



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**Polimorfismos en los genes TPMT y NUDT15
asociados a cambios en el metabolismo de tiopurinas en
pacientes con leucemias linfoblásticas agudas del
Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja,
periodo 2020**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias de la Salud

AUTOR

Francisco José Melchor SÁNCHEZ PINTO

ASESOR

Dra. Zully Luz ACOSTA EVANGELISTA

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Sánchez F. Polimorfismos en los genes TPMT y NUDT15 asociados a cambios en el metabolismo de tiopurinas en pacientes con leucemias linfoblásticas agudas del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja, periodo 2020 [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado; 2023.

Hoja de Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Francisco José Melchor Sánchez Pinto
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	45970873
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-7830-0527
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Zully Luz Acosta Evangelista
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08199506
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-2005-4116
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Alicia Jesús Fernández Giusti
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09137019
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Maritza Dorila Placencia Medina
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08471948
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Oscar Emilio Ruiz Franco
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07214991
Datos de investigación	
Línea de investigación	No Aplica

Grupo de investigación	No Aplica
Agencia de financiamiento	Perú. Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja (INSNSB). Fondo concursable para ejecutar proyectos de investigación en el INSN-SB 2019”. Resolución Directoral N° 000199-2019-DG-INSNSB
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja (INSNSB) – Servicio de Genética País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Urbanización: Jacarandá II Avenida: Agustín de la Rosa Toro # 1399 Latitud: -12.085639 Longitud: -76.992184
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Enero 2020 - diciembre 2020
URL de disciplinas OCDE	Hematología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.02.06 Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 Bioinformática https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.02.03



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

FACULTAD DE MEDICINA

Vicedecanato de Investigación y Posgrado

SECCION DOCTORADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR

En la ciudad de Lima, a los seis días del mes de julio del año dos mil veintitrés, siendo las 12:30 pm, ante el Jurado de sustentación, bajo la Presidencia de la **DRA. ALICIA JESÚS FERNÁNDEZ GIUSTI**, y los Miembros del mismo:

❖ DRA. ALICIA JESÚS FERNÁNDEZ GIUSTI	PRESIDENTE
❖ DRA. MARITZA DORILA PLACENCIA MEDINA	MIEMBRO
❖ DR. OSCAR EMILIO RUIZ FRANCO	MIEMBRO
❖ DRA. ZULLY LUZ ACOSTA EVANGELISTA	ASESORA

El postulante al grado de Doctor es **MAGÍSTER EN GENÉTICA HUMANA**, don: **FRANCISCO JOSÉ MELCHOR SÁNCHEZ PINTO**, procedió a la exposición y defensa pública de su tesis titulada: "**POLIMORFISMOS EN LOS GENES TPMT Y NUDT15 ASOCIADOS A CAMBIOS EN EL METABOLISMO DE TIOPURINAS EN PACIENTES CON LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS AGUDAS DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO SAN BORJA, PERIODO 2020**" para optar el Grado Académico de **Doctor en Ciencias de la Salud**.

Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, la cual obtuvo la siguiente calificación: "**A**" **EXCELENTE 20 (VEINTE)** a continuación la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad de Medicina, proponga que se le otorgue al Magister: **FRANCISCO JOSÉ MELCHOR SÁNCHEZ PINTO**, el Grado Académico de **DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD**.

Se expide la presente acta y siendo la 1:30 pm. se da por concluido el acto académico de sustentación presencial.

DRA. ALICIA JESÚS FERNÁNDEZ GIUSTI
PRESIDENTE DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN



DRA. MARITZA DORILA PLACENCIA MEDINA
MIEMBRO DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN

DR. OSCAR EMILIO RUIZ FRANCO
MIEMBRO DEL JURADO DE SUSTENTACION

DRA. ZULLY LUZ ACOSTA EVANGELISTA
ASESORA DE LA TESIS



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado



CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo **Martha Brígida Martina Chávez**, Jefa de la Sección de Doctorado, responsable del Software de Similitud textual Turnitin, informar que se ha revisado y evaluado la tesis titulado "**Polimorfismos en los genes *TPMT* y *NUDT15* asociados a cambios en el metabolismo de tiopurinas en pacientes con leucemias linfoblásticas agudas del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja, periodo 2020**", presentado por el/la Mg: **Francisco José Melchor Sánchez Pinto**. para optar el grado académico de **Doctor en Ciencias de la salud**.

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, evaluación y análisis mediante el software para la detección de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 8% de similitud, nivel **PERMITIDO**, para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación**.

Se emite el presente certificado con fines de continuar con los trámites respectivos para su publicación.

MARTHA BRÍGIDA MARTINA CHÁVEZ

DNI: 07880214



Página de aceptación o veredicto de la Tesis por los miembros del Jurado
Examinador

DEDICATORIA

A mi madre Vilma Pinto Flores, cuya perseverancia durante toda su vida, me ha enseñado a impulsar mis objetivos.

A mi padre Rivo Sánchez Mendoza, que con su humildad me acompaña desde la eternidad.

A mis hermanos, Giovanna, Nicolás, Julio, Mary, Fernando, Jesús y Sandra; por su cariño y ánimo en los momentos de tomar decisiones.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo de Investigación fue realizado en el Servicio de Genética del Instituto Nacional de Salud del Niño de San Borja, gracias al financiamiento del Fondo Concursable 2019 con código PI-364-2019 de esta misma Institución.

Agradecer a mi asesora de Tesis, la Dra. Zully Acosta Evangelista, por su apoyo, tiempo y consejos invaluable en la revisión de este trabajo de investigación.

Al jefe del Servicio de Genética, la Dra. Gioconda Manassero Morales, por la autorización y apoyo en realizar proyectos de investigación. A mis compañeros que están y los que ya no, del Servicio de Genética del INSNSB, especialmente a Óscar, Cindy, Lourdes, Orson, Julissa, Mónica, Guillermo, José y Susan.

A mis amigos Ricardo, Dominique, Gloria y Leonor del Instituto de Patología y Biología Molecular Arias Stella, por su permanente apoyo y consejos.

Agradecer a la Unidad de Desarrollo de Investigación, Tecnologías y Docencia, por incentivar a la investigación, especialmente a la Dra. María Medina Pflucker, Leny Sánchez y Raquel Huamaní.

Al Dr. Jorge Contreras y a la Dra. Alicia Mafaldo, del Servicio de Hematología y la Unidad de Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos; por el enrolamiento de los pacientes, ya que sin su ayuda no podría haberse realizado este trabajo de investigación.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	IV
INDICE GENERAL.....	V
ABREVIATURAS	IX
MARCOS CONCEPTUALES.....	XI
LISTA DE CUADROS	XIV
LISTA DE FIGURAS	XVI
RESUMEN.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Situación problemática.....	1
1.2. Formulación del problema	4
1.3. Justificación Teórica	4
1.4. Justificación práctica.....	5
1.5. Objetivos.....	7
1.5.1 Objetivo General.....	7
1.5.2. Objetivos Específicos	7
CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO.....	8
2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación.....	8
2.2. Antecedente de la investigación	9
2.2.1 Estudios del gen <i>TPMT</i> y <i>NUDT15</i>	9
2.2.2. Estudios del gen <i>TPMT</i>	10
2.2.3. Estudios del gen <i>NUDT15</i>	12
2.3. Bases teóricas	13
2.3.1. Farmacogenética en la Salud.....	13
2.3.2. Leucemia linfoblástica Aguda.....	15
2.3.3. Tratamiento de la LLA.....	17
2.3.4. Metabolismo de las Tiopurinas	18

2.3.5. Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP).....	22
2.3.6. <i>TPMT</i>	24
2.3.6.1. Estructura del gen.....	24
2.3.6.2. Variantes alélicas.....	25
2.3.7. <i>NUDT15</i>	29
2.3.7.1. Estructura del gen.....	29
2.3.7.2. Variantes alélicas del <i>NUDT15</i>	29
2.3.8. Secuenciamiento de Nueva Generación (NGS).....	31
2.3.8.1. Preparación de Librerías	32
2.3.8.2. Generación de clúster	32
2.3.8.3. Secuenciamiento por síntesis (SBS)	34
2.3.8.4. Análisis de Datos NGS.....	35
2.3.9. Equilibrio de Hardy-Weinberg	37
CAPITULO 3: METODOLOGÍA	38
3.1. Tipo y diseño de Investigación	38
3.2. Unidad de análisis	38
3.3. Población de estudio	38
3.4. Tamaño de muestra.....	38
3.5. Técnicas de recolección de Datos	40
3.5.1. Obtención de las muestras.....	40
3.5.2. Extracción de ADN.....	40
3.5.3. Cuantificación del ADN	42
3.5.4. Integridad del ADN.....	43
3.5.5. Obtención de datos Demográficos y de Laboratorio	44
3.5.6. Genotipificación de los genes <i>TPMT</i> y <i>NUDT15</i>	44
3.5.7. Diseño del panel personalizado o customizado para los genes <i>TPMT</i> y <i>NUDT15</i>	46
3.5.8. Procedimiento experimental.....	48
3.5.8.1. Cuantificación, Dilución y Normalización del ADN	48
3.5.8.2. Amplificación de las regiones objetivo (<i>target</i>) de ADN.....	48
3.5.8.3. Digestión parcial de amplicones.....	50
3.5.8.4. Ligación de Índices.....	50

3.5.8.5. Limpieza de Librerías.....	51
3.5.8.6. Amplificación de las librerías.....	52
3.5.8.7. Segunda limpieza de librerías.....	52
3.5.8.8. Verificación y Normalización de las librerías.....	53
3.5.8.9. Preparación del <i>pool de librerías</i> para el Iseq100.....	55
3.5.8.10. Sistema de Secuenciamiento Iseq100.....	55
3.6. Análisis e interpretación de la información.....	56
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
4.1. Presentación de Resultados.....	57
4.1.1. Caracterización demográfica y laboratorial de las muestras de estudio.....	57
4.1.2. Genotipificación de los polimorfismos en los genes <i>TPMT</i> y <i>NUDT15</i>	67
4.1.2.1. Genotipos del gen <i>TPMT</i>	67
4.1.2.2. Genotipos del gen <i>NUDT15</i>	68
4.1.2.3. Frecuencias alélicas y genotípicas.....	75
4.1.2.4. Tipificación del gen <i>TPMT</i>	80
4.1.2.5. Tipificación del gen <i>NUDT15</i>	81
4.1.2.6. Polimorfismos nuevos en los genes <i>TPMT</i> y <i>NUDT15</i>	83
4.2. Análisis, interpretación y discusión de resultados.....	87
4.2.1. Caracterización demográfica y laboratorial de las muestras de estudio.....	87
4.2.2. Genotipificación de los polimorfismos en los genes <i>TPMT</i> y <i>NUDT15</i>	89
4.2.2.1. Alelo de normal función <i>TPMT</i> *1.....	89
4.2.2.2. Polimorfismo rs1800462 (238G>C) del gen <i>TPMT</i>	89
4.2.2.3. Polimorfismos rs1800460 (460G>A) y rs1142345 (719A>G) del gen <i>TPMT</i>	90
4.2.2.4. Polimorfismos nuevos en el gen <i>TPMT</i>	91
4.2.2.5. Polimorfismo 415C>T (rs116855232) del gen <i>NUDT15</i>	92
4.2.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg de los polimorfismos rs1800462, rs1800460, rs1142345 y rs116855232.....	95
4.2.4. Medicina personalizada o de Precisión.....	96
CONCLUSIONES.....	101
RECOMENDACIONES.....	102
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

ANEXOS.....	125
Anexo 1. Aprobación del Comité de Ética del INSNSB	125
Anexo 2. Presupuesto del Fondo Concursable 2019 (PI-364-201)	126
Anexo 3. Consentimiento informado para el padre y/o apoderado	127
Anexo 4. Asentimiento informado	130
Anexo 5. Ficha de Recolección de Datos	132
Anexo 6. Cuantificación de ADN de las 80 muestras en estudio.	133
Anexo 7. Cuantificación de las librerías de las 80 muestras en estudio.	134
Anexo 8: Casos seleccionados para los genes <i>TPMT</i> y <i>NUDT15</i> con sus características demográficas, laboratoriales y genotipificación del NGS asociados a su fenotipo.	135

ABREVIATURAS

6-MP: 6-mercaptopurina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

AZA: Azatioprina

BAM: Mapeo de alineación binaria

CDS: Secuencia de codificación

COSMIC: Catalogo de mutaciones somáticas en cáncer

cSNP: Polimorfismo de un solo nucleótido de regiones codificantes

DHFR: Dihidrofolato reductasa

DNPS: Síntesis de timidina y purina de novo

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FPGS: Folilpoliglutamil sintetasa

HGVS: Variación del Genoma Humano

kb: Kilobase

kDa: Kilo Dalton

LLA: Leucemia linfoblástica aguda

Minsa: Ministerio de Salud

mL: mililitro

MT: Terapia de mantenimiento

MTX: Metotrexato

NGS: Secuenciamiento de nueva generación

NUDT15: Fracción ligada a nucleósido difosfato X- Motivo de tipo 15

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: Marco de lectura abierto

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PharmVar: Consorcio de Variación Farmacogénica

SBS: Secuenciamiento por síntesis

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido

STR: Repetición en tándem simple

TAE: Tris-Acetato-EDTA

TG: Tioguanina

TGN: 6-tioguanina

TPMT: Tiopurina metiltransferasa

V: Voltios

XO: Xantina oxidasa

WBC: Recuento de globulos blancos

MARCOS CONCEPTUALES

Alelo: Es una de dos o más versiones de una secuencia de ADN (una base única o un segmento de bases) en una ubicación genómica determinada (Allele, 2022).

Amplicon: Representan fragmentos de ADN que son la fuente y/o producto de eventos de amplificación (cdadmin, 2019).

Biblioteca o librería de ADN: Es una representación de todo el conjunto de ADN , ya sea genómico o complementario a los ARN (*Dna Libraries - MCAT Content*, 2020).

Celda de Flujo (flow cell): Es un canal para adsorber fragmentos de ADN móviles, y también es un recipiente de reactor de secuenciación central: toda la secuenciación ocurre aquí (cdadmin, 2018)

Contig: Es un conjunto de segmentos o secuencias de ADN que se superponen parcialmente de forma tal que colectivamente dan una representación continua de una región genómica (Cóntigo, 2022).

Control interno: Control que se utiliza dentro de un proceso, el cual permite validar los resultados obtenidos de una muestra negativa, o detectar alguna falla (por inhibición) que podrían causar la obtención de resultados falsos negativos (Chauhan, 2021).

Debut: Empleado para referirse al comienzo de una enfermedad. Se suele emplear para referirse al conjunto de síntomas y signos con los que comenzó una enfermedad en un caso concreto (Diccionario médico, 2023).

Electroforesis: Es una técnica de laboratorio que se usa para separar moléculas de ADN, ARN o proteínas en función de su tamaño y carga eléctrica (*Electroforesis*, 2022).

Exón: Es una región del genoma que finaliza con una molécula de ARNm (Exon, 2022).

Farmacogenética: es el estudio de la respuesta farmacológica del individuo según el genotipo (Genosalut_Palma, 2022).

Fluoróforo: Es un componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente (*Fluoróforos*, 2023)

Gen: Se considera la unidad básica de la herencia. Los genes se transmiten de los progenitores a la descendencia y contienen la información necesaria para especificar los rasgos físicos y biológicos (Gen, 2022).

Genoma: El genoma es el conjunto completo de instrucciones del ADN que se hallan en una célula. En los seres humanos, el genoma consta de 23 pares de cromosomas ubicados en el núcleo de la célula, así como de un pequeño cromosoma en la mitocondria de la célula (Genoma, 2022).

Genotipo: Es una clasificación del tipo de variante presente en una ubicación determinada (es decir, un locus) en el genoma (Genotipo, 2022).

Haplotipo: Es una agrupación física de variantes genómicas (o polimorfismos) que tienden a heredarse juntas. Un haplotipo específico por lo general refleja una combinación única de variantes que residen una cerca de la otra en un cromosoma (Haplotipo, 2022).

Intrón: es una región que reside en el interior de un gen, pero no permanece en la molécula madura final de ARNm después de la transcripción de ese gen y no codifica para los aminoácidos que confirman la proteína codificada por ese gen (Intrón, 2022).

Ley de Hardy-Weinberg: Principio que establece que la variación genética en una población se mantendrá constante de una generación a la siguiente en ausencia de factores perturbadores. Cuando el apareamiento es aleatorio en una gran población sin circunstancias perturbadoras, la ley predice que tanto el genotipo como la frecuencia de los alelos se mantendrán constantes porque están en equilibrio (Hardy-Weinberg Equilibrium, 2023).

Llamada de bases (Base Calling): La llamada de base es el proceso mediante el cual se infiere un orden de nucleótidos en una plantilla durante una reacción de secuenciación. Las plataformas de secuenciación de última generación que utilizan terminadores reversibles marcados con fluorescencia tienen un color único para cada base (*Base Calling, 2023*).

Locus: es un sitio o ubicación físicos en un genoma (como un gen u otro segmento de ADN de interés), algo así como una dirección. El plural de locus es loci (*Locus, 2022*).

Marcador genético: Es un segmento de ADN con una ubicación física conocida en un cromosoma. Los marcadores genéticos pueden ayudar a vincular una enfermedad hereditaria con el gen responsable (*Marcador genético, 2023*).

Mutación: Una mutación es un cambio en la secuencia de ADN de un organismo. Las mutaciones pueden producirse a partir de errores en la replicación del ADN durante la división celular (*Mutación, 2023*).

Pellet: Utilizada para referirse a pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido (*pellet, 2023*).

Polimorfismo: Es la presencia de dos o más formas variantes de una secuencia específica de ADN que puede producirse entre diferentes personas o poblaciones (*Polymorphism, 2023*).

Transcriptoma: Es el conjunto, distribución y número de transcritos de ARN que se genera desde el núcleo al citoplasma como paso intermedio para generar proteínas (*Transcriptoma, 2023*).

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Clasificación de la OMS de la leucemia linfoblástica aguda.
- Cuadro 2.** Polimorfismos del gen *TPMT* con sus alteraciones nucleotídicas.
- Cuadro 3.** Operacionalización de variables de la población en estudio.
- Cuadro 4.** Reactivos para el proceso de la Mix HiFi.
- Cuadro 5.** Datos demográficos de la población en estudio.
- Cuadro 6.** Datos laboratoriales de la población en estudio.
- Cuadro 7.** Consolidado de las variables demográficas.
- Cuadro 8.** Consolidado de las variables laboratoriales.
- Cuadro 9.** Polimorfismos frecuentes en el gen *TPMT*.
- Cuadro 10.** Polimorfismo frecuente en el gen *NUDT15*.
- Cuadro 11.** Genotipos de los polimorfismos frecuentes del gen *TPMT* de las 80 muestras estudiadas.
- Cuadro 12.** Genotipos del polimorfismo frecuente del gen *NUDT15* de las 80 muestras estudiadas.
- Cuadro 13.** Consolidado de los genotipos de los genes *TPMT* y *NUDT15*.
- Cuadro 14.** Consolidado de los alelos de los genes *TPMT* y *NUDT15*.
- Cuadro 15.** Frecuencias alélicas de los polimorfismos de los genes *TPMT* y *NUDT15*.
- Cuadro 16.** Frecuencias genotípicas e individuos observados y esperados para los polimorfismos de los genes *TPMT* y *NUDT15*.
- Cuadro 17.** Frecuencias de los Haplotipos del gen *TPMT*.

Cuadro 18. Frecuencias de los tipos polimórficos del gen *TPMT*.

Cuadro 19. Frecuencias de los Haplotipos del gen *NUDT15*.

Cuadro 20. Frecuencias de los tipos polimórficos del gen *NUDT15*.

Cuadro 21. Polimorfismos nuevos en el gen *TPMT* identificados en nuestra población.

Cuadro 22. Frecuencias de los polimorfismos nuevos del gen *TPMT*.

Cuadro 23. Polimorfismos nuevos en el gen *NUDT15* identificados en nuestra población.

Cuadro 24: Frecuencias de los polimorfismos nuevos del gen *NUDT15*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo de tiopurina y metotrexato y mecanismos de resistencia a tiopurina.

Figura 2. Representación esquemática del polimorfismo de un solo nucleótido (*SNP*).

Figura 3. Estructura del gen *TPMT*.

Figura 4. Estructura del gen *NUDT15*.

Figura 5. Polimorfismos del gen *NUDT15* con sus alteraciones nucleotídicas.

Figura 6. Amplificación en puente según el método de Illumina.

Figura 7. Secuenciación por Síntesis.

Figura 8. Integridad de ADN de 24 casos del INSNSB.

Figura 9. Amplicones totales del gen *TPMT*.

Figura 10. Amplicones totales del gen *NUDT15*.

Figura 11. Integridad de Librería de 24 casos del INSNSB.

RESUMEN

Objetivo: Identificar los polimorfismos de los genes *TPMT* y *NUDT15* asociados a cambios en el metabolismo de tiopurinas en pacientes con leucemias linfoblásticas agudas del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja (INSNSB).

Metodología: Estudio observacional, descriptivo, de corte transversal y prospectivo. Se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas en los polimorfismos de los genes *TPMT* y *NUDT15*, utilizando la secuenciación de nueva generación (NGS) en 80 pacientes pediátricos del INSNSB, durante el periodo 2020.

Resultados: Para el gen *TPMT*, el genotipo más frecuente fue el *TPMT*1/TPMT*1* el cual se encontró en el 77,5% de la población, seguido de los genotipos *TPMT*1/TPMT*3A* (21.25%) y *TPMT*1/TPMT*2* (1.25%); asimismo, las frecuencias de los alelos mutantes *TPMT*3A* y *TPMT*2* fue 10.625% y 0.625% respectivamente. Para el gen *NUDT15*, las frecuencias genotípicas fueron las siguientes: *NUDT15*1/NUDT15*1* con una frecuencia de 85%, seguido del *NUDT15*1/NUDT15*3* con 13.75% y *NUDT15*3/NUDT15*3* con 1.25%; además su alelo mutante *NUDT15*3*, tuvo una frecuencia de 8.125% en nuestra población. Se identificó para el gen *TPMT*, las variantes nuevas alélicas *TPMT*1S* y *TPMT*3E*, encontrándose en los 80 y 17 casos respectivamente. Para el gen *NUDT15*, se identificó la variante nueva *NUDT15*2*, la cual se identificó en 11 casos del total de la población.

Conclusión: Se determinó las variantes polimórficas de los genes *TPMT* y *NUDT15*, las cuales permitieron optimizar el conocimiento de la medicina de precisión, mediante la identificación de marcadores genéticos en pacientes pediátricos con LLA.

Palabras clave: *Leucemia linfoblástica aguda, polimorfismos, TPMT, NUDT15, tiopurinas, pediátrico.*

ABSTRACT

Objective: To identify the polymorphisms of the *TPMT* and *NUDT15* genes associated with changes in the metabolism of thiopurines in patients with acute lymphoblastic leukemia from the San Borja National Institute of Child Health (INSNSB).

Methodology: Observational, descriptive, cross-sectional and prospective study. The genotypic and allelic frequencies in the polymorphisms of the *TPMT* and *NUDT15* genes were determined, using next generation sequencing (NGS) in 80 pediatric patients from the INSNSB, during the 2020 period.

Results: For the *TPMT* gene, the most frequent genotype was *TPMT**1/*TPMT**1, which was found in 77.5% of the population, followed by the *TPMT**1/*TPMT**3A (21.25%) and *TPMT**1/*TPMT**2 (1.25%); likewise, the frequencies of the *TPMT**3A and *TPMT**2 mutant alleles were 10.625% and 0.625% respectively. For the *NUDT15* gene, the genotypic frequencies were as follows: *NUDT15**1/*NUDT15**1 with a frequency of 85%, followed by *NUDT15**1/*NUDT15**3 with 13.75% and *NUDT15**3/*NUDT15**3 with 1.25%; In addition, its mutant allele *NUDT15**3 had a frequency of 8.125% in our population. The new allelic variants *TPMT**1S and *TPMT**3E were identified for the *TPMT* gene, being found in 80 and 17 cases respectively. For the *NUDT15* gene, the new variant *NUDT15**2 was identified, which was identified in 11 cases of the total population.

Conclusion: The polymorphic variants of the *TPMT* and *NUDT15* genes were determined, which allowed to optimize the knowledge of precision medicine, through the identification of genetic markers in pediatric patients with ALL.

Keywords: *Acute lymphoblastic leukemia, polymorphisms, TPMT, NUDT15, thiopurines, pediatric.*

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una enfermedad clonal maligna del tejido hematopoyético. Es el cáncer más común en la infancia, y representa aproximadamente el 25% de todas las neoplasias malignas pediátricas. El uso óptimo de fármacos antileucémicos conocidos en el contexto de ensayos clínicos multicéntricos y las mejoras en el campo de la terapia de apoyo han llevado a tasas de supervivencia más altas (Pui et al., 2012).

Está bien establecido que la tasa de incidencia de LLA está estrechamente relacionada con la edad y el sexo (Malard & Mohty, 2020). Informes mostraron que la tasa de incidencia de LLA alcanzó un pico en niños de 1 a 4 años, luego descendió drásticamente y tuvo el punto más bajo en adultos de 25 a 45 años (Siegel et al., 2018, 2019). Alrededor del 60% de los casos de LLA se diagnostican antes de los 20 años; en comparación con las mujeres, los hombres tienen más probabilidades de desarrollar LLA (la proporción hombre/mujer = 1,23 en los Estados Unidos) (Malard & Mohty, 2020).

Aunque la LLA tiene una cura, es probable que en diferentes partes del mundo no tengan acceso a tratamientos modernos. Aproximadamente de ocho a nueve de cada diez niños que tienen LLA se consideran supervivientes a largo plazo y se curan en los países desarrollados, pero estos resultados difieren notablemente en los países en desarrollo (Abdelmabood et al., 2020; Rivera & Ribeiro, 2014). Estos resultados positivos se deben a tener acceso a los mejores

tratamientos en las instituciones más avanzadas (Rivera & Ribeiro, 2014). Aunque la tasa de supervivencia a cinco años es del 93,5%, cuando se utilizan los protocolos más nuevos y la quimioterapia superior, todavía se producen algunos casos de recaída (Pui & Evans, 2013). No obstante, no todos los países pueden acceder al tratamiento superior, ya que pueden intervenir muchos factores, como la escasez de recursos (Mosadeghrad, 2014).

En el Perú se encuentran algunos hospitales que proveen la suficiente capacidad para el tratamiento de la LLA; por ejemplo, en el Ministerio de Salud (MINSA), se encuentran básicamente dos: el Instituto de Enfermedades Neoplásicas (INEN) y INSNSB. En el INEN, del total de hospitalizaciones en el año 2016, el 50% fueron para la LLA. Con respecto al INSNSB, en un período de 3 años, han recibido 105 casos de LLA, con un rango de edad de 1.5-17.3 años (mediana: 6.14 años), es decir un promedio de casi 35 casos por año (MINSA, 2017).

En nuestro país es muy importante proporcionar a las distintas regiones geográficas, un tratamiento preciso y adecuado, con el fin de que la supervivencia de los pacientes pediátricos se aproxime de manera exitosa como en los países desarrollados. Asimismo, hacer un monitoreo oportuno para que los apoderados estén vigilantes con la toma de los medicamentos de sus niños; con el objetivo de disminuir el abandono del tratamiento por alguna causa; ya que con el tiempo podría significar más gastos de la salud y desafortunados resultados (INEN, 2020).

La estructura del tratamiento es una quimioterapia que consiste en las fases de inducción, consolidación y mantenimiento a largo plazo (Gottlieb et al., 1984; Scavino et al., 1976).

Los fármacos necesarios para el manejo de los pacientes con LLA pediátricos y adultos en la etapa de mantenimiento son aquellos de la familia de tiopurinas (*e.g.* azatriopina, 6-mercaptopurina (6-MP), tioguanina (Wu & Li, 2018); cuyo uso también se emplea en enfermedad inflamatoria intestinal y en el área médica de trasplantes (Cacabelos et al., 2019).

Actualmente, el servicio de Hematología del INSN–SB, facilita el fármaco tiopurina, para el tratamiento en mantenimiento en los pacientes pediátricos con LLA, el cual, en algunos niños generan cierto tipo de hepatotoxicidad, mielotoxicidad u otros efectos adversos en el organismo. Ante este escenario el médico hematólogo disminuye empíricamente o suspende el tratamiento de las tiopurinas. En algunos casos esto provoca recaída de la enfermedad, conllevando en algunos casos al fallecimiento del paciente.

Se conocen algunos polimorfismos o variantes frecuentes en los genes *TPMT* y *NUDT15* como predictores de resultados y toxicidad inducida por la 6-MP, durante la fase de mantenimiento del tratamiento en la leucemia linfoblástica aguda pediátrica (Milosevic et al., 2018).

A pesar de existir variantes recurrentes en estos genes, cada vez se reportan más variantes nuevas en estos genes, que tendrían un impacto clínico en los cambios de metabolismo de las tiopurinas (Moriyama et al., 2015). Por lo tanto, el conocimiento de los polimorfismos en los genes *TPMT* y *NUDT15*, en la población peruana; a través de un panel de marcadores farmacogenéticos, permitiría su contribución para determinar las variantes que están asociadas en la predicción de la toxicidad inducida por tiopurina en los pacientes pediátricos con LLA que acudan al INSN–SB.

Estos hallazgos tienen que confirmarse en otras investigaciones originales con el objetivo de identificar la frecuencia y las variantes más observadas en cada población de niños con LLA en los genes *TPMT* y *NUDT15*. Así, el presente estudio se realizará por primera vez en los niños peruanos con LLA, permitiría en un futuro, personalizar las dosis de tratamiento, siguiendo los lineamientos del Consorcio de Implementación Clínica de Farmacogenética (CPIC). De esta manera, se podría contribuir a disminuir los efectos adversos asociados al uso de tiopurinas con una prueba farmacogenética en nuestros pacientes y así llegar a un manejo personalizado.

De esta forma, conocer los genes y sus polimorfismos en la población peruana pediátrica con LLA, facilitará a sentar las bases para el conocimiento de nuevas variantes que tengan un impacto significativo relacionadas al metabolismo de tiopurinas o variantes que ya han sido reportadas en la literatura y que están asociadas en nuestra población peruana.

1.2. Formulación del problema

¿Cuáles son los polimorfismos en los genes *TPMT* y *NUDT15* asociados a cambios en el metabolismo de tiopurinas en pacientes con leucemias linfoblásticas agudas del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja, periodo 2020?

1.3. Justificación Teórica

El tratamiento de la LLA infantil se estableció mediante ensayos pioneros realizados en las décadas de 1960 y 1970 (Rivera & Ribeiro, 2014). La respuesta individual a la terapia depende de múltiples factores, incluidas las características biológicas y genéticas de los blastos de leucemia en el momento del diagnóstico, así como características del paciente. Múltiples estudios han encontrado una amplia variabilidad entre pacientes en la exposición general a los fármacos y la tolerabilidad de los regímenes farmacológicos para la LLA. Por lo tanto, la recaída puede atribuirse a la resistencia de las células leucémicas a los fármacos o a una exposición inadecuada al fármaco como resultado de la variabilidad farmacocinética entre pacientes. Una gran cantidad de investigación se centra ahora en el 20% de los pacientes que no se curan con la terapia inicial y busca definir las diferencias genéticas en las células somáticas o tumorales que están asociados con el fracaso del tratamiento. Se prevé que los niños con LLA, que se curan con la terapia inicial, tendrán una esperanza de vida prolongada. A

medida que las mejoras en la farmacoterapia conducen a mejorar la curación. Los investigadores buscan formas de minimizar la toxicidad del huésped (efectos secundarios tanto agudos como crónicos) mientras continúan logrando excelentes tasas de curación (Pui, 2009).

Estudios recientes sugieren que las características genéticas basales del hospedador pueden predecir tanto la toxicidad crónica como la toxicidad aguda. A medida que las tecnologías estén más disponibles, será posible detectar estas variaciones genéticas antes de la terapia y maximizar la calidad de vida futura de estos niños.

