

IMPACTO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LA VÍA METABÓLICA DEL METOTREXATO SOBRE LA SOBREVIDA DE NIÑOS MEXICANOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA)

IMPACT OF GENETIC POLYMORPHISM OF METABOLIC PATHWAY OF METHOTREXATE AND SURVIVAL RATE OF MEXICAN CHILDREN WITH ALL

Fausto ZARUMA-TORRES, MsC^{*1,3}, Ismael LARES-ASSEFF, PhD¹,
 Aarón REYES-ESPINOZA, MD-Hem PED², Verónica LOERA-CASTAÑEDA, PhD¹,
 Horacio ALMANZA-REYES, PhD⁴, María Cristina ARIAS-PELÁEZ, MsC.⁵

Recibido: Febrero 11 de 2015 Aceptado: Octubre 27 de 2015

RESUMEN

Antecedentes: La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es un padecimiento oncológico importante en la población pediátrica mexicana, cuya base genética pudiera modificar la efectividad de la quimioterapia del antifolato metotrexato (MTX) y el tiempo de sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida total. **Objetivo:** Determinar la asociación de 10 polimorfismos genéticos de la vía del folato: en transportadores celulares (*COL18A1*, *SLC19A1*, *ABCB1* y *ABCC5*) y las enzimas folilpoliglutamil sintetasa (*FPGS*) y xantina oxidasa (*XO*), con la sobrevida de los niños con leucemia linfoblástica aguda. **Métodos:** En el Centro Estatal de Cancerología de Durango- México, se estudiaron 39 niños con leucemia linfoblástica aguda tratados con MTX y 102 controles sin la enfermedad, a quienes mediante qPCR, se les determinaron 10 polimorfismos en la vía del folato. Durante 5 años de seguimiento se determinó la sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida total, y su relación con su genotipo. **Resultados:** Cuatro polimorfismos no estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg *COL18A1*(rs2274808), *ABCC5*(rs9838667 y rs3792585) y *XO*(rs17011368). Únicamente el rs17011368 de *XO* se asoció con riesgo de estar presente en los pacientes con leucemia linfoblástica aguda cuyo OR fue 9.771(IC95% 4.974-19.196, p=0,001). El *FPGS* (rs1544105) afectó la sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida total (Log Rank p<0.05). **Conclusiones:** El polimorfismo (rs17011368) de la *XO* presentó riesgo para leucemia linfoblástica aguda; así mismo, se encontró una asociación importante entre los portadores del polimorfismo *FPGS* (rs1544105) que modificaría la sobrevidas de los pacientes tratados con MTX.

Palabras clave: Metotrexato, xantina oxidasa, supervivencia, leucemia linfoblástica, genotipo.

¹ Instituto Politécnico Nacional-CIIDIR, Unidad Durango, México. Calle Sigma #119, Fracc. 20 de Noviembre II, C.P. 34220, Durango Dgo México

² Centro Estatal de Cancerología (CECAN) of SSA, Durango, México.

³ Escuela Bioquímica y Farmacia, Universidad de Cuenca, Ecuador.

⁴ Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California, México

⁵ Departamento de Fisiología de Facultad de Medicina de Universidad Juárez del Estado de Durango-México

* Autor de correspondencia: fausto.zaruma@ucuenca.edu.ec

ABSTRACT

Background: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a major cancer disease in Mexican pediatric population, where the genotype could affect the effectiveness of chemotherapy in which the methotrexate (MTX) is involved and consequently the time of disease free survival and overall survival. **Objective:** Determine the association of 10 genetic polymorphisms of the folate pathway: in cellular carriers (*COL18A1*, *SLC19A1*, *ABCB1* and *ABCC5*) and in enzymes such as folylpolyglutamate synthetase (*FPGS*) and xanthine oxidase (*XO*), with survival of children with acute lymphoblastic leukemia. **Methods:** Thirty-nine children with acute lymphoblastic leukemia from the State Cancer Center in Durango (Mexico) treated with MTX and 102 healthy controls, were qPCR analyzed for 10 polymorphisms in the folate pathway. During 5 years of follow up, the disease-free survival and overall survival rates were investigated in relation with their genotypes. **Results:** Four polymorphisms were not found in Hardy-Weinberg Equilibrium *COL18A1* (rs2274808), *ABCC5* (rs9838667 and rs3792585) and *XO* (rs170113685). Only *XO* (rs170113685) was associated with risk of being present in patients with ALL whose odds ratio was 9.771 (95% 4.974-19.196, $p=0.001$). The polymorphism rs1544105 for *FPGS* affected disease free survival and overall survival (Log Rank test $p<0.05$). **Conclusion:** Polymorphism (rs17011368) of *XO* showed risk association for acute lymphoblastic leukemia; likewise, an important association was found between carriers of the *FPGS* (rs1544105) and increased survival times of patients treated with methotrexate.

Keywords: Methotrexate, *XO*, *FPGS*, survival, Precursor Cell Lymphoblastic Leukemia-Lymphoma/*drug therapy/genetics, genetic polymorphisms, ATP-binding cassette transporter gene.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) ha sido uno de las enfermedades oncológicas más frecuentes en pediatría, la cual ha crecido de manera permanente a nivel mundial (1). En México, los últimos reportes del 2012 de la Secretaría de Salud, indican que LLA es una de las causas de morbilidad y mortalidad en pacientes en edad pediátrica, especialmente en los estados de Sinaloa, Baja California y Durango (2, 3). Dentro del tratamiento farmacológico de la LLA se utilizan fármacos que emplean la vía del folato, la cual está regulada por la función coordinada de varias enzimas como metilen-tetrahydrofolato reductasa (MTHFR)(4), Tiopurin-metil transferasa (TPMT), timidilato sintetasa (TS), folilpoliglutamil sintetasa (*FPGS*) (5), xantina oxidasa (*XO*), entre otras. La *FPGS* cumple un papel fundamental en la transformación del ácido fólico a poliglutamato que es el metabolito activo y precursor indispensable en la síntesis de purinas(6). Estas últimas, ingresan a la vía de la *XO* (7) para su transformación en ácido úrico que facilita su eliminación renal. El metotrexato (MTX), antifolato que forma parte del tratamiento de elección en todas las etapas de quimioterapia de los pacientes con LLA, por su semejanza con el folato, usa la misma vía metabólica a partir de su paso

por la *FPGS* (8). Adicionalmente, el MTX es inhibidor selectivo de la *XO*(9) altamente tóxico (10).

