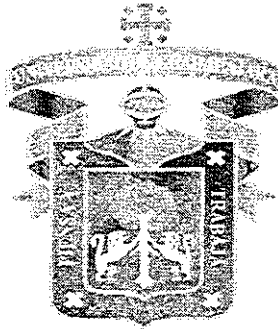

2002 A - 2007 A

397000913

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO C677T DEL GEN *MTHFR* EN PACIENTES
ADULTOS CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA DEL OCCIDENTE DE MÉXICO

TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE
TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA
DAVID ALEJANDRO CARBAJAL URIBE
Las Agujas Zapopan, Jal., noviembre 2008



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura
en Biología
1053/ C. C. BIOLOGÍA

C. DAVID ALEJANDRO CARBAJAL URIBE
PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Tesis e Informes** opción **Tesis** con el título: **"FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO C677T DEL GEN MTHFR EN PACIENTES ADULTOS CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA DEL OCCIDENTE DE MÉXICO"** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: **DRA. MARTHA PATRICIA GALLEGOS ARREOLA** y el asesor/es es el/la: **DRA. ANA MARÍA PUEBLA PÉREZ.**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Las Agujas, Zapopan., 14 de Marzo del 2007.


DR. CARLOS ALVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


M en C. ISELA LETICIA ALVAREZ BARAJAS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

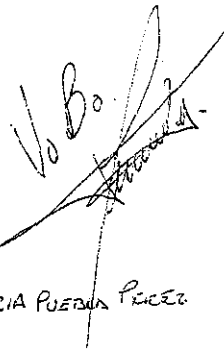

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad tesis, opción 1, con el título: "FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO C677T DEL GEN MTHFR EN PACIENTES ADULTOS CON LEUCEMIA LINFOCITICA AGUDA DEL OCCIDENTE DE MÉXICO" que realizó el pasante David Alejandro Carbajal Uribe con número de código 397000913 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

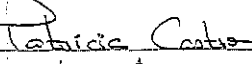



Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

Las Agujas Zapopan, Jal., 22 de Octubre de 2008


 Firma
 Nombre Martha Patricia Gallegos A.
 Director/a del trabajo,


 Firma 
 Nombre ANA MARIA PIEDAD PEREZ
 Asesor(es)

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Marta Patricia Castro Felix		22-Oct-08
Anne Santerre		22 oct 2008
Carlos Alvarez		30/oct/08
Supl. Adolfo Cuadras Ortega		30/10/08

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN:

Laboratorio de Genética Molecular

División de Medicina Molecular

El presente estudio fue financiado por el Centro de Investigación Biomédica de Occidente (C.I.B.O.) y el Fondo de Fomento a la Investigación (FOFOI) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

Bajo la dirección de:

Dra. Martha Patricia Gallegos Arreola

Asesoría

Dra. Ana María Puebla Pérez

COLABORACIÓN:

Dr. José Luis Delgado Lamas

Dr. Oscar Miguel Garcés Ruiz

Departamento de Hematología

Hospital de Especialidades (HE)

Centro Medico Nacional de Occidente (C.M.N.O.), IMSS.

AGRADECIMIENTOS:

CIBO, IMSS

Financiamiento 2006-2008

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA)

Universidad de Guadalajara

Licenciatura en Biología

Gracias a mi directora de tesis Patricia Gallegos por darme la oportunidad de aprender de ella y por dedicarme su tiempo para poder llevar a cabo este trabajo que no ha sido nada fácil pero todo el apoyo que he tenido de su parte lo hizo posible.

A los sinodales:

Dra. Patricia Castro Felix

Dra. Anne Santerre Lucas

Dr. Carlos Álvarez Moya

Dr. Adolfo Cardenas Ortega

Por sus valiosas aportaciones y sugerencias, las cuales fueron de gran ayuda para mejorar este trabajo.

Dedicatoria:

Dedicada a mi hija **Grecia** que es mi motivación para no rendirme y seguir luchando para conseguir todos los planes que tengo en mente, entre ellos este trabajo.

A mi esposa **Blanca** quien me motiva para salir adelante y siempre ha tenido confianza en mí, además de estar con migo en los momentos buenos y malos, lo cual le agradezco de corazón.

A mi **mamá** quien siempre me acompaña y a pesar de pasar momentos difíciles todo lo hemos superado, le admiro por su valor y fuerza para sacarnos adelante.

A mi **papá** que me ha guiado para ser independiente y que me ha dado buenos consejos.

A mis **hermanos** que se esfuercen más para lograr lo que se propongan y que nada es imposible aunque así lo parezca aquí esta un ejemplo de ello.

A Dionisio quien en algunas ocasiones me aconseja.

A TODOS GRACIAS!!

RESUMEN

Antecedentes: las leucemias se caracterizan por la producción excesiva de células hematopoyéticas inmaduras en médula ósea. En el caso de la Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), las células inmaduras que se producen excesivamente son los linfoblastos que desplazan a las células sanas hasta invadir órganos y sistema nervioso. Puede presentarse en niños siendo la segunda causa de muerte y la sexta en adultos, considerándose como un problema de salud a nivel mundial. El **Objetivo** del presente estudio fue determinar la frecuencia del polimorfismo 677C? T del gen MTHFR en pacientes con LLA y controles del Occidente de México. **Material y Métodos:** mediante un estudio de casos y controles (no pareado) se colectaron 107 muestras de pacientes con LLA provenientes del Servicio de Hematología, CMNO, IMSS y 170 controles de la población general, a los que se les tomo 5 ml de sangre periférica (con EDTA) para la extracción de ADN. Se amplificó un segmento del gen *MTHFR* que para la identificación del polimorfismo 677C→T, previo reconocimiento con la enzima de restricción *Hinf* I y electroforesis en poliacrilamida teñida con nitrato de plata. **Resultados:** las frecuencias genotípicas fueron: para 677TT del 10% en pacientes y 19% en controles; para 677CT del 50% y 48%; y para 677CC del 40% y 34% respectivamente, que al compararlos entre si no se observaron diferencias. La comparación de los genotipos del polimorfismo 677C→T clasificados por edad, género, antecedentes familiares de cáncer y consumo de tabaco de los grupos de estudio, no mostro diferencias. Sin embargo, al comparar al grupo de pacientes por subtipo de LLA y los portadores del genotipo 677TT, se observo diferencias entre la LLA-L3 en comparación con la L2 (OR 11, IC95% 1.74-78.43) p<0.05. **Conclusión:** no se observaron diferencias genotípicas, ni alélicas del polimorfismo 677C? T en pacientes y controles. Los pacientes con subtipo L3 comparados con L2 portadores del genotipo 677TT presentaron mayor riesgo de tener la forma grave de la LLA.

INDICE

	Página
Introducción	1
Antecedentes	2
☆ Leucemia	2
☆ Leucemia linfocítica aguda	2
☆ Clasificación de la LLA	3
☆ Signos y síntomas de la LLA	7
☆ Diagnóstico	8
☆ Epidemiología	10
☆ Causas y factores de riesgo	11
☆ Pronóstico	12
☆ Enzima 5' 10 – metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR)	15
☆ Gen <i>MTHFR</i>	19
Justificación	25
Planteamiento del problema	26
Hipótesis	27
Objetivos	28
Material y métodos	29
Resultados	35
Discusión	47
Conclusiones	51
Bibliografía	52

ANEXOS

Anexo I	60
Anexo II	61
Anexo III	63
Anexo IV	71
Anexo V	74
Abreviaturas VI	76
Glosario VII	78

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfocítica aguda (LLA) es un tipo de cáncer que se caracteriza por un exceso en la producción de linfocitos en la médula ósea; en esta y otras patologías de origen multifactorial se ha descrito la asociación de factores genéticos y ambientales en su desarrollo. Dentro de los factores genéticos implicados se encuentran, alteraciones en los protooncogenes y en los genes supresores de tumor, implicados en el crecimiento, proliferación y diferenciación celular. Otros factores genéticos son las alteraciones cromosómicas, así como, variaciones en genes que participan en el metabolismo de fármacos y xenobióticos¹⁻⁴.

Entre los genes implicados en la síntesis de nucleótidos y metilación del ADN se encuentra el gen metileno tetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) que participa de manera importante en la carcinogénesis⁵. Este gen codifica para la enzima 5,10-metil-tetrahidrofolato (5,10-MTHF), que cataliza la conversión irreversible de 5,10-metil-tetrahidrofolato (5,10-MTHF) a 5-MTHF⁶. Variaciones en la actividad catalítica de esta enzima pueden provocar inestabilidad en el ADN, se ha observado que el polimorfismo 677C→T (ala222val) del gen *MTHFR* afecta la actividad y termolabilidad de la enzima. Los heterocigotos presentan aproximadamente el 60% de su actividad, mientras que los homocigotos para el polimorfismo presentan solo el 30% de la actividad catalítica de la enzima^{6,7}.

Al respecto, se ha descrito la relación que existe entre el polimorfismo anterior y el riesgo a contraer diferentes tipos de cáncer, incluyendo las leucemias^{4, 6, 8}. Sin embargo, en el Occidente de México aún no existen estudios a nivel molecular que relacionen directamente al polimorfismo 677C→T del gen *MTHFR* con la leucemia linfocítica aguda (LLA) en adultos (patología que se ha convertido en un problema de salud pública)⁹.

Por lo que conocer la frecuencia de este polimorfismo en controles y pacientes con LLA de nuestra población, será de gran importancia para la identificación de grupos que podrían ser sujetos a algún tipo de riesgo.

ANTECEDENTES

LEUCEMIA

El término leucemia se deriva de los vocablos griegos "leukos" (blanco) y "haima" (sangre), afecta a leucocitos, linfocitos y plaquetas. Tiene su origen en médula ósea por alteraciones en la regulación o en la formación de las mismas. La regulación en la producción de las células sanguíneas normales puede alterarse, por lo que la proliferación de células anormales se realiza independientemente del espacio disponible que existe en la médula ósea. Las células sanguíneas inmaduras (los blastos) proliferan, provocando acumulo tanto en la médula ósea, ganglios linfáticos, bazo e hígado, en el torrente sanguíneo y reemplazan a las células normales con desplazamiento de glóbulos rojos. A esta proliferación incontrolada se le denomina leucemia¹⁰.

LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA

La LLA puede presentarse en niños y en adultos por igual. Generalmente la médula ósea produce células llamadas blastos, las cuales se transforman en células sanguíneas, como los glóbulos blancos llamados linfocitos que combaten las infecciones mediante la producción de anticuerpos. Pero en el caso de LLA existe una sobre proliferación de células madre que se transforman en linfocitos llamados también linfoblastos, las cuales no maduran; su exceso en sangre y médula ósea desplaza otras células, llegando a invadir otros órganos y el sistema nervioso. La LLA progresa rápidamente si no se trata a tiempo, produciendo en la mayoría de los casos la muerte. Se estima que alrededor del 35% al 40% de los adultos con LLA sobrevivan 2 años con quimioterapia^{10, 11}.

Como en LLA infantil, los pacientes adultos con LLA están en peligro de presentar complicaciones del sistema nervioso central (SNC) durante el curso de su enfermedad¹¹.

CLASIFICACIÓN DE LA LLA

Clasificación clínica

A partir del uso generalizado de protocolos de quimioterapia, la heterogeneidad pronóstica llevó al desarrollo de estudios para definir categorías de riesgo clínico. La mayoría de los estudios llegaron a la conclusión de que la edad y la cuenta de leucocitos al diagnóstico se podían considerar factores predictivos de evolución. De manera que en 1996 el National Cancer Institute (NCI) clasificó a los pacientes en dos grupos ¹¹:

- a) pacientes con riesgo habitual, entre 1 a 9.9 años y cuenta de leucocitos $<50,000/\mu\text{l}$
- b) pacientes con riesgo alto, ≥ 10 años y cuenta de leucocitos $\geq 50,000/\mu\text{l}$ ¹².

Clasificación morfológica

La clasificación desarrollada por el grupo cooperativo French American British (FAB) en 1976 ha demostrado tener valor pronóstico ¹².

Esta clasificación utiliza criterios morfológicos e incluye tres grupos. (Cuadro 1)

- 1) LLA-L1, caracterizada por presentar linfoblastos pequeños, generalmente no se observan nucléolos ó son pequeños (Figura 1), su núcleo es redondo y en raras ocasiones hendido y la cromática es homogénea. El citoplasma, moderadamente basófilo, presenta un grado variable de vascularización.
- 2) LLA-L2, presenta linfoblastos indiferenciados de gran tamaño y generalmente contiene nucléolos que varían en tamaño y cantidad (Figura 1). Los citoplasmas son moderadamente abundantes con basófilos variables y grado variable de vascularización. En algunos casos se asocia con el cromosoma Filadelfia.
- 3) LLA-L3, consta de células grandes con núcleo regular de forma oval o redonda, con uno o más nucléolos vesiculares prominentes; vacuolación citoplasmática prominente en la mayoría de las células.

Cuadro 1. Clasificación morfológica Franco-Américo-Británica (FAB)¹³.

HALLAZGOS	L1	L2	L3
HISTOLÓGICOS			
Tamaño celular	Predominio de células pequeñas	Células grandes. Heterogéneas.	Células grandes. Homogéneas.
Cantidad de citoplasma	Escaso	Variable, con frecuencia abundante.	Abundante
Núcleolos	Pequeños o poco visibles	Uno o más, grandes	Uno o más, prominentes
Cromatina nuclear	Homogénea	Variable, heterogénea en cada caso.	Finamente punteada, homogénea.
Forma nuclear	Regular, pueden estar hendidos o indentados.	Irregular, hendidos o indentados.	Regular, ovalados y también redondos
Vacuolización citoplasmática	Variable	Variable	Prominente

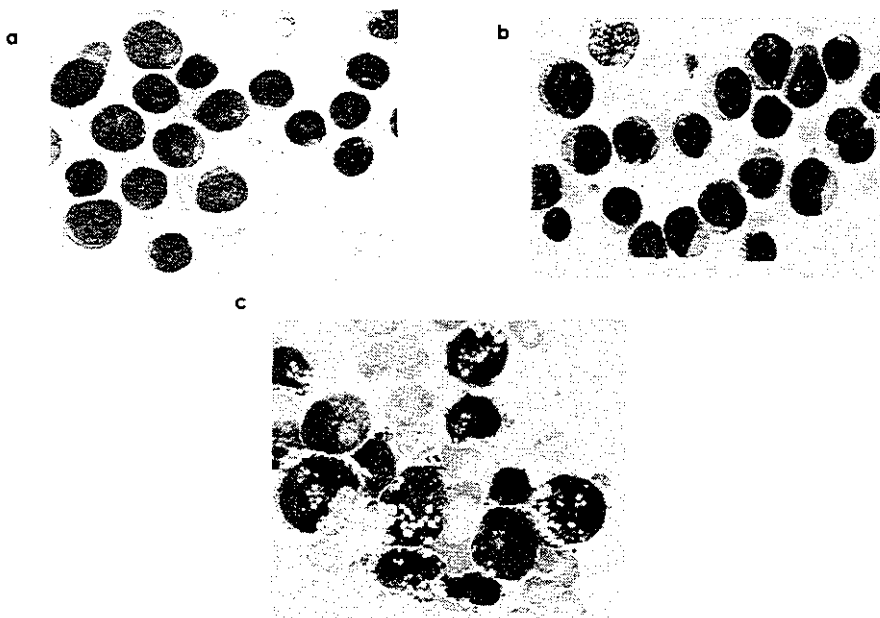


Figura 1. Frotis de médula ósea de pacientes con LLA. a) LAL-L1, b) LAL-L2, c) LAL-L3. Tinción de May-Grünwald-Giemsa x 1.200 (tomado de Atlas de hematología)¹⁴.

Clasificación inmunológica

El estudio inmunológico de los linfoblastos en pacientes con LLA ha permitido su clasificación inmunofenotípica:

- Células tipo B, subdivididas de acuerdo con la presencia de cadenas de inmunoglobulinas.
- Células T, que junto con los linfocitos B producen anticuerpos contra las infecciones.
- Células mortíferas naturales, (conocidas por sus siglas en inglés NK, (natural killer) que atacan a las células con cáncer ó a las infectadas por un virus.

En la LLA, los linfoblastos no pueden combatir la infección. Además, a medida que aumenta el número de linfoblastos en sangre y en la médula ósea,

disminuye el espacio y producción de las plaquetas, los glóbulos blancos y los glóbulos rojos normales. Esta situación puede causar infección, anemia y hemorragia que en etapas más avanzadas puede extenderse al sistema nervioso central (SNC) ¹¹.