El campo de la farmacogenómica ha aumentado nuestra comprensión de la interacción de las variaciones del huésped en los genes que codifican las enzimas, los receptores y los transportadores que metabolizan los fármacos, y la disposición y respuesta generales del fármaco para muchos de los fármacos utilizados para la terapia de la LLA. Las variantes genéticas o polimorfismos como consideraciones farmacogenómicas para los pacientes con LLA incluyen variaciones de hospedador que limitan la exposición general de una persona a las variaciones de fármacos y tumores que reducen la eficacia de los fármacos.

1.4. Justificación práctica

La visión del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja está dirigida entre sus pilares en el manejo de pacientes con enfermedad hematológica, principalmente las leucemias por ser una enfermedad que requiere un manejo altamente especializado.

El tipo de neoplasia que más afecta a los niños son las leucemias agudas y dentro de este grupo las de estirpe linfoide llegando a ser el 25% de todas estas

neoplasias malignas en la población pediátrica (Pui et al., 2008). El tratamiento de las LLA requiere un manejo de larga duración (1 año y 6 meses en INSN–SB) para lograr la remisión y curación, sin embargo, para llegar a la meta existe un camino largo con uso prolongado de medicamentos, lo cual incrementa el riesgo de efectos adversos o toxicidad, por ejemplo, la leucopenia es el efecto adverso más frecuentemente producido por la azatioprina (AZA) y la 6-MP; alteración analítica que acontece entre el 5 y el 25% de los pacientes que reciben este tratamiento (Anstey et al., 1992; Lorenzen et al., 1969). La mielotoxicidad también aparece como una forma más aguda y grave, generalmente de leucopenia o pancitopenia; diversos estudios han evidenciado una correlación entre el fenotipo o el genotipo de la *TPMT* y el riesgo de mielotoxicidad (Lennard et al., 1989; Naughton et al., 1999).

Esta investigación permitió detectar los polimorfismos de los genes *TPMT* y *NUDT15*, por la metodología de NGS, esto no sólo serviría para detectar posibles variantes que incluyan modificaciones o cambios en la secuencia aminoacídica en los pacientes pediátricos con LLA, sino también en un futuro tomar decisiones para la regulación del tratamiento de los pacientes pediátricos que reciben tiopurinas en el INSN–SB.

La metodología NGS, permite obtener una mayor información de las variantes posibles de todas las regiones codificantes de los genes *TPMT* y *NUDT15*; asimismo, disminuirá el tiempo de la detección de los polimorfismos, como también reducirá los costos en comparación si se realiza por RFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), técnica utilizada en el 2017 para el gen *TPMT* en la población pediátrica en el INSN–SB, y/o secuenciación tipo Sanger de algunas variantes de estos genes.

Es así, que este trabajo sería el primer estudio en Perú, sobre la detección de las variantes genéticas asociadas al metabolismo de las tiopurinas en los genes *TPMT* y *NUDT15*, pacientes con LLA que acudan al INSN SB en el periodo 2020.

1.5. Objetivos

1.5.1 Objetivo General

- Identificar los polimorfismos de los genes *TPMT* y *NUDT15* asociados a cambios en el metabolismo de tiopurinas en pacientes con leucemias linfoblásticas agudas del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Describir las frecuencias alélicas de los polimorfismos de los genes *TPMT* y *NUDT15* en pacientes pediátricos con LLA del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja.
- Determinar las frecuencias genotípicas de los polimorfismos de los genes *TPMT* y *NUDT15* en pacientes pediátricos con LLA del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja.

CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación

Los avances recientes en el desarrollo de tecnologías de secuenciación brindan a los investigadores posibilidades sin precedentes para los análisis genéticos. Los estudios de variación genética humana mediante secuenciación de ácido desoxirribonucleico (ADN) han experimentado un desarrollo extraordinario desde su introducción hace más de 40 años hasta las tecnologías actuales, que permiten secuenciar y analizar un genoma humano en cuestión de días (Petersen et al., 2017).

El polimorfismo consiste en mutaciones que escapan a los sistemas de reparación del ADN durante las divisiones celulares. Su tasa de aparición es, por tanto, una variable biológica. Cada nacimiento produce unas 100 nuevas mutaciones por genoma, solo una pequeña parte del genoma está codificando, el 99% de ellos no tienen efecto sobre la supervivencia o la fertilidad, por lo que se llaman neutros. El polimorfismo ha causado controversia sobre su papel en la evolución neutra, asimismo, también ha sido utilizado para reconstruir la historia pasada de las especies (Michel, 2016).

Las secuencias preliminares de varios genomas junto con nuevas tecnologías permiten el estudio de las influencias y respuestas de genomas completos en lugar de genes aislados. Esto ha abierto un nuevo ámbito de biología altamente dimensional donde las preguntas involucran multiplicidad a escalas sin precedentes: miles de polimorfismos genéticos, niveles de expresión génica,

mediciones de proteínas, secuencias genéticas o cualquier combinación de estos y sus interacciones (Mehta et al., 2006).

La búsqueda de variantes asociadas al metabolismo de tiopurinas en la leucemia linfoblástica aguda permite abordar cuestiones tan complejas que requeriría enfoques novedosos como complejas que se puede atribuir a variantes que tienen un pequeño aditivo o efecto multiplicativo sobre el genotipo y el fenotipo del individuo. Lo cual conlleva a una problemática en las decisiones farmacogenéticas y una medicina de precisión en la LLA (Petersen et al., 2017).

2.2. Antecedente de la investigación

2.2.1 Estudios del gen *TPMT* y *NUDT15*

En los estudios donde se investigan las frecuencias alélicas de los genes *TPMT* y *NUDT15* al mismo tiempo, tenemos, por ejemplo a Moradveisi et al., 2019, que realizó la investigación: “*ITPA, TPMT, and NUDT15 Genetic Polymorphisms Predict 6-Mercaptopurine Toxicity in Middle Eastern Children With Acute Lymphoblastic Leukemia*” (Irán), que determinaron los genotipos de las variantes por la metodología de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (PCR-RFLP) (Ota et al., 2007); para los genes *TPMT* y *NUDT15*. Los polimorfismos *TPMT**2 238G>C (rs1800462), *TPMT**3B 460G>A (rs1800460) y *3C 719A>G (rs1142345) se estudió para el gen *TPMT*. Para el gen *NUDT15*, se estudió el polimorfismo 415C>T (rs116855232). La información del genotipo de los polimorfismos para el gen *TPMT* fue de la siguiente manera *1/*1 (97.8%) y *1/*3A (2.2%), para la población del Líbano; y para la población de Kurdistán fue *1/*1 (98.6%) y *1/*3A (1.4%). Para el gen *NUDT15*, fue CC (99.3%) y CT (0.7%) en la población del Líbano; y para la población de Kurdistán no se reportó los genotipos.

Zhou et al., 2018, en el estudio: “*Optimal predictor for 6-mercaptopurine intolerance in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia: NUDT15, TPMT, or ITPA genetic variants?*” (China), donde participaron 105 niños con LLA de riesgo estándar y riesgo intermedio, se determinó el genotipo de los polimorfismos para los genes *TPMT* y *NUDT15*. Se encontró para el gen *TPMT* (rs1800462, rs1800460 y rs1142345), los siguientes resultados: *1/*1 (94.3%) y *1/*3A (5.7%). Para el estudio del gen *NUDT15* (rs116855232), se encontró los siguientes valores de los genotipos: CC (70.5%), CT (27.6%) y TT (1.9%); donde concluyeron que la variante del gen *NUDT15* es un predictor óptimo de intolerancia a 6-MP en pacientes pediátricos chinos con LLA y puede tener grandes implicaciones clínicas para la terapia individualizada.

2.2.2. Estudios del gen *TPMT*

Para el estudio de sólo el gen *TPMT*, se han reportado varios en todo el mundo; donde los alelos variantes predominantes identificados fueron *TPMT*3C*, *TPMT*3A* y *TPMT*2*, que representaron más del 95% de la deficiencia de *TPMT* heredada. Según los estudios de genotipo-fenotipo; los ensayos para el diagnóstico molecular de la deficiencia de *TPMT* se han centrado en los alelos mutantes *TPMT*2*, *TPMT*3A* y *TPMT*3C*. En la mayoría de estos estudios, se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o PCR-RFLP para detectar mutaciones en los alelos *TPMT* (Asadov et al., 2017).

Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998, en su estudio: “*Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population*” (Francia), mediante la metodología PCR-SSCP (polimorfismo de conformación monocatenario de la reacción en cadena de la polimerasa), determinó las siguientes frecuencias para los alelos *TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3B* y *TPMT*3C* y *TPMT*4* para la población europea, las cuales fueron 0.5, 5.7, 0.0, 0.8 y 0.0 respectivamente.

Kumagai et al., 2001, en su estudio: "*Allelotype frequency of the thiopurine methyltransferase (TPMT) gene in Japanese*" (Japón), determinó las siguientes frecuencias para los alelos *TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3B* y *TPMT*3C* y *TPMT*4* para la población japonesa, las cuales fueron 0.0, 0.0, 0.0, 1.6 y 0.0 respectivamente.

Corominas et al., 2003, en su investigación: "*Is thiopurine methyltransferase genetic polymorphism a major factor for withdrawal of azathioprine in rheumatoid arthritis patients?*" (España), usando PCR-RFLP, determinó las siguientes frecuencias para los alelos *TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3B* y *TPMT*3C* y *TPMT*4* para la población española, las cuales fueron 0.0, 2.5, 0.7, 1.0 y 0.0 respectivamente.

Cheon et al., 2009, en su investigación: "*Allele frequency of thiopurine methyltransferase and inosine triphosphate pyrophosphatase gene polymorphisms in Korean patients with inflammatory bowel diseases*" (Korea), determinó en sus resultados las siguientes frecuencias para los alelos *TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3B* y *TPMT*3C* y *TPMT*4* para la población coreana, las cuales fueron 0.0, 0.0, 0.0, 0.1 y 0.0 respectivamente.

Relling et al., 2013, en su estudio: "*Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Thiopurine Methyltransferase Genotype and Thiopurine Dosing: 2013 Update*" (EEUU), realizó una revisión enfocada de la literatura entre junio de 2010 y noviembre de 2012 sobre el genotipo *TPMT* y el uso de tiopurina, describiendo las frecuencias de alelos mutantes de *TPMT*, en los principales grupos étnicos y poblaciones; es así, que frecuencias para los alelos *TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3B* y *TPMT*3C* y *TPMT*4*, en los caucásicos fue 0.2, 3.5, 0.04, 0.4 y 0.0 respectivamente. En la población mediterránea fue 0.4, 2.5, 0.4, 0.5 y 0.0 respectivamente. En Medio Este fue 0.7, 1.1, 0.5, 0.5 y 0.0 respectivamente. En la población asiática fue 0.0, 0.01, 0.0, 1.5 y 0.0 respectivamente. En los africanos fue 0.08, 0.2, 0.0, 4.9 y 0.0 respectivamente, Y para la población sudamericana fue 0.8, 2.8, 0.05, 0.9 y 0.05 respectivamente.

2.2.3. Estudios del gen *NUDT15*

Tanaka et al., 2015, en su investigación: “*Susceptibility to 6-MP toxicity conferred by a NUDT15 variant in Japanese children with acute lymphoblastic leukaemia*” (Japón) se realizó un estudio con 92 pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA. Para la determinación de los polimorfismos, se realizó el método de discriminación alélica Taqman en Tiempo Real (Kamau et al., 2012). Los resultados mostraron que el gen *NUDT15* (rs116855232) presenta los siguientes genotipos CC (73.9%), CT (19.6%) y TT (6.5%). Se encontró que rs116855232, es un determinante importante de la mielotoxicidad de 6-MP en niños japoneses con LLA y puede representar el locus relacionado con la toxicidad más sólido en los asiáticos hasta la fecha, por lo que pueden justificar las consideraciones para la aplicación clínica.

Kakuta et al., 2016, en su estudio: “*NUDT15 R139C causes thiopurine-induced early severe hair loss and leukopenia in Japanese patients with IBD*” (Japón), se obtuvieron muestras de sangre de 135 pacientes que tenían antecedentes con tratamiento con tiopurina. Se examinó el genotipado del polimorfismo 415C>T (rs116855232) del gen *NUDT15*, utilizando un Kit de ensayo de genotipado personalizado TaqMan SNP y un sistema de PCR en tiempo real Step-One Plus. Los resultados obtenidos fueron CC (79.3%), CT (17.0%) y TT (3.7%).

Moriyama et al., 2016, en su investigación: “*NUDT15 polymorphisms alter thiopurine metabolism and hematopoietic toxicity*” (EEUU), se recolectaron 270 niños inscritos en ensayos clínicos de leucemia linfoblástica aguda en Guatemala, Singapur y Japón, identificamos cuatro variantes de codificación *NUDT15* (p.Arg139Cys, p.Arg139His, p.Val18Ile y p.Val18_Val19insGlyVal) que resultaron en una pérdida de 74,4-100 % de actividad de nucleótido difosfatasa.

Yu et al., 2020, en su estudio: “*Determination of NUDT15 variants by targeted sequencing can identify compound heterozygosity in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients*” (China), mediante las variantes de *NUDT15* se identificaron como un factor determinante de la intolerancia a la mercaptopurina.

Se seleccionó una cohorte de 37 pacientes con variantes c.36_37insGGA GTC y c.415C>T *NUDT15* para el haplotipo mediante secuenciación dirigida. El ADN complementario de *NUDT15* se amplificó y secuenció mediante secuenciación de extremos emparejados de 300 pb en Illumina MiSeq. De los 37 pacientes que portaban variantes *NUDT15*, 35 tenían variantes heterocigotas *NUDT15**1/*2 y dos tenían variantes compuestas heterocigotas *NUDT15**3/*6 y *NUDT15**2/*7.

2.3. Bases teóricas

2.3.1. Farmacogenética en la Salud

Los avances de la biología molecular y la genética tienen un gran impacto en la acción de los fármacos, y que estas herramientas son esenciales e indispensables para el progreso futuro en biomedicina y salud. La interfaz entre estos métodos y conceptos y el descubrimiento, desarrollo y uso de nuevos medicamentos se están reconociendo como nuevas "disciplinas" o facetas de la ciencia biomédica, denominadas farmacogenética y farmacogenómica (Ferreira et al., 2020).

La publicación del borrador de trabajo de la secuencia del genoma humano en 2000 (Venter et al., 2001), promete una nueva era de la medicina genómica en la que la eficacia, la dosis o los efectos secundarios de los fármacos pueden estar predeterminados con información molecular (Collins & McKusick, 2001; Ojha & Thertulien, 2005). Esto se basa en el conocimiento de los polimorfismos genéticos que alteran la síntesis de proteínas responsables de la absorción, distribución, metabolismo y eliminación del fármaco, lo que lleva a una acumulación del fármaco no utilizado en el cuerpo que resulta en toxicidad del fármaco o una eliminación demasiado rápida que provoca fallas terapéuticas. Las respuestas inmunitarias predisuestas genéticamente también pueden producir

reacciones de hipersensibilidad indeseables, que disminuyen la calidad de vida y aumentan la morbilidad y la mortalidad (Kapoor et al., 2016).

Los beneficios de las pruebas farmacogenómicas sobre la práctica convencional de la medicina clínica radican en la intención de estratificar a los pacientes de acuerdo con los requisitos farmacológicos esperados o los resultados, en términos generales en las tres categorías de: (i) predecir la dosis óptima del fármaco; (ii) identificar pacientes en riesgo de toxicidad inducida por fármacos o efectos secundarios adversos; o (iii) si un fármaco indicado será eficaz. Las terapias dirigidas que realmente mejoran la eficacia del tratamiento y minimizan la mortalidad y morbilidad no intencionales también pueden (iv) generar ahorros considerables en los costos para los sistemas de salud, incluso más allá de los gastos adicionales incurridos en la realización de las pruebas genéticas (Kapoor et al., 2016).

La práctica convencional de la medicina clínica se basa en el juicio del médico y en la monitorización rutinaria del paciente para establecer una dosis de trabajo del régimen farmacológico. Para la mayoría de las drogas, están disponibles formas de dosificación preparadas comercialmente y estas contienen típicamente la cantidad de componentes de fármacos activos que son necesarios y adecuados para la mayoría de los pacientes, o que pueden ajustarse fácilmente de acuerdo con factores biométricos específicos del paciente tales como el peso y la edad. Sin embargo, un puñado de fármacos exigen una titulación cuidadosa de la dosis para lograr el efecto clínico deseado dentro de un índice terapéutico estrecho. Antes del descubrimiento del vínculo farmacogenómico entre el perfil genético y la dosis óptima del fármaco, este proceso de ajuste continuo era en parte un enfoque de prueba y error acompañado de un seguimiento estricto y repetido de la respuesta del paciente (Kapoor et al., 2016).

2.3.2. Leucemia linfoblástica Aguda

La LLA es una malformación que consiste en la proliferación alterada de las células progenitoras de la línea linfóide de la médula ósea, y que se presenta en el 80% de los pacientes pediátricos (Smith et al., 2010). El diagnóstico inicial se dispone por la aparición de linfoblastos en la médula ósea o sangre periférica; y luego con el apoyo de otros estudios complementarios como la inmunofenotipificación, la citogenética, la biología molecular (Alvarnas et al., 2015).

La incidencia de LLA sigue una distribución bimodal, el primer pico ocurre en la infancia y un segundo pico ocurre alrededor de los 50 años (Paul et al., 2016). Los trabajos de investigación señalan que se han identificado algunas enfermedades que predisponen a casos de LLA, como por ejemplo el síndrome de Down, la anemia de Fanconi, el síndrome de Bloom, la ataxia telangiectasia y el síndrome de ruptura de Nijmegen (Bielorai et al., 2013; German, 1997; Paul et al., 2016; Shah et al., 2013)

Hay otros factores que predisponen a la LLA, como las radiaciones ionizantes, pesticidas o el virus de la inmunodeficiencia humana (Gérinière et al., 1994; Sehgal et al., 2010). Hay que resaltar que, en la mayoría de los pacientes, la LLA es producida en forma *de novo* (Mullighan et al., 2009).

Entre las manifestaciones clínicas de la LLA, tenemos algunos signos de incapacidad en el funcionamiento normal de la médula, lo que origina las anemias, leucopenias, trombocitopenias, etc. (Alvarnas et al., 2015). Entre los síntomas comunes resaltan las infecciones, sangrado, hematomas, fiebre, pérdida de peso. El daño de sitios extramedulares puede causar linfadenopatía, esplenomegalia o hepatomegalia en el 20% de los pacientes (E. J. Jabbour et al., 2005). La aparición de células leucémicas en el sistema nervioso central (SNC), sucede entre el 5-8% de los pacientes (E. Jabbour et al., 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1997, clasificó la LLA en tres tipos: la linfoblástica B, linfoblástica T y leucemia de células de Burkitt (Harris et al., 1999). Con el transcurso de los años y con las revisiones científicas de esta enfermedad, en el año 2016 la OMS la redefinió en leucemia/linfoma linfoblástico de células B, no especificado; leucemia/linfoma linfoblástico de células B, con anomalías genéticas recurrentes y leucemia/linfomas linfoblásticos de células T (Cuadro 1) (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017). En adultos, la LLA de células B representa ~ 75 % de los casos, mientras que la LLA de células T comprende los casos restantes (Arber et al., 2016).

Cuadro 1. Clasificación de la OMS de la leucemia linfoblástica aguda.

<i>Leucemia/linfoma linfoblástico de células B, no especificado de otro modo</i>
<i>Leucemia/linfoma linfoblástico de células B, con anomalías genéticas recurrentes</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico de células B con hipodiploidía
Leucemia/linfoma linfoblástico de células B con hiperdiploidía
Leucemia/linfoma linfoblástico de células B con t(9;22)(q34;q11.2)[<i>BCR-ABL1</i>]
Leucemia/linfoma linfoblástico de células B con t(v;11q23)[<i>MLL</i> reorganizado]
Leucemia/linfoma linfoblástico de células B con t(12;21)(p13;q22)[<i>ETV6-RUNX1</i>]
Leucemia/linfoma linfoblástico de células B con t(1;19)(q23;p13.3)[<i>TCF3-PBX1</i>]
Leucemia/linfoma linfoblástico de células B con t(5;14)(q31;q32)[<i>IL3-IGH</i>]
Leucemia/linfoma linfoblástico de células B con amplificación intracromosómica del cromosoma 21 (iAMP21)
Leucemia/linfoma linfoblástico de células B con translocaciones que involucran tirosina cinasas o receptores de citocinas ('LLA similar a BCR-ABL1')
<i>Leucemia/linfomas linfoblásticos de células T</i>
Leucemia linfoblástica precursora de células T temprana

Fuente. Adaptado de Terwilliger & Abdul-Hay, 2017

2.3.3. Tratamiento de la LLA

El tratamiento completo de la LLA pediátrica se divide en tres períodos distintos, cada uno con diferentes objetivos de tratamiento. El tratamiento comienza después del diagnóstico con la fase de inducción, en la que los médicos intentan inducir la remisión inmediatamente, seguida de la fase de consolidación, en la que los médicos intentan eliminar cualquier enfermedad residual que quede después de la fase de inducción, y finalmente la fase de mantenimiento, en la que los médicos intentan reducir la posibilidad de recaída (Cooper & Brown, 2015). Para cumplir el objetivo específico de cada fase del tratamiento, los fármacos elegidos y las cantidades administradas durante cada período difieren mucho entre fases.

En la fase de inducción, los agentes quimioterapéuticos que incluyen vincristina, antraciclinas, corticosteroides y asparaginasa se usan para eliminar inmediatamente las células leucémicas (Cooper & Brown, 2015). Estos medicamentos son conocidos por su alta toxicidad y efectos secundarios sustanciales. En la fase de consolidación, estos fármacos se utilizan en diversas combinaciones diseñadas para maximizar la sinergia (Cooper & Brown, 2015). Si bien los medicamentos utilizados en estas dos primeras etapas son relativamente tóxicos, estas fases del tratamiento generalmente tienden a durar un período de varias semanas a varios meses solamente. Por el contrario, la fase de mantenimiento es mucho más larga, con una duración aproximada de 2 a 3 años en pacientes pediátricos (Cooper & Brown, 2015). La 6-MP y el metotrexato (MTX) son los fármacos que se utilizan predominantemente durante la terapia de mantenimiento, que se han utilizado sistemáticamente y también se han investigado de forma exhaustiva. Idealmente, los agentes quimioterapéuticos utilizados durante un período de tiempo tan largo deberían tener efectos secundarios mínimos, o solo dar como resultado efectos secundarios de baja gravedad. No obstante, este no es el caso de 6-MP y MTX, ya que ambos tienen

toxicidades potencialmente graves y potencialmente mortales que pueden ocurrir en un subgrupo de pacientes (Paugh et al., 2010) .

Es esencial considerar los efectos farmacogenómicos del tratamiento de pacientes con medicamentos que tienen una toxicidad potencialmente variada, ya que puede guiar a los médicos a identificar y minimizar el riesgo de toxicidad potencialmente mortal en pacientes pediátricos con LLA. Dada la estrecha ventana terapéutica de los medicamentos quimioterapéuticos, la alta toxicidad de los medicamentos debe equilibrarse con su eficacia real en el tratamiento del cáncer cuando los médicos determinan qué medicamentos recetar y qué dosis usar (Paugh et al., 2010). Esta estrecha ventana terapéutica debe tenerse en cuenta al considerar todos los tratamientos contra el cáncer. Esto es particularmente cierto cuando se trata del tratamiento de la ALL, ya que los pacientes estarán expuestos a estos medicamentos durante 2 a 3 años durante la fase de mantenimiento. Cualquier forma de evaluar para qué pacientes la toxicidad puede ser una mayor preocupación podría ayudar a planificar las dosis de manera adecuada para minimizar esos efectos tóxicos. Es así, que la toxicidad de los agentes quimioterapéuticos puede variar en respuesta a alteraciones en el genoma del paciente. El 6-MP y el MTX han sido bien estudiados y las variaciones en sus toxicidades se han asociado con una serie de variaciones genómicas (Rudin et al., 2017).

2.3.4. Metabolismo de las Tiopurinas

Las Tiopurinas como mercaptopurina (MP) y tioguanina (TG), son fármacos linfocíticos que se utilizan en todas las fases de la terapia para la leucemia linfoblástica aguda (LLA), siendo la MP parte de la terapia de mantenimiento principal (Adamson et al., 1994). La terapia de mantenimiento (MT) con MTX y 6-MP es esencial para la cura de la leucemia linfoblástica aguda (Toksvang et al., 2022).

Como antifolato, el MTX ejerce su citotoxicidad al agotar los folatos reducidos e inhibir directamente los pasos distales en la síntesis de nucleótidos, bloqueando así la síntesis de timidina y purina de novo (DNPS), que es fundamental para la supervivencia de las células madre leucémicas (Chabner et al., 1985; Schmiegelow et al., 2014). El MTX es un profármaco poliglutamado intracelularmente por la folilpoliglutamil sintetasa (FPGS), con hasta siete residuos de ácido glutámico ligados a gamma. Las cadenas de glutamato más largas facilitan la retención intracelular del fármaco, así como una mayor afinidad por las enzimas diana en el metabolismo del folato, como la dihidrofolato reductasa (DHFR) (Chabner et al., 1985).

El 6-MP se metaboliza a través de tres vías competitivas: conversión a ácido tiourico por LA xantina oxidasa (XO), metilación a metil-mercaptopurina (MeMP) por *TPMT* y conversión a 6-tioguanina (TGN). Este proceso de varios pasos implica la conversión a monofosfato de tioinosina (TIMP) por hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT) seguida de la conversión a guanina monofosfato (TGMP) por inosina monofosfato deshidrogenasa. (IMPDH) y guanosina monofosfato sintetasa (GMPS). Posteriormente, las desoxinucleósido quinasas y la reductasa generan tioguanina nucleótido difosfato (TGDP) y luego 6-tioguanina trifosfato (TGTP), que se incorpora al ADN (como ADN-TG) en competencia con la guanina natural. Este proceso es contrarrestado por *NUDT15*, que desfosforila los TGN. Por el contrario, la HGPRT convierte directamente la 6-tioguanina (6-TG) en TGMP. Muchos de los metabolitos de tiopurina intermediarios son sustratos de *TPMT*, creando metabolitos inactivos (MeMP, MeTG y MeTGMP), aunque MeTIMP es un potente inhibidor de la síntesis de purina de novo (Figura 1). Mutaciones en *NT5C2*, *MSH6* y *PRPS1* provocan mecanismos de resistencia a la tiopurina que dan lugar a una recaída leucémica temprana (Toksvang et al., 2022).

La farmacocinética del 6-MP oral se caracteriza por una baja biodisponibilidad, en promedio menos del 20%, debido al metabolismo de primer paso por la xantina oxidasa en la mucosa intestinal y el hígado (Zimm et al., 1983). Como profármaco, el 6-MP sufre un extenso metabolismo intracelular por enzimas en las vías de biosíntesis de purina de novo y de rescate, formando finalmente nucleótidos de 6 TGN (Karran & Attard, 2008; Schmiegelow et al., 2014). La toxicidad del MTX a dosis bajas se manifiesta principalmente como mielosupresión y hepatotoxicidad moderadas, mientras que las dosis altas de MTX (HD-MTX), es decir, la infusión intravenosa de 24 h de 5g/m² con rescate posterior de leucovorina, se asocia con insuficiencia renal aguda grave, neuro y hepatotoxicidad (Schmiegelow, 2009).

Los polimorfismos genéticos afectan la competencia entre las vías metabólicas de activación e inactivación, lo que contribuye a la variabilidad entre pacientes en la eficacia y toxicidad de los fármacos de tiopurina, y estos polimorfismos pueden usarse para personalizar el tratamiento. El ejemplo más antiguo del uso de la farmacogenómica en la LLA y el más utilizado clínicamente es el genotipado de *TPMT*. Este gen es altamente polimórfico, habiéndose identificado una multitud de variantes. Las personas que portan dos alelos de *TPMT* con pérdida de función (individuos homocigotos o heterocigotos compuestos con deficiencia de *TPMT*) tienen un riesgo muy alto de mielosupresión potencialmente mortal, si la dosis de 6-MP no se reduce adecuadamente (Relling et al., 2019).

El genotipo y la actividad de *NUDT15* ahora se caracterizan de manera integral, con ensayos de genotipado masivos en paralelo que identifican casi el 92% de todas las posibles variantes sin sentido en *NUDT15*. Estas clasificaciones de variantes basadas en funciones predicen con precisión los alelos de riesgo para la toxicidad de las tiopurinas, lo que mejora enormemente nuestra capacidad para implementar la terapia con tiopurinas guiada por el genotipo (Suiter et al., 2020). Similar a *TPMT*, la prueba *NUDT15* ahora se incorpora en las pautas clínicas para el ajuste de la dosis de tiopurina (Relling et al., 2019), aunque la evidencia que respalda una recomendación de dosis inicial diferente para

pacientes que son metabolizadores intermedios tanto para *TPMT* como para *NUDT15* sigue siendo limitada (J. J. Yang et al., 2015).

2.3.5. Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)

En la década de 1980, se detectaron polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) utilizando enzimas de restricción para identificar la presencia o ausencia de sitios de corte y se puntuaron observando la variación resultante en la longitud del fragmento (Botstein et al., 1980). En la década de 1990, el SNP fue reemplazado en gran parte por la repetición en tándem simple (STR) como el marcador de elección para los estudios de vinculación. Los STR (repeticiones de di-, tri- o tetranucleótidos) muestran altos niveles de variación alélica en el número de unidades repetidas, se distribuyen amplia y uniformemente en todo el genoma humano y pueden tipificarse mediante la PCR. La combinación de un conjunto de marcadores altamente polimórficos y la tecnología de tipificación rápida llevó al desarrollo de sistemas semiautomáticos de alto rendimiento para la genotipificación de STR durante la década de 1990 (Livak et al., 1995).

A finales de la década de 1990 se produjo una reversión del uso de STR a SNP, que recuperó el favor de los genetistas moleculares. Tras la finalización del Proyecto Genoma Humano en 2001, ha habido un aumento adicional en el número de estudios, así como el interés en los SNP. La principal fuerza impulsora detrás del retorno a los SNP fue un cambio en el tipo de estudios genéticos realizados por los distintos grupos de investigación. Los STR son ideales para estudios de ligamiento que involucran análisis de pedigrí para identificar genes únicos responsables de trastornos monogénicos. Sin embargo, más recientemente, la necesidad de estudiar enfermedades con vías de herencia más complejas, pero con una mayor prevalencia y, por lo tanto, una mayor carga social, como la osteoporosis, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares e

inflamatorias, los trastornos psiquiátricos y la mayoría de los cánceres, ha llevado a un nuevo enfoque en los SNP (Alwi, 2005).

La forma más simple de variación del ADN entre individuos es la sustitución de un solo nucleótido por otro. Este tipo de cambio se llama SNP (Figura 2). Se estima que los SNP ocurren con una frecuencia de 1 en 1000 pb en todo el genoma. Estos simples cambios pueden ser de tipo transición o transversión.

A través del progreso de la investigación relacionada con la genómica humana, se ha identificado un gran número de SNP en la codificación de genes (Sobrinho et al., 2005). Se ha propuesto que los SNP de regiones codificantes (cSNP) tienen el potencial de ser aplicados en la identificación del origen de fluidos o tejidos corporales, ya que pueden establecer una asociación única entre un perfil de ADN específico y un tipo de fluido corporal específico (Wang et al., 2019).