El colágeno forma parte de la matriz extracelular y es codificado por el gen *COL18A1* muy cercano al gen *SLC19A1* que a su vez, codifica para el receptor de folatos tipo 1 (Reduced Folic Carrier type 1-RFC1-RFC1)(11, 12). Se ha determinado que varios polimorfismos intergénicos como el rs2274808 pueden modificar la función de transporte por la vía de los folatos y por ende de moléculas parecidas como el MTX.

Por otro lado, se han identificado varios transportadores de diferentes familias, con capacidad de generar fármaco-resistencia. Un grupo importante de estas proteínas está constituido por los transportadores de folato reducido de tipo 1 (Reduced Folic Carrier type 1-RFC1) codificados por el gen *SLC19A1* que esencialmente se encargan de introducir el folato y antifolatos a la célula, localizándose a lo largo de la membrana celular (13). Existen otros transportadores, igualmente distribuidos en la región membranal, que participan en el eflujo activo de sustancias extrañas o de desecho conocidas como proteínas de resistencia a fármacos que usan la energía de ATP, tales como Multi-drug resistance proteins (MDR1) y Multidrug related resistance proteins (MRP5) codificados por *ABCB1* y *ABCC5* respectivamente (14), genes altamente polimórficos

que modifican consecuentemente su función y su sobre-expresión (15).

Varias investigaciones reportan que los polimorfismos genéticos de un solo nucleótido (SNPs –de su abreviatura inglesa *Single Nucleotide Polymorphisms*) de los transportadores (*COL18A1*, *SLC19A1*, *ABCB1* y *ABCC5*), así como los genes de las enzimas *FPGS* y *XO*, se asocian con la presentación de reacciones adversas por MTX, y en consecuencia podrían disminuir la calidad(16) y la esperanza de vida de los pacientes (17). Por tanto el objetivo de este trabajo fue determinar el impacto de 10 polimorfismos genéticos de las enzimas (*FPGS*, *XO*) y de los transportadores de MTX mencionados, con el tiempo de supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la sobrevida total (ST) de niños mexicanos con LLA.

MÉTODOS

Pacientes y controles

Se trata de un estudio ambispectivo, observacional, comparativo y de asociación. Se incluyeron 39 pacientes pediátricos de ambos sexos atendidos en el Servicio de Hemato-oncología Pediátrica del Centro Estatal de Cancerología (CECAN) de la Secretaría de Salud de Durango-México desde enero de 2009 a junio de 2014. Todos los pacientes fueron diagnosticados con LLA de acuerdo al criterio de la Asociación Franco-Americana-Británica de Hematología (18). Esta investigación fue aprobada por el Comité de ética e investigación del CECAN validado de acuerdo a la declaración de Helsinki y a la Ley General de Salud de México. Cada paciente incluido en este estudio estuvo bajo tratamiento de quimioterapia de acuerdo al protocolo St Jude XV y por tanto recibieron MTX en diferentes vías y esquemas conforme a su fase de esquema de tratamiento (19), también se incluyeron los pacientes en vigilancia, es decir, niños que no reciben tratamiento farmacológico. Además, se evaluó un grupo de 102 niños sin LLA como control.

Genotipificación

El ADN se obtuvo a partir de sangre total utilizando un kit comercial (Macherey-Nagel® Alemania), se determinó su integridad y pureza por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se realizó la cuantificación por espectrofotometría en Nanodrop® (Thermos-

cientific, EE.UU.). Los polimorfismos *COL18A1* (rs2274808), *SLC19A11* (rs2838956), *ABCB1* (rs1045642, rs1128503), *ABCC5* (rs9838667, rs3792585), *FPGS* (rs1544105, rs4451422) y *XO* (rs17323235, rs17011368) se determinaron por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) (Applied Biosystems StepOne®, USA).

Determinación de la sobrevida libre de enfermedad (SLE) y sobrevida total (ST)

La SLE se calculó con la medición del tiempo transcurrido desde el inicio de la etapa de remisión hasta la aparición de un evento censurado como el cambio de institución hospitalaria, abandono voluntario de tratamiento, cambios en el régimen establecido, recaída u otra causa que interrumpa su continua observación. En tanto que la ST fue medida a partir del diagnóstico de LLA hasta la muerte del paciente. Posteriormente se determinó la asociación entre las sobrevidas y el genotipo de los niños.

Análisis estadístico

Se obtuvieron las frecuencias genotípicas y alélicas tanto de los niños con LLA de los 2 grupos poblacionales de pacientes con LLA y sin LLA (control). Además, se realizó el análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) con el paquete estadístico SNPStats (España) (20) y posteriormente a partir de las frecuencias alélicas se compararon los grupos de casos (enfermos) y control mediante una Chi-cuadrada (χ^2) donde un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Las diferencias genotípicas entre grupos enfermo vs control, se determinaron mediante la prueba de χ^2 , también se realizó un análisis de asociación de riesgo entre las frecuencias alélicas y la presencia de LLA mediante un χ^2 y odds ratio (OR).