La tipificación se realiza con anticuerpos monoclonales dirigidos a sitios antigénicos definidos como acúmulos (clusters) de diferenciación (CD). En algunos casos esta clasificación establece la etapa de maduración de las células neoplásicas y tiene utilidad para predecir la respuesta a la terapia convencional (Cuadro 2) ¹⁵.

Cuadro 2. Clasificación inmunológica de la LLA ¹⁶.

	Antígenos	Ig	Frecuencia	Pronósticos
B				
B temprana	CD10, CD19	No	65%	Bueno
Pre-B	CD20	En citoplasma	18-20%	Variable
B	HLA DR1a	En la superficie celular	1%	Malo
T	CD2, CD5, CD7	No	13-15%	Malo
NULA	No	No	1-3%	Variable

CD: acúmulo (clusters) de diferenciación; Ig: Inmunoglobulinas.

Clasificación por estudio genético

Como se mencionó con anterioridad, las anomalías citogenéticas que se encuentran frecuentemente en pacientes con LLA proporcionan información sobre su oncogénesis y tienen valor pronóstico.

Los pacientes con hiperploidías (sobre todo trisomías 4, 10 y 17), tienen un pronóstico favorable a 5 años, de 75-95%, probablemente se deba a que las células triploides tienen un índice alto de apoptosis y son más sensibles a una gran variedad de agentes quimioterápicos ^{1-3, 17}.

Al contrario, los linfoblastos con hipoploidías representan un pronóstico desfavorable ¹⁹. Aproximadamente un tercio de los pacientes con LLA, muestran

linfoblastos con translocaciones cromosómicas sin modificaciones en el número cromosómico. De estas translocaciones, cuatro son las más comunes.

1. **t(12;21)(p13;q22)**, presente en más del 25% de los pacientes con LLA pre-B¹⁻³. Esta translocación fusiona los genes *TEL-AML1*, el resultado de esta fusión es un factor de transcripción que funciona como correpressor de los genes *AML-1*²¹. *AML1* es un factor necesario para la transcripción de genes que participan en el desarrollo de células sanguíneas. Estudios in vitro han mostrado alta sensibilidad de los linfoblastos *TEL-AML1* a la L-asparaginasa, por lo que se ha observado que este medicamento es útil en el tratamiento de pacientes con LLA Pre-B.
2. **t(1;19)(q23;q13)**, se observa en el 30% de los casos con LLA pre-B, produce la fusión de genes *E2A* y *PBX*. El hallazgo de esta translocación establece el uso de tratamiento agresivo, debido a que su presencia sugiere mal pronóstico¹.
3. **t(4;11)(q21;q23)**, se ha observado que pacientes con esta translocación tienen mal pronóstico, debido a que se encuentra asociada con hiperleucositosis y linfoblastos que expresan antígenos de origen monocítico, lo que sugiere un origen pluripotencial o mixto de la LLA, esta translocación implica la región 1123 en donde se localiza el gen *MLL*, que participa en múltiples sitios de ruptura cromosómica.
4. **t(9;22)(q34;11)** también conocida como cromosoma Filadelfia (Ph). Los pacientes adultos portadores de esta translocación, generalmente presentan hiperleucositosis y tienen mal pronóstico. Esta translocación implica la fusión de los genes *BCR-ABL*, cuyo producto es una proteína tirosina kinasa, lo que sugiere un alto potencial oncológico¹⁸.

SIGNOS Y SINTOMAS DE LA LLA

Los pacientes que sufren de leucemia aguda presentan síndromes hemorrágicos, anémicos o infiltrativos aislados o en combinación. La anemia se

presenta como un dato constante con anisocitosis y poiquilocitosis; la trombocitopenia también es frecuente con cifras menores $50 \times 10^9/L$. En el frotis de sangre periférica y médula ósea, los blastos se presentan del 5 al 95%. La leucocitosis puede aparecer en cifras menores a $50 \times 10^9/L$. La hemorragia puede ser originada por trombocitopenia o invasión leucémica de médula ósea o coagulopatía por consumo de medicamentos, como en los casos de leucemia promielocítica LMA-M3.

En la LLA, la trombocitopenia y la disminución de leucocitos funcionales asociadas a la sustitución de la médula ósea por células malignas que se manifiestan habitualmente como: síndrome anémico agudo, facilidad para fatigarse, disnea, discrasias sanguíneas, fiebre, dificultad de cicatrización e infecciones relacionadas a neutropenia. La LLA también puede causar aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, aumento de tamaño del hígado o el bazo y/o dolor óseo y articular ¹¹.

DIAGNÓSTICO

Se realiza mediante el aspirado de médula, sin embargo en la interpretación no es rara la confusión en el diagnóstico con la leucemia mielocítica aguda (LMA, enfermedad de evolución rápida, con alta incidencia de glóbulos blancos inmaduros en sangre y médula ósea)¹⁰. El análisis de inmunofenotipificación es importante ya que se pueden distinguir a las leucemias con base a la expresión de mieloperoxidasa una enzima ampliamente distribuida en el organismo y sus fuentes fundamentales las constituyen los leucocitos (neutrófilos y monocitos) y los macrófagos, puede aislarse a partir de diferentes fluidos biológicos (saliva, líquido sinovial y semen, entre otros). Las leucemias que no presentan esta expresión son: la LMA, la leucemia megacarioblastica y la LLA ¹⁹.

Pruebas de Gabinete para la LLA

El diagnóstico de LA se efectúa con el estudio de extendidos de sangre periférica o aspirados de médula ósea, mediante el empleo de tinciones pancromáticas del tipo May-Grünwald-Giemsa, Wright-Giemsa. La identificación

de genes de fusión *PML/RAR-alfa*, *AML1/ETO*, *BCR/ABL* u otros, por medio de herramientas de la biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), permite establecer el diagnóstico, la variedad de la leucemia y es útil para evaluar la enfermedad residual mínima, una vez lograda la remisión completa del padecimiento¹⁴.

También es necesario realizar un examen físico y un historial médico completo, así como los siguientes estudios de gabinete:

- **Recuento de células sanguíneas y niveles de hemoglobina:** se realiza para comprobar el número de glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas y los niveles de hemoglobina (la proteína que transporta el oxígeno) en los glóbulos rojos.
- **Análisis de sangre periférica:** Se examina la muestra sanguínea para la búsqueda de blastos, número y la clase de glóbulos blancos y plaquetas. Así como la morfología de las células sanguíneas.
- **Biopsia de médula ósea:** Se extrae una pequeña porción de hueso y de médula ósea mediante la introducción de una aguja en cadera o esternón. Posteriormente se realiza una valoración del contenido y morfología celular.
- **Análisis citogenético:** Mediante una muestra de sangre periférica o médula ósea se realiza un cultivo de células para observar bajo el microscopio alteraciones cromosómicas.
- **Fenotipificación inmunológica:** Se examina tipo de células B o T bajo microscopio y por citometría de flujo se analizan marcadores inmunológicos¹¹.
- **Tomografía computarizada:** que muestra imágenes del cuerpo en cortes transversales u horizontales las imágenes muestran cualquier parte del cuerpo como lo son órganos, hueso y tejido adiposo con mayor resolución que como lo muestra una radiografía general²⁰.
- **Resonancia magnética:** Está constituido por un complejo conjunto de aparatos emisores de electromagnetismo, antenas receptoras de radio frecuencias y computadoras que analizan datos para producir imágenes detalladas, de dos o tres dimensiones con un nivel de precisión nunca antes

obtenido que permite detectar o descartar, alteraciones en los órganos y los tejidos del cuerpo humano.

- **Rayos X:** examen de diagnóstico que utiliza una radiación electromagnética capaz de producir imágenes de órganos, tejidos internos y hueso las cuales son mostradas a través de una placa²⁰.
- **Ecografía** (también llamada sonografía): técnica de diagnóstico por imagen que utiliza ondas sonoras de alta frecuencia y una computadora para crear imágenes de vasos sanguíneos, tejidos y órganos. Las ecografías se utilizan para ver el funcionamiento de los órganos internos y para evaluar el flujo sanguíneo en los distintos vasos²⁰

Enfermedad residual mínima

En la década de 1990 se estableció el uso de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés, PCR), para determinar la presencia de enfermedad residual mínima (ERM). El estudio de ERM permite evidenciar células leucémicas residuales no detectadas por métodos habituales, así como evaluar la respuesta a tratamiento y adecuar el tratamiento de consolidación.

La mayoría de las clasificaciones de la LLA, tienen valor pronóstico importante, que depende de la biología de las células leucémicas. Sin embargo, en algunos pacientes se presentan recaídas que llevan a la muerte, ya que muchos de estos casos no muestran datos tempranos de fracaso terapéutico¹⁰.

EPIDEMIOLOGÍA

Diferentes estudios concuerdan en que la frecuencia de la leucemia ha aumentado en los últimos 40 años. Los datos más completos se basan en la tasa de mortalidad. En Estados Unidos, la mortalidad por leucemia en 1940 fue de 3.9/100,000; en 1954 de 6.5/100,000 y en 1964, de 8/100,000¹⁰. Sin embargo, en el 2006, se diagnosticaron 3.930/100,000 adultos con LLA (2.150 hombres y 1.780 mujeres), con aproximadamente 1.490 muertes (900 hombres y 590 mujeres). Entre el 20% y 30% de los adultos con LLA logro remisión de la

enfermedad a largo plazo o la cura definitiva, lo anterior se atribuye a las características biológicas de la enfermedad, que pueden ser diferentes según el paciente. En México se informaron 1,926 casos en el año 2000 y en ese mismo año hubo 3,301 defunciones.²¹⁻²⁴

Por otra parte según datos de la Secretaría de salud de Jalisco, la LLA es responsable de aproximadamente el 75% al 80% de las leucemias en niños de entre 2 a 9 años de edad y del 6% en adultos entre los 18 a más de 66 años con una probabilidad de sobrevivir a los 5 años del diagnóstico del 85%. Registrando la enfermedad en el 2006, como la segunda causa de muerte en niños de 5 a 9 años de edad con una tasa de mortalidad de 22 por cada 100,000 y en adultos en el sexto lugar con una tasa de 3.96 por cada 100,000⁹.

CAUSAS Y FACTORES DE RIESGO

La causa precisa de las leucemias agudas se desconoce, la mayoría de los pacientes presentan alteraciones genéticas, que pueden relacionarse con el número de cromosomas o deleciones que aportan un factor pronóstico importante. Por lo que se han descrito como posibles factores de riesgo a diferentes patologías con trastornos genéticos como: síndrome de Down, de Fanconi, Bloom, Anemia de Blackfan-Diamond, Schwachman, Klinefelter, Turner, Neurofibromatosis, Ataxia telangiectasia, inmunodeficiencia combinada severa, hemoglobinuria paroxística nocturna, síndrome de Li-Fraumeni. La proliferación clonal por medio de divisiones sucesivas a partir de una célula progenitora, constituye el origen de las leucemias agudas, tanto linfoblástica como mieloblástica, la activación de oncogenes como *MLL*, *MYC*, *ABL*, *Bcl-2*, al igual que la formación de genes quiméricos como *BCR/ABL* (LLA o mieloblástica crónica) *PML/RAR*-alfa (leucemia aguda promielocítica) o *ML/ETO* (leucemia mieloblástica) hasta la fecha son de origen multifactorial¹¹⁻¹².

Por otro lado, es poco factible que exista una etiología única responsable de la proliferación aberrante de células malignas. Por lo que se han relacionado otros factores ambientales, como: radiaciones ionizantes, fármacos, alqu Coast, epipodofilotoxina, exposición a benceno, insecticidas, entre otros La exposición

previa a quimioterapia, xenobióticos o la radiación representan algunos de estos factores, además, se han identificado varias mutaciones genéticas asociadas a la LLA, algunas de ellas de importante valor pronóstico¹¹.

Así los factores de riesgo que se han identificado que podrían aumentar la posibilidad de que una persona desarrolle la enfermedad son: quimioterapia, tabaquismo, exposición a químicos, insecticidas, malos hábitos alimenticios, la edad, los antecedentes familiares y la exposición a radiaciones. Sin embargo, lo anterior aun no se puede tomar como causa directa de la enfermedad, ya que algunas personas que tienen varios factores de riesgo nunca la desarrollan, mientras que otras que carecen de factores de estos sí la desarrollan; por lo que se desconoce la causa exacta de la LLA²⁵⁻²⁷.

Otros factores de riesgo son las alteraciones cromosómicas, genes que participan en el metabolismo de tóxicos ambientales como el citocromo P450, proteína encargada de la activación o desactivación de muchos fármacos. Participa en la transformación de productos químicos en moléculas muy reactivas capaces de causar graves lesiones a los tejidos o de provocar mutaciones y participa en el metabolismo de esteroides y ácidos grasos²⁵⁻²⁸.

Otras enzimas implicadas son la glutatión S transferasa, que participa en la protección de macromoléculas biológicas como son las proteicas y los ácidos nucleicos²⁷. Así como, la enzima *MTHFR* que participan en el metabolismo de tóxicos y síntesis de DNA²⁹⁻³⁰.

PRONÓSTICO

En las últimas décadas el pronóstico en la leucemia ha mejorado, las tasas de remisión, el tratamiento inicial y supervivencia han aumentado gracias a las pautas modernas. La discrepancia entre tasas de curación en adultos y niños, puede deberse en parte a diferencias en cuanto a la capacidad de tolerancia de un tratamiento quimioterapéutico intensivo en adultos, así como a una elevada incidencia de anomalías citogenéticas de mal pronóstico en éstos¹⁰⁻¹¹

Opciones de tratamiento para la LLA

La quimioterapia es el principal tratamiento para la LLA. Habitualmente se administra una combinación de fármacos y el tratamiento se divide en tres fases:

- Primera fase: Quimioterapia de inducción a la remisión.
- Segunda fase: Quimioterapia de consolidación.
- Tercera fase: Quimioterapia de mantenimiento.

En la inducción de remisión el objetivo es eliminar las células leucémicas y restablecer el estado clínico y hematológico normal para el paciente. Tiene una duración aproximada de 4 semanas, se utilizan diferentes medicamentos de acuerdo al esquema de tratamiento. Sin embargo, generalmente se incluyen esteroides, vincristina, antraciclina y L-asparginasa. Con este tipo de esquema se logra la remisión completa en aproximadamente el 95% de los casos y se disminuye significativamente el riesgo de recaída. Así, los pacientes que han logrado la remisión completa tienen además de la evidencia clínica, menos del 5% de linfoblastos en la médula ósea y ausencia de enfermedad detectable a nivel extramedular. Si el paciente presenta mejoría clínica y más del 5% de linfoblastos en médula ósea se clasifica como estadio de remisión parcial, sino hay respuesta al tratamiento se considera como resistente³¹⁻³².

En la fase de consolidación se utilizan agentes quimioterapéuticos adicionales en un período corto, el objetivo es minimizar la resistencia a los medicamentos y por consiguiente disminuir el riesgo de recaída³¹⁻³².

Las dos fases iniciales utilizan fármacos de quimioterapia intensiva, diseñados para destruir las células leucémicas en rápido crecimiento y se administra de manera intrahospitalaria, por lo que se hacen necesarias transfusiones sanguíneas frecuentes, así como tratamientos profilácticos a infecciones al paciente. El tratamiento de la LLA suele continuar durante dos o tres años de modo ambulatorio, en la denominada fase de mantenimiento. El objetivo de la quimioterapia es lograr la remisión (ausencia de células tumorales circulantes y en la médula ósea) y restablecer la normalidad de la producción de células sanguíneas.

La terapia de profiláctica en la infiltración del sistema nervioso central (SNC) por células tumorales es la intratecal y tiene lugar simultáneamente en las tres fases. Debido a que las dosis terapéuticas de administración sistémica no alcanzan concentraciones adecuadas en líquido cefalorraquídeo, generalmente el protocolo utilizado en el tratamiento al SNC consiste en la administración de MTX intratecal³³, dosis altas de metotrexate (MTX) endovenoso y/o la aplicación intratecal de hidrocortisona o citarabina³⁴.

La radioterapia se utiliza en los pacientes con hiperleucocitosis (Pre-B y B), respuesta pobre al tratamiento inicio y/o con leucemia de células T. Con estos esquemas de tratamiento se ha logrado disminuir del 50% a 5% la incidencia de recaída al SNC³⁵.

En el tratamiento de mantenimiento se utilizan esteroides, 2-mercaptopurina, MTX, vincristina, antraciclina, etopósido y ciclofosfamida. Esta fase de tratamiento dura de 24 a 36 meses. La mejoría en el pronóstico del paciente es el resultado de modificaciones a este esquema básico³⁶.

