

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Correlación del perfil genético de los genes
TPMT y *NUDT15* con los efectos
secundarios del tratamiento en pacientes
pediátricos con Leucemia Linfoide Aguda en
tratamiento de mantenimiento en la
Fundación HOMI Hospital de la Misericordia
durante el 2017**

Óscar Leonardo Correa Jiménez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Pediatría
Bogotá, D.C., Colombia

2019

**Correlación del perfil genético de los genes
TPMT y *NUDT15* con los efectos
secundarios del tratamiento en pacientes
pediátricos con Leucemia Linfocítica Aguda en
tratamiento de mantenimiento en la
Fundación HOMI Hospital de la Misericordia
durante el 2017**

Óscar Leonardo Correa Jiménez

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Especialista en Pediatría

Directora:
Doctora Isabel Cristina Sarmiento Urbina
Oncohematóloga Pediatra

Codirectora:
Doctora Adriana Linares Ballesteros
Oncohematóloga Pediatra

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Pediatría
Bogotá, D.C., Colombia

2019

"No matter what your age and no matter where you come from, everyone can change the world in some way, whether it's being a mentor to someone younger than you or someone that doesn't have as much experience as you. If you're passionate enough, you can do whatever you want and definitely change the world."

Josh Groban.

Agradecimientos

Deseo aprovechar esta sección para expresar mis más sinceros agradecimientos a todos los que han hecho posible el logro en la ejecución de este trabajo, así como también a quienes me han acompañado en la meta colateral de ser pediatra.

En primer lugar, agradezco a Dios por todas las bendiciones recibidas, pero sobre todo por permitirme ser consciente de que nunca me ha abandonado ante adversidades y pruebas. *A mi familia: mi madre y mis hermanos*, quienes aun a la distancia me demuestran a diario su apoyo y amor incondicional.

Mi eterna gratitud a mi tutora: *Dra. Isabel Sarmiento*, gracias por su comprensión, apoyo e incondicional orientación y guía durante el desarrollo de este proyecto. A mi cotutora *Dra. Adriana Linares*, por su apoyo y acompañamiento en la ejecución de este proyecto. A ambas gracias por servir de modelos a seguir tanto en lo profesional como en lo personal, también les agradezco haberme acogido en su grupo de investigación y darme esta oportunidad de crecimiento científico. Al Dr. Juan Yunis por el acompañamiento en los ensayos de laboratorio.

Agradezco a los *profesores del Departamento de Pediatría de la Universidad Nacional de Colombia* por las enseñanzas. Pero de entre ellos, mis más sinceros sentimientos de gratitud y admiración para la *Dra. Sonia Restrepo*, ha sido un gran honor ser su estudiante y tener la oportunidad de poder realizar trabajos académicos y científicos adicionales bajo su orientación, pero sobre todo por la palabra precisa en el momento oportuno y por su apoyo incondicional para la consecución de uno de mis sueños. Extender mis agradecimientos a la Dra. Milena Villamil por los consejos y la cooperación académico/científica.

Debo mencionar también a *HOMI Fundación Hospital de la Misericordia* por prestar sus instalaciones, para el desarrollo de mis actividades de formación y la atención de los pacientes incluidos en el estudio. A estos últimos, mi mayor reconocimiento pues sin su voluntad y la de sus familiares, este proyecto no habría sido posible.

Finalmente, a mis amigos: a los viejos –*Andrea, Carla, Enrique, Kelly y Nel*- y a los nuevos –*Dianita, Marce*-, por su apoyo y recordarme a diario que vale más tener amigos de dinero.

Este proyecto ha sido financiado por la Universidad Nacional de Colombia mediante la Convocatoria Nacional de Proyectos para el Fortalecimiento de la Investigación de la Universidad Nacional de Colombia 2016-2018, Código 35872.

Resumen

Objetivo: Correlacionar el perfil genético de los genes *TPMT* y *NUDT15* con los efectos secundarios del tratamiento en pacientes pediátricos con Leucemia Linfóide Aguda que se encuentren en tratamiento de mantenimiento en la Fundación HOMI Hospital de la Misericordia durante el 2017.

Métodos: estudio observacional analítico, de corte longitudinal, en el que se determinaron los genotipos de los genes *TPMT* y *NUDT15* mediante PCR de discriminación alélica con sondas TaqMan® a 70 pacientes que durante el 2017 se encontraban recibiendo quimioterapia en fase de mantenimiento en la Unidad de Oncohematología Pediátrica del Hospital de la Misericordia.

Resultados: un total de 70 pacientes fueron incluidos en el presente estudio, de estos, se logró realizar los análisis genéticos para *NUDT15* y *TPMT* (rs1800462 y rs1800460) a 68 pacientes, en tanto que para el polimorfismo rs1142345 del gen *TPMT*, se logró la tipificación en 42 pacientes. 4 pacientes fueron heterocigotos para la variante mutada de *NUDT15*, igual número de pacientes fueron heterocigotos para rs1800462 y rs1142345 de *TPMT*, en tanto que para rs1800460 se identificó a 6 pacientes heterocigotos. No se identificó ninguna asociación estadísticamente significativa entre las variantes genéticas y los desenlaces de interés.

Conclusiones: las variantes genéticas de *NUDT15* y *TPMT* no mostraron asociación con los efectos secundarios de mercaptopurina en la muestra de estudio. Se requieren estudios con mayor tamaño poblacional así como la evaluación de otras variantes genéticas que puedan influenciar el desarrollo de efectos secundarios durante la quimioterapia de mantenimiento.

Palabras clave: (Leucemia linfoblástica aguda, Efectos Colaterales y Reacciones Adversas Relacionados con Medicamentos, Farmacogenética, niños, tiopurinas).

Fuente: DeCS server.

Abstract

Objective: To correlate the genetic profile of the *TPMT* and *NUDT15* genes with the side effects of treatment in pediatric patients with Acute Lymphoblastic Leukemia who are undergoing maintenance therapy at the HOMI Hospital de la Misericordia during 2017.

Methods: this is an analytical, longitudinal observational study in which the genotypes of the *TPMT* and *NUDT15* genes will be determined by allelic discrimination PCR with TaqMan® probes to 70 patients who were receiving chemotherapy during the maintenance phase in the Pediatric Hematology and Oncology Unit at HOMI Hospital de la Misericordia during 2017. The sociodemographic and clinical characteristics corresponding to the first 6 months of their maintenance chemotherapy have been collected. And the correlation between the genotypes obtained and the development of side effects of maintenance chemotherapy in these patients will be evaluated.

Results: a total of 70 patients were included in the present study, of these, genetic analyzes were made for *NUDT15* and *TPMT* (rs1800462 and rs1800460) to 68 patients, while for the rs1142345 polymorphism, typing was achieved in 42 patients. 4/68 patients were heterozygous for *NUDT15*, the same number of patients were heterozygous for rs1800462 and rs1142345, while for rs1800460 6 heterozygous patients were identified. No statistically significant association was identified between the genetic variants and the outcomes of interest.

Conclusions: the genetic variants of *NUDT15* and *TPMT* showed no association with the side effects of mercaptopurine in the study sample. Studies with larger population size are required as well as the evaluation of other genetic variants that may influence the development of side effects during maintenance chemotherapy.

Keywords: Acute Lymphoblastic Leukemia, Drug-Related Side Effects and Adverse Reactions, Pharmacogenetics, Children, Thiopurine. **Source:** DeCS Server.