A partir del análisis de minería de datos se identificaron reglas de asociación para establecer los vínculos de las variables independientes (polimorfismos genéticos, edad, sexo) con la variable dependiente (el evento censurado y/o muerte). Adicionalmente, se realizó una regresión logística para identificar la ecuación que explique el modelo, y por último, se aplicó el análisis multivariado de regresión logística Log Rank y el análisis de Kaplan Meier para estimar los tiempos de supervivencia. Los programas estadísticos utilizados fueron Rapid-Miner v5 (Alemania) y SPSS v20 (USA).

RESULTADOS

Características generales de los pacientes y controles

Se incorporaron al estudio 39 niños con diagnóstico de LLA del estado de Durango. El género que predominó fue el masculino con $n=24$ (61,50%) y sus edades corresponden a una mediana de 7,92 años con un IC de 2,5-18,08 años. El tiempo de seguimiento de tratamiento fue aproximadamente 70 semanas (25-286). En la Tabla 1 se presentan las

características generales y clínicas de los niños, en la cual se puede observar el número de pacientes que tuvieron recaídas, la SLE y el número de fallecimientos durante el período de estudio.

El grupo control consistió de 102 niños con una mediana de edad de 5,85 años con rango de 1,43-16,13 años de ambos sexos distribuidos en una proporción de 1:1; quienes fueron valorados previamente de acuerdo al examen médico para descartar la presencia de alguna patología oncológica.

Tabla 1. Características generales de los pacientes con LLA y controles

Variables	Pacientes con LLA	Controles
	N=39	N:102
	(mediana, rango)	(mediana, rango)
Edad(años)	7.92(2.5-18.08)	5.85(1.43-16.13)
Género (Masculino/Femenino)	24(61.50%)/15(38.50%)	51(50%)/51(50%)
Peso (Kg)	18.9(12.3-55.1)	22.9(15.3-53.7)
Talla (m)	1.11(0.91-1.71)	1.22(0.67-1.63)
Superficie corporal (m ²)	0.71(0.50-1.7)	0.77(0.57-1.34)
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	15.11(12.36-28.1)	21(18.5-27.5)
Tiempo de vigilancia(semanas)	73 (25-286)	-
Dosis MTX (mín-máx)	45.2 mg*m ² -5g*m ²	-
Hemoglobina (g/dL)	12.05(7-16.8)	12.55(11.06-14.3)
Hematocrito (%)	36.1(28.2-47.0)	36.6(34.6-45.1)
Recuento de eritrocitos (cél/mm ³)	3.59 (2.85-5.89) x106	4.3(4.0-6.54) x106
Recuento leucocitario (cél/mm ³)	3.22(1.079-13.6)x103	7.06(5.9-14.2) x103
Conteo plaquetas (cél/mm ³)	187(41.1-378) x103	255(241-790) x103
TGO (UI/L)	44.5(0.4-149)	14.0(9.2-39.5)
TGP (UI/L)	61(0.3-206)	19.4(1.9-69)
Acido úrico (mg/dL)	3.41(2-4.7)	3.77(3.1-4.86)
Urea (mg/dL)	18.0(8.89-34.3)	34.2(10.7-63.2)
Creatinina (mg/dL)	0.64(0.32-1.22)	0.8(0.42-1.32)
Fosfatasa alcalina (UI/L)	249(58-317)	62(42-335)
Número de pacientes con recaídas (%)	0 : 32(82.05)	-
	1: 5 (12.83)	-
	≥2: 2 (5.12)	-
Tiempo de sobrevida sin la enfermedad(días)	757(555.03-885.01)	-
Número de fallecidos	6(15.38%)	-

Resultados de genotipo

Se obtuvieron las frecuencias genotípicas y alélicas de los 39 pacientes con LLA, las cuales se muestran en la Tabla 2, además se presenta el valor de equilibrio de Hardy –Weinberg. Varios SNPs

presentaron un genotipo con el alelo variante, lo que repercutió sobre el EHW. Así, en el caso de los SNPs de *COL18A1* rs2274808, *ABCC5* (rs9838667 y rs3792585) y *XO* rs17011368 donde tanto el grupo con LLA y el control estuvieron en desequilibrio de Hardy Weinberg.

Tabla 2. Frecuencias genotípicas y alélicas, y valor de equilibrio de Hardy Weinberg de los pacientes con LLA y los controles.

POLIMORFISMO	GRUPOS	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS			FRECUENCIAS ALÉLICAS		Equilibrio Hardy Weinberg $p < 0.05$
		WT	HT	HM	p	q	
<i>COL18A1</i> rs2274808	CASOS	23(0.59)	6(0.15)	10(0.26)	52(0.67)	26(0.33)	<0.0001*
<i>g.45486713C>T</i>	CONTROL	64(0.63)	26(0.25)	12(0.12)	154(0.75)	50(0.25)	0.0026*
<i>SLC19A1</i> rs2838956	CASOS	18(0.46)	14(0.36)	7(0.18)	50(0.64)	28(0.36)	0.170
<i>g.45525110A>G</i>	CONTROL	19(0.19)	45(0.44)	38(0.37)	121(0.59)	83(0.41)	0.410
<i>ABCB1</i> rs1045642	CASOS	10(0.26)	15(0.38)	14(0.36)	43(0.55)	35(0.45)	0.200
<i>3435C>T</i>	CONTROL	31(0.30)	23(0.23)	48(0.47)	85(0.42)	119(0.58)	<0.0001*
<i>ABCB1</i> rs1128503	CASOS	18(0.46)	14(0.36)	7(0.18)	50(0.64)	28(0.36)	0.170
<i>1236C>T</i>	CONTROL	60(0.59)	27(0.26)	15(0.15)	147(0.72)	57(0.28)	0.001*
<i>ABCC5</i> rs9838667	CASOS	27(0.69)	5(0.13)	7(0.18)	59(0.76)	19(0.24)	0.0002*
<i>3414+434A>C</i>	CONTROL	76(0.75)	9(0.09)	17(0.17)	161(0.79)	43(0.21)	<0.0001*
<i>ABCC5</i> rs3792585	CASOS	10(0.26)	7(0.18)	22(0.56)	51(0.65)	27(0.35)	0.0002*
<i>3933+313T>C</i>	CONTROL	22(0.22)	10(0.10)	70(0.69)	150(0.74)	54(0.26)	<0.0001*
<i>FPGS</i> rs1544105	CASOS	11(0.28)	14(0.36)	14(0.36)	42(0.54)	36(0.46)	0.110
<i>g.45486713C>T</i>	CONTROL	40(0.39)	43(0.42)	19(0.19)	123(0.60)	81(0.40)	0.220
<i>FPGS</i> rs4451422	CASOS	16(0.41)	19(0.49)	4(0.10)	51(0.65)	27(0.35)	0.740
<i>45451T>G</i>	CONTROL	41(0.40)	55(0.54)	6(0.06)	137(0.67)	67(0.33)	0.0042*
<i>XO</i> rs17323235	CASOS	10(0.26)	21(0.54)	8(0.21)	41(0.53)	37(0.47)	0.750
<i>1936A>G</i>	CONTROL	7(0.07)	92(0.90)	3(0.03)	106(0.52)	98(0.48)	<0.0001*
<i>XO</i> rs17011368	CASOS	19(0.49)	0(0.00)	20(0.51)	40(0.51)	38(0.49)	<0.0001*
<i>2107A>G</i>	CONTROL	93(0.91)	3(0.03)	6(0.06)	189(0.93)	15(0.07)	<0.0001*

*Diferencias estadísticamente significativas luego de la prueba de χ^2 (WT: genotipo silvestre o wild type, HT: heterocigotos, HM: homocigotos mutados, alelo p: alelo dominante, q: alelo recesivo)

Diferencias de la distribución genotípica y alélica de pacientes con LLA y del riesgo de padecer LLA

Se realizó el estudio comparativo de genotipos de pacientes con LLA con los controles. Un análisis preliminar de la determinación del criterio de Akaike fue utilizado para obtener el mejor modelo de distribución genotípica. En todos los SNPs, el modelo codominante resultó el más adecuado. En la segunda etapa del análisis, a partir de la prueba de χ^2 de los grupos se obtuvo diferencias estadísticamente significativas en los dos SNPs de XO (rs17323235 y rs17323235).

De otra parte, en la Tabla 3 se presenta la asociación de las frecuencias alélicas de cada SNPs con el riesgo de presentar LLA, únicamente el SNPs de XO rs17011368 (2107A>G) presentó diferencias significativas entre grupos, lo que indica que los

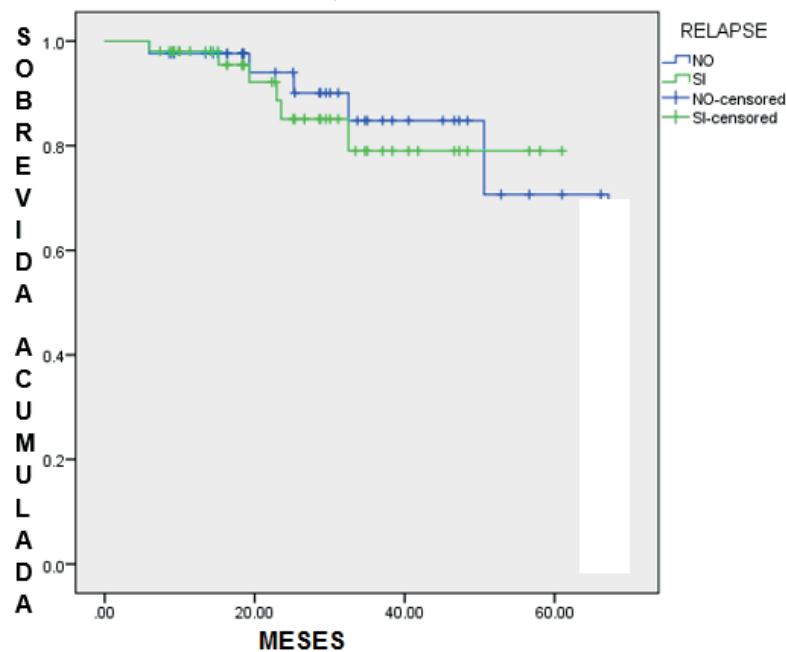
portadores del alelo recesivo (“mutado”) tienen cerca de 10 veces mayor probabilidad de asociarse con LLA (OR: 9,771; IC95% 4,974-19,196).

Resultados de análisis de sobrevida

La SLE en los pacientes sin recaídas del cuadro leucémico presentó una mediana de 58,17 meses en intervalos de confianza (IC 95%) con valores de 50,55- 65,94 meses, mientras que pacientes con recaídas mostraron una mediana de 52,95 meses en IC 95% de 47,01-63,11 meses. La comparación de ambos grupos de pacientes no mostró diferencias significativas entre los grupos Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre tales grupos (log Rank: 0,145, $p=0,704$) como se presenta gráficamente en la curva de Kaplan-Meier (Figura 1). Por otra parte, se evaluó la relación de la mortalidad con el genotipo, la Figura 2 describe la relación de la mortalidad con el genotipo.

Tabla 3. Riesgo de asociación del alelo recesivo con LLA

POLIMORFISMO	Alelo dominante Alelo recesivo	GRUPOS			
		CONTROL	CASO	p<0.05	OR (IC95%)
<i>COL18A1</i> rs2274808	C T	154(0.76) 50(0.24)	52(0.67) 26(0.33)	0.1765	referencia 1.540(0.871-2.719)
<i>SLC19A1</i> rs2838956	A G	121(0.59) 83(0.41)	50(0.64) 28(0.36)	0.497	referencia 0.816(0.475-1.4015)
<i>ABCB1</i> rs1045642	C T	119(0.58) 85(0.42)	43(0.55) 35(0.45)	0.687	referencia 1.139(0.674-1.928)
<i>ABCB1</i> rs1128503	C T	147(0.72) 57(0.28)	50(0.64) 28(0.36)	0.245	referencia 1.444(0.839-2.514)
<i>ABCC5</i> rs9838667	A C	161(0.79) 43(0.21)	59(0.76) 19(0.24)	0.627	referencia 1.205(0.651-2.234)
<i>ABCC5</i> rs3792585	T C	150(0.73) 54(0.27)	51(0.65) 27(0.35)	0.176	referencia 1.471(0.839-2.576)
<i>FPGS</i> rs1544105	C T	123(0.60) 81(0.40)	42(0.54) 36(0.46)	0.325	referencia 1.302(0.769-2.203)
<i>FPGS</i> rs4451422	T G	137(0.67) 67(0.33)	51(0.65) 27(0.35)	0.888	referencia 1.083(0.624-1.871)
<i>XO</i> rs17323235	A G	106(0.52) 98(0.48)	41(0.53) 37(0.47)	0.997	referencia 0.976(0.578-1.646)
<i>XO</i> rs17011368	A G	189(0.92) 15(0.08)	40(0.51) 38(0.49)	<0.0001	referencia 9.771(4.974-19.196)

**Figura 1.** Curva de Kaplan Meier de la sobrevida libre de la enfermedad (SLE) para los pacientes con y sin recaídas

Estimación de sobrevida libre de enfermedad: Sin recaídas (NO Relapse) 58.17 meses con recaídas (SI Relapse) 52.95 meses, log Rank: 0.145, IC 95%, p=0.704. Los puntos que cortan las curvas mencionadas representan cada evento de censura.

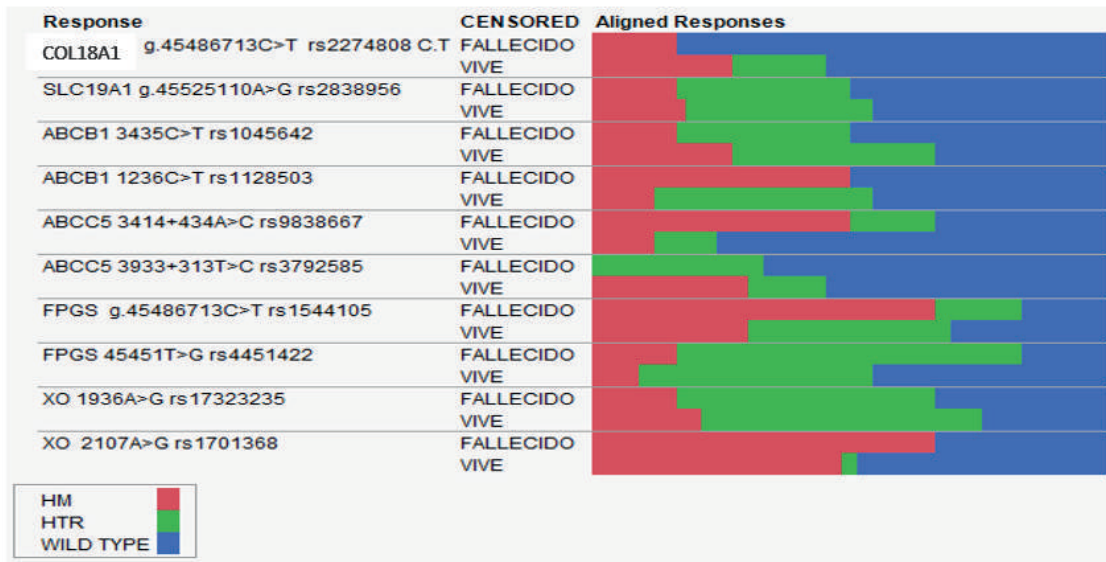


Figura 2. Distribución genotípica de los polimorfismos evaluados en los niños fallecidos y sobrevivientes

Tabla 4. Asociación del genotipo del grupo de los pacientes vivos y fallecidos con el tiempo de supervivencia total (ST)

POLIMORFISMO	GENOTIPO	VIVOS				FALLECIDOS			
		N	Tiempo (meses) Mediana (IC:95%)	p<0.05	Log Rank	N	Tiempo (meses) Mediana (IC:95%)	p<0.05	Log Rank
COL18A1 rs2274808	CC	18	20.63(16.27-31.13)	0.1386	2.19	5	26.23(5.93-27.0)	0.1386	2.1933
	CT	6	27.0(9.0-61.0)			0	NA		
	TT	9	30.03(18.5-40.53)			1	32.53(NA)		
SLC19A1 rs2838956	AA	15	28.8(16.27-38.37)	0.2018	3.2006	3	26.23(19.3-27.0)	0.8254	0.3837
	AG	12	20.65(9.30-30.03)			2	19.23(5.93-32.53)		
	GG	6	31.68(13.47-61.0)			1	26.87(NA)		
ABCB1 rs1045642	CC	9	26.63(16.27-48.40)	0.6946	0.7288	1	32.53(NA)	0.3003	2.4057
	CT	13	25.37(13.47-35.03)			2	16.47(5.93-27.0)		
	TT	11	22.77(9.00-31.13)			3	26.23(19.30-26.87)		
ABCB1 rs1128503	CC	15	18.37(9.00-34.37)	0.6332	0.9139	3	19.30(5.93-27.0)	0.343	0.899
	CT	14	27.0(18.5-35.03)			0	NA		
	TT	4	34.22(18.37-31.13)			3	26.87(26.23-32.53)		
ABCC5 rs9838667	AA	25	25.37(18.37-34.73)	0.9694	0.062	2	25.92(19.3-32.53)	0.7248	0.6434
	AC	4	24.81(18.5-40.53)			1	26.87(NA)		
	CC	4	30.083(16.27-48.40)			3	26.23(5.93-32.54)		
ABCC5 rs3792585	TT	10	27.0(9.00-37.07)	0.8549	0.3135	0	NA	0.3209	0.9853
	TC	5	18.5(8.63-61.0)			2	16.40(5.93-26.86)		
	TT	18	29.15(18.37-34.73)			4	26.61(19.3-32.55)		
FPGS rs1544105	CC	10	16.33(8.63-31.13)	0.044*	6.247	1	5.933(NA)	0.0276*	7.1818
	CT	13	30.03(18.5-38.34)			1	19.30(NA)		
	TT	10	27.0(18.34-34.73)			4	26.93(26.93-32.55)		
FPGS rs4451422	TT	15	18.37(9.0-35.03)	0.1875	3.3484	1	27(NA)	0.8970	0.2174
	TG	15	30.03(18.5-38.34)			4	22.77(5.93-32.53)		
	GG	3	18.53(18.5-28.80)			1	26.87(NA)		
XO rs17323235	AA	8	16.33(9.0-47.26)	0.2518	2.7585	2	16.47(5.93-27.0)	0.9159	0.1758
	AG	18	27.0(18.5-34.73)			3	26.23(19.30-32.53)		
	GG	7	31.13(8.63-56.63)			1	26.87(NA)		
XO rs17011368	AA	16	18.43(13.47-34.73)	0.0085*	9.5414	2	16.47(5.93-27)	0.7073	0.1416
	AG	1	9.0(NA)			0	NA		
	GG	16	28.717(18.53-37.07)			4	26.55(19.30-32.53)		

Análisis de ST de los grupos de pacientes vivos y fallecidos. NA: no aplica, * Diferencias significativas p>0.05 IC95% entre grupo

En la Tabla 4 se observan los valores de ST comparados con el genotipo, con sus respectivos valores de log Rank. Se puede observar que en la mayoría de los SNPs del grupo de los niños sobrevivientes no se encontraron diferencias en la ST entre subgrupos WT comparados con los HT y HM, excepto en los casos con los polimorfismos de *FPGS* rs1544105 y de *XO* rs17011368 (Tabla 4), no obstante, en el grupo de los fallecidos, el polimorfismo *FPGS* rs1544105 mostró un valor de $p < 0,05$.

Los resultados de regresión logística multivariada aplicada exclusivamente al grupo de los niños con LLA y estableciendo la muerte del individuo como variable dependiente, determinó la precisión de 84,17+/-17,26 y la exactitud de 70,00% +/- 26,93% del modelo generado y descrito por la ecuación general con el siguiente algoritmo:

$$M = 0,86 - 45,33 * S + 43,07 * a - 13,03 * b - 101,93 * c - 97,91 * d - 1,73 * e + 58,36 * f - 218,54 * g + 86,15 * h - 241,99 * i + 64,83 * j$$

Donde, *M*: Mortalidad; *S*: sexo; *a*: *COL18A1* rs2274808; *b*: *SLC19A1* rs2838956; *c*: *ABCB1* rs1045642; *d*: *ABCB1* rs1128503; *e*: *ABCC5* rs9838667; *f*: *ABCC5* rs3792585; *g*: *FPGS* rs1544105; *h*: *FPGS* rs4451422; *i*: *XO* rs17323235; *j*: *XO* rs17011368

Asociación de los polimorfismos genéticos con la mortalidad

El modelo de minería de datos aplicado al grupo de pacientes con LLA, reveló 8 asociaciones que favorecen el riesgo de muerte de los niños. Las Asociaciones más potentes con un nivel de confianza superior al 90% son: la asociación del sexo con rs9838667 (*ABCC5*) con una potencia de 32,5%; la asociación del rs1544105 (*FPGS*) con rs17011368 (*XO*) mostró una potencia de 25%, los dos polimorfismos de *XO* (22,5%) y en la triple asociación de rs1128503 (*ABCB1*), rs4451422 (*FPGS*) y rs17011368 (*XO*) con 22,5%. El resto de asociaciones no se mencionaron debido a que no fueron relevantes.

DISCUSIÓN

Los estudios de farmacogenética de transportadores y enzimas de la vía del folato evaluadas en nuestra investigación en población infantil con LLA del noroeste de México encontramos que el SPN *XO* (rs17011368) estuvo asociado con LLA y que el *FPGS* (rs1544105) afectó la sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida total.

Las proteínas transportadoras relacionadas con la vía de folato dependen de genes altamente polimórficos. En este trabajo investigativo encontramos que los SNPs de *COL18A1*(rs2274808) y *SLC19A1* (rs2838956) estudiados y que expresan para proteínas transportadoras específicas de folatos y de otros principios farmacológicos como el MTX presentaron el alelo alterno de manera importante (33% y 36% respectivamente), por lo cual este cambio mínimo impactaría en la función de los *SLC19A1* (21). El SNP (rs2274808) mostró genotipo mayoritario silvestre o “wild type” (WT) en el grupo de niños con LLA (59%), mientras que los portadores heterocigotos (HT) y homocigotos mutados (HM) estuvieron en frecuencias elevadas causando el desequilibrio de Hardy Weinberg. Sin embargo, el OR de 1,540(IC95%; 0,871-2,719) indica bajo riesgo de padecer LLA, aunque no se descartaría la probabilidad de ser responsable en parte, de la aparición de eventos adversos mediados por MTX, tal como lo reportó Owen *et al.* (13). El polimorfismo *SLC19A1* (rs2838956) se encontró en un importante número de pacientes con HT y HM; lo cual favorecería la posible presentación de reacciones gastro-intestinales adversas por MTX, como se ha asociado en población portuguesa (22, 23). Además, los SNPs de *SLC19A1* pudieran estar asociados a riesgos tóxicos en pacientes tratados con altas dosis de MTX tal como lo indica Faganel *et al.* (24).

Los SNPs de transportadores de *ABCB1* son trascendentales para el eflujo de fármacos al interior de las células, están relacionados con cambios sobre la glicoproteína P (P-gp). El trabajo de Kimchi-Sarfaty *et al.* (25) concluyó que los portadores del alelo alterno (CT o TT) del SNP 3435C>T (rs1045642) de esta subfamilia que expresa a las MDR1 y glicoproteína P (P-gp), pueden experimentar una disminución de su función de transporte de eflujo. En esta investigación obtuvimos un número importante de niños con estas variantes genotípicas, quienes potencialmente verían disminuida la actividad de las P-gp en varios órganos claves. Encontramos también que la distribución del alelo recesivo en nuestra población mexicana (45%) fue inferior a la que encontró (61,5% del alelo alterno). Kim *et al.* en 2012 (26) en pacientes coreanos. Al comparar las frecuencias alélicas de grupos enfermos con el grupo sano (Tabla 3) no encontramos diferencias estadísticamente significativas, por tanto, no hay evidencia de que se asocie con LLA; pero se podría

inferir que estas variantes pudieran evitar el deterioro progresivo y las recaídas de nuestros pacientes, tal como lo refiere Stanulla *et al.* (27) en pacientes con genotipo *CT* y *TT* en los que se reduce el riesgo de recaídas sobre el SNC.

Por otra parte el *SNP* de *ABCB1 1236C>T* (rs1128503) presentó una distribución genotípica de HT interesante (36% para pacientes y 26% para los controles), valores menores que las frecuencias en población brasileira (278 individuos distribuidos con el 60% del portador HT) publicado en 2010 por Mauricio-Scheiner *et al.* (28). Además, nuestra población con genotipo mutado, podría ser más susceptible para desarrollar efectos adversos por la terapia con MTX, ya que se ha asociado este *SNP* con severa mielosupresión especialmente con neutropenia así como resistencia a quimioterapia, de acuerdo a la referencia de Zgheib *et al.* (29).

La evaluación de los *SNPs* de los transportadores *ABCC5* (rs9838667 y rs3792585) destaca mayoritariamente el grupo de WT en la población pediátrica con LLA, lo que en consecuencia modificó el EHW. En cambio el rs3792585 del mismo gen *ABCC5* presentó un alto nivel de HM en la población con LLA (56%) y en el grupo de niños saludables (69%). Si bien de estos *SNPs* no se conocen referencias en población mexicana, se sabe que algunos de ellos (*ABCC5*/MRP5) tendrían repercusión en la resistencia a fármacos especialmente de tipo oncológico (30, 31).

El proceso metabólico enzimático de MTX consta de la función de la *FPGS*, cuyo mecanismo es producir metabolito activo de poliglutamato-MTX. El *SNP* rs1544105 de *FPGS* se encontró en la población de pacientes HT y HM (36% en ambos casos), lo cual resulta en un 72% de población portadora del mencionado polimorfismo. Este última distribución genotípica es muy diferente a lo que reportó Liu *et al.* (32) quienes en una muestra de población china (n=164) encontraron alto número de HT y HM que sumaron 150 casos (91,4%). Además, esta última población mostró desequilibrio ($p<0,0001$), lo que indicaría que la población pediátrica enferma pudiera estar posiblemente relacionada con la sobreexpresión de *FPGS*, hecho que afectaría el tratamiento con MTX y otros sustratos que usen esta vía metabólica. Además, Sharma *et al.* (33) evaluaron una muestra de la población hindú y reportaron que la variante mutada rs1544105 estaba asociada con la respuesta disminuida al MTX en los pacientes, pero no comentan sobre cambios importantes en la SLE o en la ST.

El *FPGS* (rs4451422) mostró mayor número de portadores HT, con un 49% en los niños con LLA. Este hallazgo pudiera explicar una pobre respuesta fisiológica de producción de poliglutamatos en los portadores del *SNP*, tal como lo reportó den-Boer *et al.* (34).

El *SNP* rs17323235 de *XO* reveló un comportamiento genotípico similar en las poblaciones estudiadas donde estuvo incrementado el número de pacientes HT. En contraste, el rs17011368 de *XO* mantuvo un nivel distinto en las dos poblaciones; así en los grupos de casos hubo un alto número de niños con HM (51%) y en el control la frecuencia fue muy contundente en favor de WT (93%). De ahí que las distribuciones alélicas hayan tenido mucha dispersión lo que en todos los grupos evaluados determinó la ausencia de EHW. Es importante indicar que sólo este *SNP* demostró un riesgo significativo de 9 -10 veces más en relación al grupo control para manifestar la enfermedad.

En nuestra población pediátrica con LLA se presentaron 6 fallecimientos y 7 pacientes hicieron recaídas durante el tiempo de observación, de los cuales cinco niños recayeron a nivel de médula ósea y dos sobre el sistema nervioso central (SNC). Del total de los niños fallecidos, 3 recayeron durante su tratamiento; sin embargo, de acuerdo al promedio de SLE y ST no encontramos diferencias importantes en la mayoría de *SNPs* y sólo fue significativo para *FPGS* (rs1544105) y *XO* (rs170113689). Este hallazgo relacionado con los *SNPs* de *FPGS* también fue descrito por Gómez-Gómez *et al.* (35), quienes estudiaron el A22G de *FPGS*, un *SNP* similar a los evaluados por nuestro grupo de investigación, y concluyeron que éste disminuye la ST en individuos HT y HM. Cabe destacar que los *SNPs* de genes que codifican enzimas que se presentan en los niños HT y HM superan ampliamente a los WT, llegando a extenderse su SLE por más de 25 meses, lo que presumiblemente se deba a la presencia del alelo recesivo. Este hecho también lo encontró en población china el equipo de Liu *et al.* (32) quienes afirman que los portadores del CC (silvestre -WT-) tienen una ligera disminución de la SLE y que contribuye a incrementar el riesgo de toxicidad y cambios farmacocinéticos del MTX (36). Finalmente consideramos que esta investigación realizó un estudio piloto, será muy importante monitorear un mayor número de nuevos casos para corroborar estos hallazgos.

CONCLUSIÓN

Las variantes genóticas y alélicas encontramos que de los polimorfismos estudiados en nuestra población infantil con LLA mostraron que cuatro no presentaron EHW, *COL18A1* (rs2274808), *ABCC5* (rs9838667 y rs3792585) y el *XO* (rs17011368), por tal razón, podría asumirse que están presentes de preferencia en niños con LLA y podrían considerarse como marcadores candidatos para analizar esta patología. Por otra parte, al comparar los grupos de casos y control, se confirmó que solamente el SNP *XO* (rs17011368) estuvo asociado con riesgo de LLA, cuyo OR fue de 9,771 (IC95%; 4,974-19,196; $p=0,0001$). De acuerdo al valor de Log Rank con $p<0,05$ se encontró que sólo el *FPGS* (rs1544105) incrementó significativamente la SLE y ST. Finalmente, al tratarse de un estudio piloto consideramos que nuestros hallazgos preliminares si bien han sido interesantes, deberán en futuras investigaciones considerarse ampliar el escrutinio de pacientes con LLA en otros estados próximos de la República Mexicana para corroborar estas tendencias.

AGRADECIMIENTOS

Al Lic. Pedro Cruz, Director General de Centro Oncológico Pediátrico de Baja California, al Dr. Jesús Manuel Lozano García, Director Médico de Centro Oncológico Pediátrico of Baja California, y al Dr. Miguel Reyes-López del Centro de Biotecnología Genómica del IPN- Reynosa Tamaulipas, México.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores y colaboradores de esta investigación declaramos no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Mejía-Aranguré J, Flores-Aguilar H, Juárez-Muñoz I, Vázquez-Langle J, Games-Eternod J, Pérez-Saldívar L, et al. Edad de aparición de los diferentes tumores malignos en la infancia. *Rev Med IMSS*. 2005;43(1):25-37.
- Dirección General de investigación en Salud. Base de datos de egresos hospitalarios por mortalidad en instituciones públicas México: Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS); 2013 [updated 2013; cited 2014 10/15]. Available from: <http://www.sinais.salud.gob.mx>.
- Rodríguez L, González-Llano O, Mancías C, Pompa T, González G, Sandoval A, et al. Observaciones sobre la incidencia de leucemias agudas en el Noreste de México. *Rev Hematol Mex*. 2010;11(2):78-81.
- Lasecka L, Dixon PH, Molokhia M, Sharma N, Schleh A, Wang CM, et al. 667C>T and 1298A>C polymorphisms of MTHFR do not predict response to methotrexate in patients with gestational trophoblastic neoplasia. *Gynecologic oncology*. 2011;123(3):605-9.
- Leil TA, Endo C, Adjei AA, Dy GK, Salavaggione OE, Reid JR, et al. Identification and characterization of genetic variation in the folypolyglutamate synthase gene. *Cancer Res*. 2007;67(18):8772-82.
- Leclerc GJ, Sanderson C, Hunger S, Devidas M, Barredo JC. Folylpolyglutamate synthetase gene transcription is regulated by a multiprotein complex that binds the TEL-AML1 fusion in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research*. 2010;34(12):1601-9.
- Kudo M, Sasaki T, Ishikawa M, Hirasawa N, Hiratsuka M. Kinetics of 6-Thioxanthine Metabolism by Allelic Variants of Xanthine Oxidase. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2010;25(4):361-6.
- Kremer J. Methotrexate pharmacogenomics. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(9):1121-3.
- Crews KR, Zhou Y, Pauley JL, Howard SC, Jecha S, Relling MV, et al. Effect of allopurinol versus urate oxidase on methotrexate pharmacokinetics in children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2010;116(1):227-32.
- Schmiegelow K. Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review. *British journal of haematology*. 2009;146(5):489-503.
- Mahajan VB, Olney AH, Garrett P, Chary A, Dragan E, Lerner G, et al. Collagen XVIII mutation in Knobloch syndrome with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(11):2875-9.
- Galbiatti AL, Castro R, Caldas HC, Padovani JA, Jr., Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Alterations in the expression pattern of MTHFR, DHFR, TYMS, and SLC19A1 genes after treatment of laryngeal cancer cells with high and low doses of methotrexate. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2013;34(6):3765-71.
- Owen SA, Hider SL, Martin P, Bruce IN, Barton A, Thomson W. Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics J*. 2013;13:227-34.
- Adema AD, Floor K, Smid K, Honeywell RJ, Scheffer GL, Jansen G, et al. Overexpression of MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5) confer resistance to the nucleoside analogs cytarabine and troxacitabine, but not gemcitabine. *Springerplus*. 2014;3:732.
- Brambila-Tapia AJL. MDR1 (ABCB1) polymorphisms: functional effects and clinical implications. *Rev Inv Clin*. 2013;55(5):445-54.
- Gillet JP, Gottesman MM. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods in molecular biology*. 2010;596:47-76.
- Gregers J, Gréen H, Christensen IJ, Dalhoff K, Schroeder H, Carlsen N, et al. Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2015.
- Haematology BSo. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia: BSH; 2006 [cited 2013 09]. Available from: http://www.bcsghguidelines.com/pdf/chronicLL_050504.pdf.
- Pui C, Pei D, Sandlund J, Ribeiro R, Rubnitz J, Raimondi S, et al. Long-term results of St Jude Total Therapy Studies 11, 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2010;24(2):371-82.
- d'Oncologia IC. SNPStats. Cataluña: ICