

Análisis de los polimorfismos génicos de Tiopurina S-Metiltransferasa (TPMT) en pacientes pediátricos mexicanos con cáncer

Silvia Selene Moreno-Guerrero,* Arturo Ramírez-Pacheco,* Elsa María Dorantes-Acosta,* Aurora Medina-Sanson*

*Departamento de Hemato-Oncología, Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Analysis of genetic polymorphisms of Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) in Mexican pediatric patients with cancer

RESUMEN

ABSTRACT

Background. Thiopurine S-Methyltransferase (TPMT) catalyzes the S-methylation of thiopurine drugs, such as 6-mercaptopurine, 6-thioguanine and azathioprine, leading to their inactivation. Individuals who carry TPMT allele variants are more likely to experience life-threatening toxicity when these drugs are given at a standard dose. Wild-type phenotype TPMT*1 exhibits high level of catalytic activity, while all variants manifest with a decreased enzymatic activity. Ethnic-related differences in the distribution of TPMT variant alleles have been found. In Mexico, limited information is available; so far only two studies have been published and clear differences exist between them. **Material and methods.** Allelic variants and genotypes of the TPMT gene were determined in 240 Mexican children with leukemia and solid tumors using DNA extracted from peripheral blood. Polymorphisms G460A and A719G were identified by PCR-RFLP and G238C by the specific-allele PCR assay. The enzyme variants were detected by allelic discrimination. **Results.** Homozygous wild-type genotype TPMT*1/TPMT*1 was found in 173 patients (72.1%); 67 cases (27.9%) were heterozygous: 18 with genotype TPMT*1/TPMT*3B (7.5%), 17 TPMT*1/TPMT*3C (7.1%), 16 TPMT*1/TPMT*2 (6.7%), 14 TPMT*1/TPMT*3A (5.8%), and 2 (0.8%) were homozygous for two variants: TPMT*2/TPMT*3B in both. The allele frequencies were TPMT*1 in 411 (85.62%), TPMT*3B in 20 (4.1%), TPMT*2 in 18 (3.75%), TPMT*3C in 17 (3.55%) and TPMT*3A in 14 (2.9%). **Conclusions.** A high frequency and diversity of variant TPMT genotypes was found in this series with predominance of the TPMT*3B allele.

Key words. Thiopurine S-Methyltransferase (TPMT). Genetic polymorphism. Cancer in Mexican children.

Antecedentes. La Tiopurina S-Metiltransferasa (TPMT) cataliza la S-metilación de tiopurinas como la 6-mercaptopurina, 6-tioguanina y azatioprina, llevando a su inactivación. Los individuos que heredan alelos variantes del gen TPMT tienen mayor probabilidad de presentar toxicidad grave que puede poner en riesgo la vida cuando estos fármacos se administran a dosis estándar. El fenotipo silvestre TPMT*1 tiene alta actividad catalítica, mientras que todas las variantes muestran disminución de la actividad enzimática. Se han encontrado diferencias en la distribución de las variantes alélicas del gen TPMT relacionadas con el origen étnico. En México la información es limitada y hasta ahora se han publicado sólo dos estudios que muestran claras diferencias entre sí. **Material y métodos.** Se determinaron las variantes alélicas y genotipos del gen TPMT en 240 niños mexicanos con leucemias y tumores sólidos empleando ADN extraído de sangre periférica. Los polimorfismos G460A y A719G se identificaron por PCR-RFLP y el G238C por PCR alelo específica. Las variantes de la enzima fueron identificadas por discriminación alélica. **Resultados.** El genotipo homocigoto silvestre TPMT*1/TPMT*1 se encontró en 173 pacientes (72.1%); 67 casos (27.9%) fueron heterocigotos: 18 con genotipo TPMT*1/TPMT*3B (7.5%), 17 TPMT*1/TPMT*3C (7.1%), 16 TPMT*1/TPMT*2 (6.7%), 14 TPMT*1/TPMT*3A (5.8%) y dos (0.8%) eran homocigotos para dos variantes: TPMT*2/TPMT*3B ambos. Las frecuencias por alelo fueron TPMT*1 en 411 (85.62%), TPMT*3B en 20 (4.1%), TPMT*2 en 18 (3.75%), TPMT*3C en 17 (3.55%) y TPMT*3A en 14 (2.9%). **Conclusiones.** En esta serie se encontró alta frecuencia y diversidad de genotipos variantes de TPMT, con predominio del alelo TPMT*3B.

Palabras clave. Tiopurina S-Metiltransferasa (TPMT). Polimorfismo génico. Cáncer en niños mexicanos.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas que participan en el metabolismo de fármacos son responsables de su activación, inactivación o detoxificación. Variaciones en la secuencia de los genes que codifican estas enzimas, ya sea en uno o ambos alelos, pueden modificar su actividad catalítica y condicionar diferencias individuales en la respuesta o en la toxicidad a diversos fármacos.

La Tiopurina S-Metiltransferasa (*TPMT*) es una enzima citoplasmática que cataliza la metilación de tiopurinas como la 6-Mercaptopurina (6-MP), Tioguanina (6-TG) y Azatioprina, y juega un importante papel en la farmacología clínica de estos análogos de purinas, que se utilizan como agentes antineoplásicos e inmunosupresores. La actividad de la *TPMT* determina la cantidad del fármaco que es inactivada a metabolitos metilados. Los nucleótidos de tioguaninas (TGNs) son los metabolitos activos que se incorporan al ADN y también los principales responsables del efecto citotóxico de las tiopurinas.^{1,2}

Existen dos reacciones importantes en la inactivación de tiopurinas *in vivo*: la oxidación, catalizada por la xantinaoxidasa y la s-metilación, catalizada por la *TPMT*. Debido a la ausencia de xantinaoxidasa en las células hematopoyéticas, la metilación por la *TPMT* tiene un papel esencial en la inactivación de fármacos tiopurínicos dentro de estas células.

Se ha demostrado que el genotipo de la *TPMT* se correlaciona directamente con la actividad de la enzima y ésta a su vez tiene una correlación inversa con los niveles de TGNs dentro de los eritrocitos y células leucémicas. Numerosos estudios han demostrado toxicidad hematológica grave que puede poner en riesgo la vida, después de la administración de dosis estándar de tiopurinas a pacientes que portan variantes no funcionales de *TPMT*²⁻⁷ y el genotipo de *TPMT* predice el riesgo de toxicidad y parece influir en el riesgo de segundas neoplasias en pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica que reciben 6-MP.^{1,8}

El gen que codifica para la *TPMT* se encuentra en el cromosoma 6p22.3 y sus alelos son heredados de manera codominante. Este gen puede presentar polimorfismos de un solo nucleótido o SNP's (*single nucleotide polymorphisms*), dando lugar a variantes alélicas, de las cuales hasta la fecha se han identificado 24 funcionalmente relevantes en regiones codificantes, y algunas otras del tipo VNTR (*variable number of tandem repeats*) en la región promotora del gen.^{9,10} El alelo *TPMT**1 corresponde a la forma silvestre, cuyo fenotipo es de alta actividad enzimática y todas las variantes dan lugar a enzimas con menor actividad. Los alelos *TPMT**2, *TPMT**3A,

*TPMT**3B y *TPMT**3C se encuentran en aproximadamente 95% de los individuos que muestran actividad enzimática baja o intermedia.^{4,5}

La variante *TPMT**2 implica un cambio del nucleótido guanina por citosina en la posición 238 del gen (G238C), que se traduce en la sustitución de una alanina por una prolina en el codón 80 (Ala80Pro). La variante *TPMT**3A contiene dos cambios, G460A y A719G, que resultan en las sustituciones de una alanina por treonina en el codón 154 (Ala154Thr) y de una tirosina por una cisteína en el codón 240 (Tyr240Cys), respectivamente. En el alelo *TPMT**3B ocurre un cambio de guanina por adenina en la posición 460 (G460A) que resulta en el cambio de alanina por treonina en el codón 154 (Ala154Thr) y en el caso del alelo *TPMT**3C existe un cambio A719G, que resulta en la sustitución de una tirosina por una cisteína en el codón 240 (Tyr240Cys).²⁻⁶ La figura 1 esquematiza los cambios de nucleótidos que ocurren en cada variante.

Los individuos homocigotos para la forma silvestre muestran actividad alta de la enzima; los heterocigotos, que portan un alelo silvestre y uno variante, presentan actividad intermedia, y los homocigotos para dos variantes tienen actividad enzimática muy baja o indetectable. En poblaciones caucásicas, 80-90% de los individuos son homocigotos silvestres, 5-10% heterocigotos y sólo 0.3% son homocigotos para dos variantes.^{7-9,11-13} Estudios epidemiológicos han demostrado diferencias en las frecuencias de las distintas variantes alélicas del *TPMT* según el origen étnico.

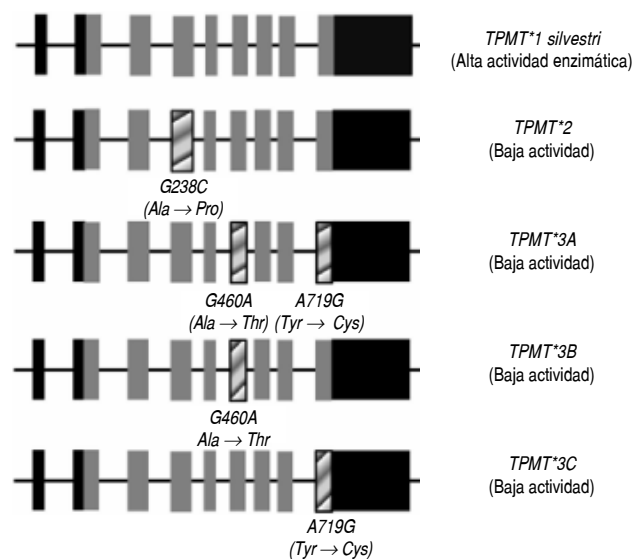


Figura 1. Variantes alélicas de la Tiopurina Metil Transferasa, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y la posición en la que presentan.

En este estudio se determinaron las variantes alélicas y los genotipos del gen *TPMT* en niños mexicanos con cáncer.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para determinar las frecuencias alélicas y genotipos del gen *TPMT* se utilizaron muestras de sangre periférica de 240 pacientes pediátricos con neoplasias hematológicas o tumores sólidos tratados en el Servicio de Oncología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, que no hubieran recibido transfusiones de hemoderivados en los tres meses previos a la toma de la muestra. Los pacientes eran procedentes de distintos estados de la República Mexicana, la mayoría de las zonas centro y suroeste, y algunos de la costa este y de estados del norte del país. El estudio fue aprobado por las Comisiones de Ética e Investigación y se obtuvo el consentimiento informado de los participantes.

EXTRACCIÓN DE ADN

Las muestras de sangre periférica fueron colectadas en tubos con EDTA. La sangre fue tratada con cloruro de amonio 1X, centrifugada a 2,500 rpm por 15 min, lavada con PBS, nuevamente centrifugada y el botón celular fue resuspendido en 2 mL de PBS. El ADN fue extraído usando el kit QIAamp DNA blood midi kit (Duesseldorf, Germany) (Quiagen®) y almacenado a -20 °C.