Contenido

Introducción	1
1. Marco Teórico.....	3
2. Pregunta de Investigación.....	7
3. Objetivos.....	8
4. Metodología.....	9
5. Resultados	15
6. Discusión.....	23
7. Conclusiones y recomendaciones	26
8. Bibliografía.....	27

Introducción

La leucemia linfocítica aguda (LLA) es el cáncer que más comúnmente afecta a la población pediátrica(1). En Estados Unidos corresponde al 26% de los casos de cáncer en niños de 0-14 años(2). Según el informe nacional de la situación del cáncer infantil del 2015; en nuestro país, la primera causa de atención por cáncer en el grupo poblacional entre 0 y 17 años, corresponde a “tumores malignos del tejido linfático, de los órganos hematopoyéticos y de tejidos afines”(3).

Aunque en los países desarrollados se han logrado supervivencias hasta de 90%(4), la realidad nacional es otra. Según los datos del registro poblacional del cáncer en Cali, la supervivencia global a 5 años para todos los cánceres en niños correspondió a un 48%, en tanto que para leucemias agudas fue de 41% para el periodo 1994-2003(5). Entre 1985 y 2008 se reportaron 13542 muertes por cáncer en niños, con una distribución de mortalidad según tipos de cáncer así; las leucemias (48,6%), seguidas de tumores del sistema nervioso central y linfomas(6).El informe nacional de la situación del cáncer infantil del 2015, muestra porcentajes de mortalidad por leucemias de 48,3% para niños y 47,3% para niñas en el periodo 2005-2013(3).

Pese a lo mencionado, algunos centros de referencia, como la Fundación HOMI, Hospital la Misericordia, han publicado resultados de tratamiento en niños con LLA con tasas de supervivencia libre de eventos de 73,3% y supervivencia global 79,9% en un corte ínterin del protocolo ALLIC 2009 (7), lo que lo proyecta como escenario propicio para el desarrollo de investigaciones tendientes a la identificación de factores de riesgo, que puedan presentar efectos sobre la respuesta a tratamiento y desarrollo de efectos deletéreos de la terapia.

Aunque diversos estudios de farmacogenética en relación a la quimioterapia para LLA se han llevado a cabo(8, 9), la representatividad de Latinoamérica en los mismos es pobre.

A la luz del conocimiento actual, el único hallazgo que puede motivar modificaciones en el tratamiento es la presencia de polimorfismos del gen *TPMT*, los cuales se han visto relacionados con menor requerimiento en la dosis de 6-mercaptopurina que aquellos que tienen alelo silvestre. A la fecha la FDA (Food Drug Administration) sugiere la realización de esta prueba antes de iniciar tratamiento, sin llegar al nivel de recomendación. En el presente trabajo se evalúa si existe correlación entre los polimorfismos de los genes *TPMT* y *NUDT15* con la aparición de efectos secundarios del tratamiento en pacientes pediátricos con Leucemia Linfocítica Aguda que se encuentren en tratamiento de mantenimiento en un centro de referencia en Bogotá, Colombia.

1. Marco Teórico

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer más frecuente en la edad pediátrica, constituyendo hasta el 25% de casos de cáncer en niños menores de 15 años(1). Se clasifica en dos grandes grupos según la célula de origen, 85% de los casos corresponde a LLA de precursores de células B y en el 15% células T(10, 11). Se presenta con mayor frecuencia en niños con ascendencia hispánica y caucásica que en aquellos de raza negra(12).

Pocos factores de riesgo ambientales se han asociado con LLA en niños (exposición a radiación y ciertos químicos); sin embargo, estas asociaciones explican solo una minoría de los casos(4). De otro lado, se han descrito diversas condiciones genéticas que aumentan el riesgo de LLA, tales como: Síndrome de Down(13), Neurofibromatosis(14), Síndrome de Shwachman-Diamond(15), Síndrome de Bloom y la Ataxia Telangiectasia(16). En este sentido, mediante los estudios de genoma completo (GWAS: por su sigla en inglés) se han identificado variantes génicas en distintos genes –como: *ARID5B*, *CEBPE*, *GATA3* e *IKZF1* – que están asociadas con un riesgo aumentado de padecer LLA(4).

Uno de los grandes hitos en la terapia de niños con LLA fue el desarrollo del régimen intensivo de 8 drogas, 8 semanas de inducción y consolidación, el mismo que fue la base del régimen BFM (Berlín-Frankfurt-Münster), el cual es el núcleo de las terapias contemporáneas para LLA (4). Desde la introducción de este régimen terapéutico, se han venido desarrollando múltiples ensayos clínicos colaborativos que han logrado importantes avances en la supervivencia de los pacientes con LLA, alcanzando tasas de supervivencias total de hasta 90%(4, 17).

Pese a las mejoras alcanzadas en supervivencia para la mayoría de pacientes pediátricos, la recaídas ocurren entre el 15-20% y son una causa importante de morbimortalidad en pacientes pediátricos con cáncer(9, 18). De otro lado, con la quimioterapia intensiva adaptada al riesgo, los niños con LLA tienen una supervivencia mayor al 80% a 5 años. En la mayoría de los ensayos multicéntricos de primera línea en LLA en niños, hasta el 5% fallecen debido a los efectos secundarios tóxicos del tratamiento(19, 20). Las muertes relacionadas al tratamiento ocurren durante episodios recurrentes y prolongados de neutropenia y linfopenia debidas a drogas citotóxicas e inmunosupresoras o porque la leucemia, por si misma, inhibe la recuperación de la médula ósea durante la terapia de inducción, especialmente en pacientes catalogados como lentos respondedores. (19, 21).

El avance tecnológico ha permitido la identificación de variaciones genómicas que determinan patrones farmacogenómicos característicos, responsables de las diferencias individuales observadas en la respuesta al tratamiento en términos de efectividad o de toxicidad. La evaluación del perfil de expresión genética mediante la utilización de diferentes técnicas moleculares comparativas, en el contexto de pacientes con LLA, ha permitido la identificación de genes cuya expresión puede tener implicación en el pronóstico, lo que permite la posibilidad de seleccionar el tratamiento específico requerido por cada paciente (22, 23). Estudios iniciales, usando la técnica de los microarreglos, permitieron establecer la relación entre la expresión de un pequeño número de genes en las células leucémicas, con sensibilidad a glucocorticoides, vincristina, asparaginasa y daunorrubicina, al igual que relación con resistencia cruzada a la quimioterapia y respuesta al tratamiento con altas dosis de metotrexate (24). La mayor parte de la información derivada del conocimiento más detallado de la genómica de esta enfermedad, ha esclarecido la participación de genes en particular y/o polimorfismos específicos, asociados a respuestas desfavorables en términos de toxicidad y asociación con recaída. Han permitido además la validación del uso de características citogenéticas puntuales, descritas en el abordaje inicial de estos pacientes, confirmando su uso actual como marcadores de pronóstico y han permitido también determinar la existencia de otros subgrupos con implicaciones terapéuticas(22). El porcentaje de anomalías detectadas por estudios citogenéticos oscila alrededor del 70%(10, 25).