Estos esquemas de tratamiento están condicionados por factores individuales tales como la edad, la capacidad para metabolizar tratamientos intensivos y los hallazgos citogenéticos. Puesto que tras una primera remisión quedan células leucémicas residuales que no es posible detectar mediante análisis de sangre o de médula ósea con técnicas convencionales, y la probabilidad de recaída es alta, el tratamiento óptimo de la LLA requiere a su vez, un tratamiento intensivo adicional una vez alcanzada la remisión, que se denomina fase de consolidación³⁶.

Al completar el tratamiento programado debe verificarse la ausencia de enfermedad medular o extramedular, después de lo cual se suspende electivamente el tratamiento; la vigilancia del paciente implica la remisión clínica y la realización de biometría hemática periódicamente, para investigar datos que sugieran recaída.

En el manejo estadístico se han establecido parámetros para valorar la respuesta al tratamiento: Los más utilizados son la sobrevida libre de eventos, que incluye el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad hasta

la presencia de recaída y la supervivencia global, que mide el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la muerte. Habitualmente se valora al paciente hasta un tiempo predeterminado, el cual generalmente se establece en 5 años después del diagnóstico³⁶. Adicionalmente se debe considerar en los pacientes el alotrasplante de médula ósea, así como, la inclusión en ensayos clínicos que estudien el autotrasplante, la inmunomodulación y los nuevos agentes quimioterapéuticos o biológicos, como alternativa para aquellos pacientes que no dispongan de un donante compatible¹⁰⁻¹².

Pronóstico de la LLA

El pronóstico en la leucemia ha mejorado en las últimas décadas, las tasas de remisión completa con el tratamiento inicial y supervivencia son mayores. La discrepancia entre tasas de curación en adultos y niños, puede deberse en parte a diferencias en cuanto a la capacidad de tolerancia de un tratamiento quimioterapéutico intensivo en adultos, así como a elevada incidencia de anomalías citogenéticas que se consideran de mal pronóstico en los pacientes con LLA¹⁰⁻¹¹.

ENZIMA 5' 10 – METILENO TETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (*MTHFR*)

La *MTHFR* participa en la homeostasis intracelular de los folatos (figura 2), es responsable de conversión de homocisteína a metionina y estructuralmente se compone de homodímeros (656 aa) de 74.5 kDa, presenta un dominio catalítico N terminal (5-MTHF + NAD(P)⁺ denominado 5,10-MTHF + NAD(P)H) y un dominio regulador C terminal (S-adenosilmetionina), con dos isoformas (70 kDa y 77kDa) y dos promotores. Forma un dímero a través de la unión monocovalente FAD³⁷.

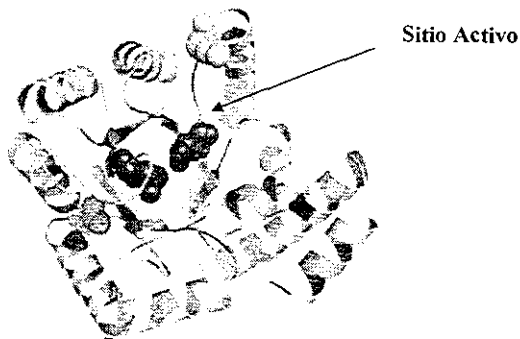


Figura 2. Estructura tridimensional de la proteína MTHFR³⁸.

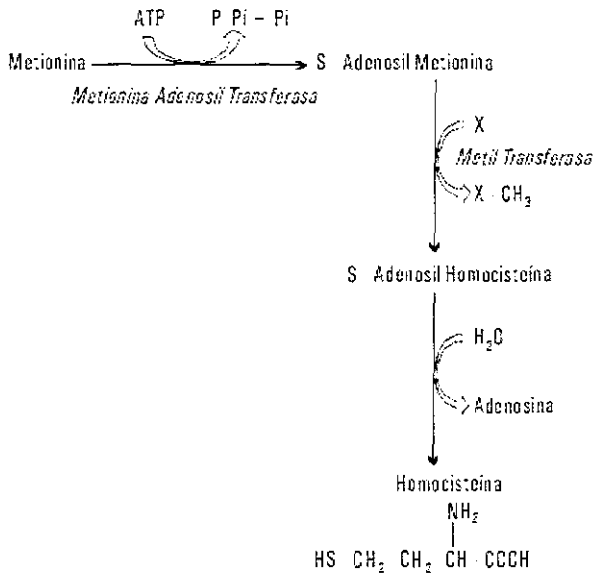


Figura 3. Metabolismo de la homocisteína.

La homocisteína es un aminoácido derivado de la desmetilación de la metionina que a su vez es metabolizada a través de dos diferentes vías, la transulfuración y la remetilación³⁹. La metionina dona un grupo metilo mediante

la reacción catalizada por la enzima metil transferasa, que da origen a la S-adenosilhomocisteína, la cual mediante la hidrólisis de la adenosina forma la homocisteína libre ³⁹.

La vía de remetilación para la recuperación de la metionina se cataboliza mediante la homocisteína metiltransferasa (metionina sintasa), que representa un paso metabólico importante por que es un punto de convergencia en donde participan diferentes cofactores y enzimas, como los cofactores derivados del complejo B, las vitaminas B12 y B6 ³⁹ (figura 4).

La vía de transulfuración interviene cuando los niveles de metionina en el organismo exceda de lo normal y permite la síntesis de cisteína (figura 5) ³⁹

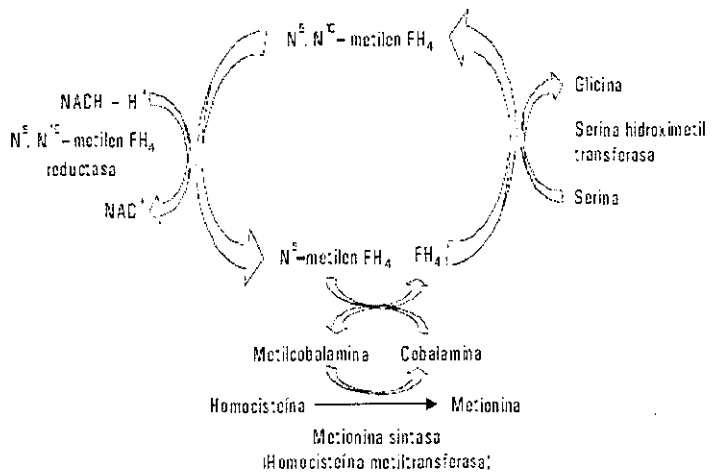


Figura 4. Síntesis de metionina por la vía de remetilación ³⁹.

pequeñas cantidades se excretan en orina. La homocisteína es por tanto un producto normal del metabolismo de la metionina que no circula en grandes cantidades, pues se recicla por la vía de recuperación de la metionina o la vía de la formación de la cisterna. Las concentraciones plasmáticas de la homocisteína pueden variar en el organismo por diferentes causas, una de ellas es la mutación de citosina a timina en el nucleótido 677 en el gen que codifica la enzima MTHFR lo que resulta un aumento de homocisteína en plasma, lo anterior puede contrarrestarse con la administración de ácido fólico que actúa como sustrato para la conversión de homocisteína a metionina. Otra causa de aumento de homocisteína plasmática se debe a la deficiencia de ácido fólico que causa un defecto en la remetilación de homocisteína a metionina. La producción del 5-metilTHF requiere un abastecimiento adecuado de folato reducido y la función apropiada de la MTHFR. Por lo tanto, si las enzimas funcionan inapropiadamente o los cofactores se encuentren en cantidades inadecuadas cabría la posibilidad de originar concentraciones elevadas de homocisteína³⁹.

GEN *MTHFR*

El gen *MTHFR* ubicado en el cromosoma 1 se localiza en el sitio p36.3 (figura 6) tiene una longitud de 2.2 Kb, integrado por 11 exones y 10 intrones (figura 7), codifica para un homodimero de aproximadamente 77 kDa la enzima 5,10-*MTHFR*, la cual desempeña un papel clave en el metabolismo de folatos, participa en la metilación de DNA y la síntesis de nucleótidos⁴⁰⁻⁴¹.

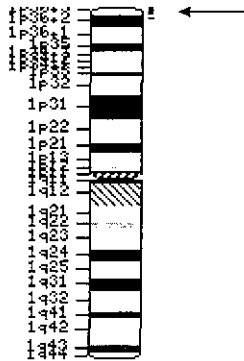


Figura 6. Cromosoma 1⁴¹.

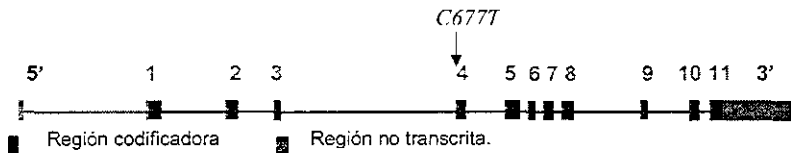


Figura 7. Gen *MTHFR*⁴¹.

Se han descrito diferentes polimorfismos en el gen *MTHFR* (cuadro 3), asociados a enfermedades de origen multifactorial, como las leucemias, defectos del tubo neural, otros tipos de cáncer, enfermedades coronarias, parkinson, entre otras. Uno de los polimorfismos más estudiados es el denominado 677C→T que se origina por un cambio de base (C por T) en el exón 4.

Cuadro 3. Variantes alélicas del gen *MTHFR* ⁴¹.

Variante	Codón afectado	Exón o Intrón
129C → T	P39P	Exón 1
IVS2+533G → A	n/a (intronic)	Intrón 2
677C → T	A222V	Exón 4
1068T → C	S352S	Exón 6
IVS6+31T → C	n/a (intronic)	Intrón 6
1298A → C	E429A	Exón 7
1317T → C	F435F	Exón 7
IVS10+262C → G	n/a (intronic)	intrón 10
1793G → A	R594Q	Exón 11

Basados en la nomenclatura oficial para cambios en genes humanos, el cambio referido como 677C→T correspondería al formato para cambios en el codón que codifica para el aminoácido, por tanto implicaría una alanina en el codón 677 sustituida por valina. La designación 677C→T es la nomenclatura correcta, ya que indica un cambio en la secuencia de nucleótidos⁴⁰.

Se ha observado que el genotipo 677TT produce termolabilidad de la enzima 5,10-*MTHFR* y como consecuencia eleva los niveles de homocisteína. Al respecto algunos estudios reportaron que la sustitución del nucleótido C por T en la posición 677 del gen *MTHFR* (mutación de sentido equivocado) produce el cambio de una alanina por una valina en la posición 222 del dominio catalítico de la enzima, con lo anterior demostraron que este cambio es responsable de la termolabilidad de la 5,10-*MTHFR* y que los homocigotos para este polimorfismo presentan el 30% de la actividad de la 5,10-*MTHFR* y niveles elevados de homocisteína circulante, mientras que en heterocigotos es de aproximadamente 65%, en contraste con la actividad encontrada en homocigotos sin el polimorfismo⁴⁻⁷.

Lo anterior fue confirmado por los hallazgos de Van Der Put y cols. (1998), quienes demostraron que el polimorfismo no solamente está asociado con termolabilidad de la enzima e incremento de los niveles plasmáticos de homocisteína, sino también con incremento de folatos en glóbulos rojos, aunque el nivel de folatos en plasma tiende a ser bajo, aún dentro del rango normal⁴⁴.

Cuadro 4. Frecuencia de las variantes alélicas 677C→T y 1298^a

<i>677C → T</i>	
Norte de China	20%
Sur de Italia	26%
México	32%
<i>1298A → C</i>	
343 controles caucásicos	
1298AA	44.50%
1298AC	46.20%
1298CC	9.30%
211 pacientes con cáncer de colon	
1298AA	45.20%
1298AC	46.70%
1298CC	8.10%

Estudios sobre la frecuencia del polimorfismo 677C→T han revelado que esta varía entre diversos grupos étnicos. En la población irlandesa se ha descrito una tasa de homocigotos T/T del 6-8%, en holandeses de 5%, en caucásicos de Estados Unidos de 13%, en canadienses del 12 % y en hispanos blancos del 25%. En México se ha descrito una incidencia de 3 a 4 veces mayor comparada con otros grupos étnicos. Sin embargo, se ha observado una alta incidencia de defectos de cierre de tubo neural en la región de Indonesia, proporcionando una incidencia del 20% en mujeres de la población general⁴²⁻⁴⁴.

Múltiples estudios epidemiológicos han intentado relacionar la asociación del polimorfismo 677C→T con la LLA en otras partes del mundo, sin embargo los resultados son contradictorios^{4-7, 45-46}.

En un estudio realizado por Doyeun O y cols. (2007), en la República de Corea en el cual participaron 118 adultos con LLA y 427 controles, buscando el riesgo asociado con el polimorfismo 677C→T del gen *MTHFR* y la LLA los autores concluyeron que los factores de riesgo asociados a este polimorfismo no están relacionados con la LLA en adultos⁴⁵.

En el grupo de Skibola C y cols. (1999), mediante un estudio de casos y controles en 308 pacientes adultos con LLA y 491 controles de la población de California se observó que el 32.5% de los pacientes fueron portadores del polimorfismo $677C \rightarrow T$ en contraste con el 35.0% de los controles. Así este polimorfismo no se encuentra asociado con la susceptibilidad al desarrollo de LLA en la población de California y sugieren que el estilo de vida juega un papel importante para el desarrollo de la enfermedad⁴.

Estudios similares realizados por Schnakenberg y cols. (2005) estudiaron 443 pacientes pediátricos con LLA y 379 controles de la población alemana y no encuentran asociación con la enfermedad⁴⁶.

Estudios de farmacogenómica en relación a los polimorfismos $677C \rightarrow T$ y A1298G en el gen *MTHFR* descritos por Aplenc R. y cols. (2005) observaron, que el Methotrexate (MTX), que se utiliza como parte de la quimioterapia de LLA tiene la propiedad de bloquear el metabolismo del folato, inhibe la síntesis del dTMP necesaria para la replicación del ADN y bloquea la conversión de 5,10-MTHFR a 5-metilTHF por *MTHFR*. Por lo que se piensa que alelos polimórficos de *MTHFR* aumentan el riesgo de recidiva en LLA, debido al aumento en la inhibición de la síntesis del DNA que impide la acción del MTX. Para probar esta hipótesis, realizaron un estudio en 520 pacientes con LLA infantil y observaron que el alelo polimórfico $677TT$ se asocio con la recaída (recidiva). Los datos anteriores proporcionaron evidencia de que el polimorfismo de *MTHFR* $677C \rightarrow T$ es una variante genética común que confiere un riesgo relativo moderado para el desarrollo de la enfermedad y un alto riesgo para la recaída en pacientes con LLA infantil⁴⁷.

Por otra parte, uno de los conceptos importantes en el estudio de los polimorfismos es el equilibrio de Hardy Weinberg (EHW), este principio se refiere al equilibrio de las frecuencias alélicas y genotípicas en una población, en ausencia de mutación, migración, selección y de apareamiento no aleatorio. Se dice que una población está en equilibrio, cuando es lo suficientemente

grande para que los errores de muestreo y efectos aleatorios sean despreciables; cuando el apareamiento dentro de la población ocurre al azar; cuando no existe ventaja selectiva de algún genotipo; cuando no existen otros factores como; mutación, migración y deriva génica al azar. Refiriéndonos a un solo par de alelos (A y a), la frecuencia de las células germinales A y a son definidas como p y q, respectivamente. El equilibrio de las frecuencias genotípicas esta dado por p^2 (AA), $2pq$ (Aa), y q^2 (aa), donde toda población cumple con la relación $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, esté o no en equilibrio. Cuando una población no está en EHW no concuerdan las frecuencias observadas para cada uno de los genotipos contra las correspondientes frecuencias esperadas⁴⁸⁻

49

JUSTIFICACIÓN

La LLA se considera como un problema de salud pública en México y en el mundo, presenta altas tasas de mortalidad en individuos adultos en edad reproductiva y productiva, por lo anterior es necesario implementar estrategias eficaces para su prevención, diagnóstico y control⁹.

Actualmente con el desarrollo del proyecto del genoma humano, se han logrado avances importantes en la descripción de genes con diversas patologías complejas de origen multifactorial como la LLA. Entre los genes que participan en el metabolismo xenobióticos se han propuesto al CYP450, al GST, NAT2; además de algunos que regulan el ciclo celular como p53 y el *MTHFR* el cual participa en la síntesis de ácidos nucleicos, entre otros. En este sentido se propone que estos genes además de contribuir a la variabilidad genética sean candidatos susceptibles para el desarrollo de la enfermedad, así como a la respuesta de terapias.

