el intrón número 1 y presenta influencia en los desórdenes dependientes de los niveles de folatos (Dulucq et al., 2011).

Algunos estudios han reportado que el polimorfismo de la delección está asociado con toxicidad en adultos ya que los portadores homocigotos de la delección de 19 pb está relacionada con el incremento en el riesgo de toxicidad hepática (Ongaro et al., 2009).

El riesgo de toxicidad hepática se ha relacionado principalmente con un desbalance en el ciclo de los folatos a través de la homocisteína; existe evidencia en donde se incrementa la homocisteína después de la administración de metotrexato. El exceso de homocisteína puede producir lesión hepática por varios mecanismos, que incluyen la sensibilización de la célula al efecto citotóxico de agentes o situaciones que inducen estrés oxidativo (Toscano et al., 2010).

Justificación

El MTX es uno de los fármacos empleados durante las fases de consolidación y mantenimiento para el tratamiento de LLA en pacientes pediátricos, desafortunadamente existe un gran riesgo de que se presenten reacciones adversas debido a la toxicidad del fármaco. Este tipo de problemas son el resultado de la falta de monitorización de las concentraciones plasmáticas del fármaco, las cuales resultan de gran importancia para poder saber si el paciente se encuentra en riesgo de sufrir algún efecto adverso ocasionado por altas concentraciones remanentes del fármaco ocasionadas por una disminución en la excreción o un metabolismo lento.

Por otro lado también existen fallas en el tratamiento ocasionadas por la resistencia de las células neoplásicas ya que las concentraciones plasmáticas del MTX no son las suficientes para alcanzar el efecto terapéutico.

Este tipo de diferencias farmacocinéticas de cada uno de los pacientes residen en las variaciones genéticas de los genes involucrados en su metabolismo del MTX, mismas que pueden ser usadas como un dato predictor de los resultados de la quimioterapia o como factores que pueden ayudar a modificar los regímenes de dosificación de los pacientes para lograr los objetivos del tratamiento.

La determinación de los polimorfismos de RFC1 y DHFR es de gran importancia, ya que junto con la determinación de los parámetros farmacocinéticos se pueden mejorar los resultados del tratamiento y predecir el riesgo de toxicidad de cada uno de los pacientes logrando un tratamiento efectivo y con una menor cantidad de efectos adversos.

Hipótesis

Los pacientes con LLA y el genotipo RFC1 (80AA) presentarán una mayor concentración plasmática de metotrexato, mientras que los pacientes con el genotipo DHFR homocigoto (del 19 pb) presentarán un mayor riesgo de toxicidad hepática.

Objetivo

Determinar la relación entre los parámetros farmacocinéticos de C_{ss} , Cl_T y $t_{1/2}$ con los efectos adversos del MTX, así como con los polimorfismos de RFC G80A y DHFR del 19 pb en una población infantil con LLA.

Objetivos particulares

- Determinar los parámetros farmacocinéticos de C_{ss} , Cl_T y $t_{1/2}$ del MTX en una población infantil con LLA que se encuentra en la segunda fase de consolidación.
- Identificar el genotipo del gen RFC G80A en los pacientes con LLA.
- Identificar el genotipo del gen de la delección DHFR del 19 pb en los pacientes con LLA.
- Analizar la relación entre los polimorfismos de los genes de RFC y DHFR con los parámetros farmacocinéticos y el efecto hepatotóxico del MTX.

Material y métodos

• Población de estudio

Pacientes pediátricos con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda por el Servicio de Hemato-Oncología del Hospital para el Niño del Instituto Materno Infantil del Estado de México, que sean tratados con altas dosis de metotrexato (2 g/m^2) durante su primer ciclo de consolidación que previamente dieron su consentimiento y asentamiento informado para la participación en este estudio. La determinación de los parámetros farmacocinéticos se realizó durante el tratamiento con metotrexato. Adicionalmente los pacientes estuvieron sujetos a los criterios de inclusión, exclusión o eliminación durante todo el proyecto.

- **Criterios de inclusión**

Se incluyeron en el estudio a los pacientes que cumplieron los siguientes criterios:

-Pacientes con diagnóstico confirmado de LLA por morfología, inmunofenotipo y biología molecular por el servicio de hemato-oncología.

-Pacientes de entre 0-16 años de edad de ambos sexos.

-Pacientes que previo consentimiento y asentamiento decidan participar en el Proyecto de Investigación.

-Cumplir con los siguientes criterios previos a su ingreso a fase de consolidación:

1. Médula ósea en M1 (menos 5% de células linfoblásticas identificados en el aspirado).

2. Datos clínicos no infiltrativos (ganglios no palpables, hepatomegalia y esplenomegalia ausentes, liquido cefaloraquídeo negativo a células linfoblásticas).

3. Biometría hemática sin datos de neutropenia, anemia, plaquetopenia o linfopenia.

- **Criterios de exclusión**

Se excluyeron en el estudio a los pacientes que no cumplieron los siguientes criterios:

-Presentar alguna enfermedad genética asociada al metabolismo de los folatos.

-Presentar síndrome metabólico, complicación hepática, complicación renal o infecciones de vías urinarias antes de la fase de recolección.

- **Criterios de eliminación**

Se excluyeron en el estudio a los pacientes que no cumplieron los siguientes criterios:

-No haber completado en tiempo y forma el apego a la terapia de consolidación para LLA.

-Pacientes cuyas muestras biológicas no fueron suficientes para el análisis o no estuvieron recolectadas en los tiempos y forma definidos en la descripción del procedimiento.

-Presentar complicación hepática, renal o infecciones de vías urinarias durante la fase de recolección.

-Decisión del paciente de salir del estudio.

-Haber cumplido 16 años antes de la fase de consolidación.

Cuantificación de MTX

La medición del MTX se realizó obteniendo las concentraciones a las 0, 12, 24, 36, 48 y 72 h después de iniciada la infusión del fármaco; la dosis del fármaco administrado fue de 2 g, con una dosis de carga de 400 mg correspondiente al 20% en la primera hora y el 80% restante en 23 horas junto con la infusión constante.

La cuantificación se realizó mediante el método EMIT (Enzyme Multiplied Immuno Assay), cuyo principio se basa en la competencia entre el MTX de la muestra y el MTX marcado con la enzima Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) por los sitios de unión de un anticuerpo anti-MTX. La actividad enzimática disminuye cuando se une al anticuerpo, así que la concentración del fármaco en la muestra puede medirse de forma indirecta en términos de actividad enzimática. La enzima activa convierte la NAD^+ a NADH (nicotinamida adenina dinucleótido), resultando en un cambio de absorbancia que es medido espectrofotométricamente a 339 nm.

Calibración

La medición de las concentraciones de MTX requirieron de una calibración previa del equipo, la cual se realizó para cada lote de reactivos o bien cada 30 días. La calibración del equipo consta de la determinación de dos curvas de calibración, se nombran como MTX para concentraciones altas y MTX bajo para concentraciones más bajas de MTX.

La primera curva MTX se realizó con concentraciones de 0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 $\mu\text{mol/L}$, adicionando 100 μL de cada uno de los reactivos en una cubeta diferente, las cuales se colocaron en los espacios marcados por el equipo y se procedió a realizar la determinación.

Para la segunda curva de calibración MTX Low se utilizaron concentraciones de 0, 0.02, 0.05, 0.2, 0.5 y 1.0 $\mu\text{mol/L}$, para la obtención de esta curva se colocaron 100 μL de los reactivos con 0, 0.2, 0.5, 1 $\mu\text{mol/L}$ en una cubeta cada uno, mientras que para obtener las concentraciones de 0.02 y 0.05 $\mu\text{mol/L}$ se diluyeron 1:10 en buffer de reacción las soluciones de 0.2 y 0.5 $\mu\text{mol/L}$ respetivamente, mismas que se colocaron en los espacios marcados por el equipo y se procedió a realizar la determinación.

Controles

Cada vez que se procesó una muestra se utilizaron controles con intervalos específicos de concentración conocida para cada una de las muestras con el objetivo de asegurar la

veracidad de las determinaciones, estos intervalos se describen en la Tabla 3, para el lote de controles utilizados en el estudio.

Tabla 3. Controles utilizados para la curva MTX

Control	Rango de detección
1	0.31-0.46 $\mu\text{mol/L}$
2 (Dil 1:6)	1.14-1.42 $\mu\text{mol/L}$
3	0.97-1.43 $\mu\text{mol/L}$

Tabla 4. Controles utilizados para la curva MTX Low

Control	Rango de detección
1 (Dil 1:10)	0.114-0.42 $\mu\text{mol/L}$
2	0.309-0.463 $\mu\text{mol/L}$

Muestras

Para la medición de MTX se requirió una muestra de 5 mL de plasma con EDTA como anticoagulante el cual fue protegido de la luz. Las muestras fueron recolectadas a las 0, 12, 24, 36, 48 y 72 h. Los tubos fueron centrifugados a 2,500 rpm durante 15 min, se retiró el plasma con una pipeta y fueron guardadas en un tubo protegido de la luz y posteriormente se congelaron a -20°C ; todos los plasmas fueron procesados hasta que se obtuvo la muestra correspondiente a las 72 h. En caso de ser necesario, las muestras fueron diluidas para que sus lecturas se ajustaran a las obtenidas en la curva de calibración.

Obtención de los datos farmacocinéticos

Los datos farmacocinéticos de C_{ss} , Cl_T y $t_{1/2}$ se obtuvieron de manera manual utilizando un modelo bicompartamental de una administración intravenosa (Galinsky and Svensson, 2006).

Extracción de DNA

La obtención de DNA se obtuvo mediante el método de columna de acuerdo a las condiciones del fabricante (High Pure PCR Template Preparation Kit® Roche) (Anexo 1).

Cuantificación de DNA

Para determinar la pureza del DNA genómico se evaluó la relación entre las absorbancias a 260/280 nm y 260/230 nm, mientras que la concentración es proporcionada por el equipo (Nanophotometer Pearl-IMPLEN). Es necesario calibrar el

equipo para la determinación de los resultados, usando el Elution Buffer como referencia.

Calibración del equipo.

1. Colocar 2 μL de Elution Buffer en la celda.
2. Colocar la tapa marcada con 10 lid.
3. Presionar el botón Blank, el resultado debe ser igual a 0.
4. Limpiar el Elution Buffer de la tapa con una gasa.
5. Colocar 2 μL de la muestra eluida de DNA en la celda.
6. Reportar el resultado.

- **Prueba para la evaluación de la amplificación del DNA genómico**

Para determinar que la calidad de cada una de las muestras fuera la adecuada para los posteriores análisis moleculares se realizó una prueba de amplificación por PCR del gen ESR1 con las condiciones de reacción mostradas en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de reacción del gen ESR1 para la identificación de la amplificación del DNA genómico.

Reactivo	Concentración	Concentración de reacción	Volumen de reacción (μL)
dNTP's	25 mM	500 μM	0.5
DNA polimerasa	5 U/ μL	1 U/ μL	0.2
OligoESRI-21	12.5 mM	500 nM	1
OligoESRI-22	12.5 mM	500 nM	1
Buffer	10X	1X	2.5
Q-solution	5X	1X	5
Agua	-	-	13.8
DNA	30 -100 ng/ μL	100 ng	1
Volumen final			25

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94 °C por 15 min inicialmente y 30 ciclos a 94 °C por 30 s, 57 °C por 30 s, 72 °C por 30 s y final 72 °C por 10 min. El producto de PCR fue analizado en un gel de agarosa al 1.5%.

- **Genotipificación del gen RFC G80A**

La genotipificación del polimorfismo RFC G80A se realizó mediante PCR en tiempo real con el uso de los oligonucleótidos (Tabla 6), las sondas (Tabla 7) y las condiciones de amplificación reportadas en la Tabla 8 utilizando el equipo LightCycler 2.0 de la

marca Roche®. Para validar los resultados, el procedimiento se realizó por duplicado de forma independiente.

La genotipificación del gen RFC1 se realizó mediante sondas Taqman, cuyo principio se basa en la detección de la fluorescencia que es detectada por el termociclador cuando el fluoróforo que se encuentra unido a la sonda es liberado, ya que ésta ha sido incorporada a la secuencia de interés. Se trata de un método altamente específico, debido a que las sondas están diseñadas de manera que hibriden solo con la región específica, además es un método cuantitativo en donde la fluorescencia detectada por el equipo es proporcional al fluoróforo liberado y a la cantidad de DNA presente en la muestra.

Tabla 6. Secuencias de cada uno de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del polimorfismo gen RFC G80A.

Nombre	Secuencia
RFC1_Fw	5'GTG GAA CCT GGG CCT GAC'3
RFC1_Rv	5'GTG ATG AAG CTC TCC CCT G'3

Tabla 7. Secuencias de cada uno de las sondas Taqman utilizadas para la identificación del polimorfismo gen RFC G80A.