Diversos estudios de farmacogenética y farmacogenómica han sido desarrollados y se encuentran en curso, con relación tanto a la respuesta al tratamiento como toxicidad de los principales agentes quimioterapéuticos empleados en el tratamiento de LLA. De estos, el que cuenta con mejor evidencia es la mercaptopurina. La mercaptopurina y la tioguanina son esenciales el tratamiento de la LLA principalmente en la fase de mantenimiento. Requieren la participación de una vía metabólica compleja para la formación de los compuestos activos, que ejercen su citotoxicidad mediante su incorporación al DNA y al RNA. Las moléculas originales o sus metabolitos tóxicos pueden ser metilados por acción de la enzima tiopurina metiltransferasa (*TPMT*), reduciendo sus niveles(25, 26). Algunos metabolitos metilados sin embargo, continúan inhibiendo la síntesis de novo de purinas, sin perder su acción citotóxica(27). El principal efecto adverso limitante de la dosis y que refleja los niveles intracelulares del metabolito activo es la supresión de la médula, mientras que la hepatotoxicidad esta correlacionada con la metilación de las moléculas primarias(28). Uno de cada 300 individuos tiene deficiencia de *TPMT*, manifestando toxicidad severa e inclusive fatal posterior a la administración de este tipo de medicamento. Se hereda como un rasgo autosómico codominante (25). Aproximadamente el 10% de la población presenta polimorfismos que influyen en la eficacia y toxicidad, además del riesgo posterior de neoplasias secundarias. Los polimorfismos más frecuentemente hallados en el gen *TPMT* asociados con baja actividad enzimática son *TPMT**2238G>C (rs1800462), *TPMT**3460G>A (rs1800460) y *TPMT**3C719A>G (rs1142345), asociándose a alto riesgo de mielosupresión a dosis estándar(27).

Actualmente el genotipo *TPMT* es el único patrón farmacogenético con implicaciones en protocolos de tratamiento, autorizado por la FDA para su realización en pacientes con LLA, como sugerencia, para el tratamiento a base de estos medicamentos(53). En pacientes con mutaciones homocigotas se requiere reducción de la dosis entre un 85-90%(25, 27, 29, 30). Otros genes involucrados en el metabolismo de las tiopurinas han sido evaluados con respecto a su comportamiento en LLA(27). Dentro de estos, recientemente ha surgido el gen *NUDT15* como un candidato importante en la predicción de toxicidad(31).

Yang y col. mediante un estudio de GWAS y su respectiva cohorte de replicación, identificaron dos loci relacionados con la intensidad de dosificación de mercaptopurina: rs1142345 en el gen *TPMT* y rs116855232 en *NUDT15*. Esta ultima variante fue común entre asiáticos e hispanos pero infrecuente entre europeos y no observada en africanos,

contribuyendo así a las diferencias en la tolerancia a mercaptopurina relacionada con la ancestría(32). En este mismo estudio, evidenciaron que los pacientes heterocigotos para las variantes de *TPMT* o *NUDT15*, requirieron un una disminución del 50% de la dosis de mercaptopurina comparados con los de genotipo silvestre(32). El mismo grupo de Yang, basados en estos resultados replicaron posteriormente en cohortes de Guatemala, Singapur y Japón estos resultados, adicionando estudios de genómica funcional, con los que evidenciaron que la presencia de los SNPs resulta en una pérdida de la actividad nucleótido difosfatasa, por lo que los pacientes con estos alelos defectivos de *NUDT15*, presentan niveles elevados de metabolitos activos de tiopurina aumentando así su toxicidad(33). El interés científico en este gen es creciente en los últimos años y ha llevado a que se le asocie con reducciones de dosis de mercaptopurina en relación a la edad(34), asociación con mielosupresión(35), con el desarrollo de toxicidad severa(36) y la intolerancia a la mercaptopurina en grupos poblacionales específicos(37), convirtiéndolo en un candidato importante a evaluar en estudios de farmacogenética relacionados con tolerancia a mercaptopurina; aunque con menor soporte en la evidencia que el *TPMT*.

La literatura en el tema abunda, pero poco hay descrito al respecto en poblaciones latinoamericanas y los esfuerzos encontrados corresponden a estudios de replicación de los hallazgos en otras latitudes. A la fecha no hay reportes publicados de aproximaciones farmacogenómicas de la respuesta al tratamiento y toxicidad de quimioterapia para LLA en población pediátrica de Colombia. Esto cobra aun más importancia, cuando se han descrito diferencias farmacogenéticas relacionadas con la ancestría(38-41) y se ha sugerido que estudios de corte farmacogenético deben ser realizados de manera independiente o colaborativa en distintos países latinoamericanos para un mejor entendimiento de estas relaciones(42).

2.Pregunta de Investigación

¿Existe algún tipo de correlación entre los polimorfismos de los genes *TPMT* y *NUDT15* con la aparición de efectos secundarios relacionados con el tratamiento de mantenimiento en pacientes pediátricos con leucemia linfocítica aguda tratados en la Fundación HOMI Hospital de la Misericordia?

3. Objetivos

4.1. General

Correlacionar el perfil genético de los genes *TPMT* y *NUDT15* con los efectos secundarios del tratamiento en pacientes pediátricos con Leucemia Linfoide Aguda que se encuentren en tratamiento de mantenimiento en la Fundación HOMI Hospital de la Misericordia durante el 2017.

4.2 Específicos

4.2.1. Caracterizar clínica y epidemiológicamente a los sujetos de estudios incluidos en el trabajo.

4.2.2. Determinar frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de nucleotido simple (SNPs: de su sigla inglés) rs1800462, rs1800460 y rs1142345 de *TPMT* y rs116855232 de *NUDT15*.

4.2.3. Evaluar relaciones entre los alelos encontrados y la aparición de efectos secundarios debidos al tratamiento, con énfasis en: neutropenia febril, interrupción o disminución de mercaptopurina así como en los valores de laboratorio de seguimiento en los sujetos de estudio.

4. Metodología

5.1. Tipo:

Investigación primaria, cuya fuente de información fueron los pacientes y sus historias clínicas.

5.2. Diseño:

Observacional analítico, corte longitudinal y seguimiento hasta seis meses posteriores al inicio de la terapia de mantenimiento.*

5.3. Sitio de realización:

Unidad de Oncohematología Pediátrica, Fundación HOMI Hospital de la Misericordia.

5.4. Muestra y Población de estudio:

5.4.1. Población marco o de referencia:

Pacientes pediátricos con leucemia linfocítica aguda que se encontraban en tratamiento en fase de mantenimiento durante el 2017.

5.4.2. Población de estudio:

Pacientes pediátricos con leucemia linfocítica aguda que se encuentran en tratamiento en fase de mantenimiento, atendidos en la Fundación HOMI Hospital de la Misericordia.

5.4.3. Población sujeto de estudio:

Pacientes que dentro de la población de estudio cumplieron con los criterios de selección y quienes aceptaron participar en el estudio, fueron incluidos de manera consecutiva.

*nota aclaratoria: para fines del trabajo de grado el seguimiento para el análisis de datos corresponderá hasta 6 meses posteriores a la inclusión en el estudio, tal como se contempló en el proyecto macro que ha sido aprobado para financiación por la Universidad Nacional. Sin embargo, el seguimiento a los pacientes incluidos continuará hasta finalizar protocolo de tratamiento o desenlace fatal.

5.4.3.1. Criterios de inclusión:

- a. Edad menor de 18 años.
- b. Diagnóstico confirmado de leucemia linfocítica aguda B o T.
- c. Diagnóstico realizado en la Fundación HOMI Hospital La Misericordia.
- d. Pacientes que estén al menos en semana 20 de iniciado el mantenimiento largo.(29)
- e. Consentimiento informado aceptando la participación en el presente estudio.

5.4.3.2. Criterios de exclusión:

- a. Edad menor a 1 año.
- b. Pacientes con síndrome de Down.