El polimorfismo *677C→T del gen MTHFR* se ha asociado inconsistentemente con la LLA, esta inconsistencia probablemente se deba a las diferencias genéticas en las poblaciones estudiadas tales como grupo étnico, género y edad. En México no existen estudios que asocien este polimorfismo con la LLA. Por lo anterior es necesario realizar estudios sistemáticos que determinen en primera instancia la frecuencia de este polimorfismo en pacientes y controles, su asociación con la enfermedad y en un futuro inmediato realizar estudios más avanzados que se puedan relacionar con la respuesta o no de la quimioterapia.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las frecuencias del polimorfismo 677C→T del gen *MTHFR* descritas en otras poblaciones del mundo, no pueden tomarse como referencia en nuestra población por la variabilidad genética que implica. Consideramos importante conocer la frecuencia de este polimorfismo en nuestra población. Así como su asociación con la LLA en adultos. Por lo anterior se deriva la siguiente pregunta de investigación ¿Cuál es la frecuencia del polimorfismo 677C→T del gen *MTHFR* en pacientes adultos con LLA y en individuos sanos del Occidente de México?

HIPÓTESIS

La frecuencia del polimorfismo $677C \rightarrow T$ del gen *MTHFR* es diferente en adultos con LLA y controles del Occidente de México.

OBJETIVOS

A) OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia del polimorfismo $677C \rightarrow T$ del gen *MTHFR* en pacientes con LLA y controles del Occidente de México.

B) OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Establecer las distribuciones alélicas y genotípicas del polimorfismo $677C \rightarrow T$ del gen *MTHFR* en el grupo de pacientes con LLA y en el grupo control del Occidente de México.
- 2) Establecer la asociación del polimorfismo $677C \rightarrow T$ del gen *MTHFR* en pacientes con LLA y controles.
- 3) Establecer la asociación del polimorfismo $677C \rightarrow T$ del gen *MTHFR* con el tipo de LLA.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO METODOLÓGICO

SEDE

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de la misma división, en el Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS y contó con la colaboración del Servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro medico Nacional de Occidente (CMNO), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

TIPO DE ESTUDIO

Casos y controles (no pareados)

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se integró un grupo de pacientes adultos con diagnóstico clínico de LLA y un grupo control del Occidente de México.

TAMAÑO DE MUESTRA

Puesto que el objetivo del estudio consiste en estimar parámetros poblacionales, se realizaron estimaciones con el 95% de confianza, con frecuencias o diferencias alélicas iguales o mayores al 5%. Para ello, el tamaño mínimo de la muestra es de 60 cromosomas independientes, que equivale a 30 individuos.

CAPTACIÓN DE MUESTRAS

Enero 2006– Junio del 2007.

CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

GRUPO DE PACIENTES

Individuos de origen mexicano, hombres y mujeres, no consanguíneos, con LLA demostrada clínicamente y por gabinete del Occidente de México.

GRUPO DE CONTROL

Mujeres y hombres de origen mexicano, sanos, no consanguíneos, sin antecedentes familiares de defectos de tubo neural, cáncer, enfermedad cardiovascular, hipertensión arterial y/o diabetes mellitus al momento de la encuesta.

CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN:

GRUPO DE PACIENTES

Aquellos con diagnóstico de LLA sin estudios complementarios que confirmen la enfermedad.

AMBOS GRUPOS DE ESTUDIO

Sujetos recientemente transfundidos, con leucopenia y/o aquellos que se nieguen a participar en el estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Aquellos individuos cuya muestra de ADN genómico se agoto, o se deterioro y/o fue imposible obtenerla nuevamente.

MATERIAL

Se estudiaron 107 pacientes y 170 controles, a los cuales se les proporcionó información acerca del estudio (anexo I y II), se obtuvo una muestra de sangre periférica de 5-10 ml con EDTA al 10% como anticoagulante para la extracción de ADN por el método de Miller⁵⁰. Se determinó la concentración y pureza del ADN por medio de un análisis espectrofotométrico 260/280 nm y un corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1.5% ⁵¹.

Se amplificó por RCP un fragmento del gen MTHFR que incluye el exón 4, para genotipificar el polimorfismo 677C→T en los grupos de estudio (ver diagrama de flujo, figura 8).

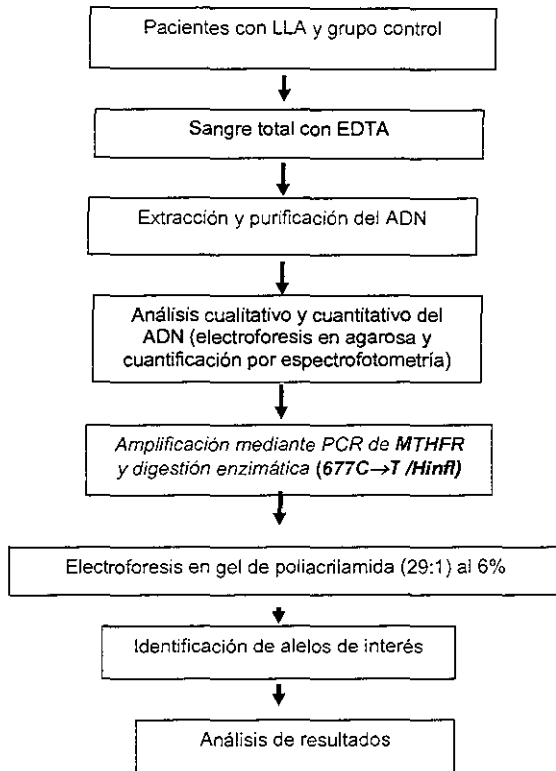


Figura 8. DIAGRAMA DE FLUJO (ESTRATEGIA METODOLOGICA)

POLIMORFISMO C677T EN EL GEN *MTHFR*

Por medio de RCP, se amplificó un fragmento de 158 pb, con los iniciadores 5'- CCTTGAACAGGTGGAGGCC -3' (sentido) y 5'- CAAAGAAAAGCTGCGTGATGAT -3' (antisentido), mediante el programa de 30 ciclos a 94°C x 4 min, 94°C x 1 min, 55°C x 1 min, 72°C x 1 min, y extensión final a 72°C x 7 min. El producto amplificado fue sometido al reconocimiento de la enzima de restricción *HinfI*, posteriormente mediante un corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 6% (29:1) y tinción con nitrato de plata se identificaron 3 genotipos (figura 9) ⁵².

- ⊕ Homocigoto para corte (alelo mutado, T/T): bandas: 28 y 130 pb
- ⊕ Homocigoto para no corte (alelo silvestre, C/C): banda: 158 pb
- ⊕ Heterocigoto (T/C): bandas: 28, 130 y 158 pb

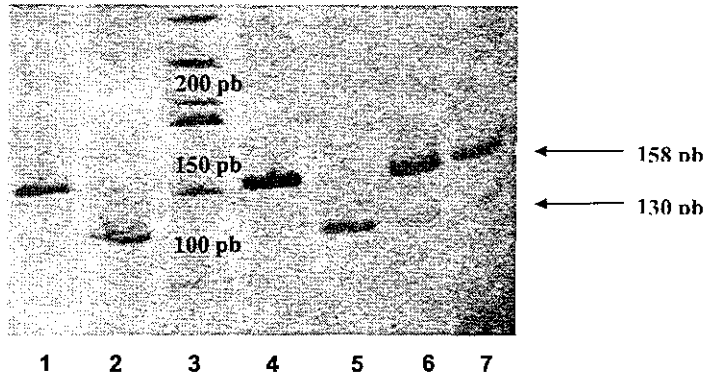


Figura 9. Electroforesis para la identificación del polimorfismo $677C \rightarrow T$. Gel de poliacrilamida al 6% (29:1) teñido con nitrato de plata. Carriles 1 y 4 muestran el genotipo 677CC. Carriles 2 y 5 muestran el genotipo 677TT. Carril 6 y 7 indican el genotipo 677CT y el carril 3 representa el marcador de peso molecular de 50 pb.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

1.- Estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas

Las frecuencias genotípicas del gen MTHFR se estimaron mediante el análisis de conteo de genotipos (homocigotos silvestres, mutados y heterocigotos). A partir del conteo genotípico se determinaron las frecuencias alélicas del marcador en la muestra analizada, los cuales se presentan en gráficas y cuadros en la sección de resultados. Se compararon los tres genotipos (677CC, 677CT y 677TT) por medio de χ^2 . Se calculó el error estándar para las frecuencias alélicas así como la raíz cuadrada de la varianza de la distribución binomial [$f \cdot (1-f/2n)$] donde f representa la frecuencia y n número de individuos de la muestra⁵³.

2.- Informatividad de los marcadores

La heterocigicidad observada (Hobs) corresponde a la frecuencia de individuos heterocigotos observados en la muestra total, la cual se calcula de la siguiente manera: $Hobs = 1 - Ho$, donde Ho constituye la frecuencia de los individuos homocigotos observados (número de homocigotos entre el total de individuos de la muestra)⁵³.

3.- Prueba Chi cuadrada (χ^2)

Se compararon por χ^2 las frecuencias observadas contra las esperadas, con sus respectivos errores estándar (EE). Su significancia estadística se evaluó por intervalos de confianza (IC) al 95%, considerando dos categorías: heterocigotos más homocigotos no polimórficos y homocigotos polimórficos para el marcador, por lo que un valor de $\chi^2 = 3.84$, con un grado de libertad corresponde a una $p = 0.05$ ⁵³.

4.- Número de genotipos observados y esperados

Esta prueba contrastó el número de genotipos observados (Gobs) con los esperados (Gesp), tanto heterocigotos como homocigotos así como sus errores estándar (EE) e intervalos de confianza del 95% (IC). Donde los Gesp representaron el número promedio de genotipos distintos que se esperaba ocurrieran según el número de individuos de la muestra, las hipótesis a evaluar fue⁴⁹⁻⁵⁴:

$H_0 \Rightarrow Gobs = Gesp (1 = p > 0.05) \Rightarrow EHW$

$H_1 \Rightarrow Gobs \neq Gesp (p = 0.05) \Rightarrow \text{Desviación EHW}$

Las pruebas de asociación de los polimorfismos se realizaron por medio de razón de momios, mediante el programa estadístico SPSS versión 13.0

5. - Microsoft Excel para Windows XP

Por medio de este programa se diseñaron las gráficas de la sección de resultados.

6.- Consideraciones éticas

En relación al artículo 17 del Reglamento en Materia de Investigación de Salud de la Ley General, el presente estudio fue clasificado como "investigación de riesgo mínimo", ya que sólo contempla, una muestra sanguínea máxima de 15 ml por sujeto. El artículo 23 de la misma Ley, contempla que este tipo de

investigación requiere la obtención de un consentimiento informado, por lo que se obtuvo dicho consentimiento firmado.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Fueron analizados un total de 277 muestras de ADN genómico, 107 integraron el grupo de pacientes con LLA y 170 muestras el grupo control. El grupo de pacientes presentó una edad promedio y desviación estándar de 40.46 ± 16.76 años y el grupo control de 37 ± 14.96 años. En cuanto al género se observó el 56.6% de hombres en el grupo de pacientes en comparación con el 45.3% en el grupo control. En cuanto al consumo de tabaco el grupo de pacientes presento menor frecuencia del consumo de tabaco 23.3% en comparación al 49.41% del grupo control.

El 24.29% del grupo de paciente refirió antecedentes familiares con cáncer. El 64.48% fue clasificado como LLA tipo 2, seguido por el 14% con LLA tipo 3 y el 8% con LLA tipo1. El 13% restante no se encontraron datos en el expediente clínico. Respecto a la sobrevida (esta fue considerada a partir del diagnóstico, tiempo de evolución y tratamiento en un lapso de 2 años) se observó una tasa de defunción del 20.56% y la sobrevida 68.22% (cuadro 5). Cabe señalar que el grupo control no refirió antecedentes de familiares con cáncer al momento de la encuesta.

Cuadro 5. Características generales de los grupos de estudio

EDAD ($\bar{x} \pm DS$) años	PACIENTES CON LLA (n=107)		GRUPO CONTROL (n=170)	
	40.46 \pm 16.76		37 \pm 14.96	
Rango (años)	18 – 88		18 – 81	
	(n)	%	(n)	%
= 30	(38)	35.52	(73)	42.94
31 – 40	(20)	18.70	(26)	15.30
41 – 50	(19)	17.75	(38)	22.35
51 – 60	(12)	11.22	(14)	8.23
61 – 70	(15)	14.01	(9)	5.30
71 – 80	(2)	1.86	(5)	2.94
81 – 90	(1)	0.94	(5)	2.94
GENERO				
Femenino	(46)	43.4	(93)	54.70
Masculino	(61)	56.6	(77)	45.3
TABACO				
Si	(25)	23.3	(84)	49.41
No	(56)	52.3	(86)	50.49
Sin datos	(26)	24.4		
ANTECEDENTES				
FAMILIARES DE CANCER				
Si	(26)	24.29		
No	(63)	58.87	(170)	100
Sin datos	(22)	16.84		
TIPO				
L1	(9)	8.4		
L2	(69)	64.48		
L3	(15)	14.00		
Sin datos	(14)	13.12		
SOBREVIDA				
SI	(73)	68.22		
NO	(22)	20.56		
Sin datos	(12)	11.22		