Genotipificación del gen *TPMT*

Se analizaron el alelo silvestre *TPMT**1 y las variantes *TPMT**1, *TPMT**2, *TPMT**3A, *TPMT**3B y *TPMT**3C empleando pares de iniciadores que in-

cluyen secuencias intrónicas y exónicas para asegurar la amplificación del gen de *TPMT* y no de un pseudogen.⁶ El cuadro 1 detalla las secuencias de oligonucleótidos utilizadas como iniciadores para cada SNP. La amplificación se realizó empleando un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf®, Germany).

Los polimorfismos G460A y A719G se identificaron por PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) y el G238C mediante PCR de punto final alelo específica. Las variantes de la enzima fueron identificadas por discriminación alélica.

Detección de polimorfismo G238C

El ADN genómico se amplificó con los oligonucleótidos específicos para el polimorfismo G238C del gen *TPMT*, dNTP's 2.5 mM, buffer 1X (20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄) y 0.5 U de Taq ADN polimerasa (New England Biolabs, Beverley, MA, USA). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min; posteriormente 40 ciclos a 94 °C por 40 seg, 50 °C por 40 seg y 72 °C por 40 seg, y extensión final a 72 °C por 10 min. Se obtuvo un producto de PCR de 256 pb (Figura 2A).

Detección de polimorfismo G460A

El ADN genómico se amplificó con los oligonucleótidos específicos para el polimorfismo G460A del gen *TPMT*, dNTP's 2.5 mM, MgCl₂ 3mM, buffer 1X (20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄) y 0.5 U de Taq ADN polimerasa (New England Biolabs). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, posteriormente 35 ciclos a 95 °C por 45 seg, 60 °C por 45 seg y 72 °C por 90 seg y extensión final a 72 °C por 8 min. Se obtuvo un

Cuadro 1. Secuencias de los iniciadores empleados para la amplificación de gen *TPMT*.⁶

SNP	Iniciador	Secuencia	Producto de amplificación (pb)
G238C	P238W	5' GTA TGA TTT TAT GCA GGT TTG 3'	256
	P238C	5' TAA ATA GGA ACC ATC GGA CAC 3'	
G238C	P238M	5' GTA TGA TTT TAT GCA GGT TTC 3'	256
	P238C	5' TAA ATA GGA ACC ATC GGA CAC 3'	
G460A	P460F	5' ATA ACA GAG TGG GGA GGC TGC 3'	365
	P460R	5' CTA GAA CCC AGA AAA AGT ATA G 3'	
A719G	P719R	5' TGT TGG GAT TAC AGG TGT GAG CCA C 3'	236
	P719F	5' CAG GCT TTA GCA TAA TTT TCA ATT CCT C 3'	

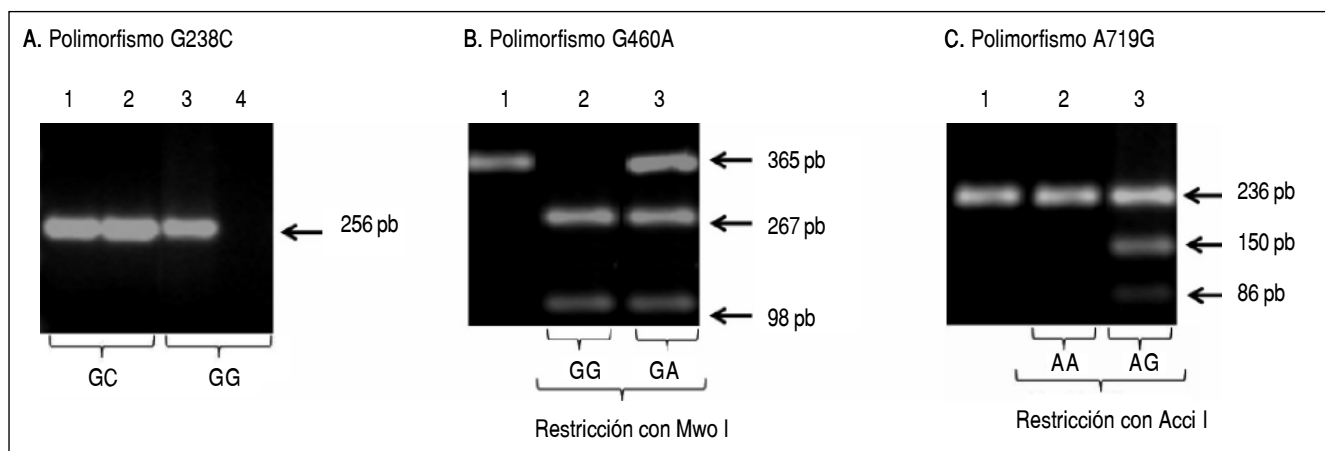


Figura 2. Identificación de variantes alélicas de TPMT. A. Polimorfismo G238C por PCR de punto final alelo específica: líneas 1 y 2 paciente GC (heterocigoto), las dos bandas de 256 pb indican una prueba positiva para ambos alelos, líneas 3 y 4 paciente GG (homocigoto silvestre) la presencia del amplificado en la línea 3 indica una prueba positiva únicamente para el alelo G y en el carril 4 no existe banda debido a que es una prueba negativa para la variante C. B. Polimorfismo G460A por RFLP: línea 1 producto de PCR de punto final antes de la digestión, línea 2 paciente GG, línea 3 paciente GA. La banda a 365 pb corresponde al producto de amplificación, si no existe polimorfismo la enzima Mwo I corta el ADN en la posición 460 generando fragmentos de 267 pb y 98pb; si existe cambio de G por A la enzima no corta y permanece el producto de 365 pb para el SNP G460A. C. Polimorfismo A719G por RFLP: línea 1 producto de PCR de punto final antes de la digestión, línea 2 paciente AA, línea 3 paciente AG para el SNP A719G. La banda 236 pb corresponde al producto de amplificación, si no existe polimorfismo la enzima AccI no corta el ADN y permanece un producto de 236 pb; si hay un cambio de A por G en la posición 719, la enzima corta generando dos fragmentos de 150 pb y 86 pb.