5.4.4. Muestra y muestreo:

Para el presente estudio, se realizó un muestreo por conveniencia incluyendo de manera consecutiva todos los pacientes que cumplieron los criterios de selección y aceptaron participar del mismo.

5.5. Operacionalización de variables:

Variable	Definición	Tipo	Categorías	Rango
Edad	Tiempo de vida en años de cada paciente teniendo en cuenta la fecha de nacimiento, al momento de inicio de su fase de mantenimiento	Cuantitativa continua	No aplica	1-18
Género	Hombre o mujer	Cualitativa nominal categórica	0- Masculino 1-Femenino	NA
Procedencia	Lugar de origen y procedencia del paciente	Cualitativa nominal categórica	0. Bogotá 1. Remitido. (dependiendo de orígenes se ampliará la variable)	NA
Seguridad	Tipo de vinculación al sistema de salud	Cualitativa nominal categórica	1. Vinculado 2. Contributivo 3. Subsidiado	NA

Variable	Definición	Tipo	Categorías	Rango
Linaje	Diagnóstico que motivo el manejo quimioterapéutico.	Cualitativa nominal	B o T	NA
Dosis Actual	Dosis en mg/m ² /día recibida de mercaptopurina al momento de ingreso al estudio.	Cuantitativa Intervalo	No aplica	A definir
Descenso de Dosis	Requirió modificación en descenso de la dosis de Mercaptopurina	Cualitativa nominal categórica	Si o No	NA
Interrupción de Dosis	Suspensión de más de dos semanas de la administración de MP.	Cualitativa nominal categórica	Si o No	NA
Dosis Acumulada	Dosis acumulada de mercaptopurina recibida por los pacientes a la semana 20	Cuantitativo continua	No aplica	A definir
Toxicidad	Presencia o no de cualquier tipo de toxicidad	Cualitativa nominal categórica	Si o No	NA
Recuentos leucocitarios	Recuentos leucocitarios discriminados de cada control mensual durante la fase de mantenimiento. (6 primeros meses)	Cuantitativa continua	No Aplica	A definir
Transaminasas	Valores séricos de AST y ALT de cada control mensual durante la fase mantenimiento. (6 primeros meses)	Cuantitativa continua	No Aplica	A definir

Variable	Definición	Tipo	Categorías	Rango
Bilirrubinas	Valores séricos de Bilirrubina Total, Directa e Indirecta de cada control mensual durante la fase mantenimiento. (6 primeros meses)	Cuantitativa continua	No Aplica	A definir
Neutropenia	Desarrollo de neutropenia febril durante el periodo de seguimiento en la fase de mantenimiento.	Cualitativa nominal categórica	Si o No	NA
Genotipo TPMT	Resultado de genotipificación de TPMT. Que se obtiene de revisar los apareamientos de los 3 diplotipos de cada uno de los SNPs.	Cualitativa nominal categórica	*1 *2 *3A *3B *3C	NA
Genotipo NUDT15	Resultado de genotipificación de NUDT15.	Cualitativa nominal categórica	CC CT TT	NA

5.6. Recolección y manejo de la información y muestras:

Para el presente estudio, las muestras de sangre periférica empleadas para los ensayos de genotipificación fueron conseguidas durante la toma programada de los exámenes establecidos para seguimiento durante el tratamiento con el protocolo ALLIC 2009, adoptado en la institución Fundación HOMI Hospital la Misericordia, previo consentimiento informado,. Los pacientes fueron seguidos hasta por seis meses para identificar la aparición de efectos deletéreos debidos al tratamiento (mielo-supresión, toxicidad hepática, muerte tóxica).

Este proyecto cuenta con los avales de los comité de ética de la Universidad Nacional (Acta Núm. 015-184-16 de 25/08/16) y el Hospital de la Misericordia (CEI-38-16 de 11/08/16).

5.7. Análisis Farmacogenético:

5.7.1. Extracción de ADN:

Para la extracción de ADN de las muestras de interés se empleó el estuche comercial Qlamp DNA Blood Mini Kit™, siguiendo las especificaciones del fabricante. En breve, 200µL de sangre total fueron sometidos a la serie de pasos descritos en la guía del fabricante, mediante el empleo de la técnica de filtración en columna mediante micro-centrifugación. La cuantificación del ADN se llevo a cabo mediante espectrofotometría en un equipo Nanodrop2000™ y en este mismo equipo se realizaron las mediciones de la razón 260/280nm para determinar la pureza del material genético. El material genético obtenido se almacenó en tubos eppendorf™ de 1.5 mL a una temperatura de -20°C hasta su empleo en los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5.7.2. PCR en tiempo real:

La determinación de los genotipos de los SNP (rs1800462, rs1800460, rs1142345 y rs116855232) en los genes *TPMT* y *NUDT15* se realizará mediante PCR en tiempo real de discriminación alélica por 5' nucleasa basada en sondas TaqMan®, siguiendo las recomendaciones descritas en "TaqMan® Allelic Discrimination Guide" y protocolos previos. Para esto, emplearemos una mezcla de PCR que contenga: 15 ng ADN (3µL), 1.25µL de la sonda TaqMan®(20X) correspondiente, 12,5µL TaqMan® Gene Expression Master Mix y 8.25µL de agua ultrapura libre de nucleasas para un volumen final por reacción de 25µL, las muestras se corrieron por duplicado. Los ensayos fueron llevados a cabo empleado el CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), siguiendo las condiciones de corrido sugeridas para cada sonda por el fabricante. Estos ensayos se llevaron a cabo en las instalaciones del Instituto de Genética de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional, bajo la supervisión del Dr. Juan J Yunis.

5.8. Análisis de los datos:

Para el trabajo propuesto se presentarán los datos como medias más desviaciones estándar para los casos de variables cuantitativas, en tanto que para los datos cualitativos se presentarán sus respectivas frecuencias. Las frecuencias alélicas, genotípicas y el equilibrio de Hardy-Weinberg se evaluarán mediante Arlequin v3.5. Para la determinación de asociación entre las variantes genéticas y el desenlace de interés (algún tipo de toxicidad) se empleará el estadístico Chi cuadrado o la prueba exacta de

Fisher según la cantidad de datos obtenidos. Para la realización de comparaciones entre grupos para el caso de variables cuantitativas se emplearán los estadísticos ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis según si los datos obtenidos sean paramétricos o no. Los análisis estadísticos adicionales fueron realizados mediante SPSS para Mac versión 20, y se tomó como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

5. Resultados

Características generales población de estudio.

Un total de 70 pacientes se incluyeron en el estudio. Hay un equilibrio en la representación por género (Relación M:F 1:1), con una mediana de edad al momento de ingresar a la fase de mantenimiento de 6 años (RIC: 7 años). Más del 50% de la población de estudio es proveniente de Bogotá. En orden de frecuencia, los lugares de origen de los pacientes que no provenían de Bogotá fueron: otros municipios de Cundinamarca (n=15, 21.4%), Meta (n=5, 7.1%), Boyacá (n=4, 5.7%), Casanare (n=3, 4.3%) y Guajira, Huila y Tolima con un paciente cada uno. La tabla 1 resume las características generales de la población de estudio.

Aunque no corresponde a los objetivos del estudio, se recuperó la información relacionada a la frecuencia de desenlaces desfavorables (muerte, recaídas). Encontramos una frecuencia de 15.7% de recaídas, de estas, el 63.6% correspondieron a recaídas medulares y el 27.3% correspondió a recaídas combinadas (medular/testicular la más frecuente). El 11.4% de los pacientes presentó neutropenia febril en la fase de mantenimiento durante el periodo de estudio correspondiente a los seis primeros meses de mantenimiento.