Sonda	Secuencia
RFC1Taq_A	5' [FAM] TCC TGG CGG CAC CTC GTG TGC [BHQ1] '3
RFC1Taq_G	5' [HEX] TCC TGG CGG CGC CTC GTG TGC [BHQ1]'3'

Tabla 8. Condiciones de reacción del DNA genómico para la determinación del polimorfismo de RFC1 G80A con sondas Taqman.

	Concentración inicial	Concentración de reacción	Volumen de reacción (µL)
Buffer	5X	1X	2.5
OligoFw	12.5 mM	0.5 µM	0.5
OligoRv	12.5 mM	0.5 µM	0.5
Sonda G	10 mM	0.2 µM	0.25
Sonda T	10 mM	0.2 µM	0.25
Agua	-	-	3.5
DNA	30 -100 ng/µL	100 ng	5
Volumen final			12.5

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, una amplificación de 40 ciclos a 95 °C por 10 s, 58 °C por 20 s y 72 °C

por 10 s, una curva de desnaturalización a 95 °C por 20 s, 40 °C por 20 s y 85 °C por 0 s y finalmente un enfriamiento 40°C por 30 s. El producto de PCR fue determinado por el mismo equipo.

- **Genotipificación del gen DHFR**

Para discernir la delección de 19 pb en el exón 1 de la DHFR se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 9) específicos que amplifican la región de interés con las condiciones descritas en la Tabla 10. Para validar los resultados, el procedimiento se realizó por duplicado de forma independiente.

Tabla 9. Secuencias de cada uno de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del polimorfismo DHFR del 19 pb.

Nombre	Secuencia
DHFR19_Fw	5'TAAGGCACCTGACAAACGGA'3
DHFR19_Rv	5'TCATGGTTGGTTCGCTAAACTG'3

Tabla 10. Condiciones de reacción del DNA genómico para la determinación del polimorfismo de del 19 pb de DHFR

Reactivo	Concentración	Concentración de reacción	Volumen de reacción (µL)
Buffer	10X	1X	2.5
OligoFw	12.5 mM	1 µM	1
OligoRv	12.5 mM	1 µM	1
dNTPs	10 mM	400 µM	1
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5
Q-solution	5X	1X	5
DNA polimerasa	5U/µL	0.5U/µL	0.1
Agua	-	-	11.7
DNA	20ng/µL	40 ng	2
Volumen final			25

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94 °C por 15 min inicialmente y 40 ciclos a 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 30 s y final 72 °C por 10 min. El producto de PCR fue analizado en un gel de agarosa al 3%.

- **Digestión enzimática del amplificado de PCR de la DHFR**

Dentro de los 19 pb que conforman la delección se encuentra la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción KpnI. La restricción de los productos de PCR con esta enzima proporcionó un método para determinar su presencia para cada paciente.

Después de la amplificación, el producto de PCR se precipitó con etanol y acetato de sodio utilizando el siguiente procedimiento:

- Agregar 1/10 parte del volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.2.
- Adicionar 1 μ L de glucógeno.
- Agregar 2.5 partes del volumen de etanol absoluto.
- Incubar por 20 min en el congelador a -20 °C.
- Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 min a 4 °C.
- Retirar el sobrenadante.
- Lavar con etanol al 70 %.
- Dejar secar.

Posteriormente se digirió el producto precipitado del PCR en un volumen de 20 μ L, adicionando 17.9 μ L de agua, 2 μ L de buffer de reacción (10X), junto con 1 U de enzima de restricción KpnI, la mezcla se incubó 37 °C por 18 h; finalmente el producto de la digestión se visualizó en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

- **Obtención de los datos de riesgo de hepatotoxicidad**

Los datos de riesgo de hepatotoxicidad se obtuvieron a partir de los resultados de enzimas hepáticas TGO (transaminasa glutámico oxalacética ó Aspartato aminotransferasa) y TGP (transaminasa glutámico pirúvica ó Alanina aminotransferasa); los valores de enzimas hepáticas que se determinaron dentro las 3 semanas posteriores al ciclo de quimioterapia utilizando el equipo Unicel DxC 600 Beckman Coulter®.

- **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó una prueba de Kolmogorov- Smirnov para determinar si los datos se ajustaban a una distribución normal; el resultado obtenido demostró que los datos no presentaban una distribución normal, por lo que se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para evaluar la relación de los genotipos y las variables farmacocinéticas o hepáticas, en donde las muestras fueron tratadas como datos no apareados y los grupos se trataron de manera independiente. En esta prueba los datos se consideraron como confiables si tienen un valor de p menor o igual 0.05.

Los datos de genotipificación y la clasificación de grado de hepatotoxicidad fueron agrupados y sus frecuencias calculadas para realizar tablas de contingencia de 2x2 en las que se realizó un análisis utilizando la prueba de χ^2 para obtener intervalos de confianza (ICs) del 95% para cada polimorfismo. Se consideró que un valor de $P \geq 0,05$ era estadísticamente significativo.

Las pruebas estadísticas fueron realizadas con la ayuda del programa GraphPad Prism 6.

Resultados

Se analizaron las muestras de 16 pacientes de la unidad de Hemato-Oncología del Hospital para el Niño del IMIEM; la población estudiada fue de 56.25 % del género masculino entre los 2 a 15 años y 43.75 % del género femenino entre los 3 a 14 años.

- **Pureza y concentración del DNA**

Los resultados de la pureza y concentración de cada una de las muestras de DNA genómico analizado se encuentra reportada en la Tabla 11, en donde se puede apreciar que la relación de las absorbancias 260/280 nm y 260/230 nm en su gran mayoría están por encima del 1.8 que teóricamente son considerados de buena calidad (ThermoScientific, 2011), al igual que la concentración de DNA genómico que en todos los casos es mayor a 30 ng/μl.

Tabla 11. Pureza y concentración del DNA

Número	Código	Abs 260/280 nm	Abs 260/230 nm	Concentración (ng/μl)
1	001-KMG	1.833	2.444	32.9
2	002-NCC	1.865	2.3	34.4
3	003-CMMQ	1.852	2.050	143
4	004-YRJ	1.945	1.981	53.4
5	005-ENCT	1.875	1.969	157
6	006-CUMG	1.862	1.964	108
7	007-LDGM	1.865	1.845	89.3
8	008-JLVM	1.889	2.078	93.3
9	009-MAR	1.878	2.081	38.4
10	0010-ALC	1.870	1.870	42.9
11	0011-EGC	1.845	1.136	31.4
12	0012-JB	1.816	1.34	68.9
13	0013-EGM	1.915	14.7	33.9
14	0014-MAOM	1.82	2.462	31.9
15	0015-CSFG	1.785	1.458	57.9
16	0016-ABSEC	1.889	2.157	73.9

- **Prueba de integridad del DNA**

Para la determinación de la integridad del DNA se realizó una prueba de electroforesis en gel de agarosa al 2%, con la cual se demostró la presencia de DNA de alto peso molecular ya que al compararlo con el marcador se demostró que el DNA presenta un mayor tamaño, esto indica que el DNA genómico no se encuentra degradado y se consideró apto para su utilización en las pruebas de amplificación por PCR como se muestra en la Figura 2.

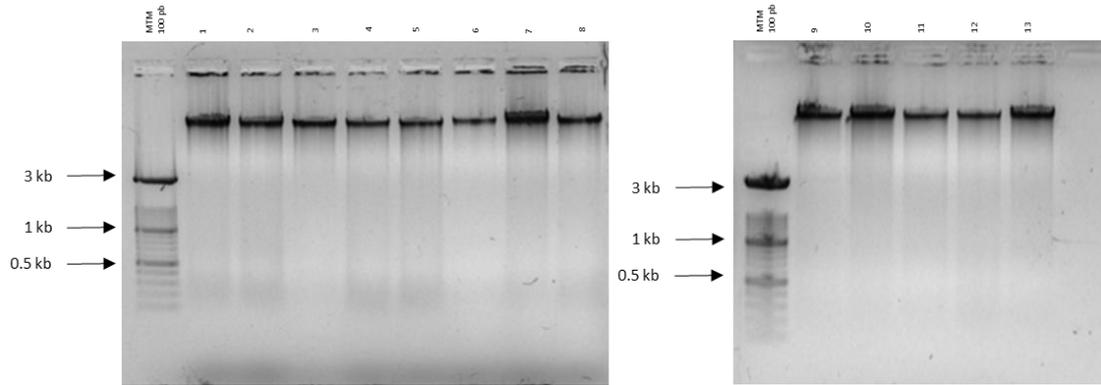


Figura 2. Prueba de verificación de la integridad del DNA. Imagen de un gel de agarosa al 2 % en donde se observan los fragmentos de DNA y el marcador de 100 pb.

- **Prueba de amplificación del DNA**

Las diferentes variaciones en las determinaciones de concentración y pureza pueden representar alguna dificultad en las pruebas de genotipificación, ya que algunas muestras presentan mejor concentración y pureza que otras, por lo que fue necesario realizar una prueba de amplificación del DNA genómico por PCR punto final antes de proceder a la genotipificación de los polimorfismos.

Para realizar esta determinación se amplificó el promotor del gen ESRI, en donde se esperaba que todas las muestras tuvieran el producto de amplificación, cuyo tamaño de 300 pb se visualizó en un gel de agarosa al 2%, con la cual se demostró que todas las muestras de DNA genómico tenían la suficiente integridad y pureza para ser amplificables y óptimas para ser utilizadas para el resto de las pruebas como se muestra en la Figura 3.

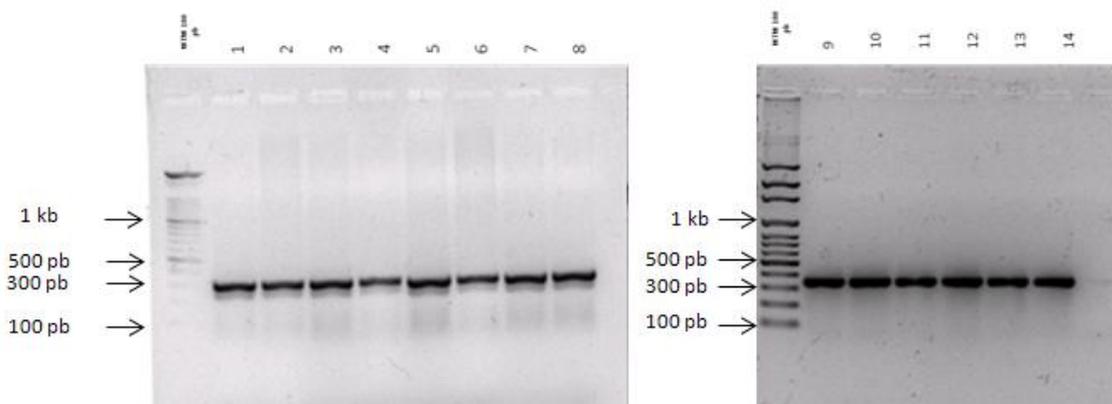


Figura 3. Prueba para la determinación de la amplificación del DNA. Imagen de dos gels de agarosa al 1.5 % en donde se observa el producto de amplificación de ESRI (300 pb) y el marcador de 100 pb.

- **Genotipificación del gen RFC1**

En la Figura 4 se encuentra la representación gráfica de los resultados de PCR en tiempo real; las sondas presentan fluorescencia específica que es captada por el termociclador, el genotipo se obtiene al identificar la relación de la fluorescencia que presenta de acuerdo a la sonda Taqman que es hidrolizada durante la amplificación, tomando como referencia el control negativo, el cual no presenta fluorescencia se puede identificar el genotipo de cada muestra debido a que el resultado de la relación 560/530 nm se encuentra a la mitad del plano, al igual que aquellas muestras de los individuos heterocigotos al polimorfismo (GA); por otro lado aquellos individuos que presenten un genotipo homocigoto a GG tienen una relación 560/530 nm que se identifica en el plano superior y finalmente aquellos individuos con un genotipo AA con relación 560/530 nm se localizan en el plano inferior de la escala.