producto de PCR de 365 pb. Después de la amplificación se realizó la digestión de 10 μ L del producto de PCR con 5 U de la enzima de restricción Mwo I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) a 60 $^{\circ}$ C por 2 h. En ausencia del polimorfismo G460A, la enzima corta el ADN en la posición 460, generando dos fragmentos, uno de 267 pb y otro de 98 pb. Cuando el polimorfismo está presente se elimina el sitio de corte y el amplificado permanece de tamaño original (365 pb) (Figura 2B).

Detección de polimorfismo A719G

El ADN genómico se amplificó con los oligonucleótidos específicos para el polimorfismo A719G del gen *TPMT* con dNTP's 2.5 mM, buffer 1X (20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄) y 0.5 U de Taq ADN polimerasa (New England Biolabs). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95 $^{\circ}$ C por 3 min, posteriormente 35 ciclos a 95 $^{\circ}$ C por 45 seg, 55 $^{\circ}$ C por 45 seg y 72 $^{\circ}$ C por 45 seg y extensión final a 72 $^{\circ}$ C por 7 min. Se obtuvo un producto de PCR de 236 pb. Después de la amplificación, 10 μ L del producto de PCR fueron digeridos con 5 U de la enzima de restricción Acc I (New England Biolabs) a 37 $^{\circ}$ C por 4 h. En presencia del polimorfismo A719G, se genera un sitio de restricción que da origen a dos fragmentos, uno de 150 pb y otro de 86 pb.

Si no existe el polimorfismo, la enzima no corta el ADN amplificado, quedando un producto del tamaño original (236 pb) (Figura 2C).

Todos los productos de PCR de punto final y restricciones fueron visualizados mediante luz ultravioleta en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Controles

Para el alelo silvestre se utilizó el ADN de un individuo sano, que fue secuenciado para confirmar que portaba genotipos silvestres.

Durante la estandarización de las técnicas de PCR se identificaron muestras de pacientes positivos para cada uno de los polimorfismos (G238C, G460A, A719G) y éstas fueron utilizadas como controles en la genotipificación de todos los casos. En cada uno de estos controles se confirmó la presencia del polimorfismo mediante secuenciación automática (Figura 3).

Análisis estadístico

Los datos se presentan en forma descriptiva, empleando frecuencias simples y relativas.

Se utilizó la prueba de χ^2 para establecer si la población analizada se encontraba en equilibrio genético de Hardy-Weinberg (EH-W) para el locus *TPMT*.

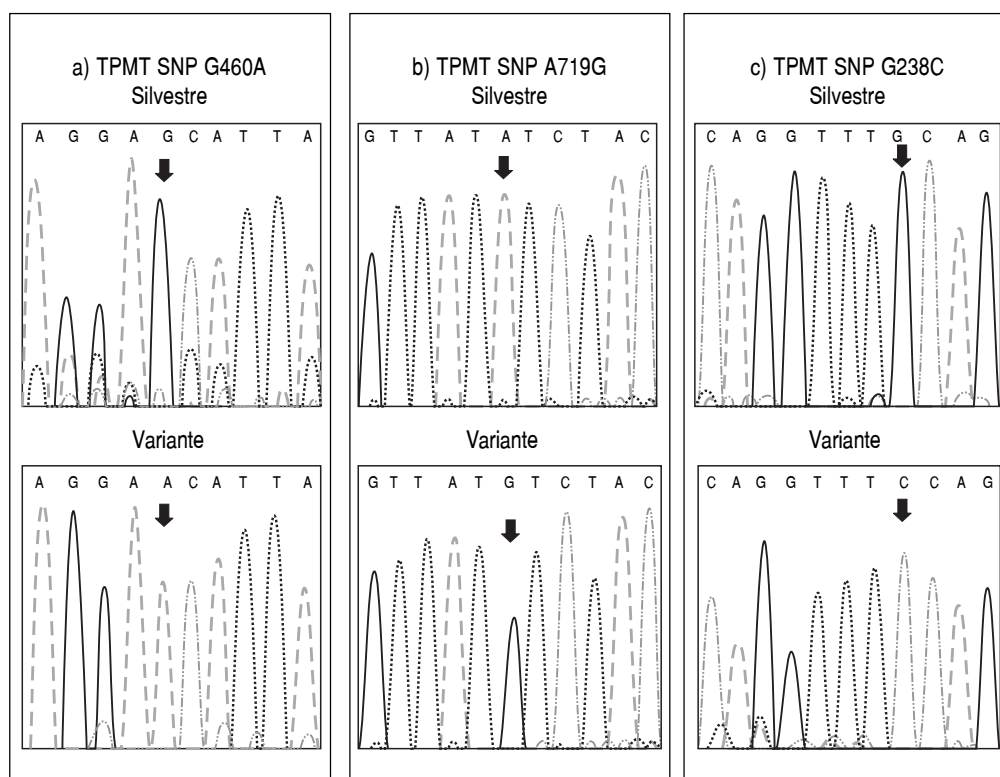


Figura 3. Imágenes de secuenciación de ADN extraído de sangre periférica de muestras control para los polimorfismos del gen TPMT. Las imágenes superiores muestran los alelos silvestres y las inferiores los alelos variantes. a) Polimorfismo G460A, las flechas señalan el cambio de base de G por A. b) Polimorfismo A719G, en donde se observa el cambio de base A por G. c) Polimorfismo G238C, que indica el cambio de base G por C.