Tomando en consideración que la mayoría de nuestra población de estudio, corresponde a pacientes cuya leucemia es de linaje B, se recuperó información respecto a translocaciones frecuentes en esta patología, la finalidad de esto es emplearla como cofactor y/o variable de asociación con los genotipos de interés y los desenlaces de efectos secundarios.

Tabla 1. Características generales de la población de estudio.

Característica		Medición	
		n o mediana	% o RIC
Género	Masculino	35	50%
	Femenino	35	50%
Edad (años cumplidos)		6	7
Afiliaación	Contributivo	51	72.9%
	Subsidiado	19	27.1%
Procedencia	Bogotá	40	57.1%
	Otras	30	42.9%
	Otro	5	7.1%
Linaje	B	65	92.9%
	T	5	7.1%
Riesgo	Estandar	7	10%
	Intermedio	34	48.6%
	Alto	29	41.4%
Descenso 6MP		23	32.9%
Interrupción 6MP		20	28.6%
Neutropenia		8	11.4%
Recaída		11	15.7%
Muerte		2	2.9%
Labs 1 mes Mto	ALT (IU/L)	48.7	91.25
	AST (IU/L)	37	25.3
	Leucocitos/mm3	3315	1370
	Neutrofilos/mm3	1820	1137.5
	Linfocitos/mm3	780	690
	Bilirrubina total (mg/dL)	0.5	0.3
Labs 2 mes Mto	ALT (IU/L)	42.5	97.5
	AST (IU/L)	33.55	31.125
	Leucocitos/mm3	3060	2160
	Neutrofilos/mm3	1721	1682.5
	Linfocitos/mm3	630	675
	Bilirrubina total (mg/dL)	0.5	0.3
Labs 3 mes Mto	ALT (IU/L)	47	98.475
	AST (IU/L)	34	37
	Leucocitos/mm3	3095	1487.5
	Neutrofilos/mm3	1615	1196.5
	Linfocitos/mm3	742	546
	Bilirrubina total (mg/dL)	0.5	0.4
Labs 4 mes Mto	ALT (IU/L)	50.35	76.425
	AST (IU/L)	32.55	23.308

Característica		Medición	
		n o mediana	% o RIC
	Leucocitos/mm3	3400	1640
	Neutrofilos/mm3	1940	1276.75
	Linfocitos/mm3	760	565
	Bilirrubina total (mg/dL)	0.6	0.425
Labs 5 mes Mto	ALT (IU/L)	50.8	116.9
	AST (IU/L)	37	42.1
	Leucocitos/mm3	3360	1700
	Neutrofilos/mm3	1850	1707.5
	Linfocitos/mm3	840	465
	Bilirrubina total (mg/dL)	0.6	0.465
Labs 6 mes Mto	ALT (IU/L)	65.1	101.9
	AST (IU/L)	39.8	36.2
	Leucocitos/mm3	3370	1920
	Neutrofilos/mm3	1830	1674.5
	Linfocitos/mm3	910	636
	Bilirrubina total (mg/dL)	0.6	0.5

Frecuencias alélicas y genotípicas.

Del total de 70 pacientes incluidos en el estudio, se obtuvo material genético con calidad y cantidad adecuada en 68 casos (concentraciones desde 10 hasta 129 ng/ μ L y una razón 260/280nm promedio de 1.87 -valores óptimos entre 1.8 y 2.0-(43, 44)), para los otros dos casos aunque se llevo a cabo la extracción de ADN en dos oportunidades no se obtuvo material genético con las condiciones de calidad para llevar a cabo los ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

En total, 14 pacientes portaron un alelo mutado de cualquier tipo: 4 para *NUDT15*, 4 para el rs1800462 (*TPMT*), 6 para rs1800460 (*TPMT*), y de éstos últimos, 4 adicionalmente portaban un alelo mutado para rs1142345 de *TPMT*.

Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de interés.

	<i>NUDT15</i> (n=68) rs116855232		<i>TPMT</i>					
			rs1800462(n=68)		rs1800460 (n=68)		rs1142345 (n=42)	
Alelos	C	132	C	132	T	6	C	4
	T	4	G	4	C	130	T	80

	<i>NUDT15</i> (n=68) rs116855232		<i>TPMT</i>					
			rs1800462(n=68)		rs1800460 (n=68)		rs1142345 (n=42)	
Genotipos	C/C	64	C/C	64	T/T	0	C/C	0
	C/T	4	C/G	4	T/C	6	C/T	4
	T/T	0	G/G	0	C/C	62	T/T	38

Se describen en la primera fila las frecuencias para cada alelo de los SNPs de interés en cada sujeto de estudio. En la segunda fila las frecuencias de las respectivas combinaciones alélicas.

Del polimorfismo de *NUDT15* (rs116855232) se logró genotipificar a los 68 pacientes de los que se obtuvo material genético con los criterios de calidad como previamente se describió. Para este polimorfismo, se considera como alelo mutado -que confiere susceptibilidad a la toxicidad por mercaptopurina- el T, en tanto que C es considerado el silvestre. Un total de cuatro pacientes portó un alelo mutado (T) en estado heterocigoto (Frecuencia Alélica: 0.03) en tanto que, el alelo silvestre (C) tuvo una frecuencia alélica de 0.97. Cabe resaltar que no identificamos combinaciones del alelo mutado en forma homocigota (T/T) e identificamos frecuencias genotípicas para C/C y C/T de 0.94 y 0.06 respectivamente.

En relación al gen *TPMT* se logró genotipificar al total de 68 muestras para los polimorfismos rs1800462 y rs1800460, en tanto que, para el caso del tercer polimorfismo (rs1142345) se logró tipificar a 42 pacientes, de los restantes 26 no se obtuvo amplificación en dos ensayos independientes de PCR. Al evaluar las posibles dificultades técnicas relacionadas con esto, se identificó que las sondas TaqMan® específicas para este polimorfismo presentaron degradación. Para el caso del polimorfismo rs1800462 de *TPMT* se identificó a 4 pacientes con genotipo heterocigoto portando un alelo mutado (G), con las siguientes Frecuencias Alélicas: C 0.97 y G de 0.03; Por su parte, las frecuencias genotípicas para este polimorfismo fueron: C/C 0.94, C/G 0.06 y G/G de 0. Las frecuencias alélicas identificadas para el polimorfismo rs1800460 fueron T (mutado) de 0.04 y C (silvestre) 0.96, con frecuencias genotípicas para T/T, T/C y C/C de 0, 0.09 y 0.91, respectivamente. Solo dos pacientes presentaron exclusivamente el alelo mutado para rs1800460, los otros cuatro adicionalmente portaron el alelo mutado para para rs1142345. Finalmente, para el último polimorfismo de *TPMT* (rs1142345), se identificó una frecuencia alélica para el alelo mutado (C) de 0.05 y de 0.95 para el silvestre (T), no

se identificó ningún caso de paciente homocigoto para el alelo mutado y frecuencias genotípicas para C/T y T/T de 0.095 y 0.905, respectivamente.

La figura 1 muestra algunos ejemplos de las gráficas de discriminación alélica para cada uno de los polimorfismos. Un hallazgo interesante, fue el que ninguno de los pacientes que portaba un alelo mutado para el polimorfismo del gen *NUDT15* fue portador de ningún alelo mutante de los polimorfismos del gen *TPMT*. La tabla 2 muestra el resumen de las frecuencias alélicas y genotípicas de cada uno de los polimorfismos de interés. Todos los polimorfismos se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. La tabla 3 resume la tipificación de *TPMT* siguiendo los estándares del “Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium” en los 42 pacientes en los que se logró la tipificación de los 3 SNPs (53). Esta clasificación se lleva a cabo identificando las posibles combinaciones de haplotípicas de los polimorfismos rs1800462, rs1800460 y rs1142345 así: *1=CCT, *2=GCT, *3A=CTC, *3B=CTT Y *3C=CCC (53).

Figura 1. Gráficas de discriminación alélica para cada uno de los polimorfismos.

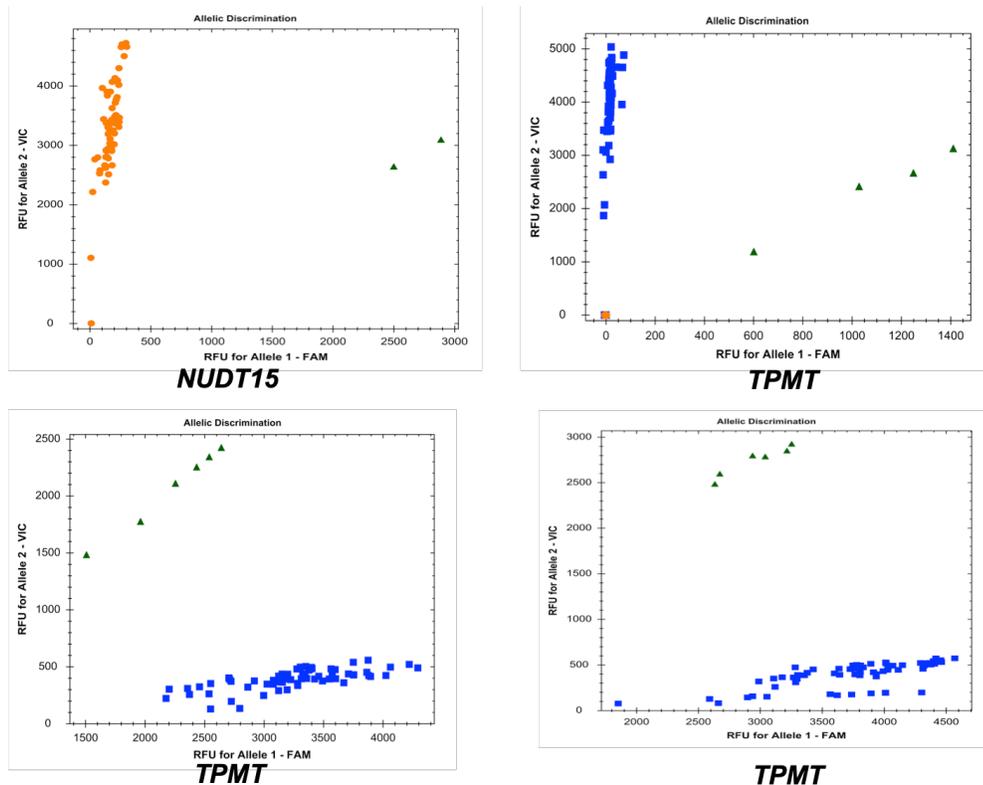


Tabla 3. Tipificación de *TPMT*

		Frecuencias	
Haplotipos	*1	78	
	*2	2	
	*3A	4	
Tipos	*1/*1	36	
	*1/*2	2	
	*1/*3A	4	

Correlación de los genotipos con los efectos secundarios de la quimioterapia.

La tabla 4 resume los resultados de los análisis bivariados en los que se evaluó la correlación entre las variantes genéticas de los polimorfismos de interés en *NUDT15* y *TPMT* con los desenlaces de efectos secundarios de interés. No se evidenció ninguna asociación entre los desenlaces de interés y la variante genética de *NUDT15*. Similares análisis fueron llevados a cabo en relación a la tipificación de *TPMT*, empleando como variable la homocigosidad para *1 versus portar *2 o *3A como heterocigoto, sin evidenciarse ninguna asociación estadísticamente significativa (datos no mostrados). Aunque no se identificaron asociaciones significativamente estadísticas, dos de los cuatro pacientes heterocigotos para *NUDT15* requirieron ajuste en descenso de mercaptopurina durante el periodo de seguimiento. En relación a las variantes genéticas de *TPMT*, para rs1800462 dos de los cuatro pacientes heterocigotos presentaron neutropenia febril y estos mismos pacientes adicionalmente requirieron interrupción de la mercaptopurina durante los primeros seis meses de mantenimiento; para el caso de rs1800460, de los seis pacientes que fueron heterocigotos tres requirieron descenso de dosis, de estos pacientes que requirieron descenso, dos pacientes también fueron heterocigotos para rs1142345.

Adicionalmente, se evaluaron las diferencias de medianas en los valores de los paraclínicos tomados en los primeros 6 meses de tratamiento de mantenimiento: aminotransferasas, bilirrubina total, leucocitos y diferencial; con base a las variantes

genéticas, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados).

Tabla 4. Análisis de correlación genotipos con desenlaces secundarios.

	NUDT15 n=68			TPMT								
	C/C	C/T	p	rs1800462 n=68			rs1800460 n=68			rs1142345 n=42		
				C/C	C/G	p	C/C	T/C	p	T/T	C/T	p
Descenso												
Si	21	2	0.559	22	1	1.000	20	3	0.399	8	2	0.236
No	43	2		42	3		42	3		30	2	
Interrupción												
Si	19	1	1.000	18	2	0.575	19	1	0.662	10	0	0.557
No	45	3		46	2		43	5		28	4	
Neutropenia												
Si	7	1	0.401	6	2	0.065	8	0	1.000	5	0	1.000
No	57	3		58	2		54	6		33	4	
Recaída												
Si	8	1	0.441	8	1	0.441	9	0	1.000	5	0	1.000
No	56	3		56	3		53	6		33	4	
Muerte												
Si	1	1	0.115	2	0	1.000	2	0	1.000	2	0	1.000
No	63	3		62	4		60	6		36	4	

6. Discusión

En nuestro conocimiento, este es el primer estudio en el país, que evalúa los polimorfismos de los genes *NUDT15* y *TPMT* y describe su correlación con los efectos de la quimioterapia en paciente pediátricos con Leucemia Linfocítica Aguda. Identificamos una frecuencia de efectos secundarios durante la quimioterapia de mantenimiento: 32.9% requirió un descenso de la dosis de 6-MP, 28.6% requirió una interrupción del tratamiento con 6-MP, y 11.4% neutropenia febril.

La frecuencia alélica para la mutación de *NUDT15* identificada en nuestro estudio (0.03) es más baja que las previamente reportadas (32, 45-47). Una posible explicación para este hallazgo es que la mayoría de estudios sobre este polimorfismo han sido desarrollados en población de origen asiático, encontrándose en ellos frecuencias alélicas de hasta 0.27, otra razón puede ser nuestro tamaño de muestra. (37, 48). Para el caso particular de los polimorfismos de *TPMT*, solo un estudio ha sido realizado previamente en población colombiana, en el cual Isaza y col. describen unas frecuencias para *2 y *3A de 0.004 y 0.035 respectivamente(49), más baja que las encontradas por nosotros (0.02 y 0.05 respectivamente). Al compararla con otros resultados latinoamericanos, encontramos que nuestras frecuencias también son ligeramente diferentes a las descritas por Garrido y col. en pacientes pediátricos con leucemia linfocítica aguda de Guatemala, en quienes identificaron una frecuencia de 0.005 para *2 y 0.0375 para *3A(50). Sin embargo, nuestra frecuencia encontrada de *2 es similar a la encontrada en Brasil por Boson y col.(51), quienes describen una frecuencia de 0.022 para *2, pero una mucho menor para *3A (0.015). más recientemente, en paciente pediátricos uruguayos que padecen leucemia linfocítica aguda, se ha identificado una frecuencia similar a la nuestra de *3A (0.05) pero una más baja de *2(52). Una posible explicación para estas diferencias es que en nuestro caso debido a inconvenientes

técnicos no hemos logrado terminar la tipificación del polimorfismo rs1142345 en 26 muestras, lo cual podría modificar significativamente las frecuencias de las variaciones genéticas en *TPMT*.

Evidencia creciente resalta el papel de las variantes genéticas en *NUDT15* con el desarrollo de efectos secundarios de toxicidad por mercaptopurina(32, 33, 47, 52). Sin embargo, al evaluar las posibles asociaciones en nuestra población de estudio, no logramos identificar ninguna estadísticamente significativa, posiblemente por el tamaño de la muestra. En relación a *TPMT* hay evidencia que soporta su papel tanto en la farmacocinética como en los efectos tóxicos de la tioguanina(29, 53). En nuestro estudio no encontramos ninguna asociación ni entre las frecuencias alélicas de cada polimorfismo ni en aquellos 42 casos en los que actualmente contamos con la tipificación completa de *TPMT*. Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los diferentes laboratorios de seguimiento cuando se compararon con base a los genotipos de interés de cualquiera de los dos genes. Dentro de las posibles razones que explicarían esto, estarían para el caso de *NUDT15* el que los estudios originales están basados en aproximaciones de secuenciación de genomas completo(32), en los que la representatividad de población latina sea baja y se pueda deber a un efecto relacionado con ancestría específica para población colombiana(54). Por su parte para el caso de *TPMT* podría explicarse con que los tipos encontrados en nuestra población (*2 y *3A) corresponden a metabolizadores intermedios que usualmente no requieren muchos ajustes en terapia(53).

De manera exploratoria, evaluamos si existía asociación entre las variantes genéticas estudiadas y los desenlaces: recaídas o muerte, revisados estos a octubre de 2018; sin evidenciarse ninguna correlación. Lo cual concuerda con lo descrito por Lennard y col. quienes tras realizar genotipificación de *TPMT* en 2387 pacientes con leucemia linfocítica aguda no encontraron asociación con la supervivencia libre de eventos(55).

Dentro de las limitaciones del presente estudio, se encuentran: el tamaño de la muestra, el sesgo de selección al ser una muestra cautiva. Sin embargo, los pacientes fueron incluidos de manera prospectiva y consecutiva lo que permitió un mejor seguimiento del desarrollo de eventos adversos de interés. De otro lado, otra gran fortaleza del presente estudio es el enfoque Translacional, partiendo de observaciones

clínicas previas y la evaluación de aspectos básicos biomédicos que pudieran darle respuesta.

7. Conclusiones y recomendaciones

Las frecuencias alélicas de los genes de interés son diferentes a las previamente descritas, incluso al compararla con estudios latinoamericanos. No encontramos ningún tipo de asociación con eventos de toxicidad para ningunos de los polimorfismos de estudio. Esto orienta a la necesidad de estudios futuros en los que se incluyan más pacientes, se evalúe la posibilidad de que otros genes puedan estar influenciando relaciones de este tipo, así como el efecto que la ancestría pueda tener.

Este tipo de estudios promueven el objetivo de la medicina translacional, integrar la investigación básica y aplicarla a la clínica, para solucionar problemas puntuales en beneficio del paciente.

8. Bibliografía

1. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD)2002.
2. Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014;64(2):83-103.
3. Dirección, Epidemiología, Demografía. Situación del cáncer en Niños, Niñas, Adolescentes y Jóvenes en Colombia, 2015. Ministerio de Salud y Protección Social 2015 Septiembre de 2015.
4. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *The New England journal of medicine*. 2015;373(16):1541-52.
5. Bravo L, Collazos T, García L, Gutierrez A, Carrascal E. Cáncer infantil en Cali, Colombia 1994-2003. Registro Poblacional del Cáncer de Cali 2009.
6. Pineros M, Gamboa O, Suarez A. [Child mortality from cancer in Colombia, 1985-2008]. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 2011;30(1):15-21.
7. Trujillo-Gaviria Á. Quimioterapia intensiva en niños con leucemia linfoblástica aguda. Análisis ínterin en un centro de referencia en Colombia. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2015.
8. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A, et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(27):2938-48.
9. Tasian SK, Loh ML, Hunger SP. Childhood acute lymphoblastic leukemia: Integrating genomics into therapy. *Cancer*. 2015;121(20):3577-90.
10. Cocce MC, Alonso CN, Rossi JG, Bernasconi AR, Rampazzi MA, Felice MS, et al. Cytogenetic and Molecular Findings in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia:

Experience of a Single Institution in Argentina. *Molecular syndromology*. 2015;6(4):193-203.

11. Gowda C, Dovat S. Genetic targets in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013;779:327-40.

12. Lim JY, Bhatia S, Robison LL, Yang JJ. Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2014;120(7):955-62.

13. Mateos MK, Barbaric D, Byatt SA, Sutton R, Marshall GM. Down syndrome and leukemia: insights into leukemogenesis and translational targets. *Translational pediatrics*. 2015;4(2):76-92.

14. Stiller CA, Chessells JM, Fitchett M. Neurofibromatosis and childhood leukaemia/lymphoma: a population-based UKCCSG study. *British journal of cancer*. 1994;70(5):969-72.

15. Dror Y. Shwachman-Diamond syndrome: implications for understanding the molecular basis of leukaemia. *Expert reviews in molecular medicine*. 2008;10:e38.

16. Seif AE. Pediatric leukemia predisposition syndromes: clues to understanding leukemogenesis. *Cancer genetics*. 2011;204(5):227-44.

17. Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(14):1663-9.

18. Nguyen K, Devidas M, Cheng SC, La M, Raetz EA, Carroll WL, et al. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia*. 2008;22(12):2142-50.

19. Prucker C, Attarbaschi A, Peters C, Dworzak MN, Potschger U, Urban C, et al. Induction death and treatment-related mortality in first remission of children with acute lymphoblastic leukemia: a population-based analysis of the Austrian Berlin-Frankfurt-Munster study group. *Leukemia*. 2009;23(7):1264-9.

20. Christensen MS, Heyman M, Mottonen M, Zeller B, Jonmundsson G, Hasle H, et al. Treatment-related death in childhood acute lymphoblastic leukaemia in the Nordic countries: 1992-2001. *British journal of haematology*. 2005;131(1):50-8.

21. O'Connor D, Bate J, Wade R, Clack R, Dhir S, Hough R, et al. Infection-related mortality in children with acute lymphoblastic leukemia: an analysis of infectious deaths on UKALL2003. *Blood*. 2014;124(7):1056-61.