Según un informe (Halushka et al., 1999), aproximadamente el 50% de los SNP se encuentran en las regiones no codificantes, el 25% conduce a mutaciones sin sentido (SNP codificantes o cSNP) y el 25% restante son mutaciones silenciosas (no cambian los aminoácidos codificados). Estos SNP silenciosos se denominan SNP sinónimos, y lo más probable es que no estén sujetos a la selección natural. Por otro lado, los SNP no sinónimos (nSNP, aminoácidos codificados por cambios) pueden producir patología y pueden estar sujetos a selección natural. Los SNP (sinónimos y no sinónimos) influyen en la actividad del promotor y en la conformación (o estabilidad) del pre-ARNm. También alteran la capacidad de una proteína para unirse a su sustrato o inhibidores (Kimchi-Sarfaty et al., 2007) y cambiar la localización subcelular de proteínas. Por lo tanto, pueden ser responsables de la susceptibilidad a enfermedades, el depósito de fármacos y la evolución del genoma. Aunque varios de ellos afectan las funciones de los genes, muchos de ellos no son perjudiciales para los organismos y deben haber escapado a la presión de selección (Shastri, 2007).

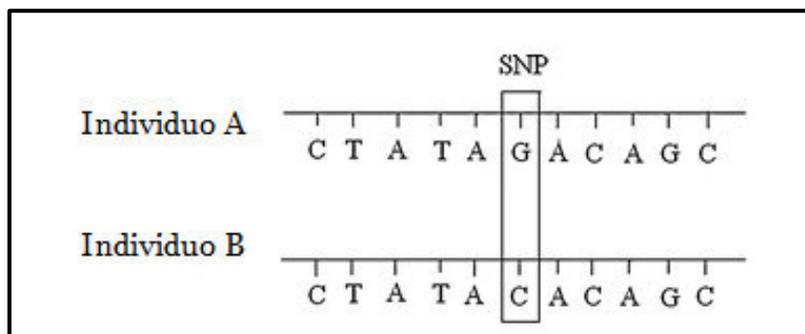


Figura 2. Representación esquemática del SNP.

Fuente: Adaptado de Shastry, 2007

2.3.6. *TPMT*

2.3.6.1. Estructura del gen

El gen *TPMT* ubicado en el cromosoma 6 (6p22.3) tiene una longitud de 34 kb y consta de 10 exones (Figura 3), ocho de los cuales codifican la proteína tiopurina metiltransferasa (28 kDa) (Fong et al., 2017). La tiopurina S-metiltransferasa es una enzima citosólica que cataliza la S-metilación de compuestos de sulfhidrilo aromáticos o heterocíclicos, especialmente sustancias exógenas como 6-MP. El gen *TPMT* exhibe un polimorfismo genético codominante autosómico, que puede conducir a una ausencia o un bajo nivel de actividad *TPMT* en individuos heterocigotos u homocigotos (Hon et al., 1999).

El fenotipo de actividad *TPMT* se hereda en el modo co-dominante autosómico; así, los individuos deficientes son homocigotos o heterocigotos para uno o dos alelos no funcionales del gen *TPMT*, mientras que los individuos intermedios son heterocigotos, es decir portadores de un alelo funcional y un alelo

no funcional del gen. Los pacientes con actividad *TPMT* intermedia tienen una alta probabilidad de reportar eventos adversos si son tratados con dosis estándar de tiopurinas. Por el contrario, estos mismos pacientes pueden no tener efectos secundarios importantes cuando la dosis se ajusta correctamente (Tamm et al., 2008).

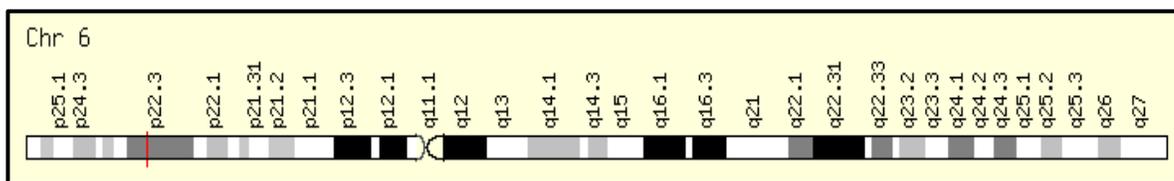


Figura 3. Estructura del gen *TPMT*.

Fuente: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TPMT>

2.3.6.2. Variantes alélicas

La presencia de polimorfismos de *TPMT* debe ser considerada y especialmente no pasada por alto en el tratamiento con fármacos basados en tiopurinas, ya que pueden afectar la tolerancia y eficacia de los fármacos. De hecho, la actividad de *TPMT* en humanos es extremadamente variable de un individuo a otro y divide a la población en tres categorías: Un grupo mayoritario de sujetos para quienes la actividad de *TPMT* es alta (o normal), un grupo de individuos para quienes la actividad se dice que es intermedio, y un pequeño grupo de sujetos para quienes la actividad *TPMT* es indetectable (Kham et al., 2009; McLeod & Siva, 2002).

El análisis de la secuencia del gen *TPMT*, realizado en poblaciones de diversos orígenes étnicos, ha confirmado el origen genético del polimorfismo de actividad *TPMT* y aclarado sus mecanismos moleculares (Krynetski et al., 1996), e identificado más de cuarenta variantes alélicas del gen *TPMT* (Lu et al., 2017).

El genotipo *TPMT**1/*TPMT**1 de tipo salvaje es consistente con la actividad enzimática *TPMT* normal. Es menos probable que las dosis estándar de medicamentos con tiopurina sean tóxicas en personas con este genotipo. Se mantiene que los heterocigotos con 1 alelo de tipo salvaje y 1 variante (como *TPMT**1/*2, *TPMT**1/*TPMT**1/*3A, *TPMT**1/*3B, *TPMT**1/*3C, los genotipos *TPMT**1/*8 y *TPMT**1/*16) tienen una actividad *TPMT* intermedia, tienen un mayor riesgo de toxicidad hematológica y pueden requerir una dosis más baja. Los alelos estrella descritos están referenciados en la base de datos del comité de nomenclatura de *TPMT* (<https://liu.se/en/research/tpmt-nomenclature-committee>) que enumera las variantes de *TPMT*. El Consorcio de Variación Farmacogénica (PharmVar) continúa actualizando nuevos alelos para proporcionar a las comunidades clínicas y de investigación un repositorio y una nomenclatura estandarizada de variación de farmacogén. (Harmand & Solassol, 2020).

Se predice que los pacientes que carecen del alelo de tipo salvaje tendrán una actividad enzimática baja o indetectable y corren un alto riesgo de toxicidad hematológica potencialmente mortal si se les administran dosis completas de medicación con tiopurina. Se debe considerar una terapia alternativa o una dosis reducida para estos pacientes (Harmand & Solassol, 2020).

Cabe señalar que los alelos *TPMT**3B, *TPMT**3C, *TPMT** 8 y *TPMT**16 llevan cada uno una variante que es específica para ellos. Sin embargo, algunos alelos tienen dos variantes, como el alelo *TPMT** A, que contiene los polimorfismos que se encuentran en los alelos *TPMT**3B y *TPMT**3C (Harmand & Solassol, 2020).

*TPMT**2,*3A y *3C representan más del 90% de los alelos inactivos (Appell et al., 2013). Entre los más comunes se encuentra el alelo *TPMT**2, que en comparación con la secuencia de tipo salvaje del gen (*TPMT**1), lleva una mutación missense en el exón 5 (c.238G > C, p.Ala80Pro). Esta variación de secuencia altera la estructura terciaria de la proteína, lo que altera la estabilidad de la enzima y conduce a su rápida degradación por proteólisis (Tai et al., 1997). El alelo *TPMT**3A alberga dos variantes sin sentido en Cis que se encuentran en los alelos *TPMT**3B (c.460G > A, p.Ala154Thr) y *TPMT**3C (c.719A > G, p.Tyr240Cys), ubicados en los exones 7 y 10, respectivamente.

Estas tres mutaciones, c.238G > C,p.Ala80Pro, c.460G > A,p.Ala154Thr y c.719A > G,p.Tyr240Cys, están en el origen de los alelos no funcionales de *TPMT* que se encuentran con mayor frecuencia, independientemente del origen étnico de los individuos, con una frecuencia creciente c.238G > C, c.460G > A, c.719A > G (Loennechen et al., 2001) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Polimorfismos del gen *TPMT* con sus alteraciones nucleotídicas

EXÓN 5:		
Variante	nucleótido	Proteína
<i>TPMT</i> *2	c.238G>C	p.Ala80Pro
<i>TPMT</i> *3D	c.292G>T	p.Glu98*
<i>TPMT</i> *9	c.356A>C	p.Lys119Thr
<i>TPMT</i> *19	c.365A>C	p.Lys122Thr
<i>TPMT</i> *34	c.319T>G	p.Tyr107Asp
<i>TPMT</i> *28	c.349G>C	p.Gly117Arg
<i>TPMT</i> *32	c.340G>A	p.Glu114Lys
EXÓN 7:		
Variante	nucleótido	Proteína
<i>TPMT</i> *10	c.430G>C	p.Gly144Gln
<i>TPMT</i> *3A	c.460G>A	p.Ala154Arg
<i>TPMT</i> *3B	c.460G>A	p.Ala154Arg
<i>TPMT</i> *22	c.474T>C	p.Ile158Ile
<i>TPMT</i> *16	c.488G>A	p.Arg163His
<i>TPMT</i> *22	c.488G>C	p.Arg158Pro
<i>TPMT</i> *33	c.487C>T	p.Arg158Cys
EXÓN 10:		
Variante	nucleótido	Proteína
<i>TPMT</i> *8	c.644G>A	p.Arg215His
<i>TPMT</i> *7	c.681T>G	p.His227Gln
<i>TPMT</i> *20	c.712A>G	p.Lys238Glu
<i>TPMT</i> *3A	c.719A>G	p.Tyr240Cys
<i>TPMT</i> *3C	c.719A>G	p.tyr240Cys
<i>TPMT</i> *41	c.719A>C	p.Tyr240Ser
<i>TPMT</i> *25	c.634T>C	p.Cys212Ser
<i>TPMT</i> *37	c.648T>A	p.Cys216*
<i>TPMT</i> *40	c.677G>A	p.Arg226Gln

Fuente: Adaptado de Harmand & Solassol, 2020

2.3.7. *NUDT15*

2.3.7.1. Estructura del gen

El gen nudix hidrolasa 15 (*NUDT15*, también conocido como *MTH2*), tiene una longitud de ~10 kb y está ubicado en el cromosoma 13 (13q14.2) (S.-K. Yang et al., 2014). El gen *NUDT15* consta de 3 exones y pertenece a la familia de hidrolasas NUDIX, que tiene la caja NUDIX altamente conservada e hidroliza el difosfato de nucleósido similar a cualquier resto a monofosfato de nucleósido (Figura 4) (Singh et al., 2017). A diferencia de otras proteínas de la familia NUDIX, la proteína *NUDT15* forma un homodímero (Carter et al., 2015).

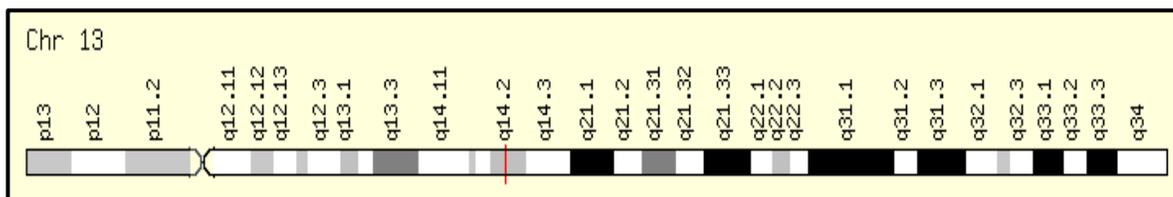


Figura 4. Estructura del gen *NUDT15*

Fuente: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=nudt15>

2.3.7.2. Variantes alélicas del *NUDT15*

A través de estudios agnósticos de asociación del genoma completo, se han identificado variantes en *NUDT15* que influyen fuertemente en la tolerancia a la tiopurina en pacientes con LLA (J. J. Yang et al., 2015).

El SNP (rs 116855232; c.415C>T) que causa p.R139C fue la primera variante *NUDT15* ligada a la toxicidad de las tiopurinas. Se demostró que este cambio de aminoácido da como resultado una pérdida casi completa de la actividad enzimática y la estabilidad de la proteína *in vitro*. Los pacientes portadores de este alelo mostraron un exceso de ADN-TG y mielosupresión grave (Moriyama et al., 2016). En niños con LLA, los pacientes homocigotos para la variante del alelo p.R139C toleraron solo el 8% de la dosis estándar de mercaptopurina, mientras que la intensidad de la dosis tolerada fue del 63% y el 83,5% para los heterocigotos y los de tipo salvaje para este SNP, respectivamente (J. J. Yang et al., 2015). La variante p.R139C se ha estudiado más extensamente en pacientes que reciben terapia con tiopurinas, por lo que proporciona la evidencia más sólida para la implementación clínica (Relling et al., 2019) .

Se han informado varias variantes de *NUDT15* asociadas con una disminución de la actividad de la difosfatasa, y se han asignado números de alelo estrella a los haplotipos con diferentes combinaciones de variantes (Figura 5).

Los que tienen una sola variante de codificación, son *NUDT15**3 (rs116855232, c.415C>T), *NUDT15**5 (rs18636481, c.52G>A), *NUDT15**6 (rs869320766, c.36_37insGGAGTC) y *NUDT15**7 (rs766023281, c.101G>C) y la que tiene dos variantes de combinación es *NUDT15**2, la cual transporta c.415C>T y c.36_37insGGAGTC, que también están presentes en *NUDT15**3 y *NUDT15**6, respectivamente (Yu et al., 2020). Numerosos estudios han establecido que las variantes del *NUDT15* están asociadas con la intolerancia a la mercaptopurina en la LLA pediátrica en diferentes poblaciones, lo que destaca la importancia de la tipificación genética preventiva en estos pacientes (Buaboonnam et al., 2019; Choi et al., 2019; Khera et al., 2019; Schaeffeler et al., 2019).

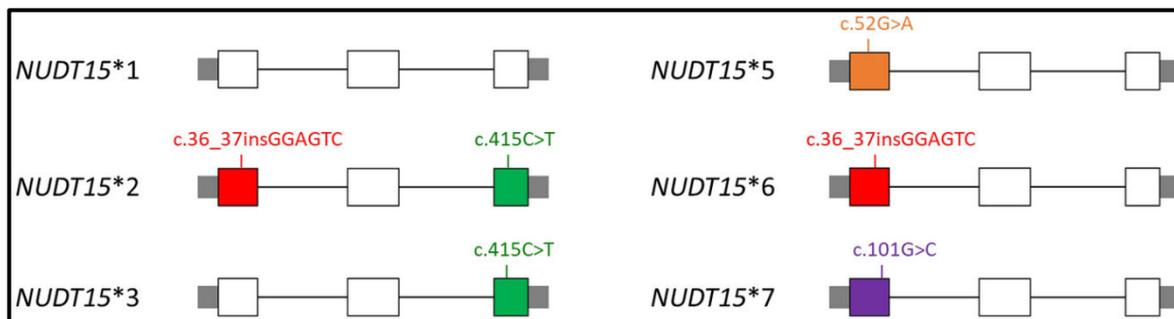


Figura 5. Polimorfismos del gen *NUDT15*

Fuente: Adaptado de Yu et al., 2020

2.3.8. Secuenciamiento de Nueva Generación (NGS)

El NGS es una nueva tecnología utilizada para la secuenciación de ácidos nucleicos (ADN y ARN), cuya finalidad generalmente es poder determinar variantes o mutaciones en el genoma. La ventaja del NGS es que se puede secuenciar miles de genes o hasta el genoma completo en un tiempo determinado. Las variantes o mutaciones de las secuencias detectadas por NGS se han utilizado ampliamente para el diagnóstico de enfermedades, el pronóstico, la decisión terapéutica y el seguimiento de los pacientes. La capacidad de su secuenciación paralela masiva ofrece nuevas oportunidades para la medicina de precisión personalizada (Margulies et al., 2005; Schuster, 2008).

Es así, que mediante el uso del NGS y utilizando las herramientas bioinformáticas, se podría identificar variantes que estén relacionados a significancia clínica, y poder clasificarla como una enfermedad de origen genético. De la misma manera, se podrá analizar si la variabilidad genómica de cada persona y cómo evoluciona a la respuesta al diagnóstico, tratamiento y estrategias de prevención (Hintzsche et al., 2016).

En estos tiempos, en el avance de las eras ómica (genómica, transcriptómica, proteómica, etc); el NGS es de gran ayuda, y una de las compañías que ha tenido gran relevancia a nivel nacional e internacional es la que es proveída por la empresa Illumina. Esta compañía contiene una amplia variedad de plataformas de secuenciación por síntesis que permiten obtener desde 4 millones de secuencias en los equipos iSeq 100 System, hasta 20.000 millones de secuencias de los equipos NovaSeq 6000 System (<https://www.illumina.com/>).

La secuenciación de síntesis por Illumina, se divide en cuatro etapas:

2.3.8.1. Preparación de Librerías

Para la preparación de librerías o bibliotecas, se preparan los fragmentos que van a ser secuenciados, esto implica la fragmentación del ADN por método enzimático. Luego estos fragmentos son seguidos de adaptadores (linkers) 5' y 3', y a su vez el marcaje combina reacciones de fragmentación y unión en un solo paso que aumenta la eficiencia del proceso de preparación de la librería. Luego, los fragmentos unidos con los adaptadores son amplificados y purificados (Clark et al., 2019).

2.3.8.2. Generación de clúster

El siguiente paso de NGS es separar o dividir la biblioteca de fragmentos de ADN genómico en ubicaciones discretas en una superficie sólida. Las plataformas de secuenciación de Illumina utiliza un flow cell (celda de flujo), que hay canales que en realidad son cámaras de microfluidos que permiten que fluyan diferentes reactivos líquidos a una velocidad definida. Además, cada una de las cámaras de microfluidos tiene una superficie inferior que está recubierta con oligonucleótidos que son complementarios a los extremos del adaptador. Para dividir la biblioteca NGS, los fragmentos preparados se inyectan en la celda de flujo y la temperatura se ajusta para que los adaptadores de ADN genómico puedan aparearse con sus oligonucleótidos complementarios en la celda de flujo. Después de que cada uno de los fragmentos de ADN genómico se adhiera a la

celda de flujo, el siguiente paso es crear un grupo mediante PCR. Este paso es esencial para la secuenciación. La generación de grupos se logra con PCR, y los cebadores de PCR son los oligonucleótidos conectados a la celda de flujo. La amplificación por PCR se produce cuando el fragmento de ADN genómico se dobla, de modo que ambos adaptadores se aparean con la superficie a través de los oligonucleótidos. La estructura se asemeja a un puente, por lo que este tipo de PCR se ha denominado amplificación en puente (Figura 6). Los ciclos continuos de temperaturas de desnaturalización, hibridación y extensión y elongación convierten la copia única de ADN genómico dentro del nanopozo o la posición en el flow cell plana en un grupo de copias idénticas. Cada grupo representa un pequeño segmento de todo el genoma y, por lo tanto, cada grupo solo proporciona una pequeña cantidad de información de secuencia de ADN. Pero hay decenas de millones de grupos en una sola celda de flujo, y cada uno proporciona una parte del código para todo el genoma (Clark et al., 2019).

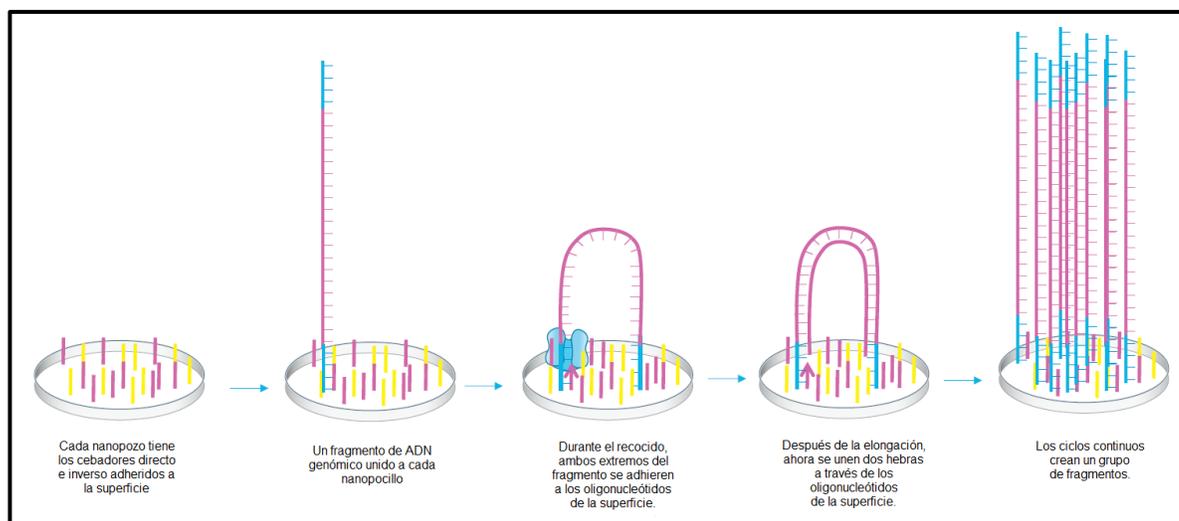


Figura 6. Amplificación en puente según el método de Illumina.

Fuente. Adaptado de Clark et al., 2019

2.3.8.3. Secuenciamiento por síntesis (SBS)

Es una tecnología de secuenciación que utiliza la química de secuenciamiento por síntesis, la cual es ampliamente adoptado por todo el mundo. El principio inicial es que se van secuenciando las cadenas molde de ADN por ciclos repetidos y luego se va agregando las bases de forma individual. Después utilizando cuatro terminadores reversibles marcados con un fluoróforo distinto, de modo que detecta cada base cuando son añadidas a las cadenas moldes de ADN. Al agregarse los nucleótidos simultáneamente y no secuencialmente, se va produciendo una competencia natural por lo que se minimizan los errores de incorporación. Como las bases individuales se añaden a todos los moldes de una manera uniforme, el proceso de secuenciación origina unas secuencias de ADN de longitud uniforme. El resultado es una secuenciación base a base muy precisa que elimina virtualmente los errores específicos de la secuencia, permitiendo asignaciones de bases fuertes entre el genoma, incluyendo regiones de secuencias repetidas y homopolímeros. De esta forma, se consiguen secuenciar los millones de clusters de la superficie de la célula al mismo tiempo (Clark et al., 2019).

Después de cada ciclo de incorporación, se eliminan los terminadores y se determina la identidad de la base insertada por la excitación inducida por láser de los fluoróforos y la consiguiente formación de imágenes que se registran (Figura 7). La asignación de bases está hecha directamente de las medidas de intensidad de señal durante cada ciclo, lo cual reduce las tasas de error comparado con otras tecnologías (Vázquez Escribano & Vázquez Escribano, 2016).

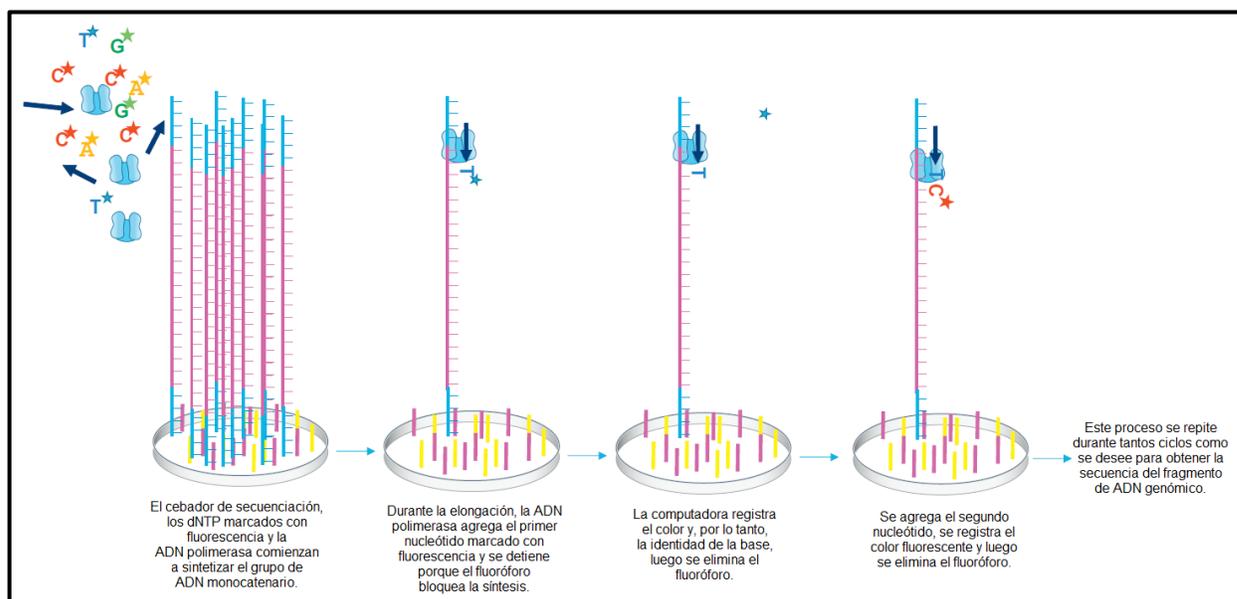


Figura 7. Secuenciación por Síntesis.

Fuente: *Adaptado de Yu et al., 2020*

2.3.8.4. Análisis de Datos NGS

El primer paso para analizar los datos obtenidos de la secuenciación por reacciones de síntesis es combinar las diferentes lecturas de cada grupo. Dos de las cuatro lecturas decodificaron la secuencia de índice en ambos adaptadores. Si el Flow cell se carga simplemente con una muestra de ADN genómico, la información del índice del adaptador o de las secuencias de códigos de barras es menos importante. El índice o los códigos de barras son más importantes cuando las muestras se multiplexan o cuando se mezclan más de una secuencia de ADN genómico. Luego, las lecturas del adaptador se utilizan para clasificar cada grupo en las diferentes muestras. Las lecturas del ADN genómico se pueden alinear en información de secuencia continua ya sea por comparación

con un genoma secuenciado previamente o comparando una lectura con otra en busca de secuencias superpuestas. El primer método es el método más común, ya que muchos organismos ya han decodificado sus genomas. En el caso del genoma humano, el genoma de referencia está disponible para que lo vea cualquiera en el sitio web del Genome Reference Consortium (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc>). Cada una de las lecturas se alinea individualmente con la referencia que se almacena como un archivo de mapeo de alineación binaria (BAM). Los paquetes de software especiales usan el archivo BAM para ver si alguna de las lecturas tiene diferencias con el genoma de referencia, llamado variante. La parte más importante es determinar el significado biológico de la variante, lo que se puede hacer con una combinación de experimentos y la extracción de otras bases de datos para obtener los resultados de otros investigadores.

Por el contrario, la secuenciación de novo o la secuenciación de ADN de una especie que no tiene un genoma de referencia utiliza la alineación de secuencias superpuestas para ordenar las lecturas. Los algoritmos informáticos buscan secuencias coincidentes entre los millones de lecturas, alineando las lecturas en una secuencia lo más larga posible. El objetivo de las alineaciones de secuenciación es juntar tantas lecturas en una longitud contigua de información de secuencia, denominada contig. La longitud del contig es otro parámetro importante de NGS, y el objetivo de cualquier análisis de secuencia es tener un contig para cada cromosoma, aunque en realidad, las regiones repetitivas a menudo lo hacen imposible. Muchas lecturas pueden tener discrepancias menores entre sí, por lo que después de la alineación, la computadora generalmente elige la base que es más común en cada posición para crear la secuencia de consenso. Hay muchas variantes de los análisis posibles como el SNP, la identificación de inserciones o deleciones, los recuentos de lecturas para los métodos RNA, los análisis filogenéticos o metagenómicos, y más. El software es capaz de recoger los datos, procesarlos y analizarlos para que haya una mínima intervención del usuario. Estos métodos de NGS permiten una amplia

variedad de técnicas, resolviendo cualquier pregunta relacionada con el genoma, transcriptoma, o epigenoma de cualquier organismo. (Clark et al., 2019).

2.3.9. Equilibrio de Hardy-Weinberg

La ley de Hardy-Weinberg establece que si se cumplen las condiciones de equilibrio de la población (emparejamiento aleatorio y mutación, migración, estratificación, deriva genética y selecciones insignificantes), las frecuencias de genotipo deben ajustarse a una distribución binomial predecible calculable a partir de las frecuencias de alelos (Sen & Burmeister, 2008).

CAPITULO 3: METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de Investigación

Observacional, descriptivo, de corte transversal y prospectivo.

3.2. Unidad de análisis

Pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda referidos al servicio de Genética del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja, durante el periodo 2020.

3.3. Población de estudio

Pacientes del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja.

3.4. Tamaño de muestra

Considerando la prevalencia más baja del polimorfismo del gen *NUDT15*, el cual es del 21% (asociados con una actividad intermedia o disminuida de la enzima), un margen de error del 5% y un nivel de confianza del 95%, se ha estimado un tamaño de muestra equivalente a 255 individuos (tamaño de la muestra). Para calcular el tamaño de muestra corregida (n_f), considero un tamaño de la

población fuente de 1000 individuos (N). Por lo que el nf equivale a 203 individuos. Sin embargo, anualmente se atienden aproximadamente entre 80 a 100 pacientes con diagnóstico de LLA en el INSNSB, que cumplen con los criterios de inclusión. Debido a este hecho se tratará de reclutar a todos los pacientes que acudan al INSNSB durante el periodo de duración del estudio. El tamaño muestra estará representado por 80 pacientes pediátricos.

Criterios de Inclusión:

- Pacientes de ambos sexos menores de 18 años.
- Pacientes con diagnóstico LLA, y cuya información clínica de laboratorio o genética-molecular sea completa.
- Pacientes que cuenten con autorización suscrita en el consentimiento informado del padre o apoderado para su ingreso al estudio; o puedan haber firmado el asentimiento informado por parte del niño.

Criterios de exclusión:

- Pacientes de sexo femenino o masculino mayores de 18 años.
- Pacientes que use alguna tiopurinas, pero no tenga LLA.
- Pacientes con enfermedad hematológica diferente a LLA.

3.5. Técnicas de recolección de Datos

3.5.1. Obtención de las muestras

A todos los participantes pediátricos de este estudio, se les tomó aproximadamente 3mL de sangre periférica, la cual fue colocada en vacutainers que contenían EDTA como anticoagulante.

Esta tesis forma parte de un proyecto de investigación ganador de un Fondo Concursable del año 2019 (PI-364-2019), del INSNSB y cuenta con el aval del Comité de Ética (Anexo 1), con un presupuesto de S/. 200, 310.00 (Anexo 2).

La toma de muestra se realizó previa firma del consentimiento (Anexo 3) y/o asentimiento informado (Anexo 4) del paciente y apoderado. Cada muestra fue identificada por un código único, garantizándose la confidencialidad de los datos de acuerdo con los requerimientos.

3.5.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con el kit Monarch® Genomic DNA Purification de New England Biolabs y se siguió las especificaciones del catálogo NEB # T3010.

Este procedimiento constó de dos etapas:

Lisis de la muestra

Para la lisis celular y degradación de la fracción proteica para una muestra; se tomó 100 μL de sangre total en un tubo de microcentrífuga y se añadió 100 μL de tampón de lisis, 10 μL de Proteinasa K y 3 μL de ARNasa A. Inmediatamente se mezcló con la ayuda del vórtex e incubó por 5 minutos a 70 °C en un mezclador térmico con agitación a máxima velocidad (~ 1400 rpm).

Unión y elución de ADN genómico

Se agregó 400 μL de tampón de unión a la mezcla del lisado. Luego se transfirió la mezcla lisada/tampón de unión (~ 600 μL) a una columna de purificación del ADN genómico (ADNg) preinsertada en un tubo de recolección. Luego se centrifugó durante 3 minutos a $100 \times g$, para la unión del ADNg e inmediatamente se centrifugó por 1 minuto a velocidad máxima ($> 12,000 \times g$) para limpiar la membrana. Se descartó el tubo de recolección y el fluido que se encontraba ahí. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de recolección y se agregó 500 μL de tampón de lavado de ADNg. Se centrifugó inmediatamente durante 1 minuto a velocidad máxima ($12.000 \times g$) y se desechó el fluido. Se volvió a insertar la columna en el tubo de recolección. Se añadió 500 μL de tampón de lavado y se centrifugó 1 minuto a velocidad máxima ($12.000 \times g$), se desechó el fluido y el tubo de recolección. Se colocó la columna de purificación de ADNg en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, debidamente rotulado con el código correspondiente. Luego se añadió entre 35 a 50 μL de tampón de elución de ADNg precalentado (60°C), durante 1 minuto. Se centrifugó por 1 minuto a velocidad máxima ($> 12,000 \times g$) para eluir el ADNg.