Cuadro 2. Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes del gen de la TPMT en 240 pacientes pediátricos mexicanos con leucemias y tumores sólidos.

Genotipo	Frecuencias n (%)	Alelos	Frecuencias n (%)
TPMT*1/TPMT*1	173 (72)	TPMT*1	411(85.62%)
TPMT*1/TPMT*2	16 (6.7)	TPMT*2	18 (3.75%)
TPMT*1/TPMT*3A	14 (5.8)	TPMT*3A	14 (2.91%)
TPMT*1/TPMT*3B	18 (7.5)	TPMT*3B	20 (4.1%)
TPMT*1/TPMT*3C	17 (7.1)	TPMT*3C	17 (3.55%)
TPMT*2/TPMT*3B	2(0.8)	-	-

RESULTADOS

De los 240 pacientes analizados, 102 (42.5%) fueron mujeres y 138 (57.5%) hombres, con un rango de edad de 28 días a 18 años. Los diagnósticos fueron leucemia linfoblástica aguda en 202 casos (84.2%), leucemia mieloblástica aguda en 29 (12.1%) y nueve (3.8%) tenían diferentes tumores sólidos.

El genotipo homocigoto silvestre *TPMT*1/TPMT*1* se encontró en 173 pacientes (72.1%) y 67 (27.9%) presentaron alguna de las variantes alélicas, 65 (27.08%) en forma de heterocigoto y dos pacientes (0.8%) fueron homocigotos para dos variantes.

De los 67 pacientes que portaban variantes alélicas, 18 (7.5%) tuvieron genotipo *TPMT*1/TPMT*3B*, 17 (7.1%) *TPMT*1/TPMT*3C*, 16 (6.7%)

*TPMT*1/TPMT*2*, 14 (5.8%) *TPMT*1/TPMT*3A* y en los dos pacientes que fueron homocigotos para dos variantes se encontró el genotipo *TPMT*2/TPMT*3B*. Las frecuencias en los 480 alelos analizados fueron: *TPMT*1* en 411 (85.62%), *TPMT*3B* en 20 (4.1%), *TPMT*2* en 18 (3.75%), *TPMT*3C* en 17 (3.55%) y *TPMT*3A* en 14 alelos (2.9%). El cuadro 2 muestra las frecuencias por genotipo y por alelo en los 240 pacientes estudiados.

Dentro del grupo de leucemias agudas linfoblásticas, que incluyó a 202 de los 240 pacientes (84.2%), los genotipos encontrados fueron: homocigoto silvestre *TPMT*1/TPMT*1* en 146 (72.3%) heterocigoto variante en 16 (7.9%) y un paciente (0.5%) fue homocigoto para dos variantes. Las frecuencias alélicas de estos 404 alelos fueron: *TPMT*1* en 347 (85.89%), *TPMT*2* en 11 (2.72%), *TPMT*3A* en 13 (3.21%),

Cuadro 3. Comparación de las frecuencias de acuerdo con el tipo de diagnóstico.

	Homocigoto silvestre	Heterocigoto	Homocigoto variante
Leucemia aguda linfoblástica, n = 202.	146 (72.3%)	55 (27.2%)	1 (0.5%)
Leucemia aguda mieloblástica, n = 29.	21 (72.4%)	8 (27.6%)	0
Tumores sólidos, n = 9.	6 (66.7%)	2 (22.2%)	1 (11.1%)

Cuadro 4. Frecuencias relativas de las variantes alélicas del gen *TPMT* en diferentes poblaciones.

Alelos	HIMFG* n = 240	Mexicanos INCan ²²		INP** ²³ n = 360	Bolivianos ¹⁷ n = 191	Españoles ²⁴ n = 276	Caucásicos americanos ¹⁴ n = 282	Kenianos ²⁵ n = 101	Chinos ²⁶ n = 192
		LLA n = 39	Sanos n = 108						
<i>TPMT</i> *1	85.62	87.2	92.17	93.19	93.4	93.84	96.4	94.6	97.7
<i>TPMT</i> *2	3.75	2.7	0.9	0.28	0	nd	0.2	0	0
<i>TPMT</i> *3A	2.91	7.6	3.23	5.69	6.52	3.26	3.2	0	0
<i>TPMT</i> *3B	4.1	0	2.3	0.28	0	1.45	nd	nd	nd
<i>TPMT</i> *3C	3.54	2.5	1.4	0.56	0	1.45	0.2	5.4	2.3

HIMFG: Hospital Infantil de México Federico Gómez. INCan: Instituto Nacional de Cancerología. INP: Instituto Nacional de Pediatría. *Pacientes pediátricos con leucemias y tumores sólidos. **Recién nacidos del Distrito Federal.

*TPMT**3B en 17 (4.2%) y *TPMT**3C en 16 (3.96%). El cuadro 3 muestra las frecuencias por genotipo y por alelo de acuerdo con el tipo de neoplasia.