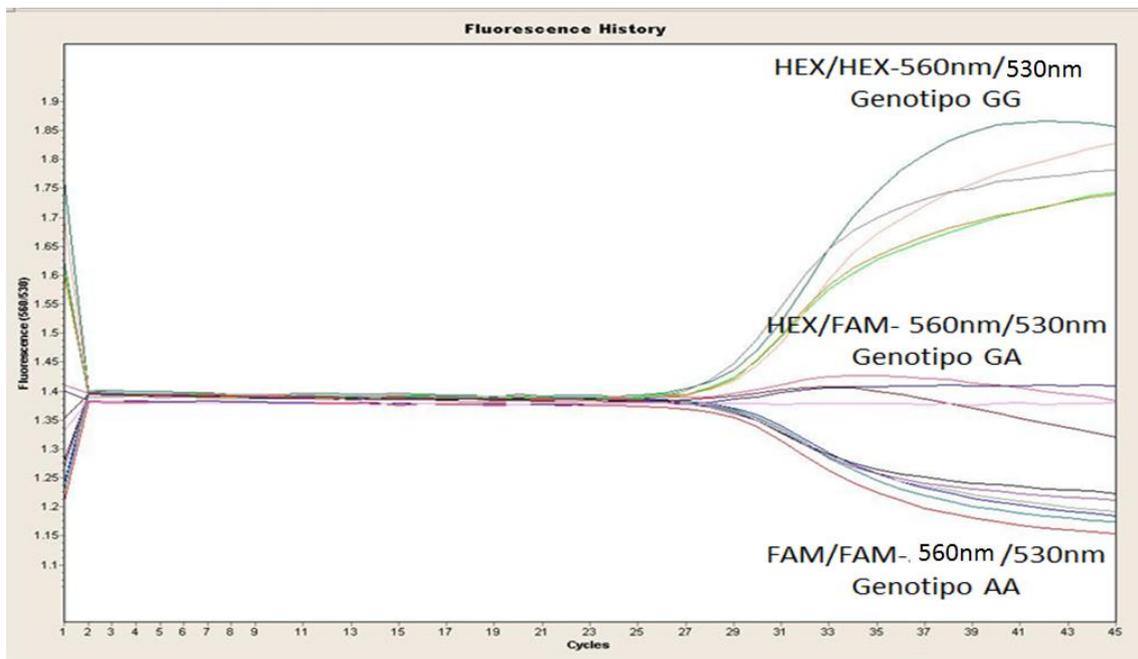


Figura 4. Representación gráfica de los resultados de genotipificación del Transportador de Folatos Reducidos (RFC G80A) mediante PCR en tiempo real.

Los resultados de emisión de fluorescencia, obtenidos a partir de cada una de las muestras de DNA genómico, permitieron identificar el genotipo de cada uno de los individuos, los cuales se encuentran reportados en la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados del genotipo del polimorfismo del Transportador de Folatos Reducidos (RFC G80A).

Número	Código	Genotipo
1	001-KMG	AA
2	002-NCC	GG
3	003-CMMQ	AA
4	004-YRJ	AA
5	005-ENCT	GA
6	006-CUMG	GG
7	007-LDGM	GA
8	008-JLVM	AA
9	009-MAR	GG
10	0010-ALC	AA
11	0011-EGC	GG
12	0012-JB	AA
13	0013-EGM	GA
14	0014-MAOM	GG
15	0015-CSFG	GG
16	0016-ABSEC	GA

De acuerdo a los resultados obtenidos de la prueba de PCR en tiempo real, se pudo identificar los genotipos del polimorfismo de RFC G80A en donde se puede observar que la frecuencia del polimorfismo GG se encuentra en el 37.5% de la población, al igual que el polimorfismo AA, mientras que el polimorfismo GA tienen una frecuencia del 25%. Con base a los resultados se encontró que la frecuencia del alelo A es de 0.5 en esta población infantil tal y como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Frecuencias de los polimorfismos de RFC G80A en la población infantil

Genotipo	Número	Porcentaje
GG	6	37.5
GA	4	25.0
AA	6	37.5

- **Genotipificación del gen de la enzima Dihidrofolato reductasa (DHFR)**

Para la determinación del polimorfismo de la del 19 pb DHFR, se visualizó el producto del PCR en gel de agarosa al 3%, con la cual se identificó a los portadores de la delección como se muestra en la Figura 5, en donde se aprecia que aquellos individuos que son homocigotos a la delección, presentan una sola banda de 380 pb, mientras que los individuos que son heterocigotos a la delección presentan dos bandas una de 380 pb y otra de 400 pb, finalmente aquellos que son homocigotos a la inserción, presentan una sola banda de 400 pb.

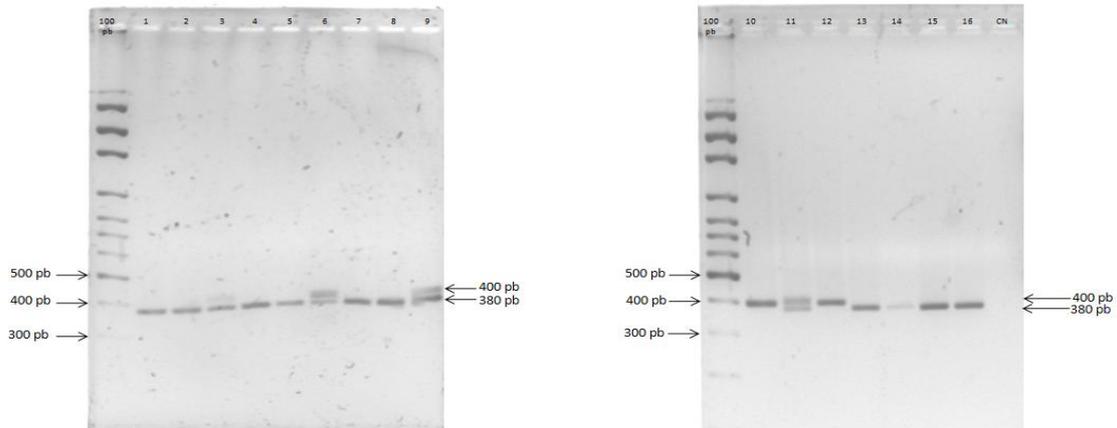


Figura 5. Productos de la amplificación del gen de DHFR en donde puede visualizarse la del 19 pb en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio.

En la Figura 6, se aprecian los productos de la digestión enzimática con KpnI; la obtención de dos productos a partir de la digestión enzimática es posible ya que aquellas secuencias que no presentan la del 19 pb serán susceptibles a la actividad de la endonucleasa. La determinación del polimorfismo se basa en la presencia de una banda de 380 pb para los individuos que son portadores de la deleción de 19 pb, mientras que aquellos individuos que presenten dos bandas de 147 pb y 253 pb no son portadores de la deleción.

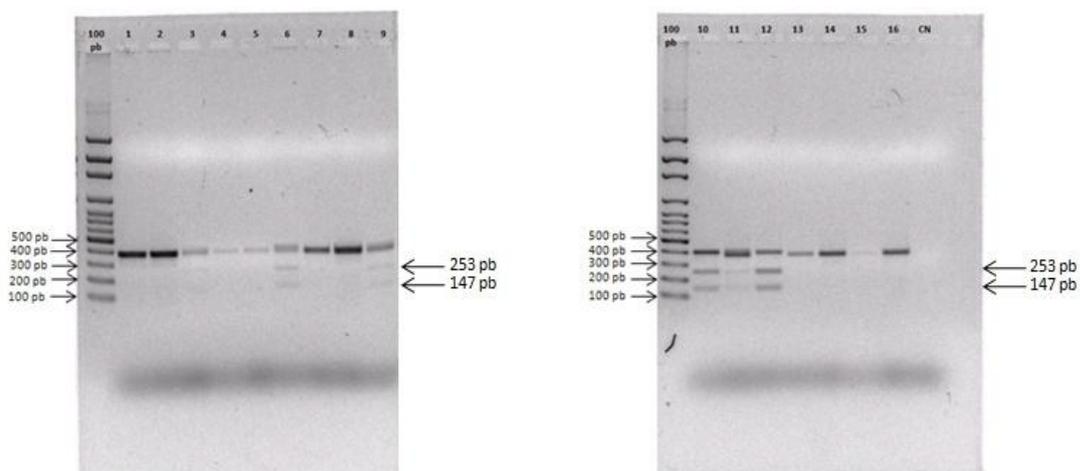


Figura 6. Productos de la digestión enzimática con KpnI, los cuales se visualizaron en gel de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio.

Con base a los resultados obtenidos a partir de los geles de agarosa, se hizo la clasificación de los genotipos correspondientes a la del 19 pb, los cuales se clasificaron como positivos o negativos a la deleción, estos se encuentran reportados en la Tabla 14.

Tabla 14. Resultados del genotipo del polimorfismo de la del 19 pb de DHFR

Número	Código	Del 19 pb
1	001-KMG	+/+
2	002-NCC	+/+
3	003-CMMQ	+/-
4	004-YRJ	+/+
5	005-ENCT	+/+
6	006-CUMG	+/-
7	007-LDGM	+/+
8	008-JLVM	+/+
9	009-MAR	+/-
10	0010-ALC	-/-
11	0011-EGC	+/-
12	0012-JB	-/-
13	0013-EGM	+/+
14	0014-MAOM	+/+
15	0015-CSFG	+/+
16	0016-ABSEC	+/+

A partir de la prueba de PCR punto final fue posible identificar los genotipos del polimorfismo DHFR del 19 pb en donde se puede ver que la frecuencia del polimorfismo (+/+) del 19 pb se encuentra en el 62.5 % de la población, mientras que el polimorfismo (+/-) del 19 pb tienen una frecuencia del 25 %, finalmente la frecuencia del polimorfismo (-/-) se encuentra en el 12.5 % de la población, los cuales se encuentran reportados en la tabla 15. De acuerdo a los resultados obtenidos, la frecuencia del alelo (+) se encuentra en el 75 % de la población y la frecuencia del alelo (-) está presente en el 25 % de la población.

Tabla 15. Frecuencias del polimorfismo de la del 19 pb de DHFR en la población infantil.

Genotipo	Número	Porcentaje
Homocigotos del 19 pb (+/+)	10	62.5
Heterocigotos del 19 pb (+/-)	4	25
Homocigotos del 19 pb (-/-)	2	12.5

- **Datos de los parámetros farmacocinéticos de los pacientes**

Los parámetros farmacocinéticos del MTX se obtuvieron de manera manual utilizando el modelo bicompartamental de una administración intravenosa en la fase de eliminación.

En la Tabla 16 se encuentran reportados los valores de los parámetros farmacocinéticos de cada uno de los pacientes, obtenidos al término de la infusión del metotrexato. Las

constantes α y β se denominan constantes híbridas de disposición. La constante α rige principalmente el proceso inicial hasta que se alcanza el estado de equilibrio en el estado estacionario; es la constante rápida de distribución. Por otro lado la constante β rige fundamentalmente el proceso una vez que se ha alcanzado el estado de equilibrio, es la constante lenta de eliminación. El volumen de distribución (Vd) representa un valor aparente que permite relacionar la concentración plasmática del fármaco con la cantidad existente en el organismo en un determinado instante, este parámetro fue obtenido en función del peso corporal. El parámetro de concentración plasmática (C_{ss}) describe el valor de la concentración máxima del fármaco en plasma que a su vez es la C_p^o para el modelo bicompartamental que se toma para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos del MTX al término de la infusión (24 h). El aclaramiento también repercute en los valores de la concentración máxima alcanzada. El parámetro de dosis de carga (D_L) representa el 20 % de la dosis del fármaco, la cual se administra en infusión constante durante la primera hora; este parámetro presenta el mismo valor para todos los pacientes, sin embargo debe ser individualizado de acuerdo a la superficie corporal del paciente ya que si administra la misma dosis de carga a todos los pacientes se corre el riesgo de desarrollar toxicidad en un periodo de tiempo más corto (Popović et al., 2015, Luyckx et al., 1985). El parámetro de aclaramiento plasmático (Cl_T) representa el volumen de sangre totalmente depurado del fármaco por unidad de tiempo, por parte del órgano eliminador, que para este caso corresponde al riñón (Ogungbenro and Aarons, 2014). El parámetro (t_{1/2}) indica el tiempo en que una determinada concentración el fármaco se reduce a la mitad de su valor. Los valores de los parámetros de Cl_T y t_{1/2} están estrechamente relacionados ya que si el aclaramiento se ve reducido, el tiempo de vida aumenta, este efecto puede observarse en los casos 2 y 15, por lo que en estos pacientes debe de tenerse especial cuidado ya que se encuentran en riesgo de desarrollar toxicidad por una lenta eliminación y mayor sobreexposición del fármaco. El caso contrario se puede apreciar en los pacientes 6 y 14, en donde un aclaramiento aumentado favorece la eliminación del fármaco del organismo.

Es posible notar que los pacientes con número 1,3, 4, 5, 10, 12 y 13 no presentan valores de los parámetros farmacocinéticos, esto se debe que no fue posible tomar las muestras sanguíneas en todos los tiempos, por lo que los valores no pudieron ser calculados con las pocas muestras recabadas.