3.5.3. Cuantificación del ADN

Para la cuantificación del ADN, se utilizó el kit de ensayo Qubit dsDNA HS (alta sensibilidad) de Life Technologies (Q32851) en un fluorómetro Qubit (v2. Invitrogen by Life Technologies).

Para la cuantificación de ADN se realiza basado en fluorescencia, como el Qubit dsDNA HS. Los de fluorescencia emplean un fluoróforo específico para el ADN de doble cadena (dsDNA) y cuantifican de manera específica y precisa el dsDNA, incluso cuando hay muchos contaminantes comunes presentes. Por el contrario, los métodos del espectrómetro UV basados en lecturas de 260 OD pueden sobrestimar las concentraciones de ADN. La sobreestimación se debe a la presencia de ARN y otros contaminantes comunes a las preparaciones de ADN.

Las cuantificaciones se realizaron en tubos de cuantificación, la cuales contienen una solución de trabajo, compuesta por un Buffer y el fluorocromo (en concentración 200X con DMSO) del Qubit dsDNA HS, en una proporción de 199 μL : 1 μL respectivamente por cada tubo de trabajo. Para las calibraciones del fluorómetro, se realizó con dos estándares denominados estándar #1 (0 ng/ μL en buffer TE) y estándar #2 (10 ng/ μL en Buffer TE), los cuales se encuentran en el kit de cuantificación. Para cada estándar se coloca 190 μL de solución de trabajo y 10 μL del estándar #1 y 10 μL del estándar #2. Luego se realizó las lecturas para cada tubo debidamente rotulado. Se comenzó con los estándares #1 y #2 para la calibración del sistema Qubit y se siguió con la lectura de los tubos por muestra. Para cada ronda de lectura de muestras, la cual oscilaba entre 5 a 10 muestras, se estandarizaba el sistema del Qubit. Para la cuantificación de cada tubo de muestra se preparó utilizando 199 μL de Solución de trabajo añadiendo 1 μL de muestra de ADN y se procedió con la lectura en el fluorómetro. En total se cuantificó las 80 muestras, obteniendo la cuantificación en ng/ μL .

3.5.4. Integridad del ADN

Para observar la calidad o integridad del ADN de las 80 muestras en estudio, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE (Tris base, ácido acético glacial y EDTA) a una concentración de 1X. La solución de agarosa se preparó en buffer de TAE 1X, donde se calentó en un microondas cuidadosamente. La agarosa en estado líquido se vertió en una cubeta nivelada y luego se colocó los peines que generan los pocillos respectivos donde irán las muestras. Una vez gelificado durante 20 minutos aproximadamente, se retiró los peines, y el gel se colocó en la cámara electroforética que contiene Buffer TAE 1X. A continuación, se sembraron en cada pocillo 3 μ L de ADN con 2 μ L de buffer de tinción (Applied Biological Materials Inc., Richmond, BC, Canadá). La corrida fue realizada en 40 minutos a 100 voltios (V). Se visualizó en un documentador de geles con luz ultravioleta. Se seleccionaron 24 muestras para la fotografía (Figura 8). Se utilizó un marcador de peso molecular (M) de 50 pb. Los carriles del 1 al 24 representa la integridad del ADN de cada una de las muestras.

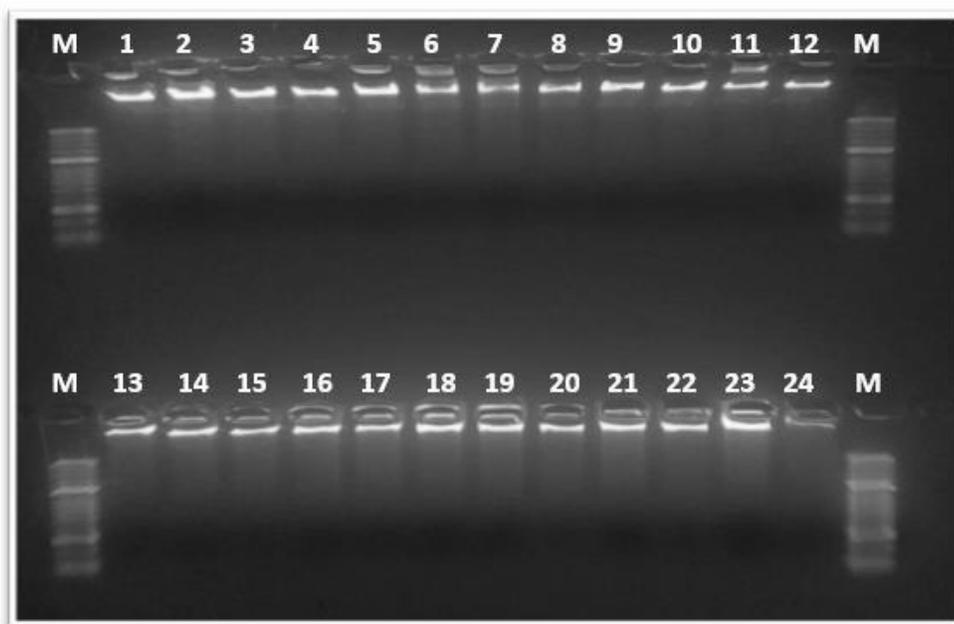


Figura 8. Integridad de ADN de 24 casos del INSNSB.

Fuente. Fotografía propia

3.5.5. Obtención de datos Demográficos y de Laboratorio

Se identificó al paciente por un código numérico para mantener la confidencialidad de la información. Se obtuvieron los datos demográficos (edad, sexo, procedencia y linaje de la LLA) y laboratoriales (recuentos leucocitarios, citogenética y panel LLA molecular) para la operacionalización de las variables del sistema informático Sis Galen Plus del INSNSB. (Cuadro 3).

Para los datos de laboratorio, se tuvo en cuenta los resultados cuantitativos y cualitativos que le realizaron al paciente con los síntomas asociados al *debut* de la probable leucemia infantil. Es así, que los valores representaron al inicio de la enfermedad.

Los datos fueron recolectados a través de la ficha de recolección de datos que se muestra en Anexo 5.

3.5.6. Genotipificación de los genes *TPMT* y *NUDT15*

Para el NGS en la determinación de los genotipos de los SNP para los genes *TPMT* y *NUDT15* se realizó en el Servicio de Genética del Instituto Nacional de Salud del Niño de San Borja, utilizando la tecnología de un iSeq™100 de Illumina®; siguiendo las recomendaciones descritas en la guía de referencia “AmpliSeq for Illumina On-Demand, Custom, and Community Panels” (Document # 1000000036408 v09- May 2020). Este sistema de secuenciación ofrece un método centrado en el NGS. Este sistema basado en aplicaciones incorpora la tecnología de secuenciación de Illumina.

Cuadro 3. Operacionalización de variables de la población en estudio.

Variable	Definición operacional	Tipo	Categorización
Edad	Días cumplidos desde la fecha de nacimiento.	Cuantitativa continua	menor a 18 años
Sexo	Condición orgánica de las personas.	Cualitativa nominal	Femenino Masculino
Procedencia	Lugar de origen y procedencia del paciente.	Cualitativa nominal	Lima Otros departamentos
Linaje de la LLA	Diagnóstico que motivo el manejo quimioterapéutico.	Cualitativa nominal	LLA tipo B LLA tipo T
Recuentos Leucocitarios o WBC	Conteo de glóbulos blancos (WBC) de la sangre en el cuerpo al debut.	Cuantitativa continua	Mayor de 0
Citogenética:	Identificación de las anomalías cromosómicas y Nomenclatura al debut.	Cualitativa nominal	Alteraciones Numéricas Alteraciones Estructurales
Panel LLA (Molecular):	Panel de genes frecuentes que se solicitan para la LLA al debut.	Cualitativa nominal	<i>BCR-ABL</i> <i>E2A-PBX1</i> <i>MLL-AF4</i> <i>TEL-AML1</i>
Polimorfismos del gen <i>TPMT</i>	Resultado de genotipificación de <i>TPMT</i> .	Cualitativa nominal	*1 *2 *3A *3B *3C otros
Polimorfismos del gen <i>NUDT15</i>	Resultado de genotipificación de <i>NUDT15</i> .	Cualitativa nominal	CC CT TT otros

Fuente. Elaboración propia.

3.5.7. Diseño del panel personalizado o customizado para los genes *TPMT* y *NUDT15*

Antes de realizar el proceso de secuenciamiento. Se diseñó un panel de ADN Ampliseq para Illumina personalizado para los genes *TPMT* y *NUDT15*. Para esto se entró a la página de Illumina (<https://www.illumina.com/>), y se creó una cuenta con el respectivo correo y contraseña. En la plataforma de Illumina, se entró a *aplicaciones* y luego a *diseñador de ensayos de secuencia*, el cual nos va permitir a comenzar un diseño de AmpliSeq para illumina a través de la personalización de paneles de amplicones customizados. Para nuestro trabajo de investigación el diseño es de ADN personalizado AmpliSeq.

En el diseño se utilizó CDS ONLY, ya para estos dos genes solo nos interesó analizar las secuencias codificantes, no las regiones UTR, las cuales entrarían si colocáramos la opción EXON ONLY.

La plataforma nos va a elaborar el número de amplicones de cada gen; para el *TPMT* fueron 11 amplicones; para el gen *NUDT15* fueron 6, como se muestra en la Figura 9 y 10.

Type	Name	Chr	Start	Stop	Amplicons	Total	Covered	Missed	Coverage
Gene	TPMT	chr6			11	1138	1138	0	100%
	TPMT	chr6	18130873	18131036	1	163	163	0	100%
	TPMT	chr6	18132338	18132433	1	95	95	0	100%
	TPMT	chr6	18134009	18134145	2	136	136	0	100%
	TPMT	chr6	18139168	18139293	1	125	125	0	100%
	TPMT	chr6	18139870	18139973	1	103	103	0	100%
	TPMT	chr6	18143801	18143984	2	183	183	0	100%
	TPMT	chr6	18148028	18148171	1	143	143	0	100%
	TPMT	chr6	18149193	18149383	2	190	190	0	100%

Figura 9. Amplicones totales del gen *TPMT*.

Fuente. Fotografía propia

Type	Name	Chr	Start	Stop	Amplicons	Total	Covered	Missed	Coverage
Gene	NUDT15	chr13			6	728	728	0	100%
	NUDT15	chr13	48611857	48612065	2	208	208	0	100%
	NUDT15	chr13	48615030	48615277	2	247	247	0	100%
	NUDT15	chr13	48615030	48615360	3	330	330	0	100%
	NUDT15	chr13	48619770	48619960	1	190	190	0	100%

Figura 10. Amplicones totales del gen NUDT15.

Fuente. Fotografía propia

Luego del diseño customizado, y la obtención de todos los insumos requeridos para el proceso de secuenciamiento. A continuación, se detalla la parte operacional del proceso, siguiendo las recomendaciones del fabricante:

Consideraciones previas:

Para el proceso del total de número de muestras de esta tesis (N=80); se realizó dos corridas de secuenciamiento. En la primera corrida se colocó en total 48 muestras, las cuales 47 fueron de los casos enrolados y 1 muestra fue utilizada como control interno. En la segunda corrida de NGS, de la misma forma se colocaron 47 muestras; las cuales contenían 33 casos enrolados para llegar al N, 14 muestras de verificación de la primera corrida y 1 muestra como control.

Sabemos que en un primer momento cuando cada muestra llega al Servicio de Genética, se extrae el ADN, se cuantifica el ADN y luego se guarda a -20°C para su posterior uso. Pero para el inicio del proceso operativo previo al secuenciamiento, se volvió a cuantificar las 48 muestras de ADN; con la finalidad de tener los valores más exactos para la siguiente etapa (Normalización). Con fines prácticos para la obtención de los volúmenes para la normalización de cada muestra se dejó o diluyó cada muestra de ADN entre 20 a 50 ng/uL

3.5.8. Procedimiento experimental

3.5.8.1. Cuantificación, Dilución y Normalización del ADN

Reactivos y materiales: Low TE, ADN, strip, tips de 10uL, tips de 200uL, micropipeta 2-10uL, micropipeta de 20-200uL, multicanal de 20 uL y tubos de 1.5mL.

Operacionalidad: El volumen de ADN diluido necesario depende del número de grupos de cebadores. Se cuantificó el ADN de cada muestra que se encuentra en los tubos de 1.5mL mediante el método fluorométrico en el Qubit (Según el punto 3.5.3). Cada muestra fue diluida en una concentración entre 20 a 50 ng/uL usando el Low TE. Para la normalización de cada muestra, los *inputs* (entrada) de cada ADN deben estar a 4ng/uL, el cual depende del número de pools utilizados; para nuestro trabajo se utilizó dos *pools*, por lo que según las recomendaciones del fabricante cada muestra debe entrar con 4ng/uL. La normalización (4ng/uL) se realizó en strip. Al haber 48 muestras, entonces se utilizó 6 strips de 8. Para cada tubo, se colocó 20 uL y se usó retiró y añadió el volumen teórico del ADN con la concentración inicial. Por ejemplo, para la muestra con código TN-001 (39.4 ng/uL), en el tubo que le corresponde, el cual contiene 20 uL de Low TE, se le quitó 2uL de Low TE y se añadió 2 uL de ADN. (Anexo 6).

3.5.8.2. Amplificación de las regiones objetivo (*target*) de ADN

Este paso se utiliza PCR para amplificar las regiones objetivo de la muestra de ADN. El procedimiento de amplificación del objetivo depende del número de *pools* de cebadores en el panel de ADN. Para nuestro trabajo, se utilizó dos *pools*, por lo que el proceso siguiente se realizó siguiendo esa cantidad de *pools*.

Reactivos y materiales: ADN normalizado (4ng/uL), panel ADN customizado 2X AmpliSeq (dos *pools*), 5X AmpliSeq HiFi Mix, Agua libre de nucleasas, film adhesivo transparente, Placa PCR de 96 pocillos, strip, tips de 10uL, tips de 20uL, micropipeta 2-10uL, micropipeta de 2-20 uL, multicanal de 20 uL y tubos de 1.5mL

Operacionalidad: Para cada muestra de las 48 se utilizó los siguientes reactivos y volúmenes para preparar el Mix de 12.5 uL (Cuadro 4).

Cuadro 4. Reactivos para el proceso de la Mix HiFi.

Reactivo	Volumen (uL)
5X AmpliSeq HiFi Mix	5
ADN (4ng/uL)	7.5
Volumen Total	12.5

Fuente. Elaboración propia.

En otra placa de PCR adicional, para cada muestra; se transfirió en un pocillo 5 uL del *pool 1* y 5 uL del *pool 2*; y luego se añadió en cada pocillo 5 uL del Mix de 12.5 uL; dando en cada pocillo un volumen final de 10 uL, luego se homogenizó. Luego se selló la placa y se colocó en el termociclador, con el programa **Amp_ADN** guardado; según la siguiente programación:

99°C x 2 min

20 ciclos de:

- 99°C x 15 segundos
- 60°C x 4 minutos

Se podría mantener a 10°C hasta 24 horas.

3.5.8.3. Digestión parcial de amplicones

Este paso utiliza el reactivo FuPa para digerir dímeros de cebadores y digerir parcialmente los amplicones.

Reactivos y materiales: Fupa, strip, tips de 10 uL, multicanal de 20 uL, multicanal de 10 uL, micropipeta 2-10uL y film adhesivo transparente.

Operacionalidad: De la placa PCR, las cuales contiene las reacciones de amplificación; se trasladó con el multicanal, los 10 uL del *pool* 1 con los 10 uL del *pool* 2 (para cada muestra). Luego se homogenizó con el multicanal de 20 uL. Luego se adicionó para cada muestra 2 uL de Fupa y luego se homogenizó con el multicanal de 20 uL. Se realizó un spin.

Luego se selló la placa y se colocó en el termociclador, con el programa **FuPa** guardado; según la siguiente programación:

50°C x 10 minutos

55°C x 10 minutos

62°C x 20 minutos

Se podría mantener a 10°C hasta 1 hora.

3.5.8.4. Ligación de Índices

Este paso se liga los adaptadores de índice 1 (i7) e índice 2 (i5) a cada muestra. Los índices están premezclados en una placa de un solo uso para garantizar combinaciones únicas. Cada biblioteca tuvo una combinación de índice única para la secuenciación de índice dual.

Reactivos y materiales: AmpliSeq CD Indexes, ADN ligasa, Switch Solution, tips de 10 uL, tips de 20 uL, multicanal de 10 uL, multicanal de 20 uL, film adhesivo transparente y Placa PCR de 96 pocillos.

Operacionalidad: Para cada muestra se adicionó en el orden siguiente los siguientes reactivos: 4 uL Switch Solution, 2 uL AmpliSeq CD Index y 2 uL de ADN Ligasa. Se

homogenizó y luego se hizo un spin. Se selló la placa de PCR y se colocó en el termociclador con el programa **Ligasa**, según la siguiente programación:

22°C x 30 minutos

68°C x 5 minutos

72°C x 5 minutos

Se podría mantener a 10°C hasta 24 horas.

3.5.8.5. Limpieza de Librerías

Este paso utiliza perlas Agencourt AMPure XP para limpiar la biblioteca.

Reactivos y materiales: Perlas AMPure XP, Etanol al 70% (recién preparado), tips de 10 uL, tips de 20 uL, tips de 200 uL, micropipeta 2-10uL, micropipeta de 20-200 uL y multicanal de 200 uL.

Operacionalidad: Se transfirió 30 uL de perlas a cada pocillo de reacción de la placa de PCR, luego se homogenizó. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y luego se colocó en un soporte magnético durante 2 minutos. Luego evitando tocar las perlas, se removió el sobrenadante de cada pocillo. Se adicionó 150 uL de etanol al 70% y se incubó por 30 segundo a temperatura ambiente, luego se descartó el sobrenadante (este paso con el etanol se realizó 2 veces). Luego se verificó que todo el etanol se haya retirado de los pocillos y se dejó secar las perlas a temperatura ambiente por 15 minutos. No se retiró del soporte magnético.

3.5.8.6. Amplificación de las librerías

Este segundo paso se amplificó las bibliotecas para garantizar una cantidad suficiente para la secuenciación en los sistemas Illumina. La reacción de amplificación contiene las perlas, que se transfirieron del paso anterior.

Reactivos y materiales: 1X Lib Amp Mix, 10X Library Amp Primers, film adhesivo transparente, strip, tips de 10 uL, tips de 200 uL, micropipeta de 20-200 uL y multicanal de 200 uL.

Operacionalidad: Para cada muestra se añadió 45 uL de 1X Lib Amp Mix y 5 uL de 10X Library Amp Primers, se homogenizó. Se selló la placa de PCR y se realizó spin. Se colocó en el termociclador con el programa **Amp 7**, según la siguiente programación:

98°C x 2 min

7 ciclos de:

- 98°C x 15 segundos
- 64°C x 1 minuto

Se podría mantener a 10°C hasta 24 horas.

3.5.8.7. Segunda limpieza de librerías

Este segundo paso de limpieza se utilizó perlas Agencourt AMPure XP para realizar dos rondas de purificación. En la primera ronda, las perlas capturaron el ADN de alto peso molecular y lo desechan. La librería y los cebadores se retienen en el sobrenadante y se transfieren a una placa nueva para la segunda ronda de purificación. En la segunda ronda, las perlas capturaron las librerías del sobrenadante, mientras que los cebadores permanecen en el sobrenadante. El pellet de las perlas fue salvado y las librerías se eluyeron de las perlas.

Reactivos y materiales: Perlas AMPure XP, Etanol al 70% (recién preparado), Low TE, tips de 10 uL, tips de 20 uL, tips de 200 uL, micropipeta 2-10uL, micropipeta de 20-200 uL y multicanal de 200 uL.

Operacionalidad: Se agregó 25 uL de perlas a cada pocillo, se homogenizó e incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se colocó la placa de PCR al soporte magnético y se dejó reposar por 5 minutos. Luego se transfirió todo el sobrenadante, el cual contiene las librerías de amplicones deseada, a una nueva placa de PCR. Luego en cada pocillo con el sobrenadante se agregó 60 uL de perlas, se homogenizó e incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y luego se colocó en un soporte magnético durante 5 minutos. Luego evitando tocar las perlas, se removió el sobrenadante de cada pocillo. Se adicionó 150 uL de etanol al 70% y se incubó por 30 segundos a temperatura ambiente, luego se descartó el sobrenadante (este paso con el etanol se realizó 2 veces). Luego se verificó que todo el etanol se haya retirado de los pocillos y se dejó secar las perlas a temperatura ambiente entre un rango de 10 a 15 minutos. No se retiró del soporte magnético. Luego de asegurarnos que todo etanol se haya evaporado, se retiró la placa del soporte magnético y se adicionó 20 uL de Low TE y se homogenizó. Luego se colocó en el soporte magnético y se incubó por 5 minutos. Luego evitando tocar las perlas se transfirió los aproximadamente 20 uL del sobrenadante de cada muestra, donde se encuentra la librería de amplicones, a otra placa de PCR, con la ubicación respectiva de cada pocillo con su muestra.

3.5.8.8. Verificación y Normalización de las librerías

Para que las densidades de los clusters sean óptimas en la celda de flujo, se cuantificó y calificó las librerías. Para la cuantificación de las librerías de las 48 muestras, se utilizó la misma metodología del punto **3.5.3**. Los valores de la cuantificación se observan en el Anexo 7. Estos valores se utilizaron para calcular la molaridad de la librería de cada muestra usando la siguiente fórmula:

$$\frac{ng/\mu L \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{tamaño promedio de la librería}} = \text{Molaridad (nM)}$$

Hay que tener en cuenta que el tamaño promedio de nuestra librería fue aproximadamente 245 pb, teniendo una distribución de longitud del amplicon entre 125 a 275 pb. De esta manera se determinó la molaridad de cada muestra, luego las librerías de cada muestra fueron diluidas a la concentración de su sistema de secuenciación (2nM). Luego para la normalización de las librerías y para fines prácticos, cada librería fue diluida a un volumen final de 20 uL y una concentración de 2nM. Por ejemplo (Anexo 7), para la muestra con código TN-001 (3.5 ng/uL), se determinó su concentración inicial de acuerdo a la fórmula, la cual fue 10.9 nM. Luego para llevarlo a 2nM en 20 uL, se necesitó 3.6 uL de la librería con 16.4 uL de Low TE. De la misma forma para todas las muestras.

Se seleccionaron 24 muestras para observar la integridad de las librerías (Figura 11). Se utilizó un marcador de peso molecular (M) de 50 pb. Los carriles del 1 al 24 representa las librerías de cada una de las muestras.

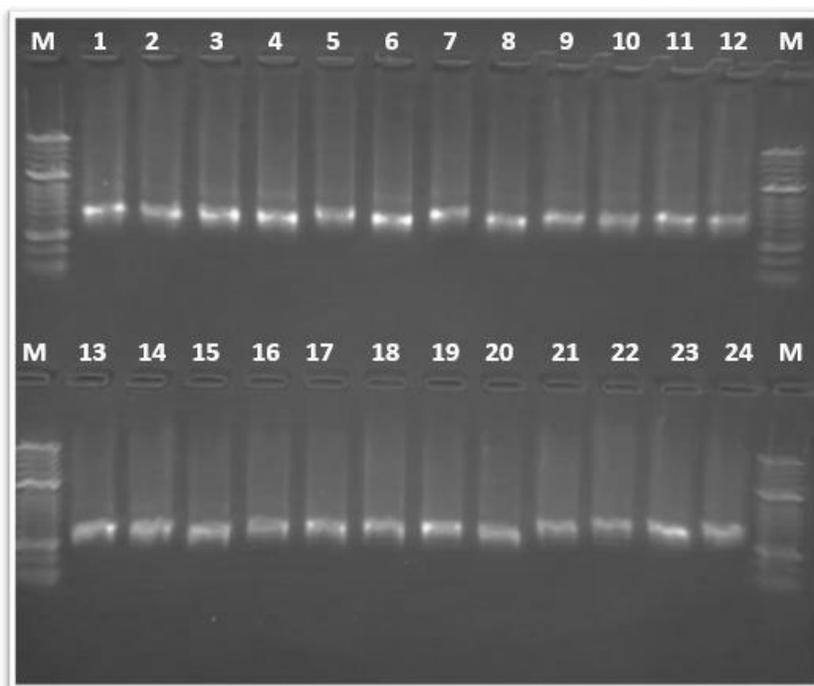


Figura 11. Integridad de Librería de 24 casos del INSNSB.

Fuente. Fotografía propia

3.5.8.9. Preparación del *pool de librerías* para el Iseq100

Todas las muestras normalizadas a 2 nM, luego fueron juntadas (*pool de librerías* a 2nM) en un tubo de 1.5 mL. Para esto se transfirió sólo 10 uL de cada muestra, por lo que para las 48 muestras; se obtuvo un volumen total de 480 uL (2nM).

Para el cargado final en el sistema de secuenciamiento, la concentración de la carga final según las recomendaciones del fabricante debió estar en 50 pM para el sistema del Iseq100. Por lo que para un volumen final de 100 uL, se transfirió 2.5 uL del *pool de librerías* (2 nM) a 97.5 uL de Low TE; donde se obtuvo 50 pM en 100 uL (*pool de librerías* a 50 pM).

Utilizamos un PhiX Control v3 (Illumina, Inc, SanDiego, EE.UU.), que es una librería fabricada del genoma del virus PhiX, la cual se utilizó como control de la secuenciación. Esta librería proporciona un control de calidad para la generación de “clusters”, la secuenciación o el alineamiento, Puede ser alineado rápidamente para estimar la tasa de error entre otros.

Este PhiX (10nM), también fue diluido a 50 pM en 100 uL; luego del pool de librerías de las muestras a 50 pM, se retiró 1 uL y añadimos 1 uL del PhiX (50 pM). De esta manera se trabajó el PhiX al 1%. De esta solución final se transfirió 20 uL al cartucho.

3.5.8.10. Sistema de Secuenciamiento Iseq100

El Iseq100, contiene solo un cartucho de un solo uso precargado con todos los reactivos necesarios para llevar a cabo un experimento. La celda de flujo equipada con un sensor y la biblioteca se cargaron directamente en el cartucho, el cual posteriormente se cargó en el instrumento. La identificación integrada permitió un seguimiento preciso. A través de un paquete de software integrado se controló el

funcionamiento del instrumento, el procesamiento de las imágenes y generación de las llamadas de bases. Este paquete incluyó herramientas de análisis y transferencia de datos integradas en el instrumento para poder llevar a cabo análisis externos.

El Local Run Manager introdujo la información de la muestra y, posteriormente, analizó los datos del experimento con el módulo de análisis especificado en el experimento. El software incluyó un paquete de módulos de análisis. El flujo de trabajo de secuenciación se encontró integrado en BaseSpace Sequence Hub, el entorno informático basado en la nube de Illumina para la supervisión de experimentos, el análisis de datos, el almacenamiento y la colaboración. Los archivos de resultados se transmitieron en tiempo real a BaseSpace Sequence Hub para analizarlos.

3.6. Análisis e interpretación de la información

Para este trabajo de investigación, se realizó una descripción de las variables demográficas y laborales, empleándose porcentajes y frecuencias absolutas para las variables cualitativas (sexo, tipo de muestra, citogenética y panel LLA molecular) y medidas de tendencia central como la media y desviación estándar o mediana para las variables cuantitativas (edad y recuento leucocitario), según se ajusten o no a una distribución normal. Estos análisis estadísticos fueron realizados mediante SPSS v.26.

Para el análisis bioinformático, se utilizó el *BaseSpace Variant Interpreter* de Illumina, el cual nos permitió identificar las variantes o polimorfismo significativos de los datos genómicos humanos de todas las muestras.

Con todos los datos obtenidos para los polimorfismos del gen *TPMT* y *NUDT15*, se calcularon las frecuencias genotípicas, donde a partir de ellas se obtuvieron las frecuencias alélicas. Las frecuencias alélicas, genotípicas y el equilibrio de Hardy-Weinberg se evaluaron mediante Arlequin v3.5.

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Presentación de Resultados

4.1.1. Caracterización demográfica y laboratorial de las muestras de estudio

En nuestro estudio de las 80 muestras con diagnóstico de LLA de tipo B o T, siguiendo los criterios de inclusión y exclusión, se pudo obtener las características demográficas (edad, sexo, procedencia y linaje de la LLA) y laboratoriales (recuento leucocitario, citogenética y panel LLA molecular).

Para los datos demográficos (Cuadro 5), se puede observar que las edades representan cronológicamente hasta la fecha actual, a todos los pacientes pediátricos que fueron atendidos en el INSNSB. El sexo para todos los casos se categorizó en femenino y masculino. La procedencia de las pacientes perteneció a diversas regiones del Perú la cual estuvieron incluidos los departamentos de Amazonas, Ancash, Cajamarca, Callao, Cusco, Huánuco, Ica, Junín, La Libertad, Lambayeque, Lima, Loreto, Moquegua, Piura, San Martín, Tumbes y Ucayali. El linaje o tipo de leucemia linfoblástica aguda, se encontró para B y T.

Para los datos laboratoriales (Cuadro 6), el recuento leucocitario se midió en $10^3/\text{mm}^3$; donde se pueden observar valores altos relacionados a una

hiperleucocitosis, como también valores bajos relacionados a pacientes que probablemente fueron leucopenicos, pancitopenicos o bicitopenicos. La citogenética representó cariotipos normales como también alteraciones numéricas y/o estructurales; asimismo, en algunos casos no hubo crecimiento celular, el cual indicó la no presencia de la nomenclatura de esos casos. Para el panel LLA molecular de nuestra rutina del Servicio de Genética, el cual es una prueba que involucra para la detección de sólo los genes de fusión *BCR/ABL* (p210 y p190), *E2A/PBX1*, *MLL/AF4* y *TEL/AML*; los resultados negativos, indicaron la no detección de estos genes para el panel LLA. A su vez, hubo en algunos casos positivos por ejemplo para el *BCR/ABL* (variante p190) que fue la muestra con código TN-010. Hay que resaltar que para la detección de los genes de fusión del panel LLA mencionados, la positividad de un gen de fusión excluye la presencia de los demás.

Cuadro 5. Datos demográficos de la población en estudio.

Código	Edad	Sexo	Departamento	Linaje	Código	Edad	Sexo	Departamento	Linaje
TN-001	6	F	Lima	LLA - tipo B	TN-021	3	M	Callao	LLA - tipo B
TN-002	4	M	Lima	LLA - tipo B	TN-022	8	M	Loreto	LLA - tipo B
TN-003	9	F	Lima	LLA - tipo B	TN-023	13	M	Ica	LLA - tipo B
TN-004	8	M	Ancash	LLA - tipo B	TN-024	4	M	Moquegua	LLA - tipo B
TN-005	10	M	Lima	LLA - tipo B	TN-025	7	F	La Libertad	LLA - tipo B
TN-006	3	M	Lima	LLA - tipo B	TN-026	7	M	Lima	LLA - tipo B
TN-007	11	F	Lima	LLA - tipo B	TN-027	12	M	Lima	LLA - tipo B
TN-008	16	F	Ucayali	LLA - tipo B	TN-028	8	M	Loreto	LLA - tipo B
TN-009	6	M	Lima	LLA - tipo B	TN-029	5	M	Lima	LLA - tipo B
TN-010	14	M	Ica	LLA - tipo B	TN-030	5	M	Callao	LLA - tipo B
TN-011	3	F	Lima	LLA - tipo B	TN-031	5	F	Piura	LLA - tipo B
TN-012	5	M	Lima	LLA - tipo B	TN-032	7	F	Piura	LLA - tipo B
TN-013	7	F	Lima	LLA - tipo B	TN-033	6	M	Lima	LLA - tipo B
TN-014	11	M	Lima	LLA - tipo B	TN-034	7	F	Piura	LLA - tipo B
TN-015	6	M	Cusco	LLA - tipo B	TN-035	7	M	Lima	LLA - tipo B
TN-016	8	M	Lima	LLA - tipo B	TN-036	17	M	La Libertad	LLA - tipo T
TN-017	6	M	Lima	LLA - tipo B	TN-037	11	F	Lima	LLA - tipo B
TN-018	6	F	Cajamarca	LLA - tipo B	TN-038	9	M	Lambayeque	LLA - tipo T
TN-019	16	F	La Libertad	LLA - tipo B	TN-039	7	F	Lima	LLA - tipo B
TN-020	7	M	Ica	LLA - tipo B	TN-040	16	F	Huánuco	LLA - tipo B

Fuente. Elaboración propia.