Considerando dos tipos de alelos, Silvestre (*TPMT**1) y variante (no-*TPMT**1), la distribución genotípica obtenida en la población analizada no se aparta de la esperada de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Los valores esperados para *TPMT**1/*TPMT**1 fueron de 175.95, para *TPMT**1/no-*TPMT**1 de 59.08 y no-*TPMT**1/no-*TPMT**1 ≤ 4.95 . Se obtuvo un valor de χ^2 de 2.4, con un nivel de significancia de 3.84.

DISCUSIÓN

El análisis de los polimorfismos del gen *TPMT* es importante en la evaluación de pacientes que requieren tiopurinas como parte del tratamiento y representa uno de los mejores ejemplos de la aplicación clínica que tienen los estudios de farmacogenética. En algunos centros este análisis se realiza de manera rutinaria con el fin de individualizar las dosis de estos medicamentos.

La variación individual en la capacidad de S-metilación de la enzima *TPMT*, está determinada por el genotipo que resulta de los alelos paterno y materno que cada individuo hereda (homocigoto silvestre, heterocigoto u homocigoto variante).¹⁴ Estudios *in vitro* han demostrado que cuando la variante *TPMT**2

se presenta en forma heterocigota, la capacidad enzimática de la *TPMT* disminuye 100 veces¹² y cuando existe homocigocidad para la variante *TPMT**3A, hay una pérdida total de la actividad enzimática.⁷ La disminución o pérdida de esta actividad da lugar a un aumento en los metabolitos activos de tiopurinas, incrementando la acción farmacológica y los efectos adversos de estos medicamentos.

Están bien demostradas las diferencias en la frecuencia de las variantes del gen entre grupos étnicos. En población caucásica, el alelo *TPMT**3A tiene una frecuencia de 3.2-5.7%, el *TPMT**3C se presenta en 0.2-0.8% y el *TPMT**2 en 0.2-0.5%, y la frecuencia de la variante *TPMT**3B no se ha evaluado en la mayoría de las series que analizan a este tipo de población. Estudios realizados en Latinoamérica muestran una mayor frecuencia de alelo *TPMT**3A en sujetos de Argentina,¹⁵ Colombia¹⁶ y Bolivia.¹⁷ En Brasil las variantes *TPMT**2 y *TPMT**3C son las más comunes.^{18,19} En población asiática, la variante *TPMT**3C es la más frecuente.²⁰ Kapoor en la India analizó 25 pacientes con LAL, encontrando 4.1% de heterocigotos para el alelo *TPMT**3C, ningún caso portaba el alelo *TPMT**3A y no identificaron homocigotos variantes.²¹

En México la información publicada sobre el tipo y frecuencia de las variantes alélicas del gen de la enzima *TPMT* se limita a dos estudios. Taja-Chaveb publicó en 2008 el primer análisis de polimorfismos de

este gen en población mexicana,²² se estudiaron 39 pacientes adultos, 38 de ellos con LAL y uno con colitis ulcerativa crónica, además de 108 voluntarios sanos; las variantes fueron identificadas mediante DHPLC (*denaturing high performance liquid chromatography*). De sus resultados, que se detallan en el cuadro 4, resalta la mayor frecuencia del alelo *TPMT*3A*, pero también la diversidad de alelos variantes y el hallazgo de porcentajes dos a tres veces más altos para las variantes *TPMT*2*, **3A* y **3C* en el grupo de pacientes con LAL, aunque hay que tomar en cuenta que el número de individuos en este último grupo fue reducido. El segundo trabajo, publicado por González del Ángel en 2009, se realizó con ADN extraído de gotas de sangre seca colectadas en papel filtro, obtenidas de 360 recién nacidos del Distrito Federal, y sugiere que aproximadamente una de cada 180 personas nacidas en la Ciudad de México podría tener actividad enzimática de *TPMT* baja o indetectable; en este estudio se encontró también predominio de la variante *TPMT*3A*, con porcentajes menores a 1% para las otras tres variantes.²³

Se enfatiza en el hecho de que nuestro estudio representa un análisis descriptivo de base hospitalaria que no pretende en este momento hacer ninguna correlación clínica.

Se analizó a un grupo heterogéneo de neoplasias malignas pediátricas, que en su mayoría son leucemias agudas, y se decidió mostrar también los datos de los tumores sólidos, ya que en una pequeña muestra aleatoria de nueve pacientes se encontró un caso homocigoto para dos variantes de *TPMT*.

En esta serie se encontró una elevada frecuencia de individuos portadores de alelos variantes, con mayor frecuencia del alelo *TPMT*3B* y porcentajes altos para las cuatro variantes analizadas. Lo anterior contrasta con lo descrito en poblaciones caucásicas, asiáticas o africanas, en las que existe claro predominio de alguna variante y en ninguna de ellas se reporta mayor frecuencia de la variante *TPMT*3B*, aunque como se puede observar en el cuadro 4, el alelo *TPMT*3B* no fue determinado en muchas de las series que reportan las frecuencias en distintos grupos étnicos.^{14,17,22-26}

La serie que mostró mayor semejanza con nuestros hallazgos en lo que respecta a la frecuencia y diversidad de variantes alélicas, corresponde al estudio realizado en el Instituto Nacional de Cancerología de México. El INCan, al igual que el Hospital Infantil de México, es un centro de referencia que recibe a pacientes de todo el país y eso puede explicar en parte la diversidad de variantes. Es de notar que en el grupo de voluntarios sanos, el alelo *TPMT*3B* se encontró

en 2.3% de los casos, es el segundo en frecuencia, ésta es una proporción considerablemente más alta a la encontrada en la mayoría de las series, que reportan por lo general menos de 1% de esta variante. Además de estas series mexicanas, hay dos estudios españoles que encontraron más del 1% de este alelo; uno de ellos realizado en 44 pacientes con LAL en el que se encontraron 9% de heterocigotos para el gen *TPMT*, dos casos portaban el alelo *TPMT*2* (4.5%) uno el *TPMT*3B* (2.27%) y uno el *TPMT*3C*,²⁷ en el otro estudio se analizaron 276 españoles identificando cuatro casos (1.45%) del alelo *TPMT*3B*.²⁴ Aunque son pocos los estudios sobre frecuencias alélicas hasta ahora realizados en México, es posible que el alelo *TPMT*3B* sea más frecuente en población mexicana que en otras poblaciones, de ser así, sería interesante identificar si esta diferencia se limita a algún subgrupo étnico.