Tabla 16. Resultados de los parámetros farmacocinéticos C_{ss} , Cl_T y $t_{1/2}$ del primer ciclo de quimioterapia con altas dosis de MTX en la población infantil ($D_L = 400$ mg).

No.	Edad (años)	Peso (Kg)	α (h-1)	β (h-1)	Vd (L)	C_{ss} ($\mu\text{g/mL}$)	Cl_T (mL/h)	$t_{1/2}$ (h)
1	8	36	-	-	-	9.1948	-	-
2	14	46	0.3435	0.012	8.28	7.5586	99.36	57.7622
3	7	23	-	-	-	14.1416	-	-
4	4	13.5	-	-	-	16.4682	-	-
5	7	34	-	-	-	12.5061	-	-
6	15	58	0.3997	0.0709	10.44	14.1493	824.76	9.7764
7	6	20	0.5257	0.0556	3.6	20.3371	200.16	12.4666
8	4	18	0.3907	0.0674	3.24	15.0301	218.376	10.284
9	12	40	0.2563	0.0303	7.2	49.6048	218.16	22.8761
10	5	18	-	-	-	7.9213	-	-
11	3	14.5	0.375	0.0458	2.61	11.7153	119.538	15.1342
12	6	24.5	-	-	-	10.134	-	-
13	2	14	-	-	-	15.6986	-	-
14	8	37	0.4806	0.0638	6.66	32.2995	424.908	10.8643
15	15	89	0.3803	0.0046	16.02	9.9466	74.1581	104.561 2
16	10	30	0.0349	0.059	5.4	14.1459	318.6	11.7482

α = constante de distribución rápida, β = constante de distribución lenta, Vd= volumen de distribución, C_{ss} = Concentración plasmática en el estado estacionario, D_L = dosis de carga Cl_T = aclaramiento total, $t_{1/2}$ tiempo de vida media.

- **Datos de los perfiles hepáticos de los pacientes**

Para la evaluación del riesgo de toxicidad hepática por MTX se obtuvieron los datos de las enzimas hepáticas posteriores a la administración del fármaco.

Los valores de enzimas hepáticas reportados en la Tabla 17 muestran que para TGO se encuentra un valor promedio de 38 UI/L, es decir dentro del rango normal que va de 10 a 42 UI/L; mientras que para TGP, el valor promedio de 57.75 UI/L se encuentra por encima del valor de referencia que va de 10 a 42 UI/L.

Tabla 17. Resultados de las enzimas hepáticas al finalizar el ciclo de quimioterapia en la población infantil.

Número	Código	TGO (UI/L)	TGP (UI/L)
1	001-KMG	35	52
2	002-NCC	36	58
3	003-CMMQ	34	41
4	004-YRJ	41	51
5	005-ENCT	32	59
6	006-CUMG	21	12
7	007-LDGM	35	31
8	008-JLVM	68	86
9	009-MAR	38	46
10	0010-ALC	43	51
11	0011-EGC	37	107
12	0012-JB	36	15
13	0013-EGM	20	12
14	0014-MAOM	48	106
15	0015-CSFG	60	171
16	0016-ABSEC	21	26
<i>x</i> =		38	57.75

Para identificar el nivel de toxicidad en los pacientes, se clasificó el incremento de enzimas hepáticas y se agruparon en grupos de acuerdo a los Criterios del CTC de toxicidad hepática (Marrow, 1999).

Los datos se reportan en la tabla 18 en donde se identifica que los valores de TGO del 25 % de los pacientes se encuentran en el grado 1 de toxicidad al presentar un incremento de esta enzima. Con respecto a los valores de TGP el 43.75% de los pacientes se clasificaron con toxicidad grado 1 y el 18.75 % con grado 2, se aprecia los valores de TGP se encuentran mucho más elevados que los valores de TGO.

Tabla 18. Clasificación del grado de daño hepático de los pacientes de acuerdo a los Criterios del CTC de toxicidad hepática (Marrow, 1999).

Evento adverso	Grado		
	0	1	2
TGO	10 - 42 UI/L	43 – 105 UI/L	106 – 210 UI/L
Número de pacientes (%)	12 (75)	4 (25)	-
TGP	10 - 42 UI/L	43 – 105 UI/L	106 – 210 UI/L
Número de pacientes (%)	6 (37.5)	7 (43.75)	3 (18.75)

Análisis de estadístico

Para determinar si existe una relación entre el genotipo del gen RFC y un incremento de las transaminasas hepáticas se realizó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney. En la Figura 7 A, B, C se aprecia que no hay diferencias entre los haplotipos de RFC y los niveles de TGO, que se corroboró con la observación de que el valor de p fue mayor a 0.05 para cualquiera de las tres comparaciones (AA vs AG, AA vs GG y AG vs GG). Por otro lado, los resultados muestran que aunque se puede apreciar que los portadores del genotipo GG presentan mayor tendencia al incremento en los valores de TGP que los portadores de los genotipos AA y GA (Figura 7 D, E, F), sin embargo esta tendencia no fue significativa ($p \geq 0.05$).

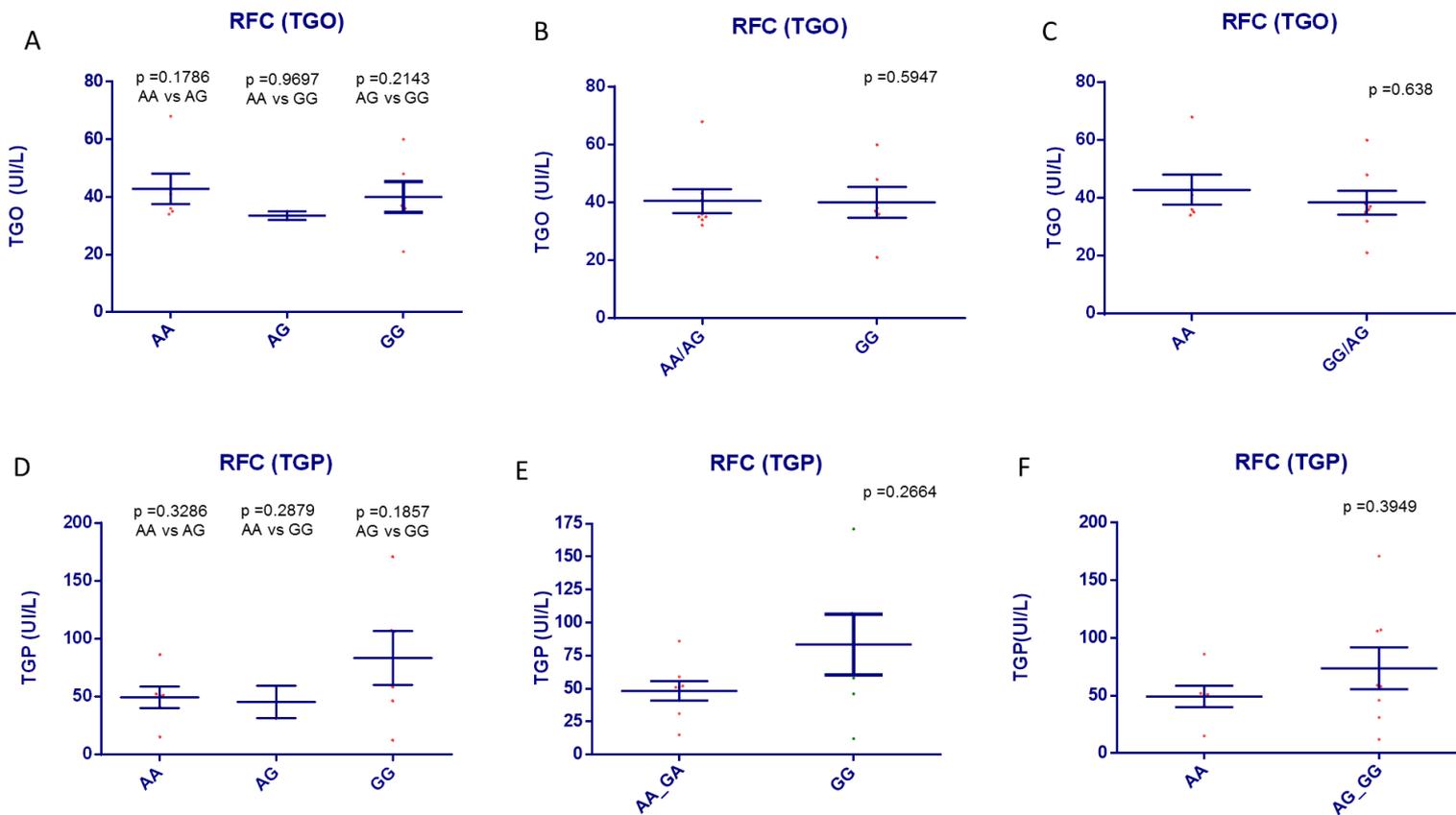


Figura 7. Representación gráfica de los genotipos de RFC y los valores de transaminasas TGO (A, B, C) y TGP (D, E, F). Se muestra la dispersión de los datos con error estándar y los valores de p obtenidos del análisis estadístico realizada entre los grupos analizados.

En la Figura 8 se muestran los resultados de la prueba de Mann-Whitney realizada para determinar si existe relación entre el polimorfismo del gen RFC y los valores de concentración plasmática de metotrexato a las 24 horas (A, B, C) y a las 72 horas (D, E, F); los resultados muestran que no existe relación. Sin embargo se observa que los portadores del genotipo GG muestran tendencia al incremento en la concentración de metotrexato a las 24 h y 72 h (Figura 8. A, B, C, D, E, F).

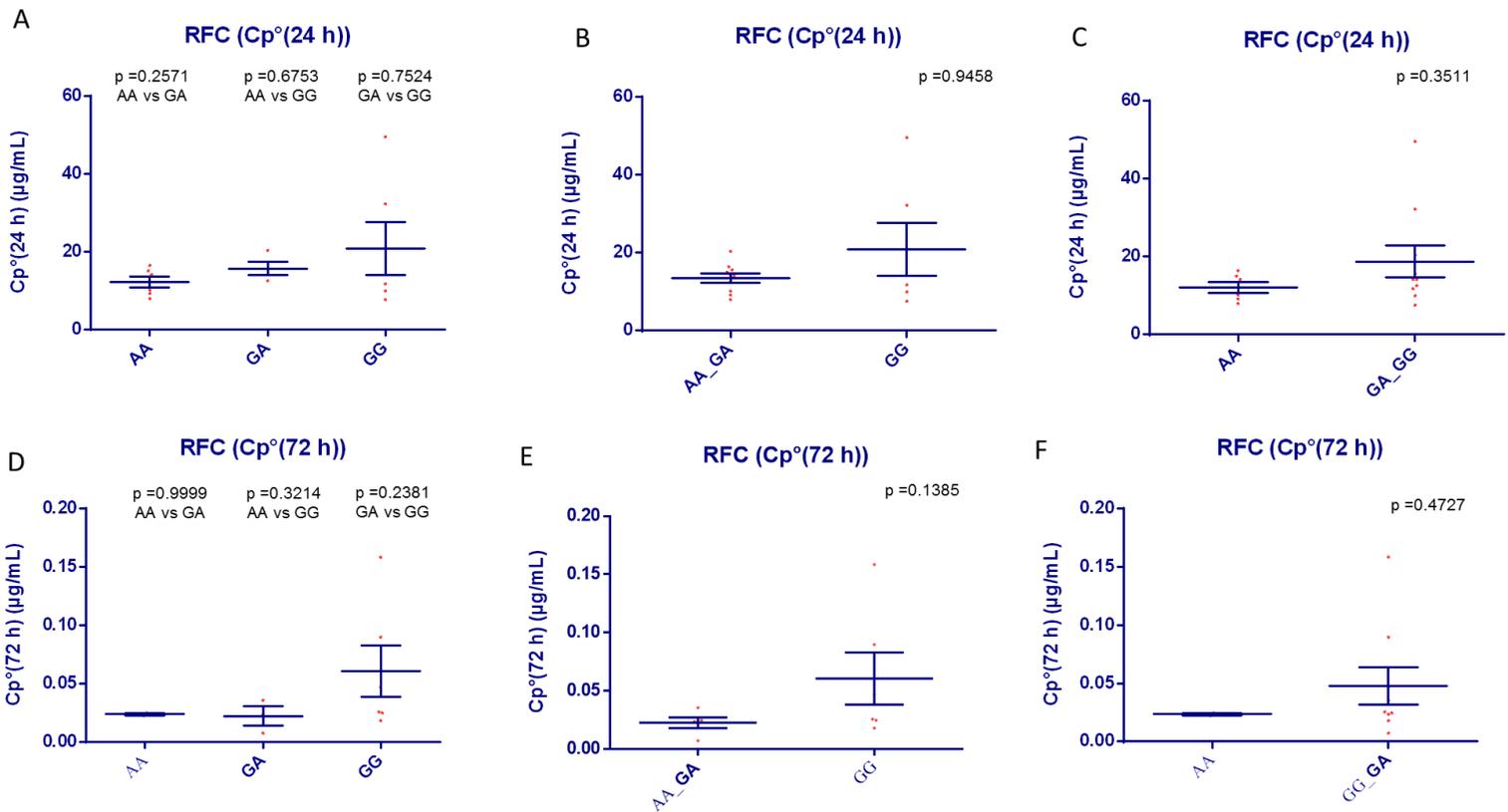


Figura 8. Representación gráfica del genotipo de RFC y los valores de concentración plasmática de metotrexato a las 24 horas (A, B, C) y a las 72 horas (D, E, F). Se muestra la dispersión de los datos con error estándar y los valores de p obtenidos del análisis estadístico realizada entre los grupos analizados.