Código	Edad	Sexo	Departamento	Linaje	Código	Edad	Sexo	Departamento	Linaje
TN-041	6	F	Lima	LLA - tipo B	TN-061	5	F	Junín	LLA - tipo B
TN-042	7	M	Lima	LLA - tipo B	TN-062	10	F	San Martín	LLA - tipo B
TN-043	9	M	Lima	LLA - tipo B	TN-063	1	F	La Libertad	LLA - tipo B
TN-044	8	M	Lima	LLA - tipo B	TN-064	9	F	Junín	LLA - tipo B
TN-045	6	M	Ancash	LLA - tipo B	TN-065	4	F	San Martín	LLA - tipo B
TN-046	2	M	Lima	LLA - tipo B	TN-066	8	M	Ica	LLA - tipo B
TN-047	4	F	Lima	LLA - tipo B	TN-067	17	F	Callao	LLA - tipo B
TN-048	5	F	Amazonas	LLA - tipo B	TN-068	7	F	Lima	LLA - tipo B
TN-049	4	M	Lima	LLA - tipo B	TN-069	16	M	Lima	LLA - tipo B
TN-050	4	M	Lima	LLA - tipo B	TN-070	8	F	Lima	LLA - tipo B
TN-051	4	M	Ancash	LLA - tipo B	TN-071	10	M	Ancash	LLA - tipo B
TN-052	2	F	Tumbes	LLA - tipo B	TN-072	14	F	Lima	LLA - tipo T
TN-053	5	M	Callao	LLA - tipo B	TN-073	16	F	Ancash	LLA - tipo B
TN-054	5	F	Ancash	LLA - tipo B	TN-074	6	M	Lima	LLA - tipo B
TN-055	6	F	Lima	LLA - tipo B	TN-075	5	M	Huánuco	LLA - tipo B
TN-056	2	M	Cusco	LLA - tipo B	TN-076	8	F	Junín	LLA - tipo T
TN-057	12	M	Lima	LLA - tipo B	TN-077	11	F	Junín	LLA - tipo B
TN-058	9	M	Lima	LLA - tipo B	TN-078	5	M	Ancash	LLA - tipo B
TN-059	8	F	Lima	LLA - tipo B	TN-079	7	F	Lima	LLA - tipo B
TN-060	5	M	Piura	LLA - tipo B	TN-080	2	M	Ucayali	LLA - tipo B

Fuente. Elaboración propia.

Cuadro 6. Datos laboratoriales de la población en estudio.

Código	WBC (10 ³ /mm ³)	Citogenética	Panel LLA
TN-001	10.23	46,XX[20]	Negativo
TN-002	3.51	46,XY,t(5;14)(q36.2;q11.2),i(9)(q11)[14]/46,XY[6]	Negativo
TN-003	6.45	54~60,XX,+4,+6,+8,+10,+11,+12,+13,+14,+16,+17,+18,+18,+21,+21,+22 [cp16]/46, XX[2]	Negativo
TN-004	87.19	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-005	1.2	46,XY[20]	TEL-AML1
TN-006	47.34	46,XY[20]	E2A-PBX1
TN-007	7.2	46,XX[20]	Negativo
TN-008	1	46,XX[20]	Negativo
TN-009	226.32	46,XY,t(15;18)(q21;q23)[15]/46,XY[5]	Negativo
TN-010	133.95	45,XY,t(9;22)(q34;q11.2),-16,add(20)(q11.2)[17]/44,XY,der(9)t(9;12)(p22;q13)t(9;22)(q34;q11.2),-12,-20,ace[2]/46,XY[1]	BCR-ABL p190
TN-011	43.12	46,XX[20]	Negativo
TN-012	4.09	52 ~ 60,XY,+X,+4,+6,+8,+10,+14,+17,+18,+21[16]	Negativo
TN-013	142.27	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-014	2.52	47,XY,add(7)(q32),-17,+21c,+mar[3]	Negativo
TN-015	16.05	46,XY[20]	Negativo
TN-016	6.05	46,XY,t(1;16)(q32;q24),t(4;21)(p10;q10),t(8;12)(p10;p10)[8]/46,XY[16]	Negativo
TN-017	109.09	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-018	2.13	47,XX,del(16)(q12),+21c[5]/47,XX,+21c[15]	Negativo
TN-019	63.43	46,XX[20]	Negativo
TN-020	49.22	47,XY,+21[20]	Negativo

Fuente. Elaboración propia.

Código	WBC (10 ³ /mm ³)	Citogenética	Panel LLA
TN-021	76.49	46,XY[20]	E2A-PBX1
TN-022	5.26	46,XY[20]	Negativo
TN-023	9.39	46,XY[20]	Negativo
TN-024	19.44	55,XXYY,+6,+10,+14,+17,+18,+21,+21[18]/46,XX[2]	Negativo
TN-025	16.71	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-026	0.66	46,XY[20]	Negativo
TN-027	2.23	46,XY[5]BIM	Negativo
TN-028	11.32	63,XY,+X,+3,+4,+5,+6,+8,+9,+10,+13,+14,+15,+16,+17,+18,+21,+21,+21[5]/46,XY[25]	Negativo
TN-029	16.74	46,XY[20]	TEL-AML1
TN-030	3.89	46,XY[7]BIM	Negativo
TN-031	8.9	46,XX[20]	Negativo
TN-032	3.77	46,XX[20]	TEL-AML1
TN-033	7.15	52,XY,+X,+5,+8,+10,+21,+21[1]/52,idem,i(17)(q10)[1]/46,XY[5]	Negativo
TN-034	24.41	56,XXX,dup(1)(q21q32),+?5,+?8,+?14,+15,+17,++19,+2,+21[20]	Negativo
TN-035	2.63	46,XY[20]	Negativo
TN-036	433.73	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-037	128.08	46,XX[20]	Negativo
TN-038	47.18	45,X,-Y[10]/idem,t(2;14)(q35;q11.2)[7]/46,XY[3]	Negativo
TN-039	2.3	46,XX[20]	Negativo
TN-040	94.3	46,XX,del(9)(p21)[4]/46,XX[16]	Negativo

Fuente. Elaboración propia.

Código	WBC (10 ³ /mm ³)	Citogenética	Panel LLA
TN-041	2.65	NO CRECIMIENTO CELULAR	TEL-AML1
TN-042	2.73	46,XY[20]	Negativo
TN-043	7.4	46,XY[20]	TEL-AML1
TN-044	11.43	46,XY, inv(5)(q13q35),der(19)t(1;19)(q23;p13.3)[1]/46,XY[1]	E2A-PBX1
TN-045	7.4	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-046	8.76	46,XY[20]	Negativo
TN-047	25.69	56~58,XX,dup(1)(q21q42),+4,+6,+7,+8,+9,+10,+14,+17,+18,+21,+21,+22 [7]/46,XX[13]	Negativo
TN-048	13.38	46,XX,der(12)t(1;12)(q23;q24)[6]/46,XX[2]	Negativo
TN-049	25.88	58,XY,+X, 4,+6,+8,+10,+14,+15,+17,+18,+21,+21,+22[4]/46,XY[5]	Negativo
TN-050	2.99	46,XY,del(12)(p13)[15]/46,XY[5]	TEL-AML1
TN-051	21.86	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-052	170.35	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[7]/46,XX[2]	MLL-AF4
TN-053	70.54	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-054	8.7	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-055	5	NO CRECIMIENTO CELULAR	TEL-AML1
TN-056	12.73	46,XY,t(16;20)(q24;q11.2)[20]	Negativo
TN-057	89.99	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-058	2.83	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-059	17.18	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-060	4.27	46,XY[20]	Negativo

Fuente. Elaboración propia.

Código	WBC (10 ³ /mm ³)	Citogenética	Panel LLA
TN-061	16.12	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-062	6.78	46,XX[20]	Negativo
TN-063	677.12	46,XX,t(4;11)(q21;q23),t(10;10)(q22;q26)[20]	MLL-AF4
TN-064	396.59	46,XX,del(9)(p22)[20]	Negativo
TN-065	26.91	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-066	8.4	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-067	14.41	NO CRECIMIENTO CELULAR	TEL-AML1
TN-068	3	NO CRECIMIENTO CELULAR	TEL-AML1
TN-069	9.23	47,XY,+21c[9]BIM	Negativo
TN-070	3.87	54,XX,+X,+4,+6,del(6)(q21),add(9)(q34),+10,+14,+17,+18,+21 [18]/46,XX[2]	Negativo
TN-071	2.77	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-072	190.47	46,XX[20]	Negativo
TN-073	32.83	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-074	3.34	46,XY,t(7;15)(q22;q15)[11]/46,XY[9]	Negativo
TN-075	8.38	66~69<3n>,XX,-Y,+5,-9,+10,-11,+14,+17,+18,-19,-20,+21,-22 [cp11]/46,XX[4]	Negativo
TN-076	150.38	45,X,-X,t(8;14)(q24;q11.2)[16]/46,XX[4]	Negativo
TN-077	3.74	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-078	14.56	46,XY[8]BIM	E2A-PBX1
TN-079	1.84	NO CRECIMIENTO CELULAR	Negativo
TN-080	108.91	46,XY,del(9)(p13)[20]	Negativo

Fuente. Elaboración propia

El consolidado del número, medias y porcentajes de los datos demográficos, se observa en el Cuadro 7. Para las 80 muestras de pacientes pediátrico con diagnóstico de LLA; la variable edad, tuvo una media de 7 años y 6 meses (7.6). Para la variable Sexo, el mayor número de pacientes fue masculino con 45 muestras (56.25%), y para el femenino fue 35 (43.75%). Con respecto a la procedencia, los casos que pertenecen al departamento de Lima fueron 38 (47.5%) individuos; y 42 (52.5%) para los casos que no provenían de Lima; es decir fue mayor el número de casos referidos de provincia al INSNSB. Para el linaje de la LLA, el tipo B con 76 (95%) individuos fue mayor que el tipo T con 4 (5%) individuos.

Cuadro 7. Consolidado de las variables demográficas.

Variable	Categorización	Valores	
		n o media	%
Edad	Cronológica (años y meses)	7.6	-
Sexo	Femenino	35	43.75
	Masculino	45	56.25
Procedencia	Lima	38	47.50
	otros	42	52.50
Linaje	B	76	95.00
	T	4	5.00

Fuente. Elaboración propia

El consolidado de las medias y porcentajes de los datos laboratoriales, se observa en el Cuadro 8. Para las 80 muestras de pacientes pediátrico con diagnóstico de LLA, la media del recuento leucocitario fue $50.85 \times 10^3/\text{mm}^3$. La citogenética mostró que el cariotipo estuvo mayoritariamente representado por alteraciones numéricas y/o estructurales (41.25%), las normales el 30% y hubo también un porcentaje significativo de no crecimiento (28.75%). Para el panel molecular de LLA, el mayor porcentaje (80%), fue negativo. La positividad fue mayor para el gen de fusión *TEL-AML1* (11.25%), luego el *E2A-PBX1* (5%), *MLL-AF4* (2.5%) y *BCR-ABL p190* (1.25%).

Cuadro 8. Consolidado de las variables laboratoriales.

Variable	Categorización	Valores	
		Media	%
Recuento Leucocitario	$10^3/\text{mm}^3$	50.85	-
Citogenética	Normales	24	30.00
	Alteraciones numéricas y/o estructurales	33	41.25
	No crecimiento	23	28.75
Panel LLA molecular	Negativo	64	80.00
	<i>BCR-ABL p190</i>	1	1.25
	<i>E2A-PBX1</i>	4	5.00
	<i>MLL-AF4</i>	2	2.50
	<i>TEL-AML1</i>	9	11.25

Fuente. Elaboración propia

4.1.2. Genotipificación de los polimorfismos en los genes *TPMT* y *NUDT15*

Con los datos obtenidos del secuenciamiento, se pudo determinar la genotipificación de los polimorfismos de los genes *TPMT* y *NUDT15* más frecuentes (los cuales han sido mayoritariamente involucrados con la actividad del metabolismo de las tiopurinas); y los polimorfismos nuevos.

4.1.2.1. Genotipos del gen *TPMT*

Los polimorfismos del gen *TPMT* más frecuentes analizados, se encuentran en el Cuadro 9. Estos polimorfismos nos sirvieron de referencia para determinar la genotipificación de los polimorfismos para las 80 muestras, las cuales se observan en el Cuadro 11.

Cuadro 9. Polimorfismos frecuentes en el gen *TPMT*.

SNP de referencia (rs)	SNP	Cambio aminoacídico	Alelo	Exón
rs1800462	238G>C	Ala80Pro	<i>TPMT</i> *2	5
rs1800460	460G>A	Ala154Thr	<i>TPMT</i> *3B	7
rs1142345	719A>G	Tyr240Cis	<i>TPMT</i> *3C	10
rs1800460 y rs1142345	460G>A y 719A>G	Ala154Thr y Tyr240Cis	<i>TPMT</i> *3A	7 y 10

Fuente. Elaboración propia

4.1.2.2. Genotipos del gen *NUDT15*

El polimorfismo del gen *NUDT15* más frecuente analizado, se encuentran en el Cuadro 10. Este polimorfismo nos sirvió de referencia para determinar la genotipificación de los polimorfismos para las 80 muestras, las cuales se observan en el Cuadro 12.

Cuadro 10. Polimorfismo frecuente en el gen *NUDT15*.

SNP de referencia (rs)	SNP	Cambio aminoacídico	Alelo	Exón
rs116855232	415C>T	Arg139Cys	<i>TPMT</i> *2	3

Fuente. Elaboración propia

Cuadro 11. Genotipos de los polimorfismos frecuentes del gen *TPMT* de las 80 muestras estudiadas.

CÓDIGO TESIS	TPMT*2 238G>C (rs1800462)			Genotipo	TPMT*3B 460G>A (rs1800460)			Genotipo	TPMT*3C 719A>G (rs1142345)			Genotipo	Genotipo final
	CC	GC	GG		CC	CT	TT		TT	TC	CC		
TN-001	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-002	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-003	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-004	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-005	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-006	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-007	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-008	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-009	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-010	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-011	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-012	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-013	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-014	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-015	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-016	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-017	CC	-	-	*1/*1	-	CT	-	*1/*3B	-	TC	-	*1/*3C	*1/*3A
TN-018	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-019	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-020	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1

Fuente. Elaboración propia

CÓDIGO TESIS	TPMT*2 238G>C (rs1800462)			Genotipo	TPMT*3B 460G>A (rs1800460)			Genotipo	TPMT*3C 719A>G (rs1142345)			Genotipo	GENOTIPO FINAL
	CC	GC	GG		CC	CT	TT		TT	TC	CC		
TN-021	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-022	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-023	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-024	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-025	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-026	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-027	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-028	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-029	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-030	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-031	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-032	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-033	CC	-	-	*1/*1	-	CT	-	*1/*3B	-	TC	-	*1/*3C	*1/*3A
TN-034	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-035	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-036	CC	-	-	*1/*1	-	CT	-	*1/*3B	-	TC	-	*1/*3C	*1/*3A
TN-037	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-038	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-039	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-040	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1

Fuente. Elaboración propia

CÓDIGO TESIS	TPMT*2 238G>C (rs1800462)			Genotipo	TPMT*3B 460G A (rs1800460)			Genotipo	TPMT*3C 719A>G (rs1142345)			Genotipo	GENOTIPO FINAL
	CC	GC	GG		CC	CT	TT		TT	TC	CC		
TN-041	CC	-	-	*1/*1	-	CT	-	*1/*3B	-	TC	-	*1/*3C	*1/*3A
TN-042	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-043	CC	-	-	*1/*1	-	CT	-	*1/*3B		TC	-	*1/*3C	*1/*3A
TN-044	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-045	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-046	CC	-	-	*1/*1	-	CT	-	*1/*3B	-	TC	-	*1/*3C	*1/*3A
TN-047	CC	-	-	*1/*1	-	CT	-	*1/*3B		TC	-	*1/*3C	*1/*3A
TN-048	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-049	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-050	CC	-	-	*1/*1	-	CT	-	*1/*3B	-	TC	-	*1/*3C	*1/*3A
TN-051	CC	-	-	*1/*1	-	CT	-	*1/*3B	-	TC	-	*1/*3C	*1/*3A
TN-052	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-053	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-054	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-055	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-056	CC	-	-	*1/*1	-	CT	-	*1/*3B	-	TC	-	*1/*3C	*1/*3A
TN-057	CC	-	-	*1/*1	-	CT	-	*1/*3B	-	TC	-	*1/*3C	*1/*3A
TN-058	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-059	CC	-	-	*1/*1	-	CT	-	*1/*3B	-	TC	-	*1/*3C	*1/*3A
TN-060	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1

Fuente. Elaboración propia

CÓDIGO TESIS	TPMT*2 238G>C (rs1800462)			Genotipo	TPMT*3B 460G>A (rs1800460)			Genotipo	TPMT*3C 719A>G (rs1142345)			Genotipo	GENOTIPO FINAL
	CC	GC	GG		CC	CT	TT		TT	TC	CC		
TN-061	CC	-	-	*1/*1	-	CT	-	*1/*3B	-	TC	-	*1/*3C	*1/*3A
TN-062	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-063	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-064	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-065	CC	-	-	*1/*1	-	CT	-	*1/*3B	-	TC	-	*1/*3C	*1/*3A
TN-066	CC	-	-	*1/*1	-	CT	-	*1/*3B	-	TC	-	*1/*3C	*1/*3A
TN-067	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-068	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-069	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-070	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-071	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-072	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-073	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-074	CC	-	-	*1/*1	-	CT	-	*1/*3B	-	TC	-	*1/*3C	*1/*3A
TN-075	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-076	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-077	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-078	CC	-	-	*1/*1	-	CT	-	*1/*3B	-	TC	-	*1/*3C	*1/*3A
TN-079	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1
TN-080	CC	-	-	*1/*1	CC	-	-	*1/*1	TT	-	-	*1/*1	*1/*1

Fuente. Elaboración propia

Cuadro 12. Genotipos del polimorfismo frecuente del gen *NUDT15* de las 80 muestras estudiadas

CÓDIGO TESIS	415C>T (rs116855232)			CÓDIGO TESIS	415C>T (rs116855232)		
	CC	CT	TT		CC	CT	TT
TN-001	CC	-	-	TN-021	-	CT	-
TN-002	CC	-	-	TN-022	CC	-	-
TN-003	CC	-	-	TN-023	-	-	TT
TN-004	CC	-	-	TN-024	CC	-	-
TN-005	CC	-	-	TN-025	CC	-	-
TN-006	-	CT	-	TN-026	CC	-	-
TN-007	CC	-	-	TN-027	CC	-	-
TN-008	CC	-	-	TN-028	CC	-	-
TN-009	CC	-	-	TN-029	CC	-	-
TN-010	CC	-	-	TN-030	CC	-	-
TN-011	CC	-	-	TN-031	CC	-	-
TN-012	-	CT	-	TN-032	CC	-	-
TN-013	CC	-	-	TN-033	CC	-	-
TN-014	CC	-	-	TN-034	CC	-	-
TN-015	CC	-	-	TN-035	CC	-	-
TN-016	CC	-	-	TN-036	CC	-	-
TN-017	CC	-	-	TN-037	CC	-	-
TN-018	CC	-	-	TN-038	CC	-	-
TN-019	CC	-	-	TN-039	-	CT	-
TN-020	CC	-	-	TN-040	-	CT	-

Fuente. Elaboración propia

CÓDIGO TESIS	415C>T (rs116855232)			CÓDIGO TESIS	415C>T (rs116855232)		
	CC	CT	TT		CC	CT	TT
TN-041	CC	-	-	TN-061	-	CT	-
TN-042	CC	-	-	TN-062	CC	-	-
TN-043	CC	-	-	TN-063			
TN-044	CC	-	-	TN-064	-	CT	-
TN-045	CC	-	-	TN-065	CC	-	-
TN-046	CC	-	-	TN-066	CC	-	-
TN-047	CC	-	-	TN-067	CC	-	-
TN-048	CC	-	-	TN-068	CC	-	-
TN-049	CC	-	-	TN-069	CC	-	-
TN-050	CC	-	-	TN-070	CC	-	-
TN-051	CC	-	-	TN-071	CC	-	-
TN-052	CC	-	-	TN-072	CC	-	-
TN-053	-	CT	-	TN-073	CC	-	-
TN-054	CC	-	-	TN-074	-	CT	-
TN-055	-	CT	-	TN-075	CC	-	-
TN-056	-	CT	-	TN-076	CC	-	-
TN-057	CC	-	-	TN-077	CC	-	-
TN-058	CC	-	-	TN-078	CC	-	-
TN-059	CC	-	-	TN-079	CC	-	-
TN-060	CC	-	-	TN-080	CC	-	-

Fuente. Elaboración propia

4.1.2.3. Frecuencias alélicas y genotípicas

Antes de determinar las frecuencias alélicas y genotípicas, se estableció el número total de cada genotipo para los polimorfismos de los genes *TPMT* y *NUDT15* (Cuadro 13) de acuerdo a los datos observados que fueron determinados mediante el NGS. En las 80 muestras del gen *TPMT*, para el polimorfismo rs1800462 se identificó el genotipo C/C en 79 pacientes y el genotipo C/G en 1 paciente; no se encontró casos para el genotipo G/G. Para el polimorfismo rs1800460; se identificó el genotipo C/C en 63 pacientes y el genotipo T/C en 17 pacientes, no se encontró casos para el genotipo T/T. Para el polimorfismo rs1142345; se identificó el genotipo T/T en 63 pacientes y el genotipo C/T en 17 pacientes, no se encontró casos para el genotipo C/C. Hay que resaltar que para el caso de los polimorfismos rs1800460 y rs1142345; estos dos se transmiten de forma haplotípica. Este resultado de este haplotipo será discutido más adelante.

En las 80 muestras del gen *NUDT15*, para el polimorfismo más frecuente; el cual es el rs116855232, se identificó el genotipo C/C en 68 pacientes y el genotipo C/T en 11 pacientes. Se encontró 1 caso para el genotipo T/T.

Para el número alélico de cada polimorfismo (Cuadro 14), éstos se deducen de los genotipos de cada uno de ellos. Por ejemplo, para el polimorfismo rs1800462 del gen *TPMT*; el genotipo C/C se presenta en 79 pacientes, por lo que, al ser un genotipo homocigoto, el cual presenta dos alelos iguales, entonces el número alélico es el doble, es decir 159. Y para el genotipo C/G, el cual se encuentra en 1 paciente, al ser un genotipo heterocigoto, entonces el número alélico es 1. Entonces para el polimorfismo rs1800460 se encontró 143 para el alelo C y 17 para el alelo T. Para el polimorfismo rs1142345 se identificó 143 para el alelo T y 17 para el alelo C. Para el polimorfismo rs116855232 del gen *NUDT15*, se encontró 147 para el alelo C y 13 para el alelo T.

Cuadro 13. Consolidado de los genotipos de los genes TPMT y NUDT15.

Genes	TPMT						NUDT15	
	rs1800462		rs1800460		rs1142345		rs116855232	
Genotipos	C/C	79	T/T	0	C/C	0	C/C	68
	C/G	1	T/C	17	C/T	17	C/T	11
	G/G	0	C/C	63	T/T	63	T/T	1

Fuente. Elaboración propia

Cuadro 14. Consolidado de los alelos de los genes TPMT y NUDT15.

Genes	TPMT						NUDT15	
	rs1800462		rs1800460		rs1142345		rs116855232	
Alelos	C	159	T	17	C	17	C	147
	G	1	C	143	T	143	T	13

Fuente. Elaboración propia

Para la determinación de las frecuencias alélicas, éstas se determinaron a través de los genotipos observados del NGS. Por ejemplo, para el polimorfismo rs1800462 del gen *TPMT*, para el cálculo de la frecuencia de cada alelo, lo que se hizo fue dividir el número de copias de cada alelo (C y G) entre el número total de copias de todos los alelos existentes del total de casos para el locus considerado.

Así llamamos p a la frecuencia del alelo C y llamamos q a la frecuencia del alelo G, por lo que:

$$p = \frac{2D + H}{2D + 2H + 2R}$$

$$q = \frac{2R + H}{2D + 2H + 2R}$$

Donde:

D = número de individuos con genotipo CC

R = número de individuos con genotipo CG

H = número de individuos con genotipo GG

En el cuadro 15, se indica las frecuencias alélicas de los polimorfismos de los genes *TPMT* y *NUDT15*.

Cuadro 15. Frecuencias alélicas de los polimorfismos de los genes *TPMT* y *NUDT15*.

Gen	Polimorfismo	Alelos	Frecuencia
<i>TPMT</i>	rs1800462	C	0.99
		G	0.01
	rs1800460	T	0.11
		C	0.89
	rs1142345	C	0.11
		T	0.89
<i>NUDT15</i>	rs116855232	C	0.92
		T	0.08

Fuente. Elaboración propia

Se realizó la prueba de Chi-cuadrado (X^2), para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg, para los polimorfismos de los genes *TPMT* y *NUDT15* (Cuadro 16). Por lo que, se verificó si el número de individuos observados por genotipo se desvían del número esperado en situación de equilibrio. Para el gen *TPMT*, se obtuvieron valores de X^2 iguales a 0.003, 1.11 y 1.11 para los polimorfismos rs1800462, rs1800460 y rs1142345 respectivamente. Para el gen *NUDT15*, el X^2 fue de 0.5 para el polimorfismo rs116855232. Para analizar el equilibrio de Hardy-Weinberg, el número de grados de libertad es igual al número de clases fenotípicas menos el número de alelos. Es así que, la X^2 teórica, la comparamos con la X^2 experimental, y que corresponde a 1 grado de libertad (3 clases fenotípicas – 2 alelos). Por lo tanto, el valor de X^2 teórica para un nivel de significancia de 0.05 es 3.84. En tal sentido, como la X^2 experimental, de cada polimorfismo es menor que la X^2 teórica, no rechazamos la hipótesis de equilibrio y asumimos que los valores observados se ajustan a los esperados en equilibrio. En otras palabras, se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Cuadro 16. Frecuencias genotípicas e individuos observados y esperados para los polimorfismos de los genes *TPMT* y *NUDT15*.

Genes	Polimorfismo	Genotipo	Frecuencia genotípica	Individuos observados	Individuos esperados	$\frac{(O - E)^2}{E}$	p-valor
<i>TPMT</i>	rs1800462	C/C	0.99	79	79.003	0	0.955*
		C/G	0.01	1	0.994	0	
		G/G	0	0	0.003	0.003	
		Total	1	80	80	$\chi^2 = 0.003$	
	rs1800460	T/T	0	0	0.903	0.90	0.288*
		T/C	0.21	17	15.194	0.21	
		C/C	0.79	63	63.903	0.01	
		Total	1	80	80	$\chi^2 = 1.11$	
	rs1142345	C/C	0	0	0.903	0.9	0.288*
		C/T	0.21	17	15.194	0.21	
		T/T	0.79	63	63.903	0.01	
		Total	1	80	80	$\chi^2 = 1.11$	
<i>NUDT15</i>	rs116855232	C/C	0.85	68	67.528	0.003	0.480*
		C/T	0.14	11	11.944	0.075	
		T/T	0.01	1	0.528	0.422	
		Total	1	80	80	$\chi^2 = 0.5$	

*p>0.05

Fuente. Elaboración propia

4.1.2.4. Tipificación del gen *TPMT*

Considerando los estándares de la “Clinical Pharmacogenetics *Implementation Consortium*” para las 80 muestras de LLA; se consiguió tipificar los polimorfismos rs1800462, rs1800460 y rs1142345 del gen *TPMT*. Esta tipificación se realizó, identificando las posibles combinaciones de haplotipos. Por lo que queda así *TPMT**1=CCT, *TPMT**2=GCT, *TPMT**3A=CTC, *TPMT**3B=CTT y *TPMT**3C=CCC. Para nuestro estudio, fueron 3 haplotipos encontrados (Cuadro 17), el cual el haplotipo de mayor frecuencia fue el *TPMT**1/*TPMT**1 con 77.5%, seguido del *TPMT**1/*TPMT**3A (21.25%) y *TPMT**1/*TPMT**2 (1.25%). Asimismo, el alelo de mayor frecuencia (Cuadro 18), fue el *TPMT**1 (88.75%), seguido del *TPMT**3A (10.625%) y el *TPMT**2 (0.625%).

Cuadro 17. Frecuencias de los Haplotipos del gen *TPMT*.

Haplotipos	N° de individuos	Frecuencia (%)
<i>TPMT</i> *1/ <i>TPMT</i> *1	62	77.5
<i>TPMT</i> *1/ <i>TPMT</i> *2	1	1.25
<i>TPMT</i> *1/ <i>TPMT</i> *3A	17	21.25

Fuente. Elaboración propia

Cuadro 18. Frecuencias de los tipos polimórficos del gen *TPMT*.

Alelos	N° de individuos	Frecuencia (%)
<i>TPMT</i> *1	142	88.75
<i>TPMT</i> *2	1	0.625
<i>TPMT</i> *3A	17	10.625

Fuente. Elaboración propia

4.1.2.5. Tipificación del gen *NUDT15*

De la misma manera, se utilizó la guía de la “Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium”, para tipificar el polimorfismo más frecuente del gen *NUDT15*. Los estudios iniciales de todo el genoma asociaron solo un único polimorfismo de un solo nucleótido no sinónimo (c.415C>T) en el exón 3 de *NUDT15* con la toxicidad de la tiopurina. Esta variante c.415C>T está tipificado con *NUDT15**3 (Cuadro 19). Es así, que los genotipos están representados con las siguientes frecuencias: *NUDT15**1/ *NUDT15**1 (85%), *NUDT15**1/ *NUDT15**3 (13.75%) y *NUDT15**3/ *NUDT15**3 (1.25%).

Cuadro 19. Frecuencias de los Haplotipos del gen *NUDT15*.

Haplotipos	N° de individuos	Frecuencia (%)
<i>NUDT15*1/ NUDT15*1</i>	68	85
<i>NUDT15*1/ NUDT15*3</i>	11	13.75
<i>NUDT15*3/ NUDT15*3</i>	1	1.25

Fuente. Elaboración propia

El alelo de mayor frecuencia fue el *NUDT15*1* (93.875%), y el de menor frecuencia fue *NUDT15*3* (8.125%) (Cuadro 20).

Cuadro 20. Frecuencias de los tipos polimórficos del gen *NUDT15*.

Alelos	N° de individuos	Frecuencia (%)
<i>NUDT15*1</i>	147	93.875
<i>NUDT15*3</i>	13	8.125

Fuente. Elaboración propia

4.1.2.6. Polimorfismos nuevos en los genes *TPMT* y *NUDT15*

A través del NGS, se pudo detectar nuevos polimorfismos para los genes *TPMT* y *NUDT15*. Es así, que para el gen *TPMT*, se descubrió el cambio nucleotídico 474T>C el cual representa al polimorfismo rs2842934. Asimismo, se encontró cuatro cambios nucleotídicos que se asociaban en bloque con el haplotipo *TPMT**3A (el cual está representado por 460G>A y 719A>G. Se encontró otros cambios nucleotídicos en las muestras, pero no fueron considerados debido a que no tenían un patrón frecuente significativo para nuestra población. Es así como, para las 80 muestras, todos estos polimorfismos encontrados con sus frecuencias respectivas se observan en el Cuadro 21.