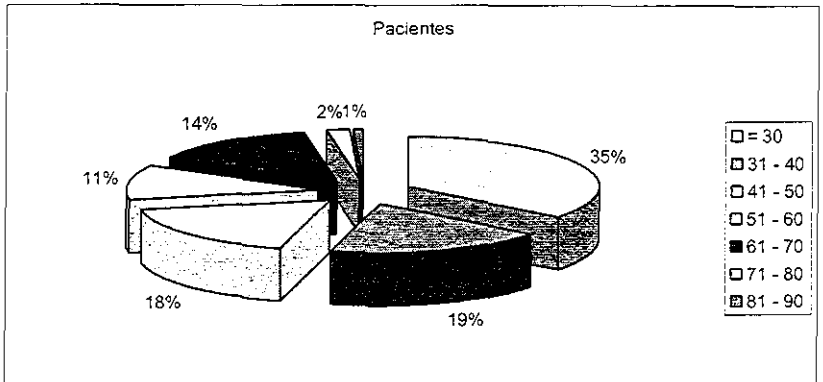


Figura 10. Pacientes con LLA clasificados por edad

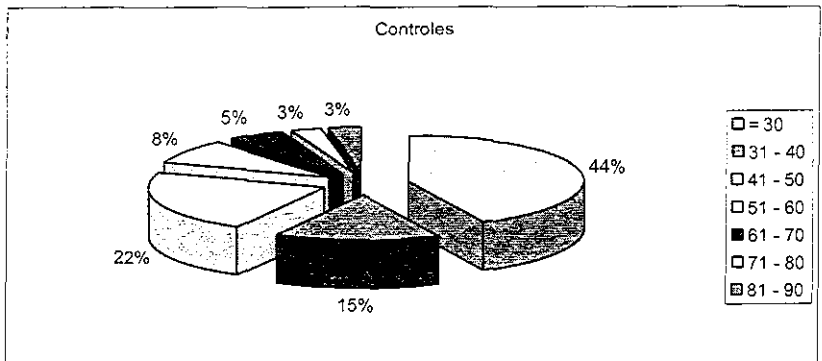


Figura 11. Controles clasificados por edad

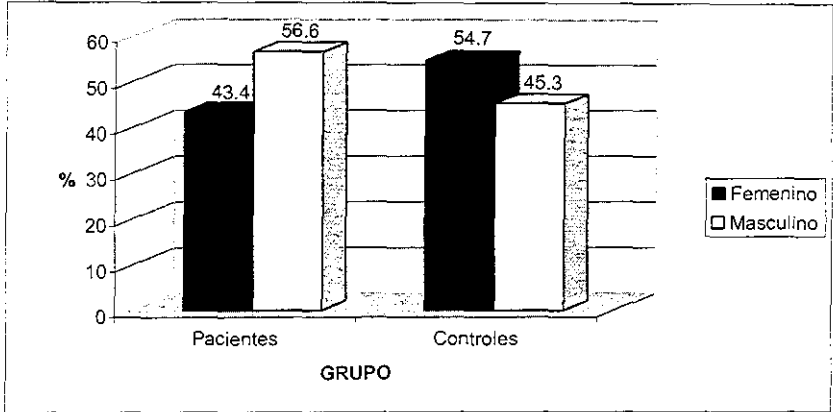


Figura 12. Clasificación por género

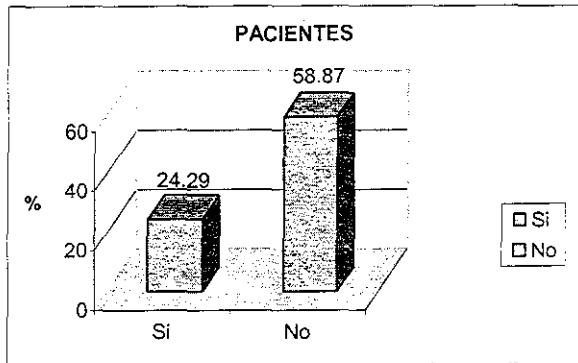


Figura 13. Antecedentes familiares

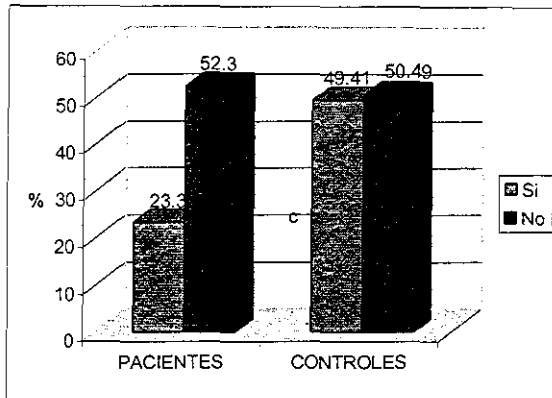


Figura 14. Consumo de tabaco

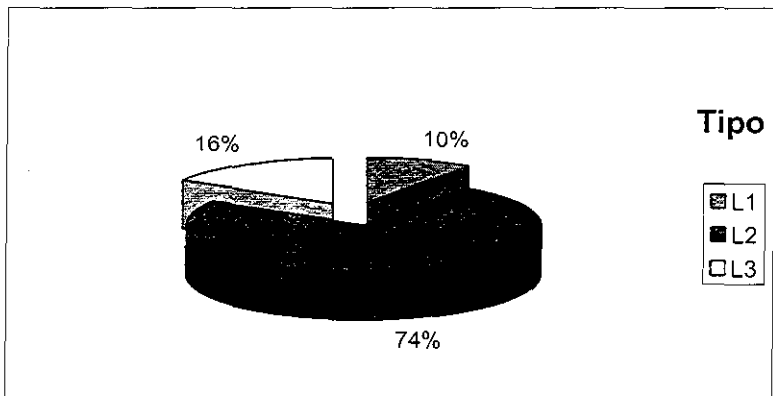


Figura 15. Frecuencia del subtipo de LLA

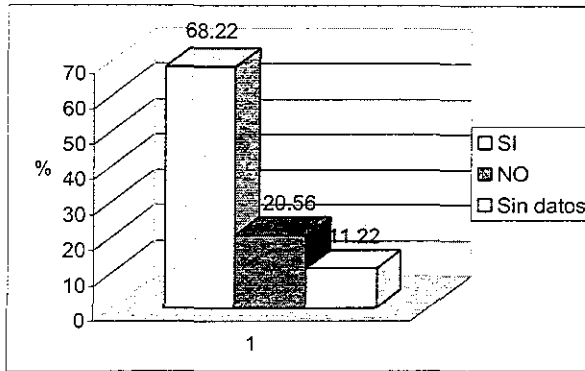


Figura 16. Sobrevida

FRECUENCIA GENOTÍPICA DEL POLIMORFISMO 677C→T DEL GEN *MTHFR*

La frecuencia del genotipo normal (677CC) en el grupo de pacientes fue del 40% (43/107), mientras que en el grupo control del 34 (58/170), el genotipo heterocigoto (677CT) resultó del 50% (53/107) en pacientes y de 48% (80/170) en controles. Respecto a la frecuencia del genotipo homocigoto polimórfico (677TT) se presentó en el 10% (11/107) en pacientes y 19% (32/170) en controles. Al comparar los grupos entre si por medio de χ^2 no mostraron diferencias significativas (Cuadro 6 y figura 17). El polimorfismo 677C→T estuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo control (Cuadro 7).

Cuadro 6. Frecuencias genotípicas del polimorfismo 677C→T en el gen *MTHFR* en los grupos de estudio

<i>MTHFR</i>	PACIENTES n=107 (%)	GRUPO CONTROL n=170 (%)	χ^2	OR (95%IC)	P
Corte 677TT	11 (10)	32 (19)	3.03	0.49 (0.21 – 1.07)	0.081
Heterocigoto 677CT	53 (50)	80 (48)	0.08	1.1 (0.66 – 1.84)	0.78
No corte 677CC	43 (40)	58 (34)	0.80	1.3(0.76 – 2.2)	0.37
	107 (100)	170 (100)			

OR menor 1 ($p < 0.05$) genotipo de protección; OR mayor 1 ($p < 0.05$) genotipo de riesgo

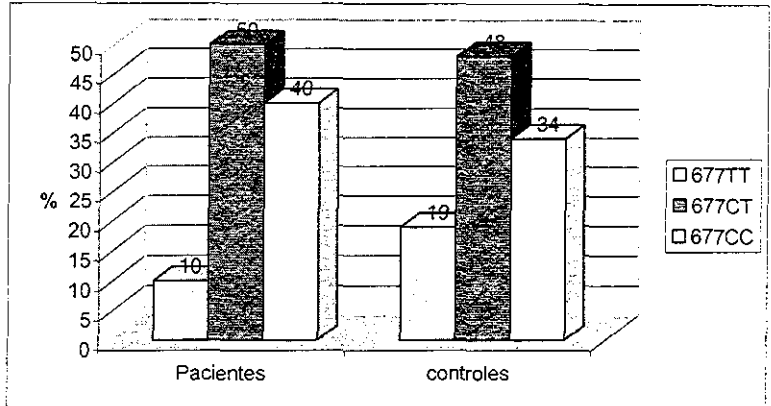


Figura 17. Frecuencias genotípicas del polimorfismo 677CT

Cuadro 7. Equilibrio de Hardy Weinberg en el grupo control

REFERENCIA	OBSERVADO	ESPERADO	χ^2	P
Corte 677TT	32	30	0.02	0.88
Heterocigoto 677CT	80	83	0.05	0.82
No corte 677CC	58	57	0.01	0.93

FRECUENCIA ALÉLICA DEL POLIMORFISMO 677C→T DEL GEN MTHFR

La frecuencia del alelo polimórfico (677T) en el grupo de pacientes fue del 35% (75/214) y en el grupo control del 42% (144/340). La del alelo normal (677C) fue de 65% (65/214) los pacientes y del 58% (58/340) en los controles. Al comparar los grupos de estudio por medio de χ^2 no fueron significativos (Cuadro 8 y figura 18).

Cuadro 8. Frecuencias alélicas de la mutación 677C→T en el gen *MTHFR* en los grupos de estudio

<i>MTHFR</i>	PACIENTES <i>n</i> (%)	CONTROLES <i>n</i> (%)	χ^2	OR (95%IC)	<i>p</i>
677T	75 (35)	144 (42)	2.64	0.73(0.51 – 1.06)	0.10
677C	139 (65)	196 (58)	2.64	1.36(0.94 – 1.97)	0.10
	214	340			

OR menor 1 ($p < 0.05$) genotipo de protección; OR mayor 1 ($p < 0.05$) genotipo de riesgo

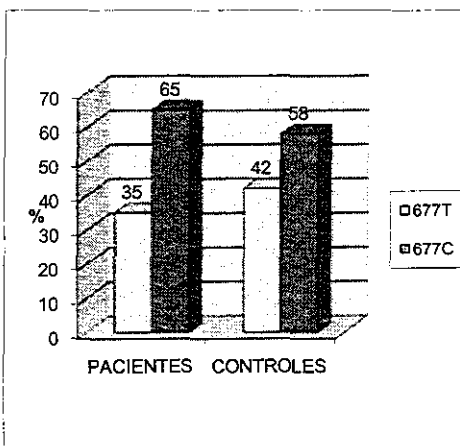


Figura 18. Frecuencias alélicas del polimorfismo 677C→T del gen *MTHFR* en los grupos de estudio

COMPARACIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO POR GÉNERO Y POLIMORFISMO 677C→T DEL GEN *MTHFR*

Al clasificar a los grupos de estudio por género y genotipos del polimorfismo 677C→T del gen *MTHFR*, no se observaron diferencias significativas al compararlos entre sí (Cuadros 9).

Cuadro 9. Comparación de los grupos de estudio clasificados por género y genotipo del polimorfismo 677C→T

	Pacientes		Controles	
	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino
Corte 677TT	8	3	14	18
Heterocigoto 677CT	29	24	35	45
No corte 677CC	24	19	28	30
TOTAL	61	46	77	93

	PACIENTES HOMBRES	vs	CONTROLES HOMBRES
	χ^2 *	OR (95%IC)	p*
Corte 677TT	0.33	0.68 (0.23 – 1.9)	NS
Heterocigoto 677CT	0.01	1.09 (0.52 – 2.25)	NS
No corte 677CC	0.03	1.14 (0.53 – 2.4)	NS

*prueba yates corregida

	PACIENTES MUJERES	vs	CONTROLES MUJERES
	χ^2 *	OR (95%IC)	p*
Corte 677TT	3.01	0.29 (0.05 – 1.09)	NS
Heterocigoto 677CT	0.06	1.16 (0.54 – 2.51)	NS
No corte 677CC	0.74	1.48 (0.66 – 3.267)	NS

**prueba yates corregida, OR menor 1 (p<0.05) genotipo de protección; OR mayor 1 (p<0.05) genotipo de riesgo

COMPARACIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO POR EDAD Y POLIMORFISMO 677C→T DEL GEN MTHFR

En los grupos de estudio no se observaron diferencias entre la edad y el polimorfismo 677C→T (Cuadro 10).

Cuadro 10. Clasificación y comparación de los grupos de estudio por edad y genotipo 677C→T

Edad	PACIENTES			Edad	CONTROLES		
	Corte 677TT	Heterocigoto 677CT	No corte 677CC		Corte 677T	Heterocigoto 677CT	No corte 677CC
<50	7	41	29	<50	19	45	36
≥50	4	12	14	≥50	13	35	22
	11	53	43		32	80	58

	PACIENTES (<50)	Vs	CONTROLES (<50)
	χ^2	OR (95%IC)	P
Corte 677TT	2.66	0.43 (0.14 – 1.14)	NS
Heterocigoto 677CT	0.88	1.39 (0.73 – 2.64)	NS
No corte 677CC	0.00	1.07 (0.55 – 2.08)	NS
	(≥50)		
	χ^2	OR (95%IC)	P
Corte 677TT	0.12	0.67 (0.15 – 2.48)	NS
Heterocigoto 677CT	19.74	0.49 (0.25 – 1.72)	NS
No corte 677CC	17.82	1.91(0.72 – 5.00)	NS

NS (p>0.05) OR menor 1 (p<0.05) genotipo de protección; OR mayor 1 (p<0.05) genotipo de riesgo

COMPARACIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO POR CONSUMO DE TABACO Y POLIMORFISMO 677C→T DEL GEN MTHFR

En los grupos de estudio no se observó diferencia al comparar consumo de tabaco y el polimorfismo 677C? T (Cuadros 11).

Cuadro 11. Clasificación y comparación de los grupos de estudio por consumo de tabaco y genotipos del polimorfismo 677C→T

	PACIENTES			CONTROLES		
	Corte 677TT	Heterocigoto 677CT	No corte 677CC	Corte 677TT	Heterocigoto 677CT	No corte 677CC
Fuma	5	13	7	19	37	28
No Fuma	5	24	27	13	43	30
Sin datos	1	16	9	0	0	0
Total	11	53	43	32	80	58

PACIENTES	FUMADORES		CONTROLES
	vs	χ^2	
Corte 677TT		0.07	NS
Heterocigoto 677CT		0.22	NS
No corte 677CC		0.00	NS
NO FUMADORES			
Corte 677TT		0.01	NS
Heterocigoto 677CT		0.44	NS
No corte 677CC		0.04	NS

OR menor 1 ($p < 0.05$) genotipo de protección; OR mayor 1 ($p < 0.05$) genotipo de riesgo

CLASIFICACIÓN DE PACIENTES POR TIPO DE LLA Y EL POLIMORFISMO 677C→T

Al clasificar a los pacientes portadores del genotipo 677TT por tipo de LLA se observó asociación de riesgo en el tipo LLA-L3 en comparación al tipo LLA-L2 con un OR (razón de momios, del inglés Odds ratio) de 11 (IC95% 1.74 – 78.43; $p < 0.05$) (Cuadro 12).

Cuadro 12. Clasificación y comparación de los grupos de estudio por tipo de LLA y genotipos
677C→T

	Corte 677TT	Heterocigoto 677CT	No corte 677CC
LLA-L1	0	3	6
LLA-L2	3	38	28
LLA-L3	5	6	4
Sin datos	3	6	5
	<i>OR(IC95%)χ^2</i>		<i>P</i>
LLA-L1 vs. LLA-L2	1.67(0.03 – 19.25)		NS
LLA-L1 vs. LLA-L3	0.18(0.00 – 2.05)		NS
LLA-L3 vs. LLA-L2	11(1.74 – 78.43)		0.003

OR menor 1 ($p < 0.05$) genotipo de protección; OR mayor 1 ($p < 0.05$) genotipo de riesgo

DISCUSIÓN

Características Generales de los grupos de estudio

La leucemia linfocítica aguda es considerada como una de las principales causas de enfermedad y muerte infantil en México y otras partes del mundo. En adultos la frecuencia es menor, sin embargo, se considera una de las principales causas de muerte después de los 50 años⁹.

Edad:

Se ha descrito que la LLA del adulto inicia entre las décadas de los 70 a 90 años. Sin embargo, datos reportados en Estados Unidos en el 2007, refieren que el 75% de casos nuevos diagnosticados fueron entre 50 a 55 años⁵⁵. En México existen tres estudios relacionados a LLA, uno realizado en 1982, por el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, que comprendió un período de 35 años en el cual se diagnosticaron 49 casos, con una edad media de 63.5 años⁵⁶. Otro estudio, multicéntrico incluyó 1,968 pacientes adultos con leucemia y sólo 6.6% de los casos fue LLA⁵⁷ y el tercer estudio, realizado en 1999, demostró que éste es un padecimiento poco común en mestizos mexicanos⁵⁸. En el presente estudio en un periodo de 18 meses se lograron captar 107 pacientes con LLA tan solo del Centro Médico de Occidente, con una edad promedio de 40 ± 16 , observándose en edades cada vez más temprana en los pacientes del Occidente de México. Una posible explicación a lo anterior, se le puede atribuir a las herramientas diagnósticas actuales, las cuales son cada vez mejores. Así como a factores ambientales como: exposición a contaminación de las grandes ciudades, radiaciones, productos químicos, herbicidas, pesticidas e infecciones recurrentes, entre otras.

Género

La literatura refiere que se presenta principalmente en el género masculino, datos que concuerdan con lo observado en el presente estudio en

donde la LLA se presentó en el 56.6% de los pacientes del sexo masculino en comparación con el 45.3% de las mujeres.

Tabaco:

El hábito de fumar en los casos fue menor (23.3%) comparado con el grupo control (49.41%), lo que demostró que no fue factor de riesgo en la muestra analizada. Sin embargo, en el 24.4% de los expedientes clínicos de los pacientes este dato no se pudo observar. Razón por la cual estos datos deben tomarse con cautela.

Antecedentes familiares:

Se consideran un factor de riesgo importante para el desarrollo de las leucemias, en el presente estudio el 24.29% del grupo de pacientes refirieron tener antecedentes familiares con cáncer, lo que se considera como el riesgo de la población general cuando se tienen antecedentes de cualquier tipo de cáncer. Sin embargo, el 5% de los pacientes refirieron tener un familiar directo con LLA. Al respecto la literatura refiere que el tener un pariente directo con LLA aumenta de 2 a 4 veces el riesgo⁵⁹.

Tipo de LLA

El porcentaje de L1 fue del 8%. Sin embargo, la frecuencia reportada es del 63-74% en infantes; la L2 (más frecuente en el adulto) fue del 64.48% y la L3 (más rara y de mal pronóstico) fue del 14 %¹⁰⁻¹². Lo anterior concuerda con lo descrito en la literatura en donde el tipo de LLA-L2 fue el que se presentó en mayor proporción en la muestra analizada

Sobrevida

Se presentó un porcentaje de defunción del 20.56% y de sobrevida del 68.22%. La sobrevida tiene una relación directa con la remisión completa del paciente después del tratamiento con quimioterapia, en el presente estudio el 21% de los pacientes con LLA, no lograron esta remisión completa después del tratamiento con quimioterapia. Lo anterior podría estar relacionado con factores

como la edad avanzada, co-morbilidad, alteraciones cromosómicas o anomalías citogenéticas (cromosoma Filadelfia), de mal pronóstico. Por lo que se sugiere que en estudios posteriores se estratifique a los pacientes de acuerdo a las alteraciones citogenéticas, esto permitiría clasificarlos en pacientes de alto riesgo y buscar una terapia más adecuada⁶⁰.