22. Graux C. Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): clinical and therapeutic relevance. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2011;44(2):183-9.
23. Staal FJ, van der Burg M, Wessels LF, Barendregt BH, Baert MR, van den Burg CM, et al. DNA microarrays for comparison of gene expression profiles between diagnosis and relapse in precursor-B acute lymphoblastic leukemia: choice of technique and purification influence the identification of potential diagnostic markers. *Leukemia*. 2003;17(7):1324-32.
24. Pui CH. Genomic and pharmacogenetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers of medicine*. 2015;9(1):1-9.
25. Mei L, Ontiveros EP, Griffiths EA, Thompson JE, Wang ES, Wetzler M. Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy. *Blood reviews*. 2015;29(4):243-9.
26. Karas-Kuzelicki N, Jazbec J, Milek M, Mlinaric-Rascan I. Heterozygosity at the TPMT gene locus, augmented by mutated MTHFR gene, predisposes to 6-MP related toxicities in childhood ALL patients. *Leukemia*. 2009;23(5):971-4.
27. Lopez-Lopez E, Gutierrez-Camino A, Bilbao-Aldaiturriaga N, Pombar-Gomez M, Martin-Guerrero I, Garcia-Orad A. Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics*. 2014;15(10):1383-98.
28. Davidsen ML, Dalhoff K, Schmiegelow K. Pharmacogenetics influence treatment efficacy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2008;30(11):831-49.
29. El-Rashedy FH, Ragab SM, Dawood AA, Temraz SA. Clinical implication of thiopurine methyltransferase polymorphism in children with acute lymphoblastic leukemia: A preliminary Egyptian study. *Indian journal of medical and paediatric oncology : official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology*. 2015;36(4):265-70.
30. Adam de Beaumais T, Fakhoury M, Medard Y, Azougagh S, Zhang D, Yakouben K, et al. Determinants of mercaptopurine toxicity in paediatric acute lymphoblastic leukemia maintenance therapy. *British journal of clinical pharmacology*. 2011;71(4):575-84.
31. Zgheib NK, Akika R, Mahfouz R, Aridi CA, Ghanem KM, Saab R, et al. NUDT15 and TPMT genetic polymorphisms are related to 6-mercaptopurine intolerance in children

treated for acute lymphoblastic leukemia at the Children's Cancer Center of Lebanon. *Pediatric blood & cancer*. 2017;64(1):146-50.

32. Yang JJ, Landier W, Yang W, Liu C, Hageman L, Cheng C, et al. 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*. 2015;33(11):1235-42.

33. Moriyama T, Nishii R, Perez-Andreu V, Yang W, Klussmann FA, Zhao X, et al. NUDT15 polymorphisms alter thiopurine metabolism and hematopoietic toxicity. *Nature genetics*. 2016;48(4):367-73.

34. Suzuki H, Fukushima H, Suzuki R, Hosaka S, Yamaki Y, Kobayashi C, et al. Genotyping NUDT15 can predict the dose reduction of 6-MP for children with acute lymphoblastic leukemia especially at a preschool age. *Journal of human genetics*. 2016.

35. Chiengthong K, Ittiwut C, Muensri S, Sophonphan J, Sosothikul D, Seksan P, et al. NUDT15 c.415C>T increases risk of 6-mercaptopurine induced myelosuppression during maintenance therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(1):e24-6.

36. Kimura S, Hasegawa D, Yoshimoto Y, Hirabayashi S, Hosoya Y, Yoshihara H, et al. Severe 6-mercaptopurine-induced hematotoxicity in childhood an ALL patient with homozygous NUDT15 missence variants. [Rinsho ketsueki] *The Japanese journal of clinical hematology*. 2016;57(6):748-53.

37. Liang DC, Yang CP, Liu HC, Jaing TH, Chen SH, Hung IJ, et al. NUDT15 gene polymorphism related to mercaptopurine intolerance in Taiwan Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *The pharmacogenomics journal*. 2015.

38. Choudhry S, Coyle NE, Tang H, Salari K, Lind D, Clark SL, et al. Population stratification confounds genetic association studies among Latinos. *Human genetics*. 2006;118(5):652-64.

39. Kishi S, Cheng C, French D, Pei D, Das S, Cook EH, et al. Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood*. 2007;109(10):4151-7.

40. Corvol H, De Giacomo A, Eng C, Seibold M, Ziv E, Chapela R, et al. Genetic ancestry modifies pharmacogenetic gene-gene interaction for asthma. *Pharmacogenetics and genomics*. 2009;19(7):489-96.

41. Hoang PT, Ambroise J, Dekairelle AF, Durant JF, Butoescu V, Chi VL, et al. Comparative pharmacogenetic analysis of risk polymorphisms in Caucasian and

Vietnamese children with acute lymphoblastic leukemia: prediction of therapeutic outcome? *British journal of clinical pharmacology*. 2015;79(3):429-40.

42. Suarez-Kurtz G, Pena SD, Struchiner CJ, Hutz MH. Pharmacogenomic Diversity among Brazilians: Influence of Ancestry, Self-Reported Color, and Geographical Origin. *Frontiers in pharmacology*. 2012;3:191.

43. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*. 1997;22(3):474-6, 8-81.

44. Desjardins P, Conklin D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp*. 2010(45).

45. Yang JJ, Whirl-Carrillo M, Scott SA, Turner AJ, Schwab M, Tanaka Y, et al. Pharmacogene Variation Consortium Gene Introduction: NUDT15. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2018.

46. Shah SAV, Paradkar MU, Desai DC, Ashavaid TF. Preemptive NUDT15 genotyping: redefining the management of patients with thiopurine-induced toxicity. *Drug Metab Pers Ther*. 2018;33(1):57-60.

47. Singh M, Bhatia P, Khera S, Trehan A. Emerging role of NUDT15 polymorphisms in 6-mercaptopurine metabolism and dose related toxicity in acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res*. 2017;62:17-22.

48. Tanaka Y, Kato M, Hasegawa D, Urayama KY, Nakadate H, Kondoh K, et al. Susceptibility to 6-MP toxicity conferred by a NUDT15 variant in Japanese children with acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology*. 2015;171(1):109-15.

49. Isaza C, Henao J, Lopez AM, Cacabelos R. Allelic variants of the thiopurine methyltransferase (TPMT) gene in the Colombian population. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2003;25(6):423-9.

50. Garrido C, Santizo VG, Mullers P, Soriano DR, Avila GB, Dean M, et al. Frequency of thiopurine S-methyltransferase mutant alleles in indigenous and admixed Guatemalan patients with acute lymphoblastic leukemia. *Med Oncol*. 2013;30(1):474.

51. Boson WL, Romano-Silva MA, Correa H, Falcao RP, Teixeira-Vidigal PV, De Marco L. Thiopurine methyltransferase polymorphisms in a Brazilian population. *The pharmacogenomics journal*. 2003;3(3):178-82.

52. Soler AM, Olano N, Mendez Y, Lopes A, Silveira A, Dabezies A, et al. TPMT and NUDT15 genes are both related to mercaptopurine intolerance in acute lymphoblastic leukaemia patients from Uruguay. *British journal of haematology*. 2018;181(2):252-5.
53. Relling MV, Schwab M, Whirl-Carrillo M, Suarez-Kurtz G, Pui CH, Stein CM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for thiopurine dosing based on TPMT and NUDT15 genotypes: 2018 update. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2018.
54. Norris ET, Wang L, Conley AB, Rishishwar L, Marino-Ramirez L, Valderrama-Aguirre A, et al. Genetic ancestry, admixture and health determinants in Latin America. *BMC Genomics*. 2018;19(Suppl 8):861.
55. Lennard L, Cartwright CS, Wade R, Vora A. Thiopurine methyltransferase and treatment outcome in the UK acute lymphoblastic leukaemia trial ALL2003. *British journal of haematology*. 2015;170(4):550-8.