Cuadro 21. Polimorfismos nuevos en el gen *TPMT* identificados en nuestra población.

Cambios de nucleótidos en el gen <i>TPMT</i>	dbSNP	Frecuencia Wild Type	Frecuencia		Total
			Heterocigoto	Homocigoto	
474T>C	rs2842934	3 (3.75%)	20 (25%)	57 (71.25%)	80
140+ 114T>A	rs3931660	62 (77.5%)	18 (22.5%)	0 (0%)	80
141-101A>T	rs12529220	7 (8.75%)	73 (91.25%)	0 (0%)	80
366 + 58T>C	rs2518463	19 (23.75%)	38 (47.5%)	23 (28.75%)	80
460G>A	rs1800460	63 (78.75%)	17 (21.25%)	0 (0%)	80
474T >C	rs2842934	3 (3.75%)	20 (25%)	57 (71.25%)	80
719A>G	rs1142345	63 (78.75%)	17 (21.25%)	0 (0%)	80

Fuente. Elaboración propia

De las 80 muestras estudiadas, para el cambio nucleotídico 474T >C está asociado al alelo *TPMT*1S*; este cambio se encontró en todas las muestras estudiadas. Asimismo, los cambios nucleotídicos 140+ 114T > A, 141–101A>T, 141–101A>T, 366 + 58T >C, 460G>A, 474T >C y 719A >G; en bloque forman el haplotipo *TPMT*3E*; la cual se encontró en 17 del total de muestras estudiadas (Cuadro 22).

Cuadro 22. Frecuencias de los polimorfismos nuevos del gen *TPMT*.

Alelo <i>TPMT</i>	Cambios de nucleótidos en el gen <i>TPMT</i>	dbSNP	Frecuencia Wild Type	Frecuencia		Total
				Heterocigoto	Homocigoto	
<i>TPMT*1S</i>	474T >C	rs2842934	3 (3.75%)	20 (25%)	57 (71.25%)	80
<i>TPMT*3E</i>	140+ 114T > A	rs3931660	0 (0%)	17 (100%)	0 (0%)	17
	141–101A>T	rs12529220	0 (0%)	17 (100%)	0 (0%)	17
	366 + 58T >C	rs2518463	0 (0%)	10 (58.82%)	7 (41.18%)	17
	460G>A	rs1800460	0 (0%)	17 (100%)	0 (0%)	17
	474T >C	rs2842934	0 (0%)	4 (23.53%)	13 (76.47%)	17
	719A >G	rs1142345	0 (0%)	17 (100%)	0 (0%)	17

Fuente. Elaboración propia

Para el gen *NUDT15*, se describió el cambio nucleotídico c.50_55dup, el cual representa el polimorfismo rs746071566. Para esta variante se observó que 69 casos tienen genotipo wild type, 10 son genotipo heterocigoto y un caso es genotipo homocigoto. Esta variante se asoció en bloque con la variante c.415C>T (la cual es el polimorfismo rs116855232 y se describió como las más frecuentes); por lo que también se describió en el Cuadro 23 para fines de correlación.

Cuadro 23. Polimorfismos nuevos en el gen *NUDT15* identificados en nuestra población.

Cambios de nucleótidos en el gen <i>NUDT15</i>	dbSNP	Frecuencia Wild Type	Frecuencia		Total
			Heterocigoto	Homocigoto	
c.50_55dup	rs746071566	69 (86.25%)	10 (12.5%)	1 (1.25%)	80
c.415C>T	rs116855232	68 (85%)	11 (13.75%)	1 (1.25%)	80

Fuente. Elaboración propia

De las 80 muestras estudiadas, la asociación en bloque de los cambios nucleotídicos c.50_55dup y c.415C>T en el gen *NUDT15* determinan el alelo *NUDT15*2*. La cual se encontró en 11 casos del total de las muestras. Es así que para estas 11 muestras; no hubo casos con genotipo wild type; pero hubo 10 con genotipo heterocigoto y 1 caso con genotipo homocigoto (Cuadro 25).

Es importante mencionar, que solo se encontró la variante c.415C>T por si sola en un caso de las 80 muestras estudiadas. Esta variante por si sola se asocia con el alelo *NUDT15*3*, la cual para nuestro estudio se encontró como genotipo heterocigoto (Cuadro 24).

Cuadro 24: Frecuencias de los polimorfismos nuevos del gen *NUDT15*.

Alelo <i>NUDT15</i>	Cambios de nucleótidos en el gen <i>NUDT15</i>	dbSNP	Frecuencia Wild Type	Frecuencia		Total
				Heterocigoto	Homocigoto	
<i>NUDT15*2</i>	c.50_55dup	rs746071566	0 (0%)	10 (90.91%)	1 (9.09%)	11
	c.415C>T	rs116855232	0 (0%)	10 (90.91%)	1 (9.09%)	11
<i>NUDT15*3</i>	c.415C>T	rs116855232	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1

Fuente. Elaboración propia

4.2. Análisis, interpretación y discusión de resultados

4.2.1. Caracterización demográfica y laboratorial de las muestras de estudio

En las características demográficas de nuestro estudio, encontramos que los participantes involucrados pertenecen a diferentes departamentos del Perú, la cual demuestra la heterogeneidad de la población; encontrándose que el mayor porcentaje provienen fuera de Lima, gracias a las referencias de los hospitales de provincia para la atención en el servicio de hematología del INSNSB. Asimismo, se observó que la mayoría de los pacientes tenían una edad promedio de 7,6 la cual se correlaciona con estudios en pacientes pediátricos con LLA, donde la edad de esta enfermedad está en un rango de 5 a 9 años (Kakaje et al., 2020). En el caso del sexo, el mayor porcentaje de pacientes se diagnosticaron con la enfermedad en el sexo masculino, lo que se correlacionó con lo reportado a nivel mundial (Kakaje et al., 2020). Para el linaje, el mayor número de casos de la LLA se desarrollan a partir de precursores de células de tipo B y el resto de los casos consiste en precursores de células de tipo T, lo cual se asocia con lo reportado en la literatura (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017).

En las características laboratoriales, para el recuento de leucocitos, los altos valores normales y bajos se evidencia de manera variable en todas las muestras estudiadas; aunque el rango normal del recuento de glóbulos blancos durante la infancia oscila entre $4,0$ a $14,5 \times 10^3/\text{mm}^3$, varios casos de nuestras muestras diagnosticados con LLA pertenecen a este rango (Jaime Pérez et al., 2018). Es así, que nuestros resultados indican que las variantes en el genoma de nuestros pacientes no influirían estrechamente en el conteo de los leucocitos de los pacientes pediátricos con LLA; y de la misma manera en los subtipos B o T. La influencia del conteo leucocitario en donde se encuentre pacientes con hiperleucocitosis o leucopénicos en la LLA, probablemente esté asociado por el impacto de variantes en la línea germinal

para la fabricación de los glóbulos blancos del individuo (Helenius et al., 2022; Jaime Pérez et al., 2018).

El estudio de la citogenética, determinado mediante el cariotipo, se pudo encontrar las alteraciones numéricas y/o estructurales; y es muy importante que la muestra se obtuvo del debut de la enfermedad; ya que es ahí donde se encuentran los linfoblastos patológicos; y por consiguiente las anomalías cromosómicas, en el caso sea la causa de la enfermedad. Para nuestro trabajo, se pudo observar que, de las 80 muestras, el mayor porcentaje presentaba alteración cromosómica, el cual en algunos casos se asociaba a una translocación recíproca producto de un gen de fusión. Asimismo, en otros casos el cariotipo fue normal, pero eso no indica que la causa podría ser de origen cromosómico, ya que la baja resolución de esta metodología en algunos casos no se puede detectar anomalías visibles en la metafase. Es importante mencionar que el no crecimiento de las metafases en algunas muestras pudo ser causado por las condiciones preanalíticas de las mismas, es decir el exceso o bajo conteo de leucocitos, el poco volumen, coágulos en la muestra, etc. Aun así, la principal ventaja de la citogenética es que permite proporcionar una pantalla global de todo el genoma, por lo que en el protocolo hematológico es una de las piezas fundamentales en la ayuda al diagnóstico y está bien establecida en la práctica clínica. Varios estudios han confirmado que la detección temprana y precisa de las anomalías citogenéticas en la LLA permite el pronóstico de la enfermedad (Hakeem et al., 2015; Moorman et al., 2022).

El panel molecular para la LLA, se observó que el gen de fusión *TEL-AML1* fue el más prevalente, el cual sólo pudo ser identificable mediante la RT-PCR (el diagnóstico molecular de rutina); ya que este gen de fusión no es detectable por el estudio citogenético, al ser una alteración críptica para el cariotipo (Liu et al., 2006). Hay que resaltar que el panel molecular sólo puede detectar los genes de fusión positivos para los *BCR-ABL*, *E2A-PBX1*, *MLL-AF4* y *TEL-AML1* (Guerra-Castillo et al., 2016); los cuales son los más frecuentes en pacientes pediátricos con LLA. Asimismo, en la mayoría de los casos fue negativo para el panel LLA, por lo que esto evidenciaría que la

causa de la falla hematológica probablemente este asociada mutaciones o variantes de la línea germinal o somática relacionadas a genes de la LLA.

4.2.2. Genotipificación de los polimorfismos en los genes *TPMT* y *NUDT15*

En nuestro estudio, la genotipificación de los polimorfismos en los genes *TPMT* y *NUDT15*, estuvo más involucrado en las variantes más frecuentes y que están asociados al metabolismo de las tiopurinas. Es así, que representamos en una primera instancia los resultados que están asociados a los SNPs referenciales y seguidamente de las variantes nuevas encontradas en esta investigación, los cuales han sido estudiados y asociados en la actividad enzimática de los genes *TPMT* y *NUDT15*.

4.2.2.1. Alelo de normal función *TPMT1**

Para el gen *TPMT*, el alelo más frecuente en todas las muestras estudiadas fue el *TPMT**1, el cual es alelo silvestre o wild type y de normal función (Appell et al., 2013) en todas las muestras, reportándose en este trabajo de investigación un porcentaje de 88.75%, el cual es coincidente con la mayoría de revisiones de diferentes regiones del mundo, como en poblaciones caucásicas, sudamericanas, africanas y asiáticas; donde el porcentaje de este alelo tiene una frecuencia entre el rango de 85%-95% (Alsous et al., 2018; Asadov et al., 2017).

4.2.2.2. Polimorfismo rs1800462 (238G>C) del gen *TPMT*

Para el polimorfismo rs1800462, el cual está asociado al tipo *TPMT**2; es analizado con la base de datos de impacto de variación genética publicadas en el PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org/>), la cual esta variante es considerada rara según las frecuencias alélicas globales de los datos de

gnomAD Genomes (base de datos de agregación del genoma). El valor de la frecuencia del alelo C (0.99) y del alelo G (0.01) del polimorfismo rs1800462, se asocia a los reportados en las poblaciones africanas, latinoamericanas, finlandesas, asiáticas, etc. Hay que tener en cuenta que el patrón de la frecuencia del alelo C tiende al 100% cuando el tamaño de la población en estudio es menor en algunos casos. Para nuestro estudio solo encontramos el polimorfismo rs1800462 en heterocigoto, en un caso de las 80 muestras analizadas. Aun así, con ese tamaño de la muestra se pudo encontrar esta variante en nuestra población.

Es así, que esta base de datos las cuales pertenecen a los datos de una coalición internacional de investigadores que, a través de una amplia variedad de proyectos de secuenciación a gran escala, han permitido resumir esta información al público. Pero hay que tener en cuenta que estos valores de las frecuencias alélicas pertenecen a muestras con diferentes tipos de enfermedades, por ejemplo, con enfermedad inflamatoria intestinal, trastornos autoinmunes, leucemia linfoblástica aguda, etc. Compararlo con la LLA que es la que se trata nuestro estudio; las frecuencias alélicas de países de la región de Sudamérica como Chile, Colombia y México (Canales López, 2012; Correa-Jimenez et al., 2021; Moreno-Guerrero et al., 2013), presentaron valores similares que los nuestros para esta variante. Asimismo, la frecuencia alélica del *TPMT*2* (0.625) presenta valor bajo, similar en nuestro estudio. El alelo menos común *TPMT*2* se observa principalmente en etnias sudamericanas y del Medio Oriente, especialmente en la población iraní (Bahari et al., 2010; Relling et al., 2013). Turquía, por otro lado, se ha informado que tiene una menor frecuencia de alelos mutantes en comparación con los países vecinos (Tumer et al., 2007).

4.2.2.3. Polimorfismos rs1800460 (460G>A) y rs1142345 (719A>G) del gen *TPMT*

Para el polimorfismo rs1800460 (460G>A), el cual está asociado al tipo *TPMT*3B*, y el polimorfismo rs1142345 (719A >G), el cual se relaciona al tipo

*TPMT*3C*, se encontró conjunto el alelo *TPMT*3A* estas dos variantes en 17 casos, pero como forma haplotípica para estos dos polimorfismos, formando en conjunto el alelo *TPMT*3A*. Para el rs1800460 (460G>A) la frecuencia alélica fue de T (0.11) y C (0.89); y la frecuencia del tipo *TPMT*3B* fue cero, debido a que no se encontraba de manera independiente. Es así, que esta frecuencia del *TPMT*3B* de nuestro estudio se relaciona con datos reportados en algunas poblaciones europeas, asiáticas, africanas, donde no se encontró el tipo *TPMT*3B*; pero si se encontró el de tipo *TPMT*3C* (719A>G), con frecuencias de 0.8, 1.5, 4.9 respectivamente (Relling et al., 2013; Spire-Vayron de la Moureyre, Debuysere, et al., 1998). En nuestro estudio para el rs1142345 (719A>G), las frecuencias alélicas fueron C (0.11) y T (0.89); y la frecuencia del tipo *TPMT*3C* fue cero. Hay que resaltar que, para nuestro trabajo, no se encontró los tipos *TPMT*3B* y *TPMT*3C*, ya que las variantes 460G>A y 719A>G estaban en forma haplotípica (*TPMT*3A*), en todos los casos encontrados, la cual para nuestro estudio tenía una frecuencia de 10.625%. Aunque se ha informado que las frecuencias de alelos mutantes varían entre los diferentes grupos étnicos (Collie-Duguid et al., 1999; Samochatova et al., 2009; Serpe et al., 2009).

El alelo más frecuente en la mayoría de las poblaciones es *TPMT*3A*, seguido principalmente por *TPMT*3C*. Se ha informado que los europeos en especial tienen una de las frecuencias más altas de *TPMT*3A* y todos los alelos mutantes en común; por otro lado, los asiáticos y africanos muestran frecuencias más altas de *TPMT*3C* (Asadov et al., 2017).

4.2.2.4. Polimorfismos nuevos en el gen *TPMT*

Hay un cambio nucleotídico 474T>C, el cual se encuentra en heterocigoto (25%) y homocigoto (71.25%). Además este cambio lo encontramos en el exón 7 cerca de la variante rs1800460 (460G>A), donde la distancia entre estas dos es de solo 14 pb, lo cual también es reportando en Japón utilizando para el secuenciamiento un pirosecuenciador (Okada et al., 2005). Con

respecto a la tipificación del alelo *TPMT*, este cambio representa en la literatura a la variante sinónima *TPMT*1S* (Spire-Vayron de la Moureyre, Debuysère, et al., 1998); y pertenece al polimorfismo rs2842934, la cual es considerada en el ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) como una variante probablemente benigna, es decir su alelo es de función normal.

Hay otros cambios nucleotídicos que encontramos en nuestra investigación y que no pertenecen a las variantes frecuentes (las cuales son principalmente de nuestro análisis de investigación). Estas variantes corresponden a los cambios nucleotídicos intrónicos: 140+114T>A (rs3931660), 141-101A>T (rs12529220) y 366+58T>C (rs2518463). Estas variantes intrónicas forman un haplotipo con las variantes exónicas 460G>A (rs1800460), 474T>C (rs2842934) y 719A>G (rs1142345), las cuales ya han sido mencionadas anteriormente. En conjunto, estos seis polimorfismos se asocian al alelo *TPMT*3E*, el cual se ha reportado que podría haber una disminución de la actividad de la *TPMT* el cual está asociado a un vínculo muy fuerte de *TPMT*3E* con la intolerancia de las tiopurinas (Colleoni et al., 2013).

4.2.2.5. Polimorfismo 415C>T (rs116855232) del gen *NUDT15*

El cambio nucleotídico 415C>T (rs116855232), el cual está asociado al *NUDT15*3*, se pudo identificar tanto en su forma heterocigota (C/T), como en homocigota (TT). Mencionar que para esta variante se considera el alelo mutado al alelo T y la forma silvestre al alelo C. La frecuencia del alelo T y C fue 0.08 y 0.92 respectivamente; la cual fue ligeramente similar a la frecuencia del alelo mutado en poblaciones de Singapur (Moriyama et al., 2016), donde la frecuencia del alelo T fue 0.089; y la población coreana, donde la frecuencia del alelo T fue 0.072 (Park et al., 2019). Asimismo, la frecuencia del alelo T de nuestro estudio fue mayor en la población de europea e hispoamérica, donde las frecuencias de su alelo T fue 0.002 y 0.041 respectivamente (J. J. Yang et al., 2015). En comparación con las frecuencias de las poblaciones de China y Japón, la frecuencia de nuestro alelo T, fue menor, donde China y Japón

contienen frecuencias para el alelo T de 0.116 y 0.109 respectivamente (Liang et al., 2016; Moriyama et al., 2016).

Es así, que la frecuencia del alelo *NUDT15**3 (8.125%) estuvo asociado con las diferentes regiones del mundo; debido a que es una variante común en las poblaciones y que se relaciona con pacientes pediátricos con LLA (Khaeso et al., 2021). Con respecto a su implicancia en la parte clínica, al ser una variante *missense* es un determinante importante de la disminución de la tolerancia a la dosis de un fármaco de la familia de las tiopurinas como la mercaptopurina en pacientes con LLA (Venkatakrisnan et al., 2016). Estudios reportan que en niños con LLA reportan que en niños con LLA, los pacientes homocigotos para la variante del alelo *NUDT15**3 toleraron solo el 8 % de la dosis estándar de mercaptopurina, mientras que la intensidad de la dosis tolerada fue del 63 % y el 83,5 % para los heterocigotos y los de tipo salvaje para este polimorfismo, respectivamente (J. J. Yang et al., 2015).

Recientemente, las Directrices del Consorcio de Implementación de Farmacogenética Clínica han recomendado que los médicos o hematólogos en el caso de la LLA, deben ajustar la dosis inicial de medicamentos de tiopurina en función de los genotipos *NUDT15* (Relling et al., 2019). Por lo expuesto, la genotipificación de esta variante conlleva a identificar el riesgo a un posible efecto de toxicidad adverso como la mielosupresión al utilizar un fármaco de la familia de las tiopurinas como tratamiento en la LLA (Moriyama et al., 2016);

4.2.2.6. Polimorfismos nuevos en el gen *NUDT15*

A parte de la variante c.415C>T o p.Arg139Cys, la cual está estrechamente asociada con las tiopurinas en los pacientes pediátricos con LLA, en 13.75% del total de las muestras se encontró la nueva variante c.50_55dup (rs746071566), la cual fue identificada por el *variant interpreter* de la base de datos obtenidas de la plataforma de illumina; asimismo, fue representada p.Gly17_Val18dup, como cambio de residuo aminoacídico. Actualmente, esta variante se describe como una inserción c.55_56insGAGTCG (p.18_19insGV)

según el consorcio de variación de farmacogén (PharmVar); mientras que la sociedad de variación del Genoma Humano (HGVS) describe la inserción como una duplicación c.50_55dup (p.Gly17_Val18dup). Independientemente qué anotación se utilice, esta inserción conduce a una ganancia de dos aminoácidos (Pratt et al., 2022). Moriyama et al., en el año 2016 descubrió esta variante y la anotó como c.36_37insGGAGTC por primera vez, donde se encontró la repetición de una inserción GGAGTC lo que condujo a una adición en el marco de un residuo de glicina y valina (p.Val18_Val19insGlyVal).

Este polimorfismo rs746071566, el cual es una inserción de 6pb, se asoció con un metabolismo deficiente de tiopurinas, la cual se evidenció en un estudio de niños con LLA; y también se descubrió que esta variante se encuentra en alto desequilibrio de ligamiento con la variante c.415C>T (rs116855232), donde la presencia de ambas variantes en conjunto forman el haplotipo *NUDT15*2*, la cual tiene una actividad enzimática severamente disminuida, y por lo tanto está asociado con la intolerancia a las tiopurinas (Moriyama et al., 2016).

Aunque existen otras variantes del *NUDT15* reportadas en la literatura, que han sido tipificadas como *NUDT15*5* (rs186364861), *NUDT15*6* (rs869320766) y *NUDT15*7* (rs766023281); las dosis tolerada para las tiopurinas podría ser significativamente diferente (J. J. Yang et al., 2019).

Es muy importante para nuestro estudio el análisis de este polimorfismo rs746071566, el cual se pudo encontrar en nuestra población; y además se identificó en mayor medida en forma heterocigota (10 casos) y solo 1 caso en forma homocigota. Por lo que esta variación en línea germinal podría tener implicancia clínica en el metabolismo de las tiopurinas; y sería necesario una terapia personalizada en los casos que se encuentren con esta variante.

4.2.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg de los polimorfismos rs1800462, rs1800460, rs1142345 y rs116855232

La determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante el estadístico de la prueba de Chi-cuadrado (X^2), evidenció que todas las frecuencias alélicas de los polimorfismos del gen *TPMT* se encontraban en equilibrio ($p > 0.05$). Esta estadística nos ayuda en teoría a no rechazar la hipótesis nula (las frecuencias alélicas se encuentran en equilibrio); pero en la práctica en nuestra población de pacientes con leucemia linfoblástica aguda no se cumple de manera regular, ya que no se cumplen algunos principios de las leyes de Hardy-Weinberg. Por ejemplo, con respecto a la deriva genética; los pacientes pediátricos con LLA que fueron atendidos en el INSNSB, pertenecen a una población pequeña ($N=80$); en este sentido si una población es pequeña se puede vulnerar el equilibrio de Hardy-Weinberg, ya que un alelo puede comenzar a desviarse hacia valores más altos o bajos, por lo que el alelo puede representar el 100% del acervo genético.

Asimismo, con respecto al flujo de genes; los pacientes pertenecen a poblaciones de diferentes regiones del Perú, donde la reproducción probablemente ha sido de inmigraciones ocasionales de una población adyacente; por lo que esto puede introducir nuevos genes o alterar las frecuencias de genes existentes en la población residente. En el caso de nuestros niños con LLA; los padres (tanto hombres como mujeres) posiblemente seleccionaron a sus parejas, por lo que sería un apareamiento no aleatorio. Pero para determinar la aleatorización se tendría que realizar el árbol genealógico de manera que no haya filiación entre ellos hasta cuarta generación. Y así predecir que fue una combinación elegida o aleatoria, la cual no es objetivo de nuestra investigación.

Por todo lo mencionado, son varios factores, como la mutación, la selección natural, el apareamiento no aleatorio, la deriva genética y el flujo de genes que pueden causar desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (Graffelman et al., 2017).

4.2.4. Medicina personalizada o de Precisión

Para abordar una medicina personalizada o de precisión en los pacientes pediátricos con LLA, se necesita tener todas las herramientas que impliquen una exitosa ayuda al diagnóstico y tratamiento para cada paciente. Entre ellas podría ser las demográficas, laboratoriales, clínicas, etc.

La medicina personalizada o de precisión hace énfasis a la investigación genómica que ha proporcionado grandes impactos en la biomedicina durante las últimas décadas; cuyo objetivo es personalizar en la práctica clínica un enfoque en el individuo a partir de usos de pruebas genéticas, identificación de biomarcadores y desarrollo de medicamentos dirigidos (Iriart, 2019).. Basada en la identificación de las características genéticas del pacientes, la medicina personalizada orienta el fármaco preciso con la dosis exacta para el tratamiento del paciente (Iriart, 2019).

Para nuestro estudio, realizamos un análisis de casos que se ha utilizado los datos reportados anteriormente, y que abarcan principalmente: características demográficas, el linaje de la LLA, el panel molecular LLA (*BCR-ABL1*, *E2A-PBX1*, *MLL-AF4*, y *TEL-AML1*), la citogenética y el NGS; que en conjunto proporcionan al médico genetista, los datos de apoyo al diagnóstico para la interpretación clínica; y asimismo, realizar un exitoso tratamiento y pronóstico para cada paciente pediátrico. Es así, que abordaremos cuatro casos que se verán a continuación:

Caso 1 (Código TN-033)

Paciente masculino de 6 años, procedente de Cañete (Lima), de linaje de LLA tipo B. El panel molecular LLA fue negativo para los 4 genes de fusión. La citogenética convencional, mediante el bandeo GTG evidenció el siguiente cariotipo: 52,XY,+X,+5,+8,+10,+21,+21[1]/52,idem,i(17)(q10)[1]/46,XY[5]. La presencia de hiperdiploidía por lo general es de buen pronóstico y se reporta una buena tasa de respuesta a la quimioterapia, asimismo la presencia de trisomía 10, tetrasomía del 21, y un cromosoma X adicional, han demostrado

un pronóstico favorable frente la implicancia de otros cromosomas (Madhusoodhan et al., 2016), pero la presencia de una trisomía 5, se ha reportado un pronóstico desfavorable (Heerema et al., 2000). EL NGS nos proporcionó información de la farmacogenética, la cual para los genes *TPMT* y *NUDT15*, sus genotipos fueron *1/*3A y *1/*1 respectivamente. Para este caso al ser un metabolizador intermedio (*TPMT*) y metabolizador normal (*NUDT15*); se recomendaría considerar la reducción de la dosis, el cual sería el 30%-80% de la dosis estándar (75 mg/m²/día), si la dosis es con mercaptopurina; o dosis reducidas entre 50% - 80% de la dosis estándar (40-60 mg/m²/día), si la dosis es tioguanina, según las guías para tiopurinas para el gen *TPMT* (Relling et al., 2019).

Caso 2 (Código TN-040)

Paciente femenino de 17 años, procedente de Dos de Mayo (Huánuco), de linaje de LLA tipo B. El panel molecular LLA fue negativo para los 4 genes de fusión. citogenética convencional, mediante el bandeo GTG evidenció el siguiente cariotipo:46,XX,del(9)(p21)[4]/46,XX[16]. La deleción del brazo corto (p) del cromosoma 9, consiste en la pérdida de material cromosómico en el brazo corto del cromosoma 9 en dicho brazo se ubica el gen supresor de tumores CDKN2A, por lo que la perdida de esta región favorecería la evolución clonal (Heerema et al., 1999). En algunas publicaciones indican que los pacientes con LLA en edad pediátrica con alteraciones que involucren el brazo corto del cromosoma 9, implicaría un factor de riesgo adverso tanto para la supervivencia libre de eventos y supervivencia global (Moorman et al., 2010; Wehrli et al., 2009). La farmacogenética indicó los genotipos *1/*1 (metabolizador normal) y *1/*3 (metabolizador intermedio) para los genes *TPMT* y *NUDT15* respectivamente; por lo que se recomendaría considerar la reducción de la dosis, el cual sería el 30%-80% de la dosis estándar (75 mg/m²/día), si la dosis es con mercaptopurina; o dosis reducidas entre 50% - 80% de la dosis estándar (40-60 mg/m²/día), si la dosis es tioguanina, según las guías para tiopurinas para el gen *NUDT15* (Relling et al., 2019).

Caso 3 (Código TN-050)

Paciente masculino de 4 años, procedente de Lima, de linaje LLA de tipo B. El panel molecular LLA fue positivo para *TEL-AML1*. La citogenética evidenció el siguiente cariotipo: 46,XY,del(12)(p13)[15]/46,XY[5]. La presencia génica del *TEL-AML1*, es un marcador de buen pronóstico que se reportó en tasas de supervivencia favorable sin complicaciones y supervivencia global; sin embargo, el impacto pronóstico de esta característica genética puede ser modificada por otros factores como: respuesta temprana al tratamiento, categoría de riesgo y régimen terapéutico (Streubel et al., 1998). La presencia del gen de fusión *TEL-AML1* y la delección 12p13, han sido descrita en el catálogo de mutaciones somáticas del cáncer (COSMIC) como anomalías cromosómicas adquiridas en LLA (Tate et al., 2019). EL NGS nos proporcionó información de la farmacogenética, para los genes *TPMT* y *NUDT15*; las cuales sus genotipos fueron *1/*3A (metabolizador intermedio) y *1/*1 (metabolizador normal) respectivamente; por lo que se recomendaría considerar la reducción de la dosis, el cual sería el 30%-80% de la dosis estándar (75 mg/m²/día), si la dosis es con mercaptopurina; o dosis reducidas entre 50% - 80% de la dosis estándar (40-60 mg/m²/día), si la dosis es tioguanina, según las guías para tiopurinas para el gen *TPMT* (Relling et al., 2019).

Caso 4 (Código TN-056)

Paciente masculino de 2 años, procedente de Canchis (Cusco), de linaje LLA de tipo B. El panel molecular LLA fue negativo para los 4 genes de fusión. La citogenética evidenció el siguiente cariotipo: 46,XY,t(16;20)(q24;q11.2)[20]. Aunque el significado clínico de la traslocación entre los brazos largos (q) de los cromosomas 16 y 20, se desconoce; la presencia de la traslocación entre los brazos largos (q) de los cromosomas 16 y 20, ha sido descrita, como una anomalía cromosómica adquirida en tumores sólidos como de pulmón (Yoshihara et al., 2015). La farmacogenética indicó los genotipos *1/*1A (metabolizador intermedio) y *1/*3 (metabolizador intermedio) para los genes *TPMT* y *NUDT15* respectivamente. En este caso también se recomendaría

considerar la reducción de la dosis, el cual sería el 30%-80% de la dosis estándar (75 mg/m²/día), si la dosis es con mercaptopurina; o dosis reducidas entre 50% - 80% de la dosis estándar (40-60 mg/m²/día), si la dosis es tioguanina, según las guías para tiopurinas para el gen *TPMT* y *NUDT15* (Relling et al., 2019).

Es importante señalar, que estos casos seleccionados (Anexo 8) que se expone como ejemplo de todas las muestras desarrolladas, con el soporte de las características demográficas, laboratoriales y el desarrollo experimental del NGS de este trabajo de investigación; es muy relevante para que el médico tratante considere al momento de guiar la elección terapéutica de cada paciente pediátrico.

El aprendizaje de las variantes genéticas o polimorfismos de los genes *TPMT* y *NUDT15* que se ha logrado estudiar en este trabajo de investigación, va permitir el beneficio de todos los pacientes pediátricos que se requiera atender en el INSNSB. Además, que este instituto cuenta con las herramientas que optimizan la medicina de precisión mediante marcadores genéticos. Es así, que nuestra intención primordial es que estos análisis sean implementados de forma rutinaria para la disminución de la toxicidad hematológica en el inicio de la dosis con el fármaco de las tiopurinas en el tratamiento de la LLA.

4.2.5. Limitaciones y consideraciones éticas

Entre las limitaciones de nuestro estudio, resalta que el enrolamiento de los pacientes pediátricos depende de los diagnosticados con LLA en el INSNSB; el cual actualmente es entre 70 a 80 casos por año, lo que dificulta tener un mayor tamaño muestral. Otra limitación, es que, en algunas muestras externas, es decir que fueron referenciadas de provincia o de otro hospital de Lima para el Servicio de Genética del INSNSB, no tienen pruebas complementarias como citometría de flujo y/o citogenética; por lo que se omiten al no estar contenidas en nuestras variables.

Entre las consideraciones éticas, hay que mencionar que es muy importante que en el enrolamiento este asociado con la firma del consentimiento

informado (0-7 años) y/o asentimiento informado (8-17 años) para los pacientes pediátricos. Para el almacenamiento de la información digital se colocó con sus códigos específicos para cada paciente de manera confidencial.