Por otra parte, otros factores de riesgo relacionados pueden ser la exposición a radiaciones, el benceno y ciertos agentes quimioterapéuticos pueden contribuir a la inducción de la leucemia⁵⁹.

Polimorfismo 677C→T

En México se han descrito diferentes frecuencias del polimorfismo 677C→T, dependiendo de la población estudiada, así como de su asociación con diferentes patologías. En este sentido, se han reportado diferentes frecuencias para el alelo T en esta población⁶¹⁻⁶². En el presente estudio no se observó asociación del genotipo TT en pacientes adultos con LLA (10%) con respecto al grupo control (19%). Datos que concuerdan con lo reportado por otros estudios^{4, 63}.

Por último, los pacientes con LLA-L3 portadores del genotipo 677TT presentaron un riesgo de 11 veces mayor comparados con los pacientes con LLA-L2, probablemente esta asociación se encuentre sobrestimada, puesto que el número de pacientes en la categoría L3 es bajo en comparación a la L2, al respecto se sugiere aumentar el número de pacientes para corroborar esta asociación.

Por otra parte, otros estudios refieren que pacientes con cáncer de colon portadores del genotipo 677TT presentaron el 50% de riesgo de desarrollar la enfermedad, comparados con aquellos con el genotipo 677CC⁶⁴. Resultados similares fueron observados en el presente estudio en pacientes con LLA-L3. También es importante señalar que el aparente efecto protector observado en los pacientes con LLA portadores con genotipo 677TT descrito en trabajos anteriores, pudiera estar enmascarado por la deficiencia de folatos que depende de los genotipos *MTHFR*. Con los datos anteriores podemos inferir

que el metabolismo de ácido fólico, así como los polimorfismos del gen *MTHFR* participan en el desarrollo de la LLA en adultos. Por lo que sería de gran importancia ampliar las investigaciones sobre la ingesta de folatos en nuestra población y su asociación con los genotipos (677TT, 1298AC, o 1298CC) del gen *MTHFR*.

CONCLUSIONES

La frecuencia del polimorfismo 677C→T del gen MTHFR fue similar en pacientes con LLA y controles del Occidente de México. La frecuencia para el genotipo 677TT fue del 10% en pacientes en tanto que para los controles del 19%; para el genotipo 677CT del 50% y 48%; y para el genotipo 677CC del 40% y 34% respectivamente.

La frecuencia del polimorfismo 677C→T en el grupo control fue consistente con el equilibrio de Hardy-Weinberg

No se observó asociación del genotipo 677TT en pacientes clasificados por edad, género, antecedentes familiares y sobrevida.

Se observó asociación del genotipo 677TT en pacientes con LLA-L3.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pui CH, Relling MV, Pharm D, Downing JR. Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*; 350:1335-1348. 2004.
2. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The Biology of chronic myeloid leukemia. *Engl J Med*; 341:164-172. 1999.
3. Fröhling S, Döhner H. Chromosomal Abnormalities in cancer. *Engl J Med*; 359:722-734. 2008.
4. Skibola C, Smith M, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright R, Morgan G. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci*; 96: 12810-12815. 1999.
5. Jones P. DNA methylation and cancer. *Cancer res*; 46:461-6. 1986.
6. Robien K, Ulrich C. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGe minireview. *Am J Epidemiol*; 157:571-582. 2003.
7. Spiroski I, Kedev S, Antov S, Arsov T, Krstevska M, Dzhekova-Stojkova S, Bosilkova G, Kostovska S, Trajkov D, Petlichkovski A, Strezova A, Efinska-Mladenovska O, Spiroski M. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR-677 and MTHFR-1298) genotypes and haplotypes and plasma homocysteine levels in patients with occlusive artery disease and deep venous thrombosis. *Acta Biochim Pol*; 55: 2008 (en prensa).
8. Heijmans BT, Boer JM, Suchiman HE, Cornelisse CJ, Westendorp RG, Kromhout D, Feskens EJ, Slagboom PE. A common variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (1p36) is associated with an increased risk of cancer. *Cancer research*; 63: 1249-1253. 2003.
9. Secretaria de Salud Jalisco. <http://ssj.jalisco.gob.mx/index.html> (Internet acceso septiembre de 2008).
10. Miñale J. Hematología Medicina de Laboratorio. 6ta edición, Editorial Reverte España, p.811-821.1995.

11. National Cancer Institute. U.S.A. leucemia linfoblástica aguda. <http://www.cancer.gov/clinical-trials/>. (disponible en línea, acceso septiembre 2008).
12. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol*; 47:553-61. 1981.
13. Medicina monografías: Leucemia y trastornos mieloproliferativos <http://www.altillo.com/medicina/monografias/leucemia.asp> (disponible en línea, acceso septiembre de 2008).
14. McDonald GA, Paul JCruickshank B. Atlas de hematología, 5 ed, Panamericana. España. p. 277. 1991.
15. Bene M, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemia's. European Group for the immunological characterization of leukemia; 9:1783-1786. 2000.
16. Mahoney D, acute Lymphoblastic Leukemia. McMillan J, DeAngelis C. *Oski's Pediatrics* 1ra ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins; 1493-1415. 1999.
17. Trueworthy R, Shuster J, T Look, W Crist, M Borowitz, A Carroll, L Frankel, M Harris, H Wagner, M Haggard. Hiperdiploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*; 10:606-13. 1992.
18. Thomas DA. Philadelphia Chromosome- Acute Lymphoblastic leukemia: A New Era of challenges. *Hematology*; 435-443. 2007.
19. Bortin MM, Horowitz MM, Gale RP, Barrett AJ, Champlin RE, Dicke KA, Gluckman E, Kolb HJ, Marmont AM, Mrcic M. Changing trends in allogeneic bone marrow transplantation for leukemia in the 1980s. *JAMA*; 268: 607-612. 1992.

20. La Hematología y los Trastornos de la Sangre <http://www.mcghealth.org/printer/internet/Greystone/speds/hematology/leukemia.html> disponible en línea, acceso Internet 2007).
21. Gaynor J, Chapman D, Little C, McKenzie S, Miller W, Andreeff M, Arlin Z, Berman E, Kempin S, Gee T. A cause-specific hazard rate analysis of prognostic factors among 199 adults with acute lymphoblastic leukemia: the Memorial Hospital experience since 1969. *J Clin Oncol*; 6: 1014-1030, 1988.
22. Hoelzer D, Thiel E, Löffler H, Büchner T, Ganser A, Heil G, Koch P, Freund M, Diedrich H, Rühl H. Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood*; 71: 123-131, 1988.
23. Zhang MJ, Hoelzer D, Horowitz MM, Gale RP, Messerer D, Klein JP, Löffler H, Sobocinski KA, Thiel E, Weisdorf DJ. Long-term follow-up of adults with acute lymphoblastic leukemia in first remission treated with chemotherapy or bone marrow transplantation. *Annals of Internal Medicine*; 123: 428-431, 1995.
24. Ortega A, Osnaya M, Rosas J. Leucemia linfoblástica aguda. Disponible en línea www.nietoeditores.com.mx. Fecha de la última consulta noviembre de 2008.
25. Han C; Wei H ; Qing L; Wen L; Fang C; Zhou R; Xin L; Ya L; Yan C. Genetic polymorphisms of metabolic enzymes CYP1A1, CYP2D6, GSTM1 and GSTT1 and leukemia susceptibility. *Eur J Can Prev*; 17:251-258, 2008
26. Gallegos M, Batista C, Deigado J, Figuera L, Puebla A, Arnaud L, Peralta V, Ramirez LJ, Zúñiga G. Cytochrome P4501A1 polymorphism is associated with susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in adult Mexican patients. *Blood Cells Mol Dis*; 33:326, 2004.
27. Krajcinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnott D. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia : Influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood*; 93:1496-1501, 1999.

28. Infante C, Krajcinovic M, Labuda D, Sinnett D. Parental smoking, CYP1A1 genetic polymorphisms and childhood leukemia (Québec, Canada). *Cancer Causes Controls*; 11:547-53, 2000.
29. Vineis P, Veglia F, Garte S, Malaveille C, Matullo G, Dunning A, Peluso M, Airoidi L, Overvad K, Raaschou-Nielsen O, Clavel-Chapelon F, Linseisen JP, Kaaks R, Boeing H, Trichopoulou A, Palli D, Crosignani P, Tumino R, Panico S, Bueno-De-Mesquita HB, Peeters PH, Lund E, Gonzalez CA, Martinez C, Dorronsoro M, Barricarte A, Navarro C, Quiros JR, Berglund G, Jarvholm B, Day NE, Key TJ, Saracci R, Riboli E, Autrup H. Genetic susceptibility according to three metabolic pathways in cancers of the lung and bladder and in myeloid leukemia in nonsmokers. *Ann Oncol*; 18:1230-1242. 2007.
30. Shimasaki N, Mori T, Torii C, Sato R, Shimada H, Tanigawara Y, Kosaki K, Takahashi T. Influence of MTHFR and RFC1 polymorphisms on toxicities during maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia or lymphoma. *J Pediatr Hematol Oncol*; 30:347-52. 2008.
31. Margolin J, Poplack D. Acute lymphoblastic Leukemia. En Pizzo DG, editores. *Principles and Practice of Oncology*. 3ra ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1ra ed. 409-462. 1997.
32. Giles FJ. Troxacitabine-based therapy of refractory leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*; 2:261-6. 2002.
33. Tubergen D, Gilchrist G, O'brien R, Coccia P, Sather H, Waskerwitz M, Hammond GD. Prevention of CNS disease in intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: comparison of cranial radiation and intrathecal methotrexate and the importance of systemic therapy a Children Cancer Group report. *J Clin Oncol*; 11: 520-526. 1993.
34. Pullen J, Boyett J, Shuster J, Crist W, Land V, Frankel L, Iyer R, Backstrom L, van Eys J, Harris M. Extended triple intrathecal chemotherapy trial for prevention of CNS relapse in good-risk and poor-

- risk patients with B-progenitor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*; 11: 839-849. 1993.
35. Chessells JM. Recent advances in Management of acute leukaemia. *Arch Dis Child*; 82:438-442. 2000.
 36. Rivera G, Zhou Y, Hancock M, Gajjar A, Rubnitz J, Ribeiro R, Sandlund JT, Hudson M, Relling M, Evans WE, Pui CH. Recurrence After Initial Intensive Treatment for Childhood Acute Lymphoblastic leukemia. *Cancer*; 103:368-376. 2005.
 37. Pejchal R, Sargeant R, Ludwig M. Structures of NADH and CH(3)-H(4)Folate Complexes of Escherichia coli Methylenetetrahydrofolate Reductase Reveal a Spartan Strategy for a Ping-Pong Reaction. *Biochemistry*; 44: 11447-11457. 2005.
 38. http://iacirc.res.in/List_of_Ongoing_Projects. (disponible en línea, acceso noviembre de 2008).
 39. Méndez A, Fernández J. Metabolismo de la homocisteína y su relación con la aterosclerosis. *Rev. Cubana Invest Biomed*; 18:155-68, 1999.
 40. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*; 431:931-945, 2004.
 41. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=retrieve&dopt=default&list_uids=4524; (disponible en línea, Internet; acceso septiembre 2008).
 42. Perales J, Valdez R, Villarreal J, Triana H, Saldívar D, Barrera H, Rojas A, López R, Garza M. Niveles de ácido fólico, homocisteína y polimorfismo de la enzima Metilentetrahidrofolato Reductasa. *Salud pública y nutrición*; 15-21, 2000.
 43. Permono B, Supriadi E, Vroling L, Cloos J, Hendrik J. Thymidilate synthase polymorphisms in Indonesian childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal*; 281-41:4, 2005.
 44. Van der Put N, Gabreels F, Stevens E, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the

- methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?. *Am J Hum Genet*; 62:1044-1051. 1998.
45. Doyeun O, Kim K, Ju L, Chul H, y cols. Association of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T and A1298C) polymorphisms in Korean patients with adult acute lymphoblastic leukemia. *Review. Anticancer Res*; 27:3419-3424, 2007.
 46. Schnakenberg E, Mehles A, Cario G, Rehe K, Seidemann K, Schlegelberger B, Hoiger AE, H Welte k, Schrappe M, Stanulla M. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and susceptibility to pediatric acute lymphoblastic leukemia in a German study population. *BMC Medical Genetics*; 6:23, 2005.
 47. Aplenc R, Thompson J, Han P, La M, Zhao H, Lange B, and Rebbeck T. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Therapy Response in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res*; 65:2482-2487, 2005.
 48. Klug WS, Cummings MR. *Conceptos de Genética*. 5^a ed. Prentice Hall Iberia. Madrid, España. 696-700. 1999.
 49. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*; 48:361-372. 1992.
 50. Miller SA, Dikes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*; 16:1215. 1998.
 51. Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor. New York, USA. 1998.
 52. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF; United Kingdom Childhood Cancer Study investigators. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci*; 98:4004-4009, 2001.
 53. Weir BS. Multiple tests. In *Genetic Data Analysis*. Sinauer Associates Sunderland MA, 109-110, 1990.

54. Devlin B, Rish N, Roeder K, Chakraborty R, NCR report on DNA typing (letter). *Science*; 260:1057-1059, 1993.
55. Espey DK, Wu X-C, Swan J, Wiggins C, Jim MA, Ward E, Wingo PA, Howe HL, Ries LAG, Miller BA, Jemal A, Ahmed F, Cobb N, Kaur JS, Edwards BK. Annual Report To the Nation on the Status of Cancer, 1975-2004, Featuring Cancer in American Indians and Alaska Natives. *Cancer*; 110: 2119-2152, 2007.
56. Aleman D, Ruiz GJ, Verduzco L, Lopez B, Labardini JR. Leucemia linfocítica crónica. Experiencia de 35 años en el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. *Rev Invest Clin*; 34:151-6, 1982.
57. Ruiz GJ, Cantú OG, Mercado L, Aprezana MG. La frecuencia de algunas neoplasias linfoproliferativas crónicas es menor en México que en poblaciones caucásicas. Estudio Multicéntrico. *Med Int Mex*; 12:41. 1996.
58. Ruiz GJ, Velázquez BM, Apreza MG, Pérez B. Chronic lymphocytic leukemia is infrequent in Mexican Mestizos. *Int J Hematol*; 69:253-5, 1999.
59. www.cancer.org/docroot/esp/conten/esp. Acceso septiembre de 2008.
60. wikipedia.org/wiki/Cromosoma_Filadelfia. Disponible en línea, internet acceso septiembre 2008.
61. Guéant RM, Guéant JL, Debard R. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutrition*; 83: 701-707, 2006.
62. Davalos IP, Olivares N, Castillo MT, Cantú JM, Ibarra B, Sandoval L, Morán MC, Gallegos MP, Chakraborty R, Rivas F. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann Genet*; 43: 89 – 92, 2000.

63. Franco RF, Simoes BO, Tone LG, Gabellini SM, Zago MA, Faicão RP. The methylenetetrahydrifolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukemia. *Br J Haematol*; 115:616-618, 2001.
64. Ma J, Stampfer M, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, Willett WC, Selhub J, Hennekens CH, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res*; 57: 1098–1102, 1997.

ANEXO I



Centro de Investigación Biomédica de Occidente

Centro Médico Nacional de Occidente, IMSS

División de Medicina Molecular

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Por medio del presente autorizo a la Dra. Martha Patricia Gallegos Arreola y al Biol. David Alejandro Carbajal Uribe, para extraer de 5-10 ml de sangre venosa de mi brazo y si es necesario, repetir el procedimiento anterior en un período no mayor de tres meses, a fin de realizar nuevos estudios.

El propósito de la toma de muestra es realizar estudios de:

“FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO C677T DEL GEN *MTHFR* EN PACIENTES ADULTOS CON LEUCEMIA LINFOCITICA AGUADA DEL OCCIDENTE DE MÉXICO”

Así como estudios genéticos de tipo poblacional, siempre y cuando se mantenga la confidencialidad de mis datos personales.

Mi firma en este documento manifiesta mi participación voluntaria en este proyecto de investigación. Tal participación no libera a los investigadores e institución de su responsabilidad ética para conmigo.

Entiendo que mi participación en esta investigación puede terminar en cualquier momento sin que se perjudique mi futura atención.

Guadalajara, Jal., a ____ de _____ de _____.