En cuanto a la relación entre el polimorfismo de RFC y los valores de los parámetros farmacocinéticos de Cl (A) y $t_{1/2}$ (B), la prueba de Mann-Whitney demuestra que no hay alguna diferencia significativa al comparar los genotipos de RFC y los parámetros (Figura 9).

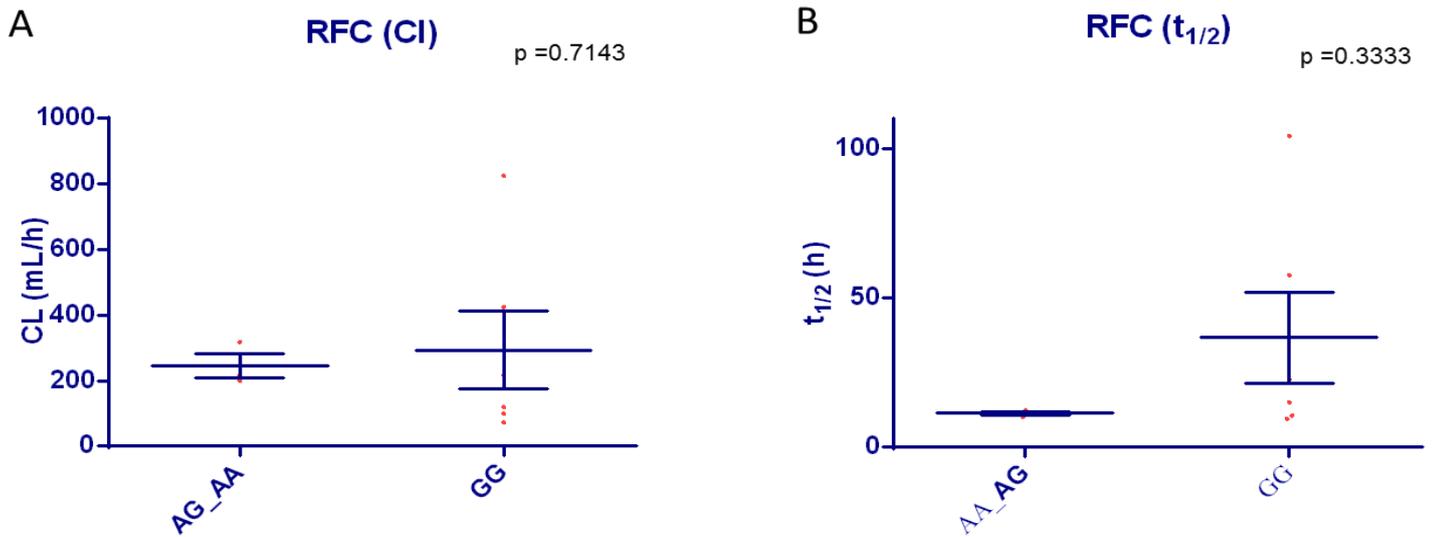


Figura 9. Representación gráfica del genotipo de RFC y los valores de aclaramiento del metotrexato (A) y tiempo de vida media (B). Se muestra la dispersión de los datos con error estándar y los valores de p obtenidos del análisis estadístico realizada entre los grupos analizados.

Para determinar si existe relación entre el polimorfismo de DHFR y una elevación de las transaminasas hepáticas se realizó una prueba de U- Mann-Whitney entre este y los valores de TGP (Figura 10.A, B, C) y TGO (Figura 10.D, E, F); los resultados obtenidos reportan un valor de p mayor a 0.05, por lo que el ser portador heterocigoto de la deleción de 19 pb de DHFR no está relacionado con el incremento de las mismas. Sin embargo se observa que los portadores de la deleción tienden a presentar niveles más elevados de transaminasas.

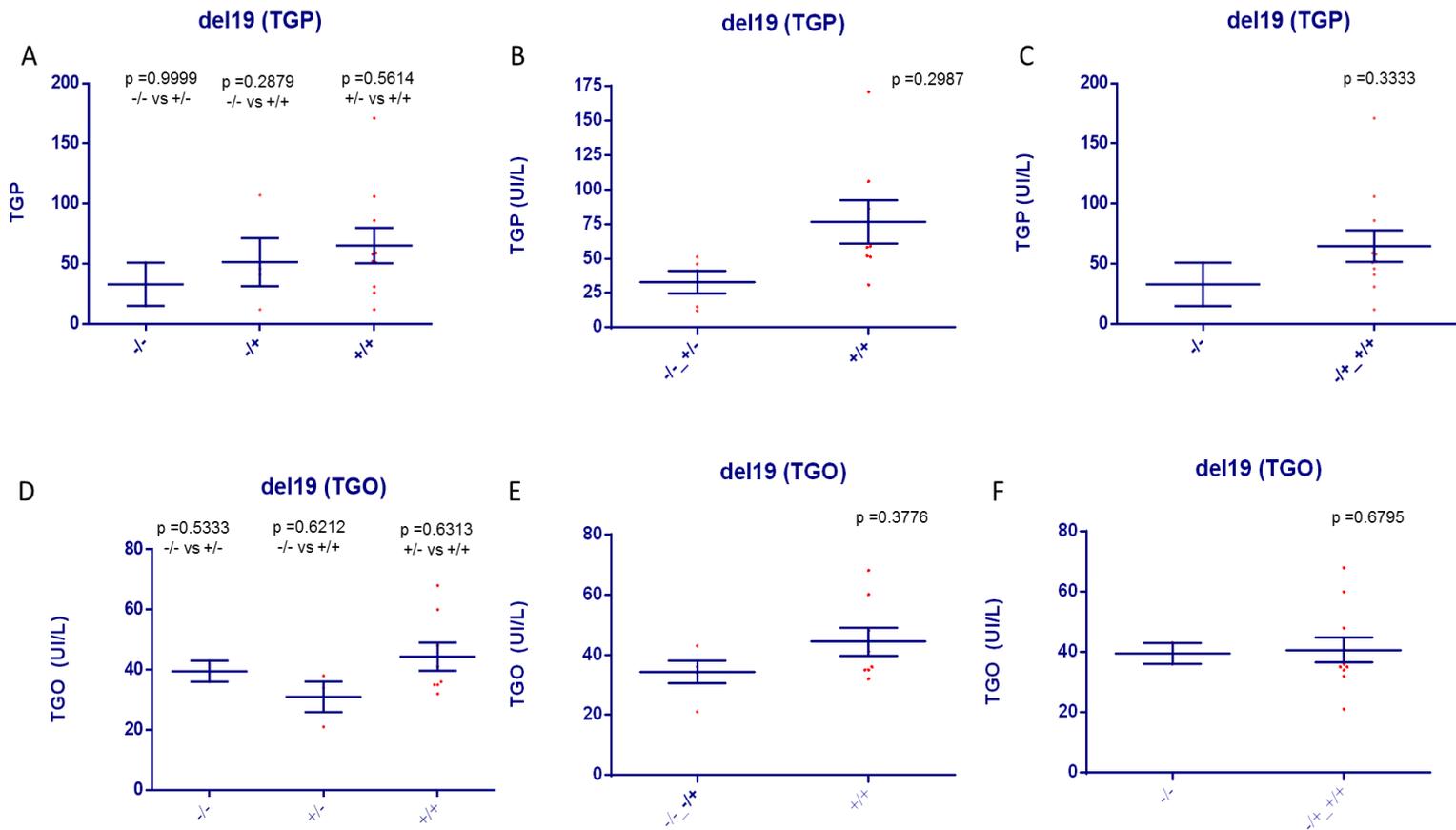


Figura 10. Representación gráfica del genotipo de del 19 pb de DHFR y los valores de transaminasas TGO (A, B, C) y TGP (D, E, F). Se muestra la dispersión de los datos con error estándar y los valores de p obtenidos del análisis estadístico realizado entre los grupos comparados.

En la figura 11 se encuentran representados los resultados de la prueba U-Mann-Whitney para determinar si existe relación entre el polimorfismo de DHFR y los valores de concentración plasmática de metotrexato a las 24 horas (A, B, C) y a las 72 horas (D); los resultados de la prueba muestran que no hay relación al presentar valores p mayores a 0.05.

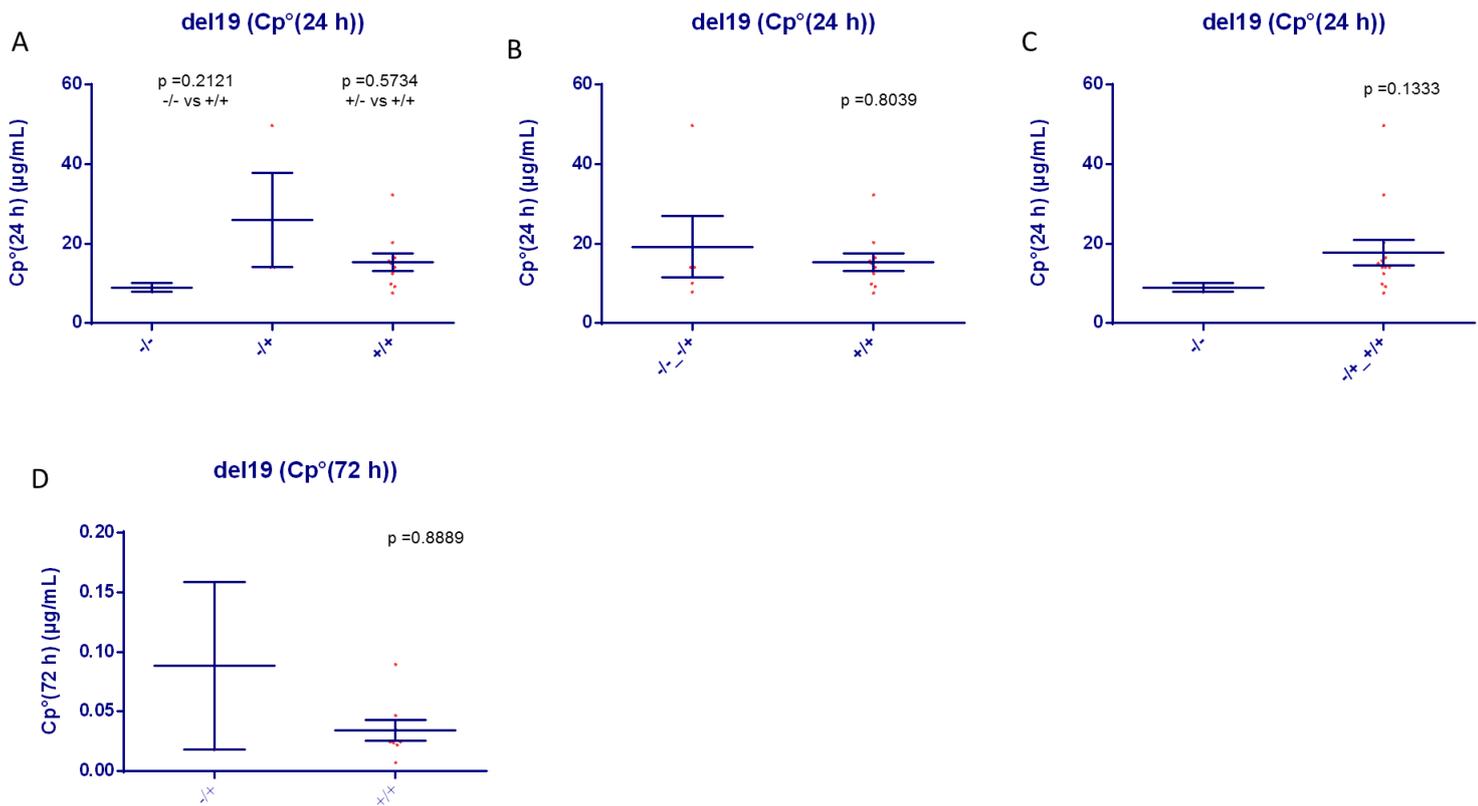


Figura 11. Representación gráfica del genotipo de del 19 pb de DHFR y los valores de concentración plasmática de metotrexato a las 24 horas (A, B, C) y a las 72 horas (D). Se muestra la dispersión de los datos con error estándar y los valores de p obtenidos del análisis estadístico realizada entre los grupos analizados.