CONCLUSIONES

1. Se encontró las variantes polimórficas 238G>C, 460G>A y 719A>G del gen *TPMT*; así como también la variante 415C>T del gen *NUDT15*. Las cuales son las consideradas las más frecuentes de estos dos genes.
2. Se determinó nuevos polimorfismos como 474T>C, 140+114T>A, 141-101A>T, 366+58T>C, para el gen *TPMT*; y el polimorfismo c.50_55dup para el gen *NUDT15*.
3. Se determinó las frecuencias alélicas de las tres variantes polimórficas del gen *TPMT*; la cual, para la rs1800462, rs1800460 y rs1142345 la mayor frecuencia la encontramos en el alelo C (0.99), alelo C (0.89) y alelo T (0.89) respectivamente. Asimismo, para el gen *NUDT15* la mayor frecuencia alélica la encontramos en el alelo C (0.92) del polimorfismo rs116855232.
4. La tipificación del gen *TPMT*, determinó los haplotipos *TPMT*1/TPMT*1*, *TPMT*1/TPMT*3A* y *TPMT*1/TPMT*2*, cuyo alelo de mayor frecuencia fue el *TPMT*1* y el de menor frecuencia fue el *TPMT*2*. Para la tipificación en el gen *NUDT15* se identificó los haplotipos que corresponden a *NUDT15*1/NUDT15*1*, *NUDT15*1/NUDT15*3* y *NUDT15*3/NUDT15*3*, el cual se obtuvo el alelo *NUDT15*1* como el más frecuente.
5. La prueba de Chi-cuadrado (X^2), determinó que las variantes polimórficas de los genes *TPMT* y *NUDT15*, para nuestra población pediátrica, se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.
6. Se encontró las variantes nuevas tipificadas como *TPMT*1S* y *TPMT*3E* para el gen *TPMT* y la variante tipificada como *NUDT15*2* para el gen *NUDT15*.

RECOMENDACIONES

1. Establecer el secuenciamiento de nueva generación, como prueba de rutina, para identificar todas las variantes frecuentes o nuevas que están asociadas a los genes *TPMT* y *NUDT15* que son candidatos en el metabolismo de las tiopurinas.
2. Evaluar un mayor número de individuos en nuestra población pediátrica, para aumentar la posibilidad de encontrar genotipos mutantes en forma homocigota.
3. Realizar el diagnóstico con todas las herramientas moleculares de apoyo para una medicina personalizada.
4. Hay que considerar que la reducción de las dosis va a depender de las dosis iniciales normales, la cual pueden variar según la raza y/o origen étnico, como en los sistemas de tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- » INEN: Aumenta significativamente supervivencia de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. (s. f.). Recuperado 30 de diciembre de 2022, de <https://portal.inen.sld.pe/inen-aumenta-significativamente-supervivencia-de-pacientes-pediatricos-con-leucemia-linfoblastica-aguda/>
- Abdelmabood, S., Fouda, A. E., Boujettif, F., & Mansour, A. (2020). Treatment outcomes of children with acute lymphoblastic leukemia in a middle-income developing country: High mortalities, early relapses, and poor survival. *Jornal De Pediatria*, 96(1), 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2018.07.013>
- Adamson, P. C., Poplack, D. G., & Balis, F. M. (1994). The cytotoxicity of thioguanine vs mercaptopurine in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research*, 18(11), 805-810. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(94\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0145-2126(94)90159-7)
- Allele. (2022, septiembre 14). Genome.Gov. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Allele>
- Alsous, M., Yousef, A.-M., Jalil, M. A., Zawiah, M., Yacoub, S., Momani, D., Gharabli, A., Omar, S., & Rihani, R. (2018). Genetic Polymorphism of Thiopurine S-methyltransferase in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia in Jordan. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 19(1), 199-205. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.1.199>
- Alvarnas, J. C., Brown, P. A., Aoun, P., Ballen, K. K., Barta, S. K., Borate, U., Boyer, M. W., Burke, P. W., Cassaday, R., Castro, J. E., Coccia, P. F., Coutre, S. E., Damon, L. E., DeAngelo, D. J., Douer, D., Frankfurt, O., Greer, J. P., Johnson, R. A., Kantarjian, H. M., ... Smith, C. (2015). Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2015. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 13(10), 1240-1279. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2015.0153>
- Alwi, Z. B. (2005). The Use of SNPs in Pharmacogenomics Studies. *The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS*, 12(2), 4-12.

- Anstey, A., Lennard, L., Mayou, S. C., & Kirby, J. D. (1992). Pancytopenia related to azathioprine--an enzyme deficiency caused by a common genetic polymorphism: A review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 85(12), 752-756.
- Appell, M. L., Berg, J., Duley, J., Evans, W. E., Kennedy, M. A., Lennard, L., Marinaki, T., McLeod, H. L., Relling, M. V., Schaeffeler, E., Schwab, M., Weinshilboum, R., Yeoh, A. E. J., McDonagh, E. M., Hebert, J. M., Klein, T. E., & Coulthard, S. A. (2013). Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenetics and genomics*, 23(4), 242-248. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32835f1cc0>
- Aprueban el Documento Técnico: "Plan Nacional para la Atención Integral de la Leucemia Linfática Aguda en Pacientes de 1 a 21 años: 2017-2021" <http://busquedas.elperuano.pe/normaslegales/aprueban-el-documento-tecnico-plan-nacional-para-la-atenci-resolucion-ministerial-n-383-2017-minsa-1523720-1/>
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M., & Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391-2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>
- Asadov, C., Aliyeva, G., & Mustafayeva, K. (2017). Thiopurine S-Methyltransferase as a Pharmacogenetic Biomarker: Significance of Testing and Review of Major Methods. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 15(1), 23-30. <https://doi.org/10.2174/1871525715666170529091921>
- Bahari, A., Hashemi, M., Bari, Z., Moazeni-Roodi, A., Kaykhaei, M.-A., & Narouie, B. (2010). Frequency of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) alleles in southeast Iranian population. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 29(3), 237-244. <https://doi.org/10.1080/15257771003720418>
- Base Calling. (s. f.). Recuperado 7 de junio de 2023, de <https://genohub.com/bioinformatics/10/base-calling>
- Bielorai, B., Fisher, T., Waldman, D., Lerenthal, Y., Nissenkorn, A., Tohami, T., Marek, D., Amariglio, N., & Toren, A. (2013). Acute lymphoblastic

- leukemia in early childhood as the presenting sign of ataxia-telangiectasia variant. *Pediatric Hematology and Oncology*, 30(6), 574-582. <https://doi.org/10.3109/08880018.2013.777949>
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314-331.
- Buaboonnam, J., Sripatanatadasakul, P., Treesucon, A., Glomglao, W., Siraprapapat, P., Narkbunnam, N., Vathana, N., Takpradit, C., Phuakpet, K., Pongtanakul, B., Tongchai, S., Sinlapamongkolkul, P., & Sanpakit, K. (2019). Effect of NUDT15 on incidence of neutropenia in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 61(8), 754-758. <https://doi.org/10.1111/ped.13905>
- Cacabelos, R., Cacabelos, N., & Carril, J. C. (2019). The role of pharmacogenomics in adverse drug reactions. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 12(5), 407-442. <https://doi.org/10.1080/17512433.2019.1597706>
- Canales López, C. (2012). Asociación de efectos adversos al tratamiento de mercaptopurinas con polimorfismos genéticos de la enzima TPTM en niños con leucemia linfoblástica aguda tratados en el Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/111229>
- Carter, M., Jemth, A.-S., Hagenkort, A., Page, B. D. G., Gustafsson, R., Griese, J. J., Gad, H., Valerie, N. C. K., Desroses, M., Boström, J., Warpman Berglund, U., Helleday, T., & Stenmark, P. (2015). Crystal structure, biochemical and cellular activities demonstrate separate functions of MTH1 and MTH2. *Nature Communications*, 6, 7871. <https://doi.org/10.1038/ncomms8871>
- cdadmin. (2018, octubre 17). Principle and Workflow of Illumina Next-generation Sequencing | CD Genomics Blog. <https://www.cd-genomics.com/blog/principle-and-workflow-of-illumina-next-generation-sequencing/>
- cdadmin. (2019, diciembre 3). Amplicons and Amplicon Sequencing | CD Genomics Blog. <https://www.cd-genomics.com/blog/amplicons-and-amplicon-sequencing/>

- Chabner, B. A., Allegra, C. J., Curt, G. A., Clendeninn, N. J., Baram, J., Koizumi, S., Drake, J. C., & Jolivet, J. (1985). Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *The Journal of Clinical Investigation*, 76(3), 907-912. <https://doi.org/10.1172/JCI112088>
- Chauhan, D. T. (2021, agosto 18). Type of PCR Controls- Negative, Positive and Internal Controls. *Genetic Education*. <https://geneticeducation.co.in/type-of-pcr-controls-negative-positive-and-internal-controls/>
- Cheon, J. H., Kim, J. H., Kim, B. Y., Kim, S. W., Hong, S. Y., Eun, C. S., Hong, S. S., Byeon, J.-S., Kim, T. I., Han, D. S., Yang, S.-K., Lee, K. R., & Kim, W. H. (2009). Allele frequency of thiopurine methyltransferase and inosine triphosphate pyrophosphatase gene polymorphisms in Korean patients with inflammatory bowel diseases. *Hepato-Gastroenterology*, 56(90), 421-423.
- Choi, R., Sohn, I., Kim, M.-J., Woo, H. I., Lee, J. W., Ma, Y., Yi, E. S., Koo, H. H., & Lee, S.-Y. (2019). Pathway genes and metabolites in thiopurine therapy in Korean children with acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 85(7), 1585-1597. <https://doi.org/10.1111/bcp.13943>
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & McGehee, M. R. (2019). Chapter 8—DNA Sequencing. En D. P. Clark, N. J. Pazdernik, & M. R. McGehee (Eds.), *Molecular Biology (Third Edition)* (pp. 240-269). Academic Cell. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813288-3.00008-2>
- Colleoni, L., Kapetis, D., Maggi, L., Camera, G., Canioni, E., Cavalcante, P., Kerlero de Rosbo, N., Baggi, F., Antozzi, C., Confalonieri, P., Mantegazza, R., & Bernasconi, P. (2013). A new thiopurine s-methyltransferase haplotype associated with intolerance to azathioprine. *Journal of Clinical Pharmacology*, 53(1), 67-74. <https://doi.org/10.1177/0091270011435989>
- Collie-Duguid, E. S., Pritchard, S. C., Powrie, R. H., Sludden, J., Collier, D. A., Li, T., & McLeod, H. L. (1999). The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics*, 9(1), 37-42. <https://doi.org/10.1097/00008571-199902000-00006>

- Collins, F. S., & McKusick, V. A. (2001). Implications of the Human Genome Project for medical science. *JAMA*, 285(5), 540-544. <https://doi.org/10.1001/jama.285.5.540>
- Cóntigo. (2022, septiembre 14). Genome.gov. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/C%C3%B3ntigo>
- Cooper, S. L., & Brown, P. A. (2015). Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Clinics of North America*, 62(1), 61-73. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2014.09.006>
- Corominas, H., Domènech, M., Laíz, A., Gich, I., Geli, C., Díaz, C., de Cuevillas, F., Moreno, M., Vázquez, G., & Baiget, M. (2003). Is thiopurine methyltransferase genetic polymorphism a major factor for withdrawal of azathioprine in rheumatoid arthritis patients? *Rheumatology (Oxford, England)*, 42(1), 40-45. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keg028>
- Correa-Jimenez, O., Yunis, J. J., Linares-Ballesteros, A., & Sarmiento-Urbina, I. (2021). Asociación de variantes genéticas en TPMT y NUDT15 con los eventos de toxicidad durante la terapia de mantenimiento en niños colombianos con Leucemia Linfoide Aguda. *Colombia Médica*, 52(3). <https://doi.org/10.25100/cm.v52i3.4569>
- Debutar. Diccionario médico. Clínica Universidad de Navarra. (s. f.). <https://www.cun.es>. Recuperado 7 de junio de 2023, de <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/debutar>
- Dna Libraries—Recombinant Dna And Biotechnology—MCAT Content. (2020, marzo 13). Jack Westin. <https://jackwestin.com/resources/mcat-content/recombinant-dna-and-biotechnology/dna-libraries>
- Electroforesis. (2022, septiembre 14). Genome.gov. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Electroforesis>
- Exon. (2022, septiembre 14). Genome.Gov. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Exon>
- Ferreira, G. M. A., Ribeiro Elias, A. B., Nascimento, J., Monteiro, W. M., Melo, G. C., Baia-da-Silva, D. C., Lacerda, M. V. G., & Suarez-Kurtz, G. (2020). Pharmacogenomics of thiopurines: Distribution of TPMT and NUDT15 polymorphisms in the Brazilian Amazon. *Pharmacogenetics*

and Genomics, 30(8), 184-189.

<https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000411>

Fluoróforos. (s. f.). Recuperado 7 de junio de 2023, de <https://www.ibian.es/158-fluoroforos>

Fong, W.-Y., Ho, C.-C., & Poon, W.-T. (2017). Comparison of Direct Sequencing, Real-Time PCR-High Resolution Melt (PCR-HRM) and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Analysis for Genotyping of Common Thiopurine Intolerant Variant Alleles NUDT15 c.415C>T and TPMT c.719A>G (TPMT*3C). *Diagnostics* (Basel, Switzerland), 7(2), E27. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7020027>

Gen. (2022, septiembre 14). Genome.gov.

<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Gen>

Genoma. (2022, septiembre 14). Genome.gov.

<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Genoma>

Genosalut_Palma. (2022, mayo 26). Pharmacogenetics, what it is and what it is used for. Genosalut. <https://www.genosalut.com/en/news/genetic-testing/pharmacogenetics/pharmacogenetics-towards-safe-and-efficient-therapy/>

Genotipo. (2022, septiembre 14). Genome.gov.

<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Genotipo>

Gérinière, L., Bastion, Y., Dumontet, C., Salles, G., Espinouse, D., & Coiffier, B. (1994). Heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in HIV-seropositive patients. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 5(5), 437-440. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.annonc.a058876>

German, J. (1997). Bloom's syndrome. XX. The first 100 cancers. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 93(1), 100-106. [https://doi.org/10.1016/s0165-4608\(96\)00336-6](https://doi.org/10.1016/s0165-4608(96)00336-6)

Gottlieb, A. J., Weinberg, V., Ellison, R. R., Henderson, E. S., Terebelo, H., Rafla, S., Cuttner, J., Silver, R. T., Carey, R. W., & Levy, R. N. (1984). Efficacy of daunorubicin in the therapy of adult acute lymphocytic leukemia: A prospective randomized trial by cancer and leukemia group B. *Blood*, 64(1), 267-274.

- Graffelman, J., Jain, D., & Weir, B. (2017). A genome-wide study of Hardy-Weinberg equilibrium with next generation sequence data. *Human Genetics*, 136(6), 727-741. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1786-7>
- Guerra-Castillo, F. X., Ramos-Cervantes, M. T., Rosel-Pech, C., Jiménez-Hernández, E., & Bekker-Méndez, V. C. (2016). Detección de translocaciones relevantes por PCR en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, Sup.* 54(3), 302-308.
- Hakeem, A., Shiekh, A. A., Bhat, G. M., & Lone, A. R. (2015). Prognostification of ALL by Cytogenetics. *Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion: An Official Journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion*, 31(3), 322-331. <https://doi.org/10.1007/s12288-014-0483-0>
- Halushka, M. K., Fan, J. B., Bentley, K., Hsie, L., Shen, N., Weder, A., Cooper, R., Lipshutz, R., & Chakravarti, A. (1999). Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nature Genetics*, 22(3), 239-247. <https://doi.org/10.1038/10297>
- Haplotipo. (2022, septiembre 14). Genome.gov. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Haplotipo>
- Hardy-Weinberg equilibrium | Learn Science at Scitable. (s. f.). Recuperado 7 de junio de 2023, de <http://www.nature.com/scitable/definition/hardy-weinberg-equilibrium-122>
- Harmand, P.-O., & Solassol, J. (2020). Thiopurine Drugs in the Treatment of Ulcerative Colitis: Identification of a Novel Deleterious Mutation in TPMT. *Genes*, 11(10), Article10. <https://doi.org/10.3390/genes11101212>
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A., & Bloomfield, C. D. (1999). World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17(12), 3835-3849. <https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.12.3835>
- Heerema, N. A., Sather, H. N., Sensel, M. G., Liu-Mares, W., Lange, B. J., Bostrom, B. C., Nachman, J. B., Steinherz, P. G., Hutchinson, R.,

- Gaynon, P. S., Arthur, D. C., & Uckun, F. M. (1999). Association of chromosome arm 9p abnormalities with adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the Children's Cancer Group. *Blood*, 94(5), 1537-1544.
- Heerema, N. A., Sather, H. N., Sensel, M. G., Zhang, T., Hutchinson, R. J., Nachman, J. B., Lange, B. J., Steinherz, P. G., Bostrom, B. C., Reaman, G. H., Gaynon, P. S., & Uckun, F. M. (2000). Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(9), 1876-1887.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.9.1876>
- Helenius, M., Vaitkeviciene, G., Abrahamsson, J., Jonsson, Ó. G., Lund, B., Harila-Saari, A., Vettenranta, K., Mikkel, S., Stanulla, M., Lopez-Lopez, E., Waanders, E., Madsen, H. O., Marquart, H. V., Modvig, S., Gupta, R., Schmiegelow, K., & Nielsen, R. L. (2022). Characteristics of white blood cell count in acute lymphoblastic leukemia: A COST LEGEND phenotype-genotype study. *Pediatric Blood & Cancer*, 69(6), e29582.
<https://doi.org/10.1002/pbc.29582>
- Hintzsche, J. D., Robinson, W. A., & Tan, A. C. (2016). A Survey of Computational Tools to Analyze and Interpret Whole Exome Sequencing Data. *International Journal of Genomics*, 2016, 7983236.
<https://doi.org/10.1155/2016/7983236>
- Hon, Y. Y., Fessing, M. Y., Pui, C. H., Relling, M. V., Krynetski, E. Y., & Evans, W. E. (1999). Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Human Molecular Genetics*, 8(2), 371-376.
<https://doi.org/10.1093/hmg/8.2.371>
- Intrón. (2022, septiembre 14). Genome.gov.
<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Intron>
- Iriart, J. A. B. (2019). Precision medicine/personalized medicine: A critical analysis of movements in the transformation of biomedicine in the early 21st century. *Cadernos de Saúde Pública*, 35.
<https://doi.org/10.1590/0102-311X00153118>

- ISEq 100 System Documentation. (s. f.). Recuperado 30 de diciembre de 2022, de https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_instruments/iseq-100/documentation.html
- Lu, Y. P. H., Helander, S., Kahlin, A. Z., Cheng, C. W., Shek, C. C., Leung, M. H., Wallner, B., Mårtensson, L.-G., & Appell, M. L. (2017). One amino acid makes a difference—Characterization of a new TPMT allele and the influence of SAM on TPMT stability. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep46428>
- Jabbour, E. J., Faderl, S., & Kantarjian, H. M. (2005). Adult acute lymphoblastic leukemia. *Mayo Clinic Proceedings*, 80(11), 1517-1527. <https://doi.org/10.4065/80.11.1517>
- Jabbour, E., O'Brien, S., Konopleva, M., & Kantarjian, H. (2015). New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 121(15), 2517-2528. <https://doi.org/10.1002/cncr.29383>
- Jaime Pérez, J. C., García Arellano, G., Herrera Garza, J. L., Marfil Rivera, L. J., & Gómez Almaguer, D. (2018). Revisiting the complete blood count and clinical findings at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: 10-year experience at a single center. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, 41(1), Article 1.
- Kakaje, A., Alhalabi, M. M., Ghareeb, A., Karam, B., Mansour, B., Zahra, B., & Hamdan, O. (2020). Rates and trends of childhood acute lymphoblastic leukaemia: An epidemiology study. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63528-0>
- Kamau, E., Alemayehu, S., Feghali, K. C., Tolbert, L. S., Ogutu, B., & Ockenhouse, C. F. (2012). Development of a TaqMan Allelic Discrimination Assay for detection of Single Nucleotides Polymorphisms associated with anti-malarial drug resistance. *Malaria Journal*, 11(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-23>
- Kapoor, R., Tan-Koi, W. C., & Teo, Y.-Y. (2016). Role of pharmacogenetics in public health and clinical health care: A SWOT analysis. *European Journal of Human Genetics*, 24(12), 1651-1657. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.114>

- Karran, P., & Attard, N. (2008). Thiopurines in current medical practice: Molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 8(1), 24-36. <https://doi.org/10.1038/nrc2292>
- Khaeso, K., Nakkam, N., Komwilaisak, P., Wongmast, P., Chainansamit, S.-O., Dornsena, A., Kanjanawart, S., Vannaprasaht, S., & Tassaneeyakul, W. (2021). Genetic Polymorphisms of Drug-Metabolizing Enzymes Involved in 6-Mercaptopurine-Induced Myelosuppression in Thai Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *Journal of Pediatric Genetics*, 10(1), 29-34. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1715818>
- Kham, S. K. Y., Soh, C. K., Aw, D. C. W., & Yeoh, A. E. J. (2009). TPMT*26 (208F-->L), a novel mutation detected in a Chinese. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 68(1), 120-123. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2009.03405.x>
- Khera, S., Trehan, A., Bhatia, P., Singh, M., Bansal, D., & Varma, N. (2019). Prevalence of TPMT, ITPA and NUDT 15 genetic polymorphisms and their relation to 6MP toxicity in north Indian children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 83(2), 341-348. <https://doi.org/10.1007/s00280-018-3732-3>
- Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J. M., Kim, I.-W., Sauna, Z. E., Calcagno, A. M., Ambudkar, S. V., & Gottesman, M. M. (2007). A «silent» polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5811), 525-528. <https://doi.org/10.1126/science.1135308>
- Krynetski, E. Y., Tai, H. L., Yates, C. R., Fessing, M. Y., Loennechen, T., Schuetz, J. D., Relling, M. V., & Evans, W. E. (1996). Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: Clinical importance and molecular mechanisms. *Pharmacogenetics*, 6(4), 279-290. <https://doi.org/10.1097/00008571-199608000-00001>
- Kumagai, K., Hiyama, K., Ishioka, S., Sato, H., Yamanishi, Y., McLeod, H. L., Konishi, F., Maeda, H., & Yamakido, M. (2001). Allelotype frequency of the thiopurine methyltransferase (TPMT) gene in Japanese. *Pharmacogenetics*, 11(3), 275-278. <https://doi.org/10.1097/00008571-200104000-00012>

- Lennard, L., Van Loon, J. A., & Weinshilboum, R. M. (1989). Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: Relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 46(2), 149-154. <https://doi.org/10.1038/clpt.1989.119>
- Liang, D.-C., Yang, C.-P., Liu, H.-C., Jaing, T.-H., Chen, S.-H., Hung, I.-J., Yeh, T.-C., Lin, T.-H., Lai, C.-L., Lai, C.-Y., & Shih, L.-Y. (2016). NUDT15 gene polymorphism related to mercaptopurine intolerance in Taiwan Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *The Pharmacogenomics Journal*, 16(6), 536-539. <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.75>
- Liu, Y., Li, Z.-G., Zhao, W., Li, B., Gong, W.-Y., & Wu, M.-Y. (2006). [Immunophenotypic characteristics of children with acute lymphoblastic leukemia carrying TEL-AML1 fusion gene]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 14(4), 714-716.
- Livak, K. J., Marmaro, J., & Todd, J. A. (1995). Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nature Genetics*, 9(4), 341-342. <https://doi.org/10.1038/ng0495-341>
- Locus. (2022, septiembre 14). *Genome.gov*. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Locus>
- Loennechen, T., Utsi, E., Hartz, I., Lysaa, R., Kildalsen, H., & Aarbakke, J. (2001). Detection of one single mutation predicts thiopurine S-methyltransferase activity in a population of Saami in northern Norway. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 70(2), 183-188. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.117445>
- Lorenzen, I., Brun, C., & Videbaek, A. (1969). Treatment of immunologic diseases with cytostatics. *Acta Medica Scandinavica*, 185(6), 501-506. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1969.tb07375.x>
- Madhusoodhan, P. P., Carroll, W. L., & Bhatla, T. (2016). Progress and Prospects in Pediatric Leukemia. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 46(7), 229-241. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2016.04.003>

- Malard, F., & Mohty, M. (2020). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* (London, England), 395(10230), 1146-1162. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33018-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33018-1)
- Marcador genético | NHGRI. (s. f.). Recuperado 7 de junio de 2023, de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Marcador-genetico>
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y.-J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Goodwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., ... Rothberg, J. M. (2005). Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. *Nature*, 437(7057), 376-380. <https://doi.org/10.1038/nature03959>
- McLeod, H. L., & Siva, C. (2002). The thiopurine S-methyltransferase gene locus—Implications for clinical pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*, 3(1), 89-98. <https://doi.org/10.1517/14622416.3.1.89>
- Mehta, T. S., Zakharkin, S. O., Gadbury, G. L., & Allison, D. B. (2006). Epistemological issues in omics and high-dimensional biology: Give the people what they want. *Physiological Genomics*, 28(1), 24-32. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00095.2006>
- Michel, V. (2016, octubre 12). Genetic polymorphism and selection. *Encyclopedia of the Environment*. <https://www.encyclopedie-environnement.org/en/life/genetic-polymorphism-and-selection/>
- Milosevic, G., Kotur, N., Krstovski, N., Lazic, J., Zukic, B., Stankovic, B., Janic, D., Katsila, T., Patrinos, G. P., Pavlovic, S., & Dokmanovic, L. (2018). Variants in TPMT, ITPA, ABCC4 and ABCB1 Genes As Predictors of 6-mercaptopurine Induced Toxicity in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Medical Biochemistry*, 37(3), 320-327. <https://doi.org/10.1515/jomb-2017-0060>
- Moorman, A. V., Barretta, E., Butler, E. R., Ward, E. J., Twentyman, K., Kirkwood, A. A., Enshaei, A., Schwab, C., Creasey, T., Leongamornlert, D., Papaemmanuil, E., Patrick, P., Clifton-Hadley, L., Patel, B., Menne, T., McMillan, A. K., Harrison, C. J., Rowntree, C. J., Marks, D. I., & Fielding, A. K. (2022). Prognostic impact of chromosomal abnormalities and copy number alterations in adult B-cell precursor acute

- lymphoblastic leukaemia: A UKALL14 study. *Leukemia*, 36(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01448-2>
- Moorman, A. V., Ensor, H. M., Richards, S. M., Chilton, L., Schwab, C., Kinsey, S. E., Vora, A., Mitchell, C. D., & Harrison, C. J. (2010). Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *The Lancet. Oncology*, 11(5), 429-438. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70066-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70066-8)
- Moradveisi, B., Muwakkit, S., Zamani, F., Ghaderi, E., Mohammadi, E., & Zgheib, N. K. (2019). ITPA, TPMT, and NUDT15 Genetic Polymorphisms Predict 6-Mercaptopurine Toxicity in Middle Eastern Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 916. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00916>
- Moreno-Guerrero, S. S., Ramírez-Pacheco, A., Dorantes-Acosta, E. M., & Medina-Sansón, A. (2013). Análisis de los polimorfismos génicos de Tiopurina S-Metiltransferasa (TPMT) en pacientes pediátricos mexicanos con cáncer. *Revista de Investigación Clínica*, 65(2), 156-164.
- Moriyama, T., Nishii, R., Perez-Andreu, V., Yang, W., Klussmann, F. A., Zhao, X., Lin, T.-N., Hoshitsuki, K., Nersting, J., Kihira, K., Hofmann, U., Komada, Y., Kato, M., McCorkle, R., Li, L., Koh, K., Najera, C. R., Kham, S. K.-Y., Isobe, T., ... Yang, J. J. (2016). NUDT15 polymorphisms alter thiopurine metabolism and hematopoietic toxicity. *Nature Genetics*, 48(4), 367-373. <https://doi.org/10.1038/ng.3508>
- Moriyama, T., Relling, M. V., & Yang, J. J. (2015). Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 125(26), 3988-3995. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-580001>
- MOSADEGHRAD, A. M. (2014). Factors Affecting Medical Service Quality. *Iranian Journal of Public Health*, 43(2), 210-220.
- Mullighan, C. G., Collins-Underwood, J. R., Phillips, L. A. A., Loudin, M. G., Liu, W., Zhang, J., Ma, J., Coustan-Smith, E., Harvey, R. C., Willman, C. L., Mikhail, F. M., Meyer, J., Carroll, A. J., Williams, R. T., Cheng, J., Heerema, N. A., Basso, G., Pession, A., Pui, C.-H., ... Rabin, K. R. (2009). Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down

- syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, 41(11), 1243-1246. <https://doi.org/10.1038/ng.469>
- Mutación. (s. f.). Recuperado 7 de junio de 2023, de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Mutacion>
- Naughton, M. A., Battaglia, E., O'Brien, S., Walport, M. J., & Botto, M. (1999). Identification of thiopurine methyltransferase (TPMT) polymorphisms cannot predict myelosuppression in systemic lupus erythematosus patients taking azathioprine. *Rheumatology (Oxford, England)*, 38(7), 640-644. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/38.7.640>
- Ojha, R. P., & Thertulien, R. (2005). Health care policy issues as a result of the genetic revolution: Implications for public health. *American Journal of Public Health*, 95(3), 385-388. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2003.026708>
- Okada, Y., Nakamura, K., Wada, M., Nakamura, T., Tsukamoto, N., Nojima, Y., Horiuchi, R., & Yamamoto, K. (2005). Genotyping of thiopurine methyltransferase using pyrosequencing. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(4), 677-681. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.677>
- Ota, M., Fukushima, H., Kulski, J. K., & Inoko, H. (2007). Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nature Protocols*, 2(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.407>
- Park, Y., Kim, H., Choi, J. Y., Yun, S., Min, B.-J., Seo, M.-E., Im, H. J., Kang, H. J., & Kim, J. H. (2019). Star Allele-Based Haplotyping versus Gene-Wise Variant Burden Scoring for Predicting 6-Mercaptopurine Intolerance in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 654. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00654>
- Paugh, S. W., Stocco, G., & Evans, W. E. (2010). Pharmacogenomics in pediatric leukemia. *Current Opinion in Pediatrics*, 22(6), 703-710. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32833fde85>
- Paul, S., Kantarjian, H., & Jabbour, E. J. (2016). Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clinic Proceedings*, 91(11), 1645-1666. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.09.010>

- pellet: Definición de pellet y sinónimos de pellet (español). (s. f.). Recuperado 7 de junio de 2023, de <https://diccionario.sensagent.com/pellet/es-es/>
- Petersen, B.-S., Fredrich, B., Hoepfner, M. P., Ellinghaus, D., & Franke, A. (2017). Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genetics*, 18, 14. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0479-5>
- Polymorphism. (s. f.). Recuperado 7 de junio de 2023, de <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymorphism>
- Pratt, V. M., Cavallari, L. H., Fulmer, M. L., Gaedigk, A., Hachad, H., Ji, Y., Kalman, L. V., Ly, R. C., Moyer, A. M., Scott, S. A., van Schaik, R. H. N., Whirl-Carrillo, M., & Weck, K. E. (2022). TPMT and NUDT15 Genotyping Recommendations: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium, College of American Pathologists, Dutch Pharmacogenetics Working Group of the Royal Dutch Pharmacists Association, European Society for Pharmacogenomics and Personalized Therapy, and Pharmacogenomics Knowledgebase. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 24(10), 1051-1063. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.06.007>
- Pui, C.-H. (2009). Toward a total cure for acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(31), 5121-5123. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.8518>
- Pui, C.-H., & Evans, W. E. (2013). A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in Hematology*, 50(3), 185-196. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2013.06.007>
- Pui, C.-H., Mullighan, C. G., Evans, W. E., & Relling, M. V. (2012). Pediatric acute lymphoblastic leukemia: Where are we going and how do we get there? *Blood*, 120(6), 1165-1174. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-378943>
- Pui, C.-H., Robison, L. L., & Look, A. T. (2008). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet (London, England)*, 371(9617), 1030-1043. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60457-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60457-2)

- Relling, M. V., Gardner, E. E., Sandborn, W. J., Schmiegelow, K., Pui, C.-H., Yee, S. W., Stein, C. M., Carrillo, M., Evans, W. E., Hicks, J. K., Schwab, M., & Klein, T. E. (2013). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Thiopurine Methyltransferase Genotype and Thiopurine Dosing: 2013 Update. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 93(4), 324-325. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.4>
- Relling, M. V., Schwab, M., Whirl-Carrillo, M., Suarez-Kurtz, G., Pui, C.-H., Stein, C. M., Moyer, A. M., Evans, W. E., Klein, T. E., Antillon-Klussmann, F. G., Caudle, K. E., Kato, M., Yeoh, A. E. J., Schmiegelow, K., & Yang, J. J. (2019). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for Thiopurine Dosing Based on TPMT and NUDT15 Genotypes: 2018 Update. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 105(5), 1095-1105. <https://doi.org/10.1002/cpt.1304>
- Rivera, G. K., & Ribeiro, R. C. (2014). Improving treatment of children with acute lymphoblastic leukemia in developing countries through technology sharing, collaboration, and partnerships. *Expert review of hematology*, 7(5), 649-657. <https://doi.org/10.1586/17474086.2014.949233>
- Rudin, S., Marable, M., & Huang, R. S. (2017). The Promise of Pharmacogenomics in Reducing Toxicity During Acute Lymphoblastic Leukemia Maintenance Treatment. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 15(2), 82-93. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.11.003>
- Samochatova, E. V., Chupova, N. V., Rudneva, A., Makarova, O., Nasedkina, T. V., Fedorova, O. E., Glotov, A. S., Kozhekbaeva, Z., Maiorova, O. A., Roumyantsev, A. G., Krynetski, E. Y., Krynetskaia, N. F., Evans, W. E., & Ribeiro, R. C. (2009). TPMT genetic variations in populations of the Russian Federation. *Pediatric Blood & Cancer*, 52(2), 203-208. <https://doi.org/10.1002/pbc.21837>
- Scavino, H. F., George, J. N., & Sears, D. A. (1976). Remission induction in adult acute lymphocytic leukemia. Use of vincristine and prednisone alone. *Cancer*, 38(2), 672-677. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197608\)38:2<672::aid-cnrcr2820380208>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197608)38:2<672::aid-cnrcr2820380208>3.0.co;2-c)

- Schaeffeler, E., Jaeger, S. U., Klumpp, V., Yang, J. J., Igel, S., Hinze, L., Stanulla, M., & Schwab, M. (2019). Impact of NUDT15 genetics on severe thiopurine-related hematotoxicity in patients with European ancestry. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 21(9), 2145-2150. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0448-7>
- Schmiegelow, K. (2009). Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: A review. *British Journal of Haematology*, 146(5), 489-503. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07765.x>
- Schmiegelow, K., Nielsen, S. N., Frandsen, T. L., & Nersting, J. (2014). Mercaptopurine/Methotrexate maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia: Clinical facts and fiction. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 36(7), 503-517. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000000206>
- Schuster, S. C. (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods*, 5(1), 16-18. <https://doi.org/10.1038/nmeth1156>
- Sehgal, S., Mujtaba, S., Gupta, D., Aggarwal, R., & Marwaha, R. K. (2010). High incidence of Epstein Barr virus infection in childhood acute lymphocytic leukemia: A preliminary study. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, 53(1), 63-67. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.59186>
- Sen, S., & Burmeister, M. (2008). Hardy-Weinberg analysis of a large set of published association studies reveals genotyping error and a deficit of heterozygotes across multiple loci. *Human Genomics*, 3(1), 36-52. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-1-36>
- Serpe, L., Calvo, P. L., Muntoni, E., D'Antico, S., Giaccone, M., Avagnina, A., Baldi, M., Barbera, C., Curti, F., Pera, A., Eandi, M., Zara, G. P., & Canaparo, R. (2009). Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics in a large-scale healthy Italian–Caucasian population: Differences in enzyme activity. *Pharmacogenomics*, 10(11), 1753-1765. <https://doi.org/10.2217/pgs.09.103>
- Shah, A., John, B. M., & Sondhi, V. (2013). Acute lymphoblastic leukemia with treatment—Naive Fanconi anemia. *Indian Pediatrics*, 50(5), 508-510.