La población mexicana es étnicamente heterogénea, se compone de individuos de diferentes orígenes y aunque la mayor parte es mestiza, resultado de la mezcla de indígenas y españoles, también hay población caucásica, asiática y afromexicana, cuya distribución se relaciona en parte con el lugar de origen. Los pacientes que estudiamos proceden de diversos estados del país y esto puede explicar al menos parcialmente la elevada frecuencia encontrada para las distintas variantes. Esta distribución de alelos variantes no sigue ningún patrón de los reportados en estudios previos; de hecho, no hubo claro predominio de ninguna variante y la diferencia entre algunas de ellas fue de uno a dos casos. Sin embargo, creemos que estos datos deben tomarse en cuenta cuando se estudie el genotipo de la enzima *TPMT* en pacientes mexicanos, y más aún si se trata de un centro de referencia nacional como el Hospital Infantil de México.

Es importante considerar también que la frecuencia de genotipos variantes encontrada en este grupo de pacientes pediátricos con cáncer, de los cuales la gran mayoría corresponde a leucemias agudas, hace manifiesta la importancia de implementar esta prueba diagnóstica, ya que los protocolos nacionales mexicanos del Seguro Popular para el tratamiento de cáncer en niños incluyen el uso de 6-mercaptopurina, tanto para LAL como para LAM, además de que estas leucemias juntas representan en México más de 40% de todas las neoplasias malignas de la edad pediátrica.²⁸⁻³⁰ A pesar de lo anterior, no existen en México centros que atiendan a niños con cáncer en donde se realice el análisis rutinario de los polimorfismos del gen *TPMT*.

Ante la falta del recurso diagnóstico para determinar el genotipo de *TPMT*, está justificado ajustar

la dosis de 6-MP cuando el paciente presenta toxicidad grados 3 o 4 atribuible a este medicamento. Sin embargo, muchas veces no es posible asegurar que la toxicidad se debe a la 6-MP, ya que los pacientes reciben poliquimioterapia y no se puede tampoco asumir que es debida a genotipos variantes del gen *TPMT*. Una práctica frecuente es disminuir en 25% la dosis de más de un fármaco y esta reducción no elimina el riesgo de toxicidad grave a 6-MP en pacientes *TPMT*-deficientes. Siempre que se haga una reducción en la dosis de 6-MP hay que tener presente que esta acción puede dar lugar a bajas concentraciones intracelulares de TGNs, condicionando menor efectividad del fármaco y aumentando el riesgo de recaídas, además de que el uso de dosis subterapéuticas puede explicar al menos en parte el desarrollo de resistencia a agentes antineoplásicos.^{31,32} Hay que considerar también que pueden ser varios los factores que determinan toxicidad a 6MP, incluyendo la disminución en la tasa de excreción, la interacción del medicamento con otros fármacos, o polimorfismos en distintas proteínas que participan en su metabolismo o transporte.

La identificación del genotipo de *TPMT* es un elemento objetivo que permite definir las dosis de tiopurinas de manera individualizada aun antes de iniciar el tratamiento. Esto reduciría el riesgo de toxicidad hematológica grave y modificaría de forma favorable la morbilidad y la supervivencia de los pacientes que requieren estos fármacos.

Las técnicas de PCR-RFLP y PCR-alelo específica son relativamente sencillas y no conllevan un costo elevado. En muchos centros de países desarrollados, la búsqueda de polimorfismos génicos empleando métodos basados en PCR ha caído en desuso, debido a la introducción de tecnologías para la secuenciación de ADN, pero es innegable que las técnicas de PCR pueden ser fácilmente implementadas y ampliamente aplicadas a un bajo costo en centros que cuenten con un laboratorio básico de biología molecular.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado con fondos federales para proyectos de investigación.