Responsable de la toma de muestra
Nombre y firma

Voluntario
Nombre y firma

Testigo
Nombre y firma

Testigo
Nombre y firma

No. de Registro: _____

ANEXO II

HOJA DE CAPTACIÓN DE DATOS

FECHA _____ COMPLETO _____ SI NO

N: CASO _____ CONTROL _____

No. DE REGISTRO EN CIBO _____

NOMBRE: _____

TELÉFONO _____

DIRECCIÓN _____

EDAD _____ AÑOS _____

Tabaquismo: Actual Previo Nunca

Tiempo de evolución de tabaquismo _____ Número de cigarrillos/día _____

Dejó de fumar _____

Antecedentes familiares: DM _____ años _____ meses _____

Familiar con DM: SI NO Padre Madre No. hermanos No. Hermanas

Hipertensión: _____

Cáncer: _____

Leucemia: _____

Defecto en cierre de tubo neural: _____

Antecedentes con enfermedad renal en el familiar _____

Antecedentes de infarto en familiar de primer grado _____

Cardiopatía Isquémica: _____

PESO: _____ TALLA _____ IMC _____ TA _____

Reporte de Hematología

Tratamiento con quimioterapia

No. de Registro: _____

ANEXO III

EXTRACCIÓN DE ADN

Existen diferentes protocolos para la extracción de los ácidos nucleicos. La mayoría se caracterizan por el empleo de detergentes y solventes orgánicos que rompen los núcleos de las células y remueven las proteínas adheridas al ADN, seguidas por la precipitación de éste con sales y alcoholes. De esta manera son utilizados en la amplificación *in vitro* por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) ⁵⁰.

MICROMÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN POR CTAB / DTAB

Método rápido de extracción de ADN partiendo de poco material biológico. Descrito por Gustincich en 1991, se basa en el empleo de dos detergentes, bromuro de duodecil trimetil aronio (DTAB) y bromuro de hexadecil trimetil aronio (CTAB). El DTAB lisa las células blanco y el CTAB detergente catiónico se une al ADN para precipitarlo⁵⁰.

PROCEDIMIENTO:

- 1- Tomar 300 µl de sangre periférica con EDTA como anticoagulante y colocarla en un microtubo de 2.0 ml previamente rotulado (6 tubos para cada muestra).
- 2- Añadir 750 µl de buffer de lisis DTAB, mezclar suavemente.
- 3- Incubar durante 5 min. a 68°C.
- 4- Retirar los tubos de la incubación e inmediatamente añadir 900 µl de cloroformo, tapar bien los tubos y agitar vigorosamente durante 1 min.
- 5- Centrifugar 15 min. a 10,000 rpm. En esta etapa se formarán tres capas: la capa inferior de cloroformo, la intermedia corresponde a la lisis celular y la superior acuosa donde se encuentra el ADN.
- 6- Transferir a tubos nuevos la capa superior acuosa con una pipeta de punta estéril (cuidadosamente)

- 7- Adicionar 100 μ l de CTAB y 800 μ l de agua inyectable y agitar suavemente.
- 8- En este paso se pueden refrigerar los tubos a 4°C durante 5 min. Para agilizar la precipitación del ADN (paso opcional).
- 9- Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min.
- 10- Desechar el sobrenadante y recuperar el botón de ADN, añadir 100 μ l de NaCl 1.2 M, más 1 ml de etanol absoluto frío, mezclar suavemente.
- 11- Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min.
- 12- Descartar el sobrenadante y recuperar el precipitado, añadir 1ml de etanol al 70%, mezclar suavemente.
- 13- Centrifugar a 5,000 rpm durante 5 min., eliminar al sobrenadante.
- 14- Repetir los pasos 12 y 13.
- 15- Juntar en un solo tubo los botones de ADN de la misma muestra, extraídos en diferentes tubos.
- 16- Eliminar completamente el etanol (evaporar).
- 17- Resuspender el ADN en buffer TE (Tris HCl 10mM, EDTA 0.2mM, pH 8), agitar suavemente y refrigerar a 4°C hasta su procesamiento.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

Buffer de lisis DTAB:

DTAB		8%	(8 g / 0.1L)
Tris	(PM 121.1)	0.1 M, pH 8.6	(1.21 g / 0.1 L)
NaCl	(PM 58.44)	1.2M	(7 g / 0.1 L)
EDTA	(PM 372.2)	0.5 M	(1.86 g / 0.1 L)

Disolver el Tris y ajustar el pH de 8.6 con HCl en $\frac{3}{4}$ del volumen final, adicionar el DTAB, el NaCl, aforar y esterilizar con autoclave.

Buffer CTAB:

CTAB		5%	(5 g / 0.1 L)
NaCl	(PM 58.44 g)	0.4 M	(2.34 g / 0.1 L)

Disolver ambas sales en agua desmineralizada estéril y aforar a 100 ml.

Solución NaCl 1.2 M:

NaCl	(PM 58.44 g)	1.2 M	(7 g / 0.1 L)
------	--------------	-------	---------------

Disolver la sal en agua desmineralizada estéril y aforar a 100 ml.

Buffer TE:

Tris	(PM 121.1 g)	0.01 M, pH 8	(0.121 g / 0.1 L)
EDTA	(PM 372.2 g)	0.001 M	(0.01286 g / 0.1 L)

Disolver el Tris y ajustar a pH 8 con HCl en $\frac{1}{4}$ del volumen final, adicionar el EDTA, aforar y esterilizar con autoclave.

MÉTODO PARA EXTRACCIÓN DE ADN POR PRECIPITACIÓN CON SALES (MÉTODO DE MILLER)

Obtención de Leucocitos de sangre periférica:

- Se toman de 5 a 10 ml de sangre periférica, en tubo con anticoagulante y se colocan en un tubo de plástico de 50 ml.
- Se adicionan 2 volúmenes de la solución para la lisis de eritrocitos ($\text{NH}_4\text{Cl} / \text{NH}_4\text{HCO}_3$ 10:1).
- La mezcla se refrigera a 4°C por 10 min. para ayudar a la lisis de eritrocitos.
- Se centrifuga a 5,000 rpm durante 10 min.
- Se descarta el sobrenadante y el botón de leucocitos se lava las veces necesarias hasta remover todos los eritrocitos (hasta que el botón quede blanco).

EXTRACCIÓN :

- El botón de leucocitos se resuspende en 3 ml de buffer de lisis de núcleos (Tris HCl 10mM, NaCl 400mM, EDTA Na_2 2mM, pH 8.2).

- El aislado de leucocitos se deja en digestión toda la noche a 37°C (12, 24 ó 48 h) con 0.2 ml de SDS 10%, 0.5 ml de solución de proteinasa K (1 mg de proteinasa K en SDS 1% y EDTA (ácido ethylenodiaminotetra acético, 2mM).
- Adicionar 1 ml de solución saturada de NaCl (6M).
- Agitar vigorosamente por 15 seg.
- Centrifugar a 2,500 rpm durante 15 min.
- Recuperar el sobrenadante (que contiene el ADN) y transferirlo a otro tubo.
- Adicionar 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente y mezclar por inversión varias veces hasta que forme un precipitado (el ADN "limpio" flota en la superficie).
- Transferir el ADN precipitado a un microtubo de 1.5 ml y lavarlo con etanol al 70% frío las veces necesarias para eliminar las sales.
- Se deja evaporar el etanol del ADN limpio.
- Disolver el ADN en buffer TE (Tris HCl 10mM, EDTA 0.2mM, pH 7.5) por 2 h a 37°C.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

Solución para obtención de leucocitos (lisis de eritrocitos):

NH ₄ HCO ₃	(PM 79.06 g)	0.01M	(0.7906 g / 1L)
NH ₄ Cl	(PM 53.49 g)	0.144M	(7.70256 g / 1L)

Disolver en agua desmineralizada estéril y aforar a 1,000 ml.

Buffer de lisis de leucocitos:

Tris	(PM 121.1 g)	0.01 M	(1,211 g / 1 L)
NaCl	(PM 58.44 g)	0.4 M	(23.376 g / 1 L)
EDTA	(PM 372.25 g)	0.002 M	(0.7445 g / 1 L)

Disolver en agua desmineralizada estéril y aforar a 1,000ml

SDS al 10%:

Disolver 10 g de SDS en agua desmineralizada estéril y aforar a 100 ml.

Solución NaCl 6M:

NaCl	(PM 58.44 g)	6 M	(35.064 g / 0.1 L)
------	--------------	-----	--------------------

Disolver en agua desmineralizada estéril y aforar a 50 ml.

Solución de proteinasa K:

Proteinasa K		1 mg / ml	(10mg)
SDS		1%	(0.1g)
EDTA	(PM 372.2 g)	0.0002 M	(0.07445 g / 1 L)

Disolver en agua desmineralizada estéril y aforar a 10 ml.

Buffer TE:

Tris	(PM 121.1 g)	0.01 M, pH 7.5	(0.121 g / 0.1 L)
EDTA	(PM 372.2 g)	0.0002 M	(0.007445 g / 0.1 L)

Disolver el Tris y ajustar a pH de 7.5 con HCl en $\frac{3}{4}$ del volumen final, adicionar el EDTA, aforar y esterilizar con autoclave.

CUANTIFICACIÓN DE ADN

Para estimar la cantidad de ADN genómico y verificar su pureza se determina la densidad óptica a 260 nm y 280 nm por medio de un espectrofotómetro. Una relación de densidad óptica 260/280 nm mayor de 1.8 indica que el ADN tiene una pureza adecuada; mientras que si es menor de 1.8 se debe de considerar contaminación de la muestra, principalmente por sales o proteínas⁵¹.

PROCEDIMIENTO:

Colocar 5 μ l de la muestra de ADN en una celda de cuarzo conteniendo 1 ml de agua destilada, mezclar suavemente y leer a 260 y 280 nm.

- Mediante la aplicación de la siguiente fórmula se determina la concentración del ADN:
- $\text{ADN ng / ml} = \text{D.O 260 nm} \times \text{dilución (1005 / 5 } \mu\text{l)} \times 50$ (factor constante).
- 50 es el coeficiente de extinción molar de 50 ng / ml de ADN que tienen la máxima absorbancia de 1.0 unidad de desviación óptica (D.O.) a 260 nm.

Para determinar la pureza del ADN (cantidad de proteínas), el valor de la relación D.O 260 nm / D.O. 280 nm debe ser de 1.8 en adelante para considerarse satisfactoria.

VERIFICACIÓN DE PUREZA DEL ADN

La electroforesis a través de gel de agarosa o poliacrilamida es un método utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de ácidos nucleicos, por lo que es un método alternativo para determinar su integridad. En el corrimiento electroforético se utiliza como control una muestra de ADN de concentración conocida, la presencia en el gel de una banda nítida es indicativo de que el ADN aislado tienen una pureza adecuada, mientras que si se observa un barrido o un patrón de varias bandas indica contaminación por sales y degradación del ADN respectivamente⁵¹.

PROCEDIMIENTO:

- Aplicar 2 μ l de ADN genómico en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1X.
- Mezclar la muestra de ADN con 3 μ l de jugo azul 6X.
- Utilizar TBE 1X como buffer de corrimiento con un voltaje constante (60 V) durante 1h 30 min. hasta que el colorante con mayor peso molecular (xilencianol) haya migrado 3 cm. a partir del punto de aplicación.

- Teñir el gel sumergiéndolo en solución de bromuro de etidio 0.5 mg / ml durante 5 min., enjuagar y visualizar el ADN con un transiluminador de UV.

El bromuro de etidio es un compuesto que tiene la propiedad de intercalarse entre las bases del ADN cuando éste se encuentra en doble cadena y fluoresce cuando incide en él luz ultravioleta. Estas propiedades son aprovechadas para la visualización de ADN que se ha sometido previamente a un corrimiento electroforético.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

Gel de agarosa al 1.5%:

- Pesar agarosa de acuerdo al volumen del molde a utilizar (30 ml para cámara chica ó 60 ml para cámara grande).
- Para una concentración de 1.5% adicionar TBE 0.5X y fundir la agarosa con calor hasta observar una solución cristalina (1.5 g de agarosa en 100 ml de TBE 0.5X).
- Bajar la temperatura hasta 55°C y verter al molde evitando la formación de burbujas.
- Reposar por lo menos 30 min. A temperatura ambiente para que la agarosa pueda gelificar.

Para preparar TBE 0.5X, tomar 50 ml de TBE 10X y aforar con agua desmineralizada a 1,000 ml.

Buffer TBE 10X:

EDTA pH8	(PM 372.2)	0.02 M	(40 ml de sol 5 M / 1.0 L)
Tris	(PM 121.1)	0.89 M	(108.0 g / 1.0 L)
Ácido Bórico	(PM 61.844)	0.89 M	(55.04 g / 1.0 L)

Preparar una solución de EDTA 0.5 M (18.61 g / 0.1 L) adicionar lentamente el NaOH para facilitar la disolución del EDTA, ajustar a pH de 8.0.

Jugo azul:

Azul de bromofenol	0.25%	(25 mg / 10 ml)
Xilencianol	0.25%	(25 mg / 10 ml)
Glicerol	30%	(3 ml / 10 ml)

Mezclar ambos colorantes con el glicerol y aforar a 10 ml con agua desionizada.

Solución de bromuro de etidio:

Para la tinción de los geles se prepara una solución stock (100X), a una concentración de 0.5 mg /ml disueltos en agua mineralizada colocándolo en un frasco color ámbar protegido de la luz. La solución de uso contiene 1 % del stock por cada 100 ml de TBE 1X. El bromuro de etidio es un compuesto CARCINOGENICO, por lo que se debe de tener gran cuidado al utilizarlo, considerando las precauciones básicas de seguridad, como uso de guantes y cubre bocas⁶².

ANEXO IV

ANÁLISIS DE GENOTIPOS

AMPLIFICACIÓN GÉNICA

La RCP es un método de síntesis in vitro de ácidos nucleicos, por medio del cual un segmento de ADN o ARN específico, es amplificado. Esta metodología involucra Buffer para la enzima Taq polimerasa, cloruro de magnesio que sirve como amortiguador de la reacción, dinucleótidos trifosfatados y dos iniciadores (oligonucleótidos) que flanquean el fragmento de ADN por ser amplificado así como ciclos repetidos de desnaturalización a alta temperatura de la cadena de ADN, alineamiento o apareamiento de iniciadores a sus secuencias complementarias en la hebra de ADN de la secuencia blanco y la taq ADN polimerasa termoestable, lo que permite el análisis de secuencias cortas a partir de cantidades muy pequeñas de ADN o ARN sin necesidad de clonación⁵¹.

DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción hidrolizan el ADN de doble cadena en sitios específicos dentro o adyacente a una secuencia particular conocida como sitio de reconocimiento.

Estas enzimas reconocen secuencias que tienen de 4 a 6 nucleótidos en longitud, generalmente palindrómicas. Algunas hidrolizan la doble hebra de ADN exactamente en el eje de simetría generando fragmentos con extremos romos, otros hidrolizan el ADN en sitios similares pero opuestos del eje de simetría creando fragmentos con extremos pegajosos. Una mutación que elimina o genera un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción es susceptible de ser detectada con esta metodología⁵¹.

GELES DE POLIACRILAMIDA

La poliacrilamida en combinación con N' metilen-bis-acrilamida se polimerizan para producir un gel de matriz rígida e inerte, este actúa como un

tamiz de moléculas de diferentes pesos moleculares. La polimerización del gel se lleva a cabo por la adición de catalizadores como el tetrametiletilendiamina (TEMED 0.05% v/v) y el persulfato de amonio (PSA, 0.05% a 1 % p/v) polimerizando en pocos minutos a temperatura ambiente. La matriz del gel se encuentra directamente relacionada con la concentración de acrilamida en forma gradual desde un 5% hasta un 12% el tamaño del poro disminuye y las moléculas se movilizan más lentamente⁵¹.

ELECTROFORESIS

Los ácidos nucleicos son compuestos polieléctricos, cargados negativamente por lo que se pueden separar por la acción de un campo eléctrico. La movilización de una molécula en un campo eléctrico depende de dos fuerzas, la de atracción y la de resistencia. La fuerza de atracción está en función del número de cargas por molécula, del signo de carga neta, el grado de disociación según el pH, la magnitud del campo eléctrico y del tiempo de exposición a dicho campo. La resistencia que se opone a la movilidad de la molécula se relaciona con el tamaño y la forma de la molécula, la solubilidad de la misma y de las propiedades absorbentes del medio que sirve como vehículo⁵¹.