- Shastri, B. S. (2007). SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution. *Journal of Human Genetics*, 52(11), 871-880. <https://doi.org/10.1007/s10038-007-0200-z>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(1), 7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7-34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Singh, M., Bhatia, P., Khera, S., & Trehan, A. (2017). Emerging role of NUDT15 polymorphisms in 6-mercaptopurine metabolism and dose related toxicity in acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia Research*, 62, 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2017.09.012>
- Smith, M. A., Seibel, N. L., Altekruse, S. F., Ries, L. A. G., Melbert, D. L., O'Leary, M., Smith, F. O., & Reaman, G. H. (2010). Outcomes for children and adolescents with cancer: Challenges for the twenty-first century. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(15), 2625-2634. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.0421>
- Sobrino, B., Brión, M., & Carracedo, A. (2005). SNPs in forensic genetics: A review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International*, 154(2), 181-194. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.10.020>
- Spire-Vayron de la Moureyre, C., Debuysere, H., Mastain, B., Vinner, E., Marez, D., Lo Guidice, J. M., Chevalier, D., Brique, S., Motte, K., Colombel, J. F., Turck, D., Noel, C., Flipo, R. M., Pol, A., Lhermitte, M., Lafitte, J. J., Libersa, C., & Broly, F. (1998). Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *British Journal of Pharmacology*, 125(4), 879-887. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702152>
- Spire-Vayron de la Moureyre, C., Debuysère, H., Sabbagh, N., Marez, D., Vinner, E., Chevalier, E. D., Lo Guidice, J. M., & Broly, F. (1998). Detection of known and new mutations in the thiopurine S-methyltransferase gene by single-strand conformation polymorphism analysis. *Human Mutation*, 12(3), 177-185.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1998\)12:3<177::AID-HUMU5>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1998)12:3<177::AID-HUMU5>3.0.CO;2-E)

- Streubel, B., Sauerland, C., Heil, G., Freund, M., Bartels, H., Lengfelder, E., Wandt, H., Ludwig, W. D., Nowotny, H., Baldus, M., Grothaus-Pinke, B., Büchner, T., & Fonatsch, C. (1998). Correlation of cytogenetic, molecular cytogenetic, and clinical findings in 59 patients with ANLL or MDS and abnormalities of the short arm of chromosome 12. *British Journal of Haematology*, 100(3), 521-533. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00591.x>
- Suiter, C. C., Moriyama, T., Matreyek, K. A., Yang, W., Scaletti, E. R., Nishii, R., Yang, W., Hoshitsuki, K., Singh, M., Trehan, A., Parish, C., Smith, C., Li, L., Bhojwani, D., Yuen, L. Y. P., Li, C.-K., Li, C.-H., Yang, Y.-L., Walker, G. J., ... Yang, J. J. (2020). Massively parallel variant characterization identifies NUDT15 alleles associated with thiopurine toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(10), 5394-5401. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915680117>
- Tai, H. L., Krynetski, E. Y., Schuetz, E. G., Yanishevski, Y., & Evans, W. E. (1997). Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT*3A, TPMT*2): Mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), 6444-6449. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6444>
- Tamm, R., Oselin, K., Kallassalu, K., Magi, R., Anier, K., Remm, M., & Metspalu, A. (2008). Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) pharmacogenetics: Three new mutations and haplotype analysis in the Estonian population. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 46(7), 974-979. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2008.187>
- Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., Bindal, N., Boutselakis, H., Cole, C. G., Creatore, C., Dawson, E., Fish, P., Harsha, B., Hathaway, C., Jupe, S. C., Kok, C. Y., Noble, K., Ponting, L., Ramshaw, C. C., Rye, C. E., ... Forbes, S. A. (2019). COSMIC: The

- Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D941-D947. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1015>
- Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: A comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*, 7(6), e577. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53>
- Toksvang, L. N., Lee, S. H. R., Yang, J. J., & Schmiegelow, K. (2022). Maintenance therapy for acute lymphoblastic leukemia: Basic science and clinical translations. *Leukemia*, 36(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01591-4>
- Transcriptoma [Transcriptome] (Genética). (s. f.). Recuperado 7 de junio de 2023, de <https://glosarios.servidor-alicante.com/genetica/transcriptoma>
- Tumer, T. B., Ulusoy, G., Adalı, O., Sahin, G., Gozdasoglu, S., & Arinc, E. (2007). The low frequency of defective TPMT alleles in Turkish population: A study on pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. <https://doi.org/10.1002/ajh.20947>
- Vázquez Escribano, A., & Vázquez Escribano, A. (2016, junio). Técnicas de secuenciación de nueva generación para el estudio del microbioma humano[Info:eu-repo/semantics/bachelorThesis]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/51037/>
- Venkatakrishnan, K., Burgess, C., Gupta, N., Suri, A., Takubo, T., Zhou, X., DeMuria, D., Lehnert, M., Takeyama, K., Singhvi, S., & Milton, A. (2016). Toward Optimum Benefit-Risk and Reduced Access Lag For Cancer Drugs in Asia: A Global Development Framework Guided by Clinical Pharmacology Principles. *Clinical and Translational Science*, 9(1), 9-22. <https://doi.org/10.1111/cts.12386>
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., ... Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5507), 1304-1351. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>
- Wang, S., Wang, Z., Tao, R., Song, F., & Hou, Y. (2019). Validating the consistency of cSNPs analysis results between DNA and RNA using SNaPshot method. *Forensic Science International: Genetics*

- Supplement Series, 7(1), 76-78.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.09.030>
- Wehrli, L. A., Braun, J., Buetti, L. N., Hagleitner, N., Hengartner, H., Kühne, T., Lüer, S., Ozsahin, H., Popovic, M. B., Niggli, F. K., Betts, D. R., & Bourquin, J.-P. (2009). Non-classical karyotypic features in relapsed childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 189(1), 29-36.
<https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2008.10.002>
- Wu, C., & Li, W. (2018). Genomics and pharmacogenomics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 126, 100-111. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.04.002>
- Yang, J. J., Landier, W., Yang, W., Liu, C., Hageman, L., Cheng, C., Pei, D., Chen, Y., Crews, K. R., Kornegay, N., Wong, F. L., Evans, W. E., Pui, C.-H., Bhatia, S., & Relling, M. V. (2015). Inherited NUDT15 variant is a genetic determinant of mercaptopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(11), 1235-1242. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4671>
- Yang, J. J., Whirl-Carrillo, M., Scott, S. A., Turner, A. J., Schwab, M., Tanaka, Y., Suarez-Kurtz, G., Schaeffeler, E., Klein, T. E., Miller, N. A., & Gaedigk, A. (2019). Pharmacogene Variation Consortium Gene Introduction: NUDT15. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 105(5), 1091-1094. <https://doi.org/10.1002/cpt.1268>
- Yang, S.-K., Hong, M., Baek, J., Choi, H., Zhao, W., Jung, Y., Haritunians, T., Ye, B. D., Kim, K.-J., Park, S. H., Park, S.-K., Yang, D.-H., Dubinsky, M., Lee, I., McGovern, D. P. B., Liu, J., & Song, K. (2014). A common missense variant in NUDT15 confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia. *Nature Genetics*, 46(9), 1017-1020.
<https://doi.org/10.1038/ng.3060>
- Yoshihara, K., Wang, Q., Torres-Garcia, W., Zheng, S., Vegesna, R., Kim, H., & Verhaak, R. G. W. (2015). The landscape and therapeutic relevance of cancer-associated transcript fusions. *Oncogene*, 34(37), 4845-4854.
<https://doi.org/10.1038/onc.2014.406>

- Yu, C.-H., Chang, Y.-H., Wang, D.-S., Jou, S.-T., Lin, C.-Y., Lin, K.-H., Lu, M.-Y., Raghav, L., Chang, H.-H., Wu, K.-H., Chou, S.-W., Ni, Y.-L., Lin, D.-T., Lin, S.-W., Chen, H.-Y., & Yang, Y.-L. (2020). Determination of NUDT15 variants by targeted sequencing can identify compound heterozygosity in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71468-y>
- Zimm, S., Collins, J. M., Riccardi, R., O'Neill, D., Narang, P. K., Chabner, B., & Poplack, D. G. (1983). Variable bioavailability of oral mercaptopurine. Is maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia being optimally delivered? *The New England Journal of Medicine*, 308(17), 1005-1009. <https://doi.org/10.1056/NEJM198304283081705>

ANEXOS

Anexo 1. Aprobación del Comité de Ética del INSNSB



San Borja, 20 de octubre del 2022

OFICIO N° 065- 2022-CIEI-INSN-SAN BORJA

Señor Doctor
Jorge Contreras Saavedra
 Investigador Principal

De mi consideración:

Es grato dirigirme a usted a nombre del Comité Institucional de Ética en Investigación del INSNSB, para saludarlo cordialmente e informarle en relación a su solicitud de extensión del proyecto de investigación PI-364, titulado: **“POLIMORFISMOS EN LOS GENES ASOCIADOS A CAMBIOS EN EL METABOLISMO DE TIOPURINAS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA”** el Comité Institucional de Ética en Investigación del INSNSB, que presido lo aprueba.

La vigencia de esta aprobación es desde el 26 de setiembre del 2022 al 25 de setiembre del 2023.

De requerir prórroga de esta autorización, los trámites deberán iniciarse 30 días antes de su vencimiento.

Aprovecho la oportunidad para reiterarle a usted los sentimientos de mi consideración y estima personal.

Atentamente,

Elías Melitón Arce Rodríguez
 Presidente
 Comité Institucional de Ética en Investigación
 Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja

Anexo 2. Presupuesto del Fondo Concursable 2019 (PI-364-201)

RESUMEN DEL PRESUPUESTO POR APORTANTE				
PARTICIPANTES	Aporte Monetario	Aporte No Monetario	Aporte Total	Distribución de Aportes
INSN-SB - SERVICIO	S/. 0.00	S/. 296,400.00	S/. 296,400.00	0.561672131
INSN-SB - SUIT	S/. 0.00	S/. 31,000.00	S/. 31,000.00	0.058744386
INSN-SB - FONDO DE INVESTIGACION	S/. 200,310.00	S/. 0.00	S/. 200,310.00	0.379583483
EXTERNO	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	0
TOTAL	S/. 200,310.00	S/. 327,400.00	S/. 527,710.00	100.00%

Porcentaje de total del aporte monetario del proyecto	S/. 200,310.00	0.379583483
Porcentaje (proporción) del aporte monetario del Fondo de Investigación	S/. 200,310.00	1

RESUMEN DEL PRESUPUESTO POR RUBROS FINANCIABLES										
RUBROS	PARTICIPANTES								TOTAL	
	INSN-SB - SERVICIO		INSN-SB - SUIT		INSN-SB - FONDO DE INVESTIGACION		EXTERNO		Aporte Monetario	Aporte No Monetario
	Aporte Monetario	Aporte No Monetario	Aporte Monetario	Aporte No Monetario	Aporte Monetario	Aporte No Monetario	Aporte Monetario	Aporte No Monetario		
I. RECURSOS HUMANOS	S/. 0.00	S/. 90,000.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 14,400.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 14,400.00	S/. 90,000.00
II. EQUIPOS Y BIENES DURADEROS	S/. 0.00	S/. 204,000.00	S/. 0.00	S/. 31,000.00	S/. 25,388.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 25,388.00	S/. 235,000.00
III. GASTOS OPERATIVOS	S/. 0.00	S/. 2,400.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 160,522.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 160,522.00	S/. 2,400.00
3.1 Insumos y materiales	S/. 0.00	S/. 2,400.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 156,522.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 156,522.00	S/. 2,400.00
3.2 Servicio de terceros	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00
3.3 Gastos varios	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 4,000.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 4,000.00	S/. 0.00
IV. GASTOS ADMINISTRATIVOS	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00
TOTAL S/.	S/. 0.00	S/. 296,400.00	S/. 0.00	S/. 31,000.00	S/. 200,310.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 0.00	S/. 200,310.00	S/. 327,400.00

Anexo 3. Consentimiento informado para el padre y/o apoderado

Título: POLIMORFISMOS EN LOS GENES ASOCIADOS A CAMBIOS EN EL METABOLISMO DE TIOPURINAS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Información General

Mi nombre es, trabajo en el Instituto Nacional de Salud del Niño-San Borja (otra institución, si aplica). Estamos realizando un trabajo de investigación que tiene como objetivo conocer los cambios genéticos en los niños con leucemias asociados a riesgo de toxicidad al tratamiento.

Procedimientos que se llevarán a cabo en este proyecto de investigación

Para realizar nuestro estudio queremos pedirle una muestra de sangre de 3 ml (una cucharita de té) de su hijo/hija o representado.

De la sangre obtendremos material genético para analizar en nuestro estudio. La muestra de sangre será extraída el día que el/la paciente tenga otros exámenes de laboratorio del servicio de hematología, en otras palabras, aprovecharemos la oportunidad para realizar la toma de muestra en un solo pinchazo en el brazo.

Participación

La participación de su niño(a) en este estudio es completamente libre y voluntaria, y que tiene derecho a negarse a participar. Si el niño participa o no, la atención médica de su hijo/a o representado no se modificará ni mucho menos se verá perjudicada.

Riesgos/ Inconvenientes

El estudio no causara ningún inconveniente al niño ya que la muestra la tomaremos el día en que se realicen otros análisis de rutina. El médico tratante autorizara la toma de esta muestra

Beneficios

Su hijo/a o representado no se beneficiará directamente de los resultados obtenidos en este estudio. Los resultados finales del estudio tendrán un impacto en el conocimiento de las leucemias de los niños pediátricos peruanos.

Gastos/ Costos

El estudio no generará ningún gasto a usted, no se realizará ningún pago por las pruebas del estudio.

Confidencialidad y privacidad de los datos

Nadie sabrá de la participación de su hijo(a) en el estudio. Una vez que se toma la muestra esta se identificará con un código y no se sabrá más a quien pertenece la muestra. Tampoco se dará los resultados de los análisis.

Al término del estudio las muestras podrán ser utilizadas para futuros trabajos de investigación en relación a la enfermedad en estudio, ya que no se sabrán a quien pertenecen.

Si usted tiene alguna duda al respecto de esta investigación o siente que sus derechos son vulnerados puede contactarte con la Dr. Luis Uribe Ramírez investigador principal del estudio, al teléfono 945333586 y/o su correo electrónico: luribe@insnsb.gob.pe. También podrá contactarse con el Presidente del Comité Institucional de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Salud del Niño-San Borja, el Dr. Melitón Arce al teléfono 999419096 o al correo electrónico rhuamani@insnsb.gob.pe. Asimismo, si surge alguna duda pueden acercarse al Comité Institucional de Ética e Investigación del INSN - SB (CIEI) localizado en Av. Agustín de la Rosa Toro 1399 - San Borja, Lima.

DECLARACION DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Confirmando haber leído y comprendido la información proporcionada en este consentimiento informado. Confirmando que también he tenido la oportunidad de hacer preguntas y he recibido respuestas con una explicación entendible. He sido informado del propósito, procedimientos, riesgos, y beneficios de este estudio de investigación a fin de decidir proporcionar la muestra biológica de mi menor hijo/a o representado. Comprendo que la participación es voluntaria. Comprendo que mi hijo/a o representado no ha renunciado a ninguno de sus derechos al permitir ingresar al este estudio. Así mismo doy mi autorización para que las muestras recolectadas en este estudio sean utilizadas en futuros estudios relacionados con esta enfermedad.

Comprendo que recibiré una copia firmada y con fecha de este consentimiento informado.

Nombre del Padre o apoderado:

DNI: _____

Firma: _____

Fecha: / /

Nombre del testigo:

DNI: _____

Firma: _____

Fecha: / /

Nombre de la persona que aplica el consentimiento:

DNI: _____

Firma: _____

Fecha: / /

Anexo 4. Asentimiento informado

Título: POLIMORFISMOS EN LOS GENES ASOCIADOS A CAMBIOS EN EL METABOLISMO DE TIOPURINAS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Hola mi nombre es....., personal del servicio de Genética (Hematología) del Instituto Nacional de Salud del Niño-San Borja (otra institución, si aplica).

Deseamos saber si hay cambios en algunos genes que hacen que el tratamiento sea diferente en niños con enfermedades de la sangre. Nuestros genes son como las palabras que se componen de letras, pero si una de esas letras cambia, la palabra cambia. Por ejemplo, cuando decimos “color”, tiene diferente significado a decir “calor”.

Para saber si hay algunos de estos cambios en tu sangre, nos gustaría pedirte un poco de tu sangre, aproximadamente una cucharita de té (3 mL). No te preocupes por que la muestra la tomaremos cuando te realicen otros exámenes de laboratorio; para así evitar que te hagan un nuevo pinchazo.

En algunos casos excepcionales podemos obtener muestras (sobrantes) de la sangre obtenida de hueso como parte de exámenes de laboratorio dentro de tu hospitalización.

Tu participación en el estudio es voluntaria y no cambiara la atención que te dan en el hospital. Nadie sabrá que eres parte de este estudio, tampoco sabrán de los resultados de tus análisis.

Si tienes alguna duda sobre esta investigación, tus padres podrán llamar Dr. Luis Uribe Ramírez investigador principal del estudio al teléfono 945333586 y/o su correo luribe@insnsb.gob.pe. También podrán comunicarse con el Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud del Niño-San Borja, el Dr. Melitón Arce, al teléfono 999419096 o al correo electrónico rhuamani@insnsb.gob.pe; así como acercarse al Comité Institucional de Ética e Investigación del INSN - SB (CIEI) localizado en Av. Agustín de la Rosa Toro 1399 - San Borja, Lima.

Yo.....Declaro
que he leído la hoja de asentimiento que se me ha entregado y comprendo su
contenido por lo que**Acepto** o **No acepto** participar en este
estudio.

Nombre del niño y/o niña y/o adolescente:

DNI: _____

Firma: _____

Fecha: / /

HUELLA

Nombre del testigo:

DNI: _____

Firma: _____

Fecha: / /

HUELLA

Nombre de la persona que aplica el consentimiento:

DNI: _____

Firma: _____

Fecha: / /

HUELLA

Anexo 5. Ficha de Recolección de Datos

Número	Código paciente	Fecha	Sexo	F.N	Muestra Biológica	Procedencia	Variante <i>TPMT</i>	Variante <i>NUDT15</i>	Datos Clínicos			Alteración genética	
									Riesgo Clínico	Conteo de leucocitos al ingreso	Hallazgos de biopsia de médula	Citogenética	Molecular
					Sangre o Médula ósea								

Fuente. *Elaboración propia*

Anexo 6. Cuantificación de ADN de las 80 muestras en estudio

NGS - 1				NGS - 2			
Código	ng/uL inicial	Dilución de ADN (20 µl) a 4ng/µl		Código	ng/uL inicial	Dilución de ADN (20 µl) a 4ng/µl	
		ADN (uL)	Low TE (uL)			ADN (uL)	Low TE (uL)
TN-001	39.4	2.0	18.0	TN-041	28.8	2.8	17.2
TN-002	37.4	2.1	17.9	TN-042	49.4	1.6	18.4
TN-003	29.2	2.7	17.3	TN-043	33.8	2.4	17.6
TN-004	22.8	3.5	16.5	TN-044	40.5	2.0	18.0
TN-005	23.6	3.4	16.6	TN-045	35.0	2.3	17.7
TN-006	39.6	2.0	18	TN-046	30.2	2.6	17.4
TN-007	28.8	2.8	17.2	TN-047	44.6	1.8	18.2
TN-008	41.8	1.9	18.1	TN-048	41.6	1.9	18.1
TN-009	49.2	1.6	18.4	TN-049	42.4	1.9	18.1
TN-010	23.1	3.5	16.5	TN-050	34.8	2.3	17.7
TN-011	25.2	3.2	16.8	TN-051	27.0	3.0	17.0
TN-012	45.4	1.8	18.2	TN-052	23.7	3.4	16.6
TN-013	49.4	1.6	18.4	TN-053	29.8	2.7	17.3
TN-014	33.8	2.4	17.6	TN-054	31.4	2.5	17.5
TN-015	45.0	1.8	18.2	TN-055	44.7	1.8	18.2
TN-016	42.4	1.9	18.1	TN-056	25.6	3.1	16.9
TN-017	25.4	3.1	16.9	TN-057	23.1	3.5	16.5
TN-018	29.5	2.7	17.3	TN-058	20.1	4.0	16.0
TN-019	39.2	2.0	18.0	TN-059	28.1	2.8	17.2
TN-020	24.5	3.3	16.7	TN-060	42.1	1.9	18.1
TN-021	28.0	2.9	17.1	TN-061	23.2	3.4	16.6
TN-022	44.6	1.8	18.2	TN-062	33.6	2.4	17.6
TN-023	49.5	1.6	18.4	TN-063	39.5	2.0	18.0
TN-024	46.6	1.7	18.3	TN-064	35.3	2.3	17.7
TN-025	28.1	2.8	17.2	TN-065	24.8	3.2	16.8
TN-026	40.8	2.0	18.0	TN-066	21.7	3.7	16.3
TN-027	26.9	3.0	17.0	TN-067	23.9	3.3	16.7
TN-028	35.6	2.2	17.8	TN-068	46.1	1.7	18.3
TN-029	39.8	2.0	18.0	TN-069	45.0	1.8	18.2
TN-030	22.6	3.5	16.5	TN-070	49.3	1.6	18.4
TN-031	38.8	2.1	17.9	TN-071	24.5	3.6	16.7
TN-032	43.4	1.8	18.2	TN-072	42.5	1.9	18.1
TN-033	33.8	2.4	17.6	TN-073	41.4	1.9	18.1
TN-034	28.8	2.8	17.2	TN-074	30.7	2.6	17.4
TN-035	25.1	3.2	16.8	TN-075	24.7	3.2	16.8
TN-036	33.4	2.4	17.6	TN-076	37.9	2.1	17.9
TN-037	34.2	2.3	17.7	TN-077	20.0	4.0	16.0
TN-038	25.2	3.2	16.8	TN-078	46.3	1.7	18.3
TN-039	44.8	1.8	18.2	TN-079	24.5	3.3	16.7
TN-040	38.7	2.1	17.9	TN-080	26.1	3.1	16.9
Control	40.6	2.0	18.0	Control	45.0	1.8	18.2

Fuente. Elaboración propia

Anexo 7. Cuantificación de las librerías de las 80 muestras en estudio

NGS - 1					NGS - 2				
Código	ng/uL inicial	nM inicial	Librería 2nM (20 µl)		Código	ng/uL inicial	nM inicial	Librería 2nM (20 µl)	
			Librería(uL)	Low TE (uL)				Librería(uL)	Low TE (uL)
TN-001	3.5	10.9	3.6	16.4	TN-041	10.5	32.5	1.2	18.8
TN-002	4.8	14.9	2.6	17.4	TN-042	9.5	29.3	1.4	18.6
TN-003	3.9	12.0	3.4	16.6	TN-043	7.5	23.3	1.8	18.2
TN-004	6.3	19.5	2.0	18.0	TN-044	6.1	19.0	2.2	17.8
TN-005	4.4	13.6	3.0	17.0	TN-045	5.3	16.3	2.4	17.6
TN-006	5.0	15.3	2.6	17.4	TN-046	3.7	11.3	3.6	16.4
TN-007	9.1	28.1	1.4	18.6	TN-047	3.7	11.5	3.4	16.6
TN-008	6.2	19.4	2.0	18.0	TN-048	3.8	11.7	3.4	16.6
TN-009	4.9	15.1	2.6	17.4	TN-049	6.4	19.8	2.0	18.0
TN-010	12.4	38.3	1.0	19.0	TN-050	5.8	18.0	2.2	17.8
TN-011	2.9	8.9	4.4	15.6	TN-051	15.0	46.4	0.9	19.1
TN-012	2.7	8.3	4.8	15.2	TN-052	15.4	47.6	0.8	19.2
TN-013	3.9	12.0	3.4	16.6	TN-053	26.8	82.9	0.5	19.5
TN-014	4.3	13.3	3.0	17.0	TN-054	13.4	41.4	1.0	19.0
TN-015	18.0	55.7	0.7	19.3	TN-055	24.3	75.1	0.5	19.5
TN-016	6.7	20.6	2.0	18.0	TN-056	14.3	44.2	0.9	19.1
TN-017	7.8	24.1	1.6	18.4	TN-057	18.0	55.7	0.7	19.3
TN-018	2.1	6.6	6.2	13.8	TN-058	16.4	50.7	0.8	19.2
TN-019	1.6	4.9	8.2	11.8	TN-059	17.5	54.1	0.7	19.3
TN-020	2.7	8.3	4.8	15.2	TN-060	22.1	68.3	0.6	19.4
TN-021	8.5	26.4	1.6	18.4	TN-061	13.0	40.2	1.0	19.0
TN-022	11.7	36.2	1.1	18.9	TN-062	15.8	48.9	0.8	19.2
TN-023	13.0	40.2	1.0	19.0	TN-063	5.1	15.8	2.5	17.5
TN-024	8.7	26.7	1.4	18.6	TN-064	15.2	47.0	0.9	19.1
TN-025	6.3	19.5	2.0	18.0	TN-065	16.6	51.3	0.8	19.2
TN-026	5.6	17.3	2.4	17.6	TN-066	19.8	61.2	0.7	19.3
TN-027	8.9	27.6	1.4	18.6	TN-067	11.8	36.5	1.1	18.9
TN-028	9.0	27.7	1.4	18.6	TN-068	19.3	59.7	0.7	19.3
TN-029	4.6	14.1	2.8	17.2	TN-069	15.8	48.9	0.8	19.2
TN-030	11.1	34.4	1.2	18.8	TN-070	12.2	37.7	1.1	18.9
TN-031	3.3	10.3	3.8	16.2	TN-071	14.2	43.9	0.9	19.1
TN-032	6.7	20.7	2.0	18.0	TN-072	18.5	57.2	0.7	19.3
TN-033	7.2	22.2	1.8	18.2	TN-073	10.4	32.2	1.2	18.8
TN-034	7.5	23.2	1.8	18.2	TN-074	13.6	42.1	1.0	19.0
TN-035	8.3	25.6	1.6	18.4	TN-075	12.5	38.7	1.0	19.0
TN-036	3.6	11.1	3.6	16.4	TN-076	12.7	39.3	1.0	19.0
TN-037	6.7	20.7	2.0	18.0	TN-077	11.4	35.3	1.1	18.9
TN-038	7.4	22.9	1.8	18.2	TN-078	12.5	38.7	1.0	19.0
TN-039	15.3	47.3	0.8	19.2	TN-079	13.8	42.7	0.9	19.1
TN-040	1.3	3.9	10.2	9.8	TN-080	13.6	42.1	1.0	19.0
Control	7.8	24.1	1.6	18.4	Control	14.6	45.1	0.9	19.1

Fuente. Elaboración propia

Anexo 8: Casos seleccionados para los genes *TPMT* y *NUDT15* con sus características demográficas, laboratoriales y genotipificación del NGS asociados a su fenotipo

Código	Sexo	Edad (años)	Linaje LLA	Panel Molecular	Citogenética	Genotipo (<i>TPMT</i>)	Fenotipo (<i>TPMT</i>)	Genotipo (<i>NUDT15</i>)	Fenotipo (<i>NUDT15</i>)
TN-033	M	6	B	Negativo	52,XY,+X,+5,+8,+10,+21,+21[1]/52,idem,i(17)(q10)[1]/46,XY[5]	*1/*3A	metabolizador intermedio	1/*1	metabolizador normal
TN-040	F	17	B	Negativo	46,XX,del(9)(p21)[4]/46,XX[16]	*1/*1	metabolizador normal	*1/*3	metabolizador intermedio
TN-050	M	4	B	<i>TEL-AML1</i>	46,XY,del(12)(p13)[15]/46,XY[5]	*1/*3A	metabolizador intermedio	*1/*1	metabolizador normal
TN-056	M	2	B	Negativo	46,XY,t(16;20)(q24;q11.2)[20]	*1/*1A	metabolizador intermedio	*1/*3	metabolizador intermedio

Fuente. Elaboración propia