Finalmente la prueba de Mann-Whitney para la asociación entre el polimorfismo de del 19 pb de DHFR y los valores de los parámetros farmacocinéticos (Figura 12) de C_l (A) y $t_{1/2}$ (B), demuestra que no existe relación al presentar valores p mayores a 0.05.

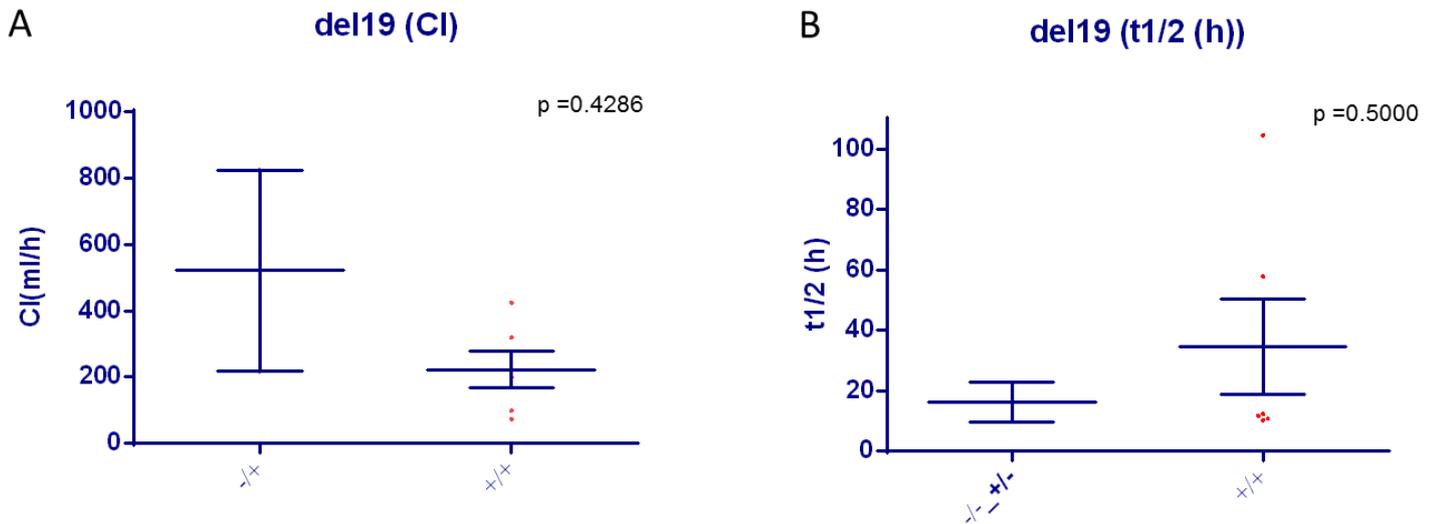


Figura 12. Representación gráfica del genotipo de del 19 pb de DHFR y los valores de aclaramiento del metotrexato (A) y tiempo de vida media (B). Se muestra la dispersión de los datos con error estándar y los valores de p obtenidos del análisis estadístico realizada entre los grupos analizados.

Para determinar si existe relación entre el genotipo del polimorfismo de RFC y los valores de $t_{1/2}$ se agruparon los datos de acuerdo al genotipo y se compararon los valores de media < 12.2 h y > 12.2 h de acuerdo al valor promedio máximo para MTX reportado en la literatura (Bleyer, 1978). Se agruparon en tablas de contingencia y se realizó un análisis de χ^2 , se consideran como significativos aquellos valores de p menores o iguales a 0.05.

Tabla 19. Prueba de χ^2 para el genotipo de RFC y los valores de $t_{1/2}$.

Criterio	$t_{1/2}$	
	Valor de p	OD (IC 95%)
GG, AA vs $t_{1/2}$	0.2123	0.1852 (0.00529-6.481)
GG, GA vs $t_{1/2}$	0.6733	0.5 (0.1113-3.992)
GA, AA vs $t_{1/2}$	0.3865	0.3333 (0.0066-16.82)
GG, GA y AA vs $t_{1/2}$	0.3428	0.25 (0.0132-4.732)

Los resultados obtenidos muestran que no existe relación entre el polimorfismo de RFC y los valores de $t_{1/2}$ del metotrexato.

Por otro lado se buscó la relación entre el polimorfismo de la delección de 19 pb de DHFR con los diferentes grados de toxicidad obtenidos a partir del aumento de los valores de TGP (Tabla 18); los valores se agruparon en tablas de contingencia y se realizó un análisis de χ^2 , se consideran como significativos aquellos valores de p menores o iguales a 0.05.

Tabla 20. Prueba de χ^2 para el genotipo de DHFR y los valores de TGP.

TGP		
Criterio	Valor de p	OD (IC 95%)
+/+, -/- vs grado de toxicidad	0.5839	0.4286 (0.0196-9.371)
+/+, +/- vs grado de toxicidad	0.4805	0.4286 (80.0395-4.64)
-/-, +/- vs grado de toxicidad	1	1 (0.0335-29.83)
+/+, -/- y +/- vs grado de toxicidad	0.4237	0.4286 (0.0527-3.485)

Los resultados obtenidos muestran que no existe relación entre el polimorfismo de la delección y los diferentes grados de toxicidad presentados por los pacientes.

Discusión

El metotrexato es uno de los fármacos más utilizados en todas las fases del tratamiento de LLA. Se han realizado diversos estudios tanto en población infantil como en población adulta para poder identificar si existe alguna relación entre los polimorfismos genéticos encargados del metabolismo del metotrexato asociados con los resultados del tratamiento y pronóstico de LLA (Lin and Scott, 2012; Ongaro et al., 2009).

Usualmente el tratamiento con altas dosis de metotrexato consiste en la administración de la misma cantidad del fármaco a todos los pacientes, y la determinación de la concentración plasmática posterior a las 24 horas tiene como finalidad disminuir el riesgo de toxicidad mediante la administración de rescates con ácido folínico (Hess y Khasawneh, 2015). La variabilidad interindividual ocasiona que las concentraciones plasmáticas del fármaco sean muy inconstantes y no es posible asegurar que estas concentraciones lleguen al estado estacionario del fármaco (C_{ss}) las cuales se encuentran entre 0.0454 a 4.5444 $\mu\text{g/mL}$, o están por encima de él; lo que conlleva a un mayor riesgo de desarrollar efectos adversos ocasionados por una sobreexposición al fármaco (Winograd et al., 1986), y por otro lado un tratamiento ineficaz al no alcanzarse la concentración efectiva para ejercer el efecto terapéutico deseado (Thompson et al., 2007).

Los pacientes estudiados fueron tratados con altas dosis de metotrexato (2 g/m^2) durante su primer ciclo de consolidación en donde se administró una dosis de carga (D_L) correspondiente al 20 % en la primera hora (400 mg) y posteriormente el resto del fármaco se administró en infusión continua hasta las 24 horas.

En este estudio se encontró que existe gran variabilidad en los valores de las concentraciones en el estado estacionario (C_{ss}), el cual se alcanza a las 24 horas. Al término de la infusión, se pudo identificar que en todos los pacientes este parámetro se encuentra incrementado al encontrarse valores de 7.5586 $\mu\text{g/mL}$ como límite inferior y 49.6048 $\mu\text{g/mL}$ como límite superior, lo que representa un mayor riesgo de toxicidad. La variabilidad de este parámetro se basa en los diferentes valores del volumen de distribución, ya que un volumen de distribución menor está relacionado con una mayor concentración del fármaco, por otra parte el aclaramiento también influye en los valores de la concentración máxima alcanzada.

La determinación de los valores de vida media del fármaco son similares a los que se reportan en la literatura, los cuales oscilan entre $10.4 \pm 1.8 \text{ h}$ (Bleyer, 1978), sin

embargo solo en el 44.44 % de los pacientes se encuentra en este rango, mientras que para el 55.56 % este parámetro se encuentra incrementado.

Los valores de los parámetros de $t_{1/2}$ y Cl_T están estrechamente relacionados ya que si el aclaramiento se reduce, el tiempo de vida aumenta. Este efecto puede observarse en algunos de los pacientes en donde se identifica la estrecha relación entre estos dos parámetros, se debe tener precaución ya que estos pacientes se encuentran en riesgo de desarrollar toxicidad por una lenta eliminación y mayor sobreexposición del fármaco; por otro lado también se puede identificar que un aclaramiento aumentado favorece la eliminación más rápida del fármaco del organismo. Los principales factores que pueden modificar estos parámetros farmacocinéticos son la función renal y hepática de los individuos. Estas funciones son de vital importancia ya que son las rutas de eliminación y metabolismo del metotrexato. La alteración de la función renal prolonga la semivida del fármaco dentro del organismo debido a la disminución del aclaramiento renal (Thompson et al., 2007).

La principal ruta de eliminación del metotrexato es la vía renal y en menor grado la hepática, la disminución del aclaramiento renal tiende a aumentar las concentraciones plasmáticas del fármaco dentro del organismo ocasionando una sobreexposición del hígado al fármaco y a sus metabolitos activos que son responsables de la toxicidad en este órgano al ser retenidos por más tiempo (Camps Carlos, 2004). Los parámetros calculados demuestran que en algunos pacientes el $t_{1/2}$ se encuentra aumentado y por lo tanto hay una sobreexposición al metotrexato ya que existe una eliminación mas lenta, sin embargo se carece de los datos que puedan descartar un daño renal previo.

Otro factor importante que suele alterar los valores de los parámetros farmacocinéticos es la retención del fármaco en fluidos extravasculares que también conllevan un aumento en el riesgo de desarrollar efectos adversos (Thompson et al., 2007).

Es importante evaluar los datos farmacocinéticos de concentración plasmática, aclaramiento y tiempo de vida media utilizando como referencia los valores de aclaramiento de creatinina para determinar si existe daño renal previo (Winograd et al., 1986).

Las modificaciones en las dosis, así como la duración de las infusiones tienen como finalidad disminuir las diferencias individuales en la acumulación de MTX ya que los efectos citotóxicos del MTX dependen de la concentración y de la duración de la exposición al fármaco (Popović et al., 2015, Luyckx et al., 1985). Por otra parte, el monitoreo terapéutico del fármaco y los ajustes de dosis se basan en datos

farmacocinéticos poblacionales que han provisto de valores para la optimización, eficacia y seguridad de los fármacos de estrecho índice terapéutico en poblaciones especiales (Nader et al., 2016); este monitoreo es un estándar para la aplicación de los rescates de leucovorina, especialmente en pacientes con aclaramiento de MTX reducido u otros riesgos relacionados con la exposición prolongada al fármaco, daño renal y hepático o retención de líquidos (Thompson et al., 2007). En este estudio no fue posible realizar el ajuste de dosis, sin embargo se realizó la determinación del fármaco en los diferentes tiempos para conocer su concentración plasmática y saber si el paciente requería o no rescates con leucovorina para disminuir la toxicidad.

La obtención de los parámetros es de gran importancia para poder adecuar el tratamiento a las necesidades del paciente, ya que su individualización ayudará a prevenir la toxicidad ocasionada por el fármaco y mejorar la efectividad del tratamiento (Ogunbenro and Aarons, 2014).

Para el estudio de la farmacogenética del metotrexato en la población infantil con LLA, la investigación se centró en el estudio de la relación entre el polimorfismo del gen RFC G80A con una mayor concentración plasmática del metotrexato en plasma y por otro lado el polimorfismo de la del 19 pb de DHFR con un mayor riesgo de toxicidad hepática (Ongaro et al., 2009).

Para el genotipo de RFC G80A pudo identificarse que el polimorfismo GG se encuentra en el 37.5% de la población, al igual que el polimorfismo AA, mientras que el polimorfismo GA tuvo una frecuencia del 25%. Con base a los resultados se encontró que la frecuencia del alelo A es de 50 % en esta población infantil. La frecuencia del alelo AA encontrado en la población infantil estudiada es similar a los datos descritos por Lin y Scott en el 2012 en donde describe una frecuencia para el alelo AA de 0.472 en la población hispana y de 0.473 en población caucásica, estos datos sirven de referencia para conocer la distribución del alelo dentro de las distintas poblaciones estudiadas y compararlo con los resultados obtenidos para la población mexicana.