PREPARACIÓN DE UN GEL DE POLIACRILAMIDA

Colocar en un matraz las siguientes soluciones: 7 ml de poliacrilamida-bis-acrilamida (29:1), 3.5 ml de buffer TBE 1X (10X), 29.9 ml de agua, 30 µl de TEMED y 600 µl de PSA (persulfato de amonio, 10%); agitar durante 10 segundos, verter la solución en los moldes de vidrio para la formación del gel, con el cuidado de no formar burbujas, inmediatamente después colocar el peine para formar los pozos de aplicación, se deja polimerizar durante 10 min. Después de este tiempo se retira el peine con cuidado de no dañar el gel, el cual se lava a chorro de agua para retirar el resto de poliacrilamida. Se coloca en la cámara de electroforesis y se adiciona buffer TBE 1X hasta cubrir completamente el gel, posteriormente se aplican las muestras problema⁵¹.

PROCEDIMIENTO:

- Mezclar 10 μl de la muestra problema mas 5 μl de jugo azul y aplicar en cada uno de los pozos del gel, una vez colocadas todas las muestras, poner 2 μl de marcador de peso molecular con el fin de tener una referencia (escalera de 100 pb) de nuestros productos amplificados.
- Correr las muestras a 200 V durante 1 hora en buffer TBE 1X y teñirlo en solución de plata para identificar los diferentes alelos de los productos digeridos.

TINCIÓN DE GELES CON NITRATO DE PLATA

La verificación de los productos digeridos de los polimorfismos se realizó por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% ⁵.

PROCEDIMIENTO:

- Fijar los productos digeridos al gel de poliacrilamida, a través de la solución fijadora (etanol 10% y ácido acético al 0.4%) durante 10 min.
- Eliminar la solución fijadora (se debe tener cuidado de no tocar el gel con las manos) y adicionar la solución de tinción (nitrato de plata 0.2 en solución fijadora) durante 5 min.
- Eliminar la solución de tinción (no tocar el gel con la mano) y adicionar agua destilada para eliminar el resto de nitrato de plata, durante 2 min. Agitar constantemente.
- Eliminar el agua y adicionar solución reveladora (hidróxido de sodio al 3%, formaldehído al 0.05%) agitar constantemente hasta la aparición de las bandas (3-5 min.).
- Eliminar la solución reveladora y enjuagar con agua corriente varias veces (tener cuidado de no tocar con las manos esta solución).
- Colocar el gel sobre un papel filtro de poro grueso y cubrir con plástico solo por el lado del gel.
- Deshidratar el gel en un secador de geles durante 1 hora a 80°C.

ANEXO V

POLIMORFISMO 677C→T DEL GEN MTHFR

Se analizó el polimorfismo génico 677C→T, el cual se origina por una mutación con sentido equivocado que cambia una C por una T, convirtiendo un residuo de alanina en un residuo de valina en la posición 222, dentro del exón 4. A este polimorfismo se le ha atribuido la termolabilidad de la proteína que hace que la actividad enzimática de la 5,10- Metileno Tetrahidrofolata disminuya.

Por medio de PCR, se amplificó un fragmento de 158 pb, con los iniciadores 5'- CCTTGAACAGGTGGAGGCC -3' (sentido) y 5'- CAAAGAAAAGCTGCGTGATGAT -3' (antisentido), mediante de 30 ciclos a 94°C x 4 min, 94°C x 1 min, 55°C x 1 min, 72°C x 1 min, y extensión final a 72°C x 7 min y las condiciones de PCR (cuadro i). El producto amplificado se sometió al reconocimiento de la enzima de restricción *HinfI* (cuadro ii), posteriormente mediante un corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 6% (29:1) y tinción con nitrato de plata donde se identificaron 3 genotipos (ANEXO IV)⁵¹.

Cuadro i. Condiciones de amplificación para el gen *MTHFR*

Condiciones de RCP 677C→T	
REACTIVOS	CANTIDAD
Buffer (10X)	1.5 µl
Iniciador 1 (5 pmol)	1 µl
Iniciador 2 (5pmol)	1 µl
dNTPs (10 mM)	0.3 µl
MgCL2 (50 mM)	0.6 µl
Taq Pol (5 U/? l)	0.075 µl
ADN (50ng)	1 µl

Cuadro ii. Condiciones de la digestión con la enzima *HinfI*

Digestión enzimática 677C→T Enzima <i>HinfI</i>	
REACTIVOS	CANTIDAD
Buffer enzima (10 X)	1.2µl
ADN	3µl
Enzima(10 U/? l)	0.4µl
Água (QBP)	11.2µl

SITIO DE RECONOCIMIENTO PARA LA ENZIMA *HinI*: Identificación de la mutación 677C→T del gen *MTHFR*

El sitio de restricción analizado fue:

Nombre	Sitio de reconocimiento	Fuente
<i>HinI</i>	5'...G ↓ A N T C...3' 3'...C T N A ↑ G ...5'	<i>Haemophilus influenzae</i>

Las flechas (↓ ↑) indican los sitios de corte de la enzima de restricción.

VI ABREVIATURAS

5FU	5-Fluorouracilo
5, MetiITHF	5-Metiltetrahidrofolato
5,10-MetilenoTHF	5,10-Metilenotetrahidrofolato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
C	Citosina
CIBO	Centro de Investigación Biomédica de Occidente
CMNO	Centro Médico Nacional de Occidente
CTAB	Bromuro de hexadecil trimetil amonio
DA	Distribución alélica
DNTP's	Dinucleótidos trifosfatados
DPD	Dihidropirimidina Deshidrogenasa
DTAB	Bromuro de duodecil trimetil amonio
dTDP	Desoxitimidina-5'- difosfato
dTMP	Desoxitimidina-5'-monofosfato
dTTP	Desoxitimidina-5'-trifosfato
dUMP	Desoxiuridina-5'-monofosfato
dUTP	Desoxiuridina-5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético (Ácido acético)
F	Frecuencia
EE	Errores estándar
FdUMP	5-Fluorodeoxiuridina monofosfato
FdUrd	5-Fluorodeoxiuridine
FUMP	5-F- Uridina monofosfato
FUTP	Ribonucleósido trifosfato ()
G	Guanina
Gly	Glicina

HE	Hospital de Especialidades
IC	Intervalo de confianza
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
MPM	Marcador de peso molecular
MTHFR	Metileno tetrahidrofolato reductasa
n	Número de Individuos de la muestra
OR	Razón de momios
PA	Poliacrilamida
Pb	Pares de bases
PM	Peso molecular
PSA	Persulfato de amonio
QT	Quimioterapia
RCP	Reacción en cadena de la Polimerasa
RR	Riesgo relativo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema nervioso central
SSJ	Secretaría de Salud Jalisco
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
T	Timina
Taq Pol	Enzima Taq ADN Polimerasa
TE	Buffer TE (Tris HCl 10mM, EDTA 0.2 mM, pH 7.5)
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TMP	Timina monofosfato
Tris	Trisma Base
TS	Timidilato Sintasa
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
X²	Prueba Xi Cuadrada

VII GLOSARIO

5-Fluorouracilo: Agente antineoplásico utilizado en el tratamiento de tumores sólidos, de tracto gastrointestinal, páncreas, mama, Sistema Nervioso Central y cuello. Funciona como antimetabolito sintético análogo de bases pirimídicas.

Adenina (A): Base púrica encontrada en DNA y RNA. En secuencias dúplex de DNA adenina se aparea con timina. En secuencias dúplex DNA-RNA adenina (en DNA) se aparea con uracilo (en RNA).

Adjuvante: Cirugía, radioterapia, QT, hormonoterapia u otro tratamiento usado durante o después y como complemento de la terapia principal. Uso frecuente para referirse a la QT.

ADN: Acido desoxiribonucleico. Polímero formado por la unión covalente de nucleótidos. Un nucleótido = base (Adenina, Timina, Guanina, Citosina) + azúcar (2' deoxiribosa) + fosfato. Moléculas de DNA eucariotes y procariontes son de doble hebra antiparalelas que presentan en promedio una conformación de tipo B, definida por Watson y Crick al analizar los parámetros de hélice obtenidos por difracción de rayos X. Ambas hebras están unidas por enlaces de tipo no covalente: efecto hidrofóbico y puentes de H. El DNA es el material genético de células procariontes, eucariotes y virus de DNA. La información genética está contenida en la secuencia de bases de una de las hebras de la molécula dúplex.

Alelo: Formas alternativas de un gen en un mismo locus. Por ejemplo 2 posibles alelos en el locus v de la cebada son v y V. El término de alelo ó alelomorfo fue acuñado por William Bateson; literalmente significa "forma alternativa".

Alquilante: Característica de un grupo de drogas quimioterapéuticas, que actúan interfiriendo con el crecimiento y reproducción celular.

Antimetabolito: Drogas quimioterapéuticas que actúan interrumpiendo la reproducción celular compitiendo con metabolitos esenciales para la misma.

Apoptosis: Muerte celular programada. Un proceso que ocurre en células normales

Aminoácido: Monómero que al unirse covalentemente mediante el enlace peptídico forma cadenas polipeptídicas. La secuencia de los aminoácidos en las cadenas polipeptídicas está determinada por el código genético (el que no codifica para la síntesis de aminoácidos).

Amplificación: Aumento de número de copias de un fragmento específico de ADN. Puede producirse in vivo o in vitro.

ARN: Ácido Ribonucleico. Ácido nucleico de cadena sencilla similar al ADN pero que contiene azúcar ribosa en lugar de desoxirribosa y uracilo en lugar de timina como una de las bases nitrogenadas.

Célula cancerosa: Célula que se divide y reproduce anormalmente, con un crecimiento descontrolado, y que se disemina y/ siembra en otras partes del cuerpo.

Citotóxico: Sustancia que provoca la muerte celular.

Cromosoma: Un cromosoma corresponde a una molécula de DNA acompañada con proteínas y RNA. Los cromosomas eucariotes son lineales y poseen centrómero y generalmente se presentan en pares. El cromosoma procarionte es circular, no posee centrómero y el genoma es monoploide. Son los portadores de los genes y representan el fundamento de los mecanismos Mendelianos de segregación independiente.

Delección : Es un tipo de mutación que ocurre en mutaciones de tipo puntual y también por aberración cromosómica. En el caso de la mutación puntual se refiere a la pérdida de una base.

Diferenciación: El grado en el que se parecen las células neoplásicas a las células normales que le dieron origen. En general las más indiferenciadas son las más agresivas.

dNTP: Desoxinucleósido trifosfato. Se distinguen el dATP, dCTP, dTTP y dGTP. El grupo trifosfato se encuentra siempre localizado en posición 5'. Son los precursores utilizados en reacciones de polimerización de ADN.

Efectos secundarios: Efectos no deseados que se producen como consecuencia de la administración de un fármaco.

Electroforesis: Técnica para separar moléculas de diferentes tamaños y cargas, típicamente ADN ó proteínas. La muestra se pone en una matriz que generalmente es un gel de acrilamida o agarosa, se somete a la acción de un campo eléctrico y las moléculas se separan de acuerdo a carga y tamaños. Para moléculas de ADN y ARN donde todas tienen igual carga, migran más rápido aquellas de menor tamaño.

Enzima de Restricción ó Endonucleasas de Restricción: Enzima que reconoce una secuencia específica entre 4 a 6 pares de bases de ADN de doble hebra y corta un enlace fosfodiéster en cada una de las hebras. Generan segmentos discretos de ADN. Según el tipo de enzima el corte puede generar moléculas de ADN con extremos cohesivos de tipo palíndrome ó extremos ciegos.

Exón: Secuencia de ADN que se transcribe y es parte de la molécula funcional.

Fenotipo: Forma que toma un carácter (o conjunto de caracteres). Manifestación externa observable de un genotipo concreto.

Frecuencia alélica: La frecuencia de un determinado alelo en un locus particular en una población. Es la proporción de los alelos de un gen.

Frecuencia Genotípica: La frecuencia de un genotipo en particular sabiendo su proporción en la población.

Gen: Unidad fundamental, física y funcional de la herencia, que transmite información de una generación a la siguiente., tramo de ADN compuesto de una región que se transcribe o una secuencia reguladora que hace posible la transcripción.

Genotipo: Composición alélica específica de una célula, bien referida al total del genoma o más comúnmente a un gen o conjunto de genes.

Guanina (G): Base púrica presente en ADN y ARN. En secuencias dúplex se aparea con citosina mediante tres enlaces por puente de H.

Ley de Hardy-Weinberg: Se utiliza para calcular las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas. Es un modelo teórico para genética de poblaciones, se basa en las siguientes hipótesis; 1. La población es panmíctica (todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el

apareamiento es al azar, (panmixia). 2. La población es suficientemente grande (para minimizar las diferencias existentes entre los individuos). 3. La población no está sometida a migración, mutación o selección (no hay pérdida ni ganancia de alelos). 4. Las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación. Bajo estas circunstancias las poblaciones genéticas se mantienen en equilibrio.

Heterocigoto: Existencia de diferentes alelos en un locus.

Heterogenicidad: Variación de tipos celulares dentro de un mismo tumor.

Homocigoto: Existencia de alelos iguales en un locus.

Iniciador: Secuencia corta de nucleótidos, a la cual se agregan nuevos desoxirribonucleótidos por acción de la ADN Polimerasa.

Inmunosupresión: Estado orgánico con disminución de resistencia a enfermedades, muchas veces consecuencia de la QT.

Intrón: Clásicamente es un segmento de DNA dentro de un gen eucarionte, el que se transcribe pero es eliminado del transcrito primario mediante una modificación post transcripcional (splicing). Pero por efecto de un empalme alternativo un intrón determinado puede ser parte de la secuencia de ARNm funcional. También los intrones se han descrito para algunos genes procariontes.

In vitro: Literalmente "en vidrio". Acción que toma lugar fuera del organismo.

In vivo: Acción que toma lugar dentro del organismo.

Locus: Posición de un gen en un cromosoma.

Marcador: Posición física identificable en un cromosoma cuya herencia puede seguirse. Los marcadores pueden ser una región de ADN que se expresa o un segmento de ADN que no se conoce que codifica pero que se puede seguir su manera de heredarse.

Metástasis: Propiedad que presentan los tumores malignos de formar focos cancerosos secundarios, a distancia del foco original.

Mutación: Cambio permanente y heredable en el material genético.

Oligonucleótido: Secuencia lineal de nucleótidos (hasta 20).

Par de Bases (bp): Se refiere a un par de bases complementarias, cada base presente en una hebra diferente de la molécula.

Polimerasa: Enzimas que catalizan la síntesis de ácidos nucleicos en base a templados existentes.

Polimorfismo: En genética, es la existencia de más de un alelo normal en un locus, en la que el alelo más raro excede del 1% en frecuencia. Un polimorfismo puede existir a muchos niveles, como variantes de la secuencia del ADN, secuencia de aminoácidos, estructura cromosómica o rasgos fenotípicos.

Quimioterapia: Término general utilizado para referirse a drogas que actúan de diferentes maneras para matar células tumorales interrumpiendo el ciclo de reproducción celular. Se emplean en tratamientos sistémicos, distribuyéndose por todo el cuerpo. A diferencia de la radioterapia que es un tratamiento de uso local. Diferentes tipos de drogas son activas contra diferentes fases del ciclo celular; razón por la cual este uso de combinación de drogas en un tratamiento (protocolo) es más efectivo que la administración de una sola droga. Las drogas quimioterapéuticas incluyen: agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos, alcaloides, hormonas y otros. Pueden administrarse oralmente, por inyección o infusión intramuscular o endovenosa, o dentro de las cavidades del cuerpo, o aplicarse tópicamente.

Reacción en Cadena de la Polimerasa: Es un método in vitro para la amplificación enzimática de secuencias específicas de ADN. Utiliza iniciadores y la ADN polimerasa Taq. La amplificación ocurre a través de ciclos de desnaturalización, alineamiento con primer y extensión con ADN polimerasa. La secuencia de ADN se amplifica 106 veces.

Resistencia a drogas: Cuando las células tumorales son insensibles a las drogas quimioterapéuticas. La resistencia cruzada es cuando el cáncer desarrolla resistencia a una droga posteriormente a haber usado una droga químicamente relacionada.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms): Fragmentos de restricción de longitud polimórfica. Son uno de los marcadores moleculares de mayor utilización en mejoramiento genético. Para obtener un patrón de RFLP se

debe aislar ADN, se digiere con enzimas de restricción y se analizan mediante un Southern Biot que hibrida con una sonda marcada.

Sitios de corte por enzimas de restricción: Una secuencia de bases específicas en la molécula de ADN al cual corta una enzima particular de restricción. Algunos sitios se encuentran frecuentemente en el ADN, otros son mucho menos frecuentes por ejemplo cada 10, 000 pares de bases.

Toxicidad: Efectos adversos de las sustancias químicas en los organismos vivos.

BIBLIOTECA CUCBA