REFERENCIAS

- Relling MV, Hancock ML, Boyett JM, Evans WE, et al. Prognostic importance of 6-Mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999; 93: 2817-23.
- McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 567-72.
- McLeod HL, Coulthards S, Thomas AE, Richards SM, et al. Analysis of thiopurine methyltransferase variant alleles in childhood acute lymphoblastic leukemia. *British Journal Haematol* 1999; 105: 696-700.
- Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinsilboun RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1990; 336: 225-9.
- Weinsilboun R. Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2001; 29: 601-05.
- Seki T, Tanaka T, Nakamura Y. Genomic structure and multiple single-nucleotide polymorphisms (SNP's) of the thiopurine S-methyltransferase (*TPMT*) gene. *Journal Human Genetic* 2000; 45: 299-302.
- Tai HL, Krynetski EY, Yates CR, Evans WE, et al. Thiopurine S-methyltransferase deficiency: Two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 694-702.
- Coulthard SA, Howell C, Robson J, Hall AG. The relationship between Thiopurin Methyltransferase activity and genotype in blasts from patients with acute leukemia. *Blood* 1998; 92: 2856-62.
- Schaeffler E, Zanger UM, Eichelbaum M, et al. Highly Multiplexed Genotyping of Thiopurine S-Methyltransferase Variants Using MALDI-TOF Mass Spectrometry: Reliable Genotyping in Different Ethnic Groups. *Clin Chem* 2008; 54: 1637-47.
- Shufeng Z. Clinical Pharmacogenomics of Thiopurine S-methyltransferase. *Current Clinical Pharmacology* 2006; 1: 119-28.
- Stocco G, Cheok MH, Relling MV, Evans WE, et al. Genetic polymorphism of Inosine Triphosphate Pyrophosphatase is a determinant of Mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Pharmacol Ther* 2009; 85(2): 164-72.
- Krynetski EY, Schutz JD, Gapin AJ, Evans WE, et al. A single mutation leading to loss of catalytic in human thiopurine s-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 949-53.
- Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Schwab M, et al. Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel *TPMT* variants. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 407-17.
- Yates CR, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE, et al. Molecular diagnosis of Thiopurine S-methyltransferase deficiency: Genetic basis for Azathioprine and Mercaptopurine intolerance. *Annals of Internal Medicine* 1997; 126: 608-14.
- Larovere LE, de Kremer RD, Lambooy LH, de Abreu RA. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase in Argentina. *Ann Clin Biochem* 2003; 40: 388-93.
- Isaza C, Henao J, López AM, Cacabelos R. Allelic variants of the thiopurine methyltransferase (*TPMT*) gene in the Colombian population. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2003; 25: 423-9.
- Lu HE, Sum MC, Hsuen SC, Chang JG, et al. Molecular analysis of the thiopurine S-methyltransferase alleles in Bolivians and Tibetans. *Journal Clinical Pharmacology Therapy* 2005; 30: 491-6.
- Boson WL, Romano-Silva MA, Correa H, Marco DL, et al. Thiopurine methyltransferase polymorphisms in a Brazilian population. *The Pharmacogenomics Journal* 2003; 3: 178-82.
- Reis M, Santoro A, Suarez-Kurtz G. Thiopurine methyltransferase phenotypes and genotypes in Brazilians. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 371-3.

20. Cao Q, Zhu Q, Shang Y, Gao M, Si J. Thiopurine Methyltransferase Gene Polymorphisms in Chinese patients with inflammatory Bowel Disease. *Digestion* 2009; 79: 58-63.
21. Kapoor G, Maitra A, Somalata, Brahmachari. Application of SNaPshot for analysis of thiopurine methyltransferase. *Indian J Med Res* 2009; 129: 500-05.
22. Taja-Chaveb L, Vidal-Millan S, Gutierrez O, Dueñas-Gonzalez A, et al. Thiopurine S-methyltransferase gene (*TPMT*) polymorphisms in a Mexican population of healthy individuals and leukemic patients. *Med Oncology* 2008; 25: 56-62.
23. González del Ángel, Bermudes-López C, Alcántara-Ortigoza MA, Torres-Espindola L, et al. Thiopurine S-methyltransferase (*TPMT*) genetic polymorphisms in Mexican newborns. *Journal Clinical Pharm Ther* 2009; 34(6): 703-08.
24. Corominas H, Doménech M, del Río E, Baiget M. Frecuencia y distribución de las variantes alélicas del gen de la tiopurina S-metiltransferasa en distintos grupos étnicos españoles. *Medical Clinical (Barcelona)* 2006; 126(11): 410-2.
25. McLeod HL, Pritchard SC, Githanga J, Collie-Duguid ESR, et al. Ethnic differences in thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: evidence for allele specificity in Caucasian and Kenyan subjects. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 773-6.
26. Collie-Duguid ESR, Prichard SC, Powrie RH, McLeod HL, et al. The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 37-42.
27. Badell, Baiget ME, Fernández-Delgado R, Bure E, et al. Toxicidad en el tratamiento de mantenimiento del protocolo LAL/SHOP-2005. Estudio farmacogenético preliminar. *Anales de pediatría* 2007; 4: 442-3.
28. Fajardo-Gutiérrez A, Juárez-Ocaña S, González-Miranda G, Mejía-Aranguré, et al. Incidence of cancer in children residing in ten jurisdictions of the Mexican Republic: importance of the Cancer registry (a population-based study). *BioMed Central Cancer* 2007; 7: 68.
29. Juárez-Ocaña S, González Miranda G, Mejía Aranguré JM, Fajardo-Gutiérrez A. Frequency of cancer in children residing in Mexico City and treated in the hospitals of the Instituto Mexicano del Seguro Social (1996-2001). *BioMed Cancer* 2004; 4: 50.
30. Medina-Sanson A, Martínez-Avalos A, Gallegos-Castorena S, et al. Pediatric oncology at hospital Infantil de Mexico: Fifty-Five Years of Accomplishment. *Ped Hem Oncol* 2002; 19: 383-7.
31. Evans EW, Hon HY, Bomgaars L, et al. Preponderance of Thiopurine S-Methyl transferase Deficiency and Heterozygosity Among Patients Intolerant to Mercaptoprine or Azathioprine. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2293-301.
32. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med* 2006; 57: 119-37.

Reimpresos:

Dra. Aurora Medina Sanson

Departamento de Hemato-Oncología
 Hospital Infantil de México Federico Gómez
 Dr. Márquez, Núm. 162
 Col. Doctores
 06720, México, D.F.
 Tel.: 5228-9917, Ext. 9015 y 2124
 Correo electrónico: amedina@himfg.edu.mx,
 auroramedina@aol.com.mx

Recibido el 31 de enero 2012.
 Aceptado el 19 de diciembre 2012.