Con base a estos datos puede reconocer que tanto el alelo A como el G se encuentran distribuidos en la misma proporción en la población infantil estudiada; los datos obtenidos difieren a los reportados; esta variación puede deberse principalmente al tipo de población estudiada ya que Lin y Scott en el 2012 reportan sus frecuencias con base a población hispana y caucásica, aunque hay pocas descripciones que permitan comparar la frecuencia entre las distintas poblaciones. Los datos obtenidos en este estudio son similares a los reportados por (Vidal-Millán y Due, 2016) en donde

demuestran que este polimorfismo presenta una frecuencia del 50.7 % en población sana y 40.7 % en pacientes mexicanos con LLA; estos resultados presentan similitud ya ambos fueron obtenidos a partir de pacientes mexicanos con LLA.

Estudios realizados por Lin y Scott, 2012 sugieren que el polimorfismo de RFC G80A puede estar relacionado con un incremento en las concentraciones plasmáticas del metotrexato, además de una mayor cantidad de eventos adversos y un mal pronóstico en niños con LLA. Este efecto se ha relacionado con el cambio de histidina por arginina en el residuo 27 del receptor, lo que sugiere que disminuye su actividad de transporte del metotrexato al interior de la célula.

Por otro lado el análisis de χ^2 para la comparación entre el genotipo de RFC y los valores de $t_{1/2}$ demuestra que no existe asociación, ya que la razón de posibilidades (OR) presenta valores inferiores a 1, este resultado se puede deber a que el tamaño de la muestra se redujo ($n = 9$) debido a que se carecía de algunas de las mediciones del fármaco, por lo que este parámetro no pudo ser calculado para todos los pacientes.

A pesar de que no se encontró significancia estadística entre las variables estudiadas, se pudo identificar que los portadores del genotipo GG tienden a presentar concentraciones plasmáticas más altas a las 24 h y 72 h que aquellos individuos que tienen genotipo GA o AA. Otra tendencia que se encontró fue que aquellos individuos que tienen genotipo GG presentan un incremento en los valores de TGP todo esto sin que fuera estadísticamente significativo, este resultado difiere a lo reportado por Ongaro et al., en 2009, en donde se encontró que los portadores de la delección presentan un mayor riesgo de daño hepático, es necesario aumentar el tamaño de la muestra con el fin de identificar si esta tendencia se mantiene o llega a presentar algún cambio en la población estudiada.

Los resultados obtenidos difieren de otros estudios, entre ellos los realizados por (Laverdière et al., 2002, Lin and Scott, 2012) en niños canadienses de origen francés en donde determinaron que los portadores del genotipo AA presentan mayores niveles de MTX en plasma, así como un mal pronóstico que aquellos pacientes con genotipo GG y GA, y a los efectuados por (Zain et al., 2014) en pacientes adultos de Malasia en donde se relaciona al genotipo AA con un mayor riesgo de toxicidad hepática.

En este estudio debido a los pocos pacientes ($n=9$) no fue posible asociar el genotipo de AA con una mayor concentración plasmática de metotrexato debido a que algunos de los pacientes con este genotipo carecen de alguna de las mediciones de metotrexato. Es por ello que es necesario tomar más muestras posteriores a las 24 horas para identificar si alguno de los polimorfismos de RFC está asociado a concentraciones remanentes de

metotrexato a las 24 h y 72 h, así como aumentar el número de pacientes para encontrar una mayor significancia estadística.

El gen de la DHFR presenta diversos polimorfismos y es uno de los más estudiados al tratarse de las principales dianas terapéuticas en el tratamiento de LLA debido a que su inhibición provoca la disminución de las formas reducidas del tetrahidrofolato favoreciendo la muerte celular (Hess and Khasawneh, 2015).

Entre los diversos polimorfismos identificados en la DHFR relacionados con su actividad, uno de los menos estudiados es la delección de 19 pares de bases. En estudios previos (Ongaro et al., 2009) se reportó que este polimorfismo está asociado con toxicidad en adultos ya que los portadores homocigotos y heterocigotos de la delección de 19 pb han presentado un incremento en el riesgo de toxicidad hepática.

Se ha propuesto que este polimorfismo representa cambios en los niveles de expresión; en la que la delección propiciaría una menor expresión del gen de DHFR (Dulucq et al., 2011), por lo que una menor cantidad de esta enzima en el interior de la célula que favorecería una mayor acumulación de metotrexato y un exceso de homocisteína, un aminoácido azufrado que ocasiona lesiones hepáticas (Toscano et al., 2010).

En este estudio se identificó el genotipo del polimorfismo DHFR del 19 pb en donde se observa que el polimorfismo homocigoto positivo a la delección de 19 pb (+/+) se encuentra en el 62.5 % de la población, mientras que el polimorfismo heterocigoto a la delección de 19 pb (+/-) se encuentra en el 25 % y finalmente el polimorfismo homocigoto negativo a la delección (-/-) se encuentra en el 12.5 % de la población.

La frecuencia del alelo (+) de la del 19 pb se encuentra en el 75% de la población, mientras que el alelo (-) a la del 19 pb tienen una frecuencia del 25%. Al ser un polimorfismo poco estudiado, se carece de datos sobre la frecuencia en población mexicana. Sin embargo el estudio realizado en población caucásica italiana (Ongaro et al., 2009) demostró que este polimorfismo presenta una frecuencia del 45.45 % para los homocigotos negativos a la delección (-/-), 43.02 % para los portadores heterocigotos (+/-) y 11.63 % para los portadores homocigotos positivos a la delección (+/+), que es completamente distinta a la población estudiada.

En este estudio se buscó la relación entre los portadores de la del 19 pb y el incremento de enzimas hepáticas utilizando la prueba U-Mann-Whitney; con respecto a los portadores heterocigotos y los no portadores (-/+, -/-) contra los portadores homocigotos (+/+) a la delección y los valores de TGP se encontró un valor de $p = 0.2987$ para la prueba; y para los valores de TGO se encontró un valor de $p = 0.3776$.

El resultado obtenido demuestra que no existe relación entre el polimorfismo de la del 19 pb, ya que ser portador heterocigoto u homocigoto no condiciona el incremento de los valores de TGP y TGO, como resultado de una mayor exposición a homocisteína.

El análisis de χ^2 para la comparación entre el polimorfismo de DHFR y los diferentes grados de toxicidad hepática demostró que no existe asociación, ya que los valores de la razón de posibilidades (OR) presentan valores inferiores a 1. Los resultados obtenidos difieren a los reportados por Ongaro et.al. en 2009 en donde encontraron que los portadores homocigotos y heterocigotos de la delección presentaban de 2.02-4.57 veces más riesgo de toxicidad hepática ($p = 0.052$), que aquellos pacientes que no presentaban la delección.

Se buscó la relación entre este polimorfismo y los valores de TGO, las concentraciones plasmáticas a las 24 h y 72 h, CI y $t_{1/2}$; el resultado obtenido muestra que no existe relación entre estos resultados y el genotipo, este resultado también coincide con los datos reportados por Ongaro et.al. en 2009 ya que asocian este polimorfismo al incremento de homocisteína como principal causante de lesiones hepáticas, pero no presentan datos de asociación con los parámetros farmacocinéticos, ni con las concentraciones plasmáticas del metotrexato.

En este estudio no fue posible asociar el genotipo de delección de 19 pb de DHFR con el riesgo de toxicidad por metotrexato debido a que algunos de los pacientes con genotipo homocigoto y heterocigoto a la delección presentaron aumento de transaminasas. Los incrementos en los valores de transaminasas suelen ser transitorios y posteriores a los ciclos de quimioterapia, sin embargo debe asegurarse que el aumento sea solo transitorio para descartar daño hepático. Por otro lado, se observó que una tendencia en que los portadores del polimorfismo presentan valores más elevados de transaminasas. Es por ello que es necesario aumentar el número de la muestra que permita identificar si esa tendencia se fortalece o presentara algún cambio al incrementar el número de pacientes.

Es de vital importancia continuar realizando estudios farmacocinéticos y farmacogenéticos para poder establecer con mayor seguridad si estos polimorfismos están relacionados con los resultados del tratamiento pero se debe considerar una mayor población de estudio. De igual manera la obtención de los parámetros farmacocinéticos es la principal forma de individualizar el tratamiento al proveer datos de la ruta del fármaco dentro del organismo con fin de lograr un tratamiento eficaz con un mínimo de efectos adversos.

Conclusiones

- Se encontró que no existe relación entre el polimorfismo del gen RFC con los valores de concentración plasmática de metotrexato a las 24 y 72 h, TGO, TGP, Cl y $t_{1/2}$.
- Se identificó que el ser portador del polimorfismo de la del 19 pb no está relacionado con incremento en los valores de concentración plasmática de metotrexato a las 24 y 72 h, Cl, $t_{1/2}$; y tampoco está relacionado con el riesgo de toxicidad por el aumento en los valores de TGO, TGP.
- No se encontró relación entre el polimorfismo de la del 19 pb de DHFR con los valores de concentración plasmática de metotrexato a las 24 h, 72 h, TGO, Cl y $t_{1/2}$.

Anexos

- Anexo 1

Extracción de DNA (High Pure PCR Template Preparation Kit® Roche).

1. Tomar el equivalente a 3, 000,000 de leucocitos de acuerdo a los resultados de la citometría hemática.

Ejemplo: si la muestra tiene 3, 700 leucocitos/ μ l

$$\frac{(3,000,000 \text{ leucocitos})(1 \mu\text{l})}{3,700 \text{ leucocitos}} = 811 \mu\text{l}$$

2. Depositar la muestra de sangre en un tubo cónico de 15 mL con 10 mL de buffer de lisis.
3. Incubar durante 20 min.
4. Centrifugar a 400 g durante 10 min y retirar el sobrenadante.
5. Adicionar 1000 μ l de buffer de lisis y homogeneizar para retirar paquete leucocitario.
6. Extraer la suspensión y llevarla a un tubo cónico de 1.5 mL.
7. Centrifugar a 400 g durante 10 min.
8. Retirar el sobrenadante.
9. Adicionar 200 μ l de solución isotónica, 200 μ l de Binding Buffer y 40 μ l de Proteinasa K, agitar en vórtex e incubar a 75 °C por 10 min.
10. Adicionar 100 μ l de isopropanol e invertir el tubo varias veces, posteriormente transferir todo el contenido del tubo a una columna de extracción.
11. Centrifugar a 8000 x g por 1 min, pasar la columna a un nuevo tubo colector y adicionar 500 μ l de Inhibitor Removal Buffer
12. Centrifugar a 8000 x g por 1 min, pasar la columna a un nuevo tubo colector y adicionar 500 μ l de Wash Buffer.
13. Centrifugar a 8000 x g por 1 min, pasar la columna a un nuevo tubo colector y adicionar 500 μ l de Wash Buffer.
14. Centrifugar a 8000 x g por 1 min y pasar la columna a un nuevo tubo colector.
15. Centrifugar 10 s a máxima velocidad para remover el exceso de Wash Buffer.
16. Pasar la columna a un tubo cónico de 1.5 mL y adicionar 100 μ l de Elution Buffer previamente calentado a 75 °C.
17. Incubar durante 5 min y centrifugar a 8000 g por 1 min.
18. El tubo cónico contiene el DNA eluido y purificado que deberá ser guardado a una temperatura ente 2-8 °C o de 15-15 °C para su posterior análisis.

- **Anexo 2**

Reconstitución de los reactivos EMIT

Previo a la determinación de la curva estándar, se procedió a preparar cada uno de los reactivos.

1. Preparación del buffer de trabajo (1X)

Diluir el buffer concentrado 1:15.

2. Reconstitución de los reactivos de la curva de calibración

Reconstituir cada vial con 1.0 mL de agua inyectable.

3. Reconstitución de los reactivos A y B de METOTREXATO

Reconstituir cada uno de los frascos con 3.0 mL de agua inyectable.

4. Preparación de los reactivos 1 y 2 de METOTREXATO

Usar el buffer de trabajo (1X) para diluir los reactivos A y B 1:9.

- Anexo 3

Relación de pacientes con las variables obtenidas

Número	Código	Del 19 pb	Genotipo	Edad (años)	Peso (Kg)	Cp°(24 h) (µg/mL)	Cp (72 h) (µg/mL)	α (h-1)	β (h-1)	Vd (L)	C _{ss} (µg/mL)	Do (mg)	Cl _r (mL/h)	t _{1/2} (h)	TGO (10-42 UI/L)	TGP (10-42 UI/L)
1	001-KMG	+/+	AA	8	36	9,1948	-	-	-	6,48	9,1948	400	-	-	35	52
2	002-NCC	+/+	GG	14	46	7,5586	0,0898	0,3435	0,012	8,28	7,5586	400	99,36	57,7622	36	58
3	003-CMMQ	+/-	AA	7	23	14,1416	-	-	-	4,14	14,1416	400	-	-	34	41
4	004-YRJ	+/+	AA	4	13,5	16,4682	0,0248	-	-	2,43	16,4682	400	-	-	41	51
5	005-ENCT	+/+	GA	7	34	12,5061	7,18E-03	-	-	6,12	12,5061	400	-	-	32	59
6	006-CUMG	+/-	GG	15	58	14,1493	0,018	0,3997	0,0709	10,44	14,1493	400	824,76	9,7764	21	12
7	007-LDGM	+/+	GA	6	20	20,3371	0,0237	0,5257	0,0556	3,6	20,3371	400	200,16	12,4666	35	31
8	008-JLVM	+/+	AA	4	18	15,0301	0,0222	0,3907	0,0674	3,24	15,0301	400	218,376	10,284	68	86
9	009-MAR	+/-	GG	12	40	49,6048	0,1584	0,2563	0,0303	7,2	49,6048	400	218,16	22,8761	38	46
10	0010-ALC	-/-	AA	5	18	7,9213	-	-	-	3,24	7,9213	400	-	-	43	51
11	0011-EGC	+/-	GG	3	14,5	11,7153	0,0258	0,375	0,0458	2,61	11,7153	400	119,538	15,1342	37	107
12	0012-JB	-/-	AA	6	24,5	10,134	-	-	-	4,41	10,134	400	-	-	36	15
13	0013-EGM	+/+	GA	2	14	15,6986	-	-	-	2,52	15,6986	400	-	-	20	12
14	0014-MAOM	+/+	GG	8	37	32,2995	0,0248	0,4806	0,0638	6,66	32,2995	400	424,908	10,8643	48	106
15	0015-CSFG	+/+	GG	15	89	9,9466	0,0468	0,3803	4,63E-03	16,02	9,9466	400	74,1581	104,5612	60	171
16	0016-ABSEC	+/+	GA	5	30	14,1459	0,0355	0,0349	0,059	5,4	14,1459	400	318,6	11,7482	21	26

Referencias

- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). 2014. Cancer Facts and Figures American Cancer Society. Atlanta: American Society of Clinical Oncology.
- AQUERRETA, I., ALDAZ, A., GIRALDEZ, J. & SIERRASESUMAGA, L. 2002. Pharmacodynamics of high-dose methotrexate in pediatric patients. *Ann Pharmacother*, 36, 1344-50.
- BLEYER, A. 1978. The clinical pharmacology of methotrexate : New application of an old drug. *Cancer*, 41, 36-51.
- CAMPS CARLOS, J. C., CASAS ANA 2004. Manual SEOM de Cuidados Continuos.
- CHENG, Q., CHENG, C., CREWS, K. R., RIBEIRO, R. C., PUI, C.-H., RELLING, M. V. & EVANS, W. E. 2006. Epigenetic regulation of human gamma-glutamyl hydrolase activity in acute lymphoblastic leukemia cells. *American journal of human genetics*, 79, 264-74.
- CSORDAS, K., LAUTNER-CSORBA, O., SEMSEI, A. F., HARNOS, A., HEGYI, M., ERDELYI, D. J., EIPEL, O. T., SZALAI, C. & KOVACS, G. T. 2014. Associations of novel genetic variations in the folate-related and ARID5B genes with the pharmacokinetics and toxicity of high-dose methotrexate in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 166, 410-20.
- DULUCQ, S., ST-ONGE, G., GAGNÉ, V., ANSARI, M., SINNETT, D., LABUDA, D., MOGHRABI, A., KRAJINOVIC, M., DC, W. & GAGNE, V. 2011. DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Childhood A Global Journal Of Child Research*, 111, 3692-3700.
- GALINSKY, R. E. & SVENSSON, C. K. 2006. Basic Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 1171-1190.
- GUILMAN & GOODMAN 2003. Las bases farmacológicas de la terapéutica.
- HESS, J. A. & KHASAWNEH, M. K. 2015. Cancer metabolism and oxidative stress : Insights into carcinogenesis and chemotherapy via the non-dihydrofolate reductase effects of methotrexate. *BBACLI*, 3, 152-161.
- HIDER, S. L., BRUCE, I. N. & THOMSON, W. 2007. The pharmacogenetics of methotrexate. *Rheumatology (Oxford)*, 46, 1520-4.
- IMANISHI, H., OKAMURA, N., YAGI, M., NORO, Y., MORIYA, Y., NAKAMURA, T., HAYAKAWA, A., TAKESHIMA, Y., SAKAEDA, T., MATSUO, M. & OKUMURA, K. 2007. Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. *Journal of Human Genetics*, 52, 166-171.
- IMBACH, P., KÜHNE, T. & ARCECI, R. J. 2014. Pediatric Oncology.
- LAVERDIÈRE, C., CHIASSON, S., COSTEA, I., MOGHRABI, A., KRAJINOVIC, M., DC, W. & LAVERDIE, C. 2002. Polymorphism G 80 A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia Polymorphism G 80 A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate pla. 100, 3832-3834.
- LEVINSEN, M., ROSTHØJ, S., NYGAARD, U., HELDRUP, J., HARILA-SAARI, A., JONSSON, O. G., BECHENSTEEN, A. G., ABRAHAMSSON, J., LAUSEN, B., FRANDBSEN, T. L., WEINSHILBOUM, R. M. & SCHMIEGELOW, K. 2015. Myelotoxicity after high-dose methotrexate in childhood acute leukemia is influenced by 6-mercaptopurine dosing but not by intermediate thiopurine methyltransferase activity. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 75, 59-66.
- LIN, G. G.-H. & SCOTT, J. G. 2012. SLC19A1 Pharmacogenomics Summary. 100, 130-134.
- LUYCKX, M., CAZIN, J. L., BRUNET, C., GOSSELIN, P. & DEMAILLE, M. C. 1985. Clinical pharmacokinetics of 6-hour infusion of high-dose methotrexate. Preliminary trial of monitoring high infusion doses. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 28, 457-462.

- M. P. GALLEGOS-ARREOLA, C. B.-G. R., G. M. ZUÑIGA-GONZÁLEZ, L. E. FIGUERA, A. M. PUEBLA-PÉREZ AND J. R. GARCÍA-GONZÁLEZ 2013. Pathophysiology of Acute Lymphoblastic Leukemia. In: MEJIA-ARANGURE, J. M. (ed.) *Clinical Epidemiology of Acute Lymphoblastic Leukemia - From the Molecules to the Clinic*. InTech.
- MARROW, B. B. 1999. Common Toxicity Criteria (Ctc) Allergy / Immunology Auditory / Hearing. *Publish*, 1-35.
- NADER, A., ZAHARAN, N., ALSHAMMAA, A., ALTAWHEEL, H., KASSEM, N. & WILBY, K. J. 2016. Population Pharmacokinetics of Intravenous Methotrexate in Patients with Hematological Malignancies: Utilization of Routine Clinical Monitoring Parameters. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 1-8.
- NCCN 2014. Acute lymphoblastic leukemia. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Version 1.2014 National Comprehensive Cancer Network.
- NIEDZIELSKA, E., WĘCŁAWEK-TOMPOL, J., MATKOWSKA-KOCJAN, A. & CHYBICKA, A. 2013. The influence of genetic RFC1, MS and MTHFR polymorphisms on the risk of acute lymphoblastic leukemia relapse in children and the adverse effects of methotrexate. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*, 22, 579-84.
- OGUNGBENRO, K. & AARONS, L. 2014. Physiologically based pharmacokinetic modelling of methotrexate and 6-mercaptopurine in adults and children. Part 1: methotrexate. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 41, 159-171.
- ONGARO, A., DE MATTEI, M., PORTA, M. G. D., RIGOLIN, G., AMBROSIO, C., DI RAIMONDO, F., PELLATI, A., MASIERI, F. F., CARUSO, A., CATOZZI, L. & GEMMATI, D. 2009. Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: Effects on methotrexate-related toxicity and survival. *Haematologica*, 94, 1391-1398.
- PAULEY, J. L., PANETTA, J. C., CREWS, K. R., PEI, D., CHENG, C., MCCORMICK, J., HOWARD, S. C., SANDLUND, J. T., JEHA, S., RIBEIRO, R., RUBNITZ, J., PUI, C. H., EVANS, W. E. & RELLING, M. V. 2013. Between-course targeting of methotrexate exposure using pharmacokinetically guided dosage adjustments. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 72, 369-378.
- POPOVIĆ, J. K., SPASIĆ, D. T., TOŠIĆ, J., KOLAROVIĆ, J. L., MALTI, R., MITIĆ, I. M., PILIPOVIĆ, S. & ATANACKOVIĆ, T. M. 2015. Fractional model for pharmacokinetics of high dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation*, 22, 451-471.
- PUI, C. H., CARROLL, W. L., MESHINCHI, S. & ARCECI, R. J. 2011. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol*, 29, 551-65.
- PUI, C. H., MULLIGHAN, C. G., EVANS, W. E. & RELLING, M. V. 2012. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood*, 120, 1165-74.
- RAFAEL, J., MÉNDEZ, L., CEBALLOS, E. C., GENARO, O., NAVARRO, L., ALFARO, C. C., MARTÍNEZ, M. B., ARACELI, A., IBARRA, B., RAMIRO, J., ZAMORA, E., PÉREZ, C. M., TOVAR, J. O., FLORENCIA, A., IBARGÜEN, R., VERA, S. R., ARTURO, S., GUERRERO, S., CÁRDENAS, M. S., PAULINA, N., CANTO, Z. & CANDELARIA, M. 2011. Leucemia Linfoblástica Aguda. *Cancerologia*, 6, 111-115.
- RIZZARI, C., SALA, A., CHIESA, R., CITTERIO, M. & BIONDI, A. 2004. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Orphanet Encyclopedia*, 350, 1-13.
- SALUD, S. D. 2014. Protocolo de la atención para leucemia linfoblástica. Guía clínica y esquema de tratamiento del Seguro Popular. *Igarss 2014*, 1-5.
- SCHMIEGELOW, K., NIELSEN, S. N., FRANDBSEN, T. L. & NERSTING, J. 2014. Mercaptopurine/Methotrexate maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical facts and fiction. *J Pediatr Hematol Oncol*, 36, 503-17.
- SHARIFI, M. J., BAHUSH, G., ZAKER, F., ANSARI, S., RAFSANJANI, K. A. & SHARAFI, H. 2014. Association of -24CT, 1249GA, and 3972CT ABCC2 gene polymorphisms with methotrexate serum levels and toxic side effects in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*, 31, 169-77.

SINAVE 2011. Perfil epidemiológico del Cáncer en niños y adolescentes en México. *Sinav/Dge/Salud*, 1-159.

THERMOSCIENTIFIC 2011. NanoDrop: Assessment of Nucleic Acid Purity. *Protocols and Product Manuals*, 1-2.

THOMPSON, P. A., MURRY, D. J., ROSNER, G. L., LUNAGOMEZ, S., BLANEY, S. M., BERG, S. L., CAMITTA, B. M., DREYER, Z. E. & BOMGAARS, L. R. 2007. Methotrexate pharmacokinetics in infants with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 59, 847-853.

TIRADO GÓMEZ, L. L. & MOHA BETANCOURT, A. 2007. Epidemiología de las Neoplasias Hemato-Oncológicas. *Instituto Nacional de Cancerología*, 2, 109-120.

TOSCANO, E., COTTA, J., ROBLES, M., LUCENA, M. I. & ANDRADE, R. J. 2010. Toxicidad hepática inducida por los nuevos fármacos inmunosupresores. *Gastroenterología y Hepatología*, 33, 54-65.

VELÁZQUEZ, L. 2008. Farmacología Básica y Clínica.

VIDAL-MILLÁN, S. & DUE, A. 2016. G80A Single Nucleotide Polymorphism in Reduced Folate Carrier-1 Gene in a Mexican Population and its Impact on Survival in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia.

WALL, A. M., GAJJAR, A., LINK, A., MAHMOUD, H., PUI, C. H. & RELLING, M. V. 2000. Individualized methotrexate dosing in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 14, 221-5.

WINOGRAD, B., LIPPENS, R. J. J., OOSTERBAAN, M. J. M., DIRKS, M. J. M., VREE, T. B. & KLEIJN, E. V. D. 1986. of Methotrexate in Children. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 231-238.

ZAIN, S. M., BEE, P.-C. & LIAN, L.-H. 2014. Pharmacogenomics Effect of polymorphisms within methotrexate pathway genes on. *Pharmacogenomics*, 15, 1479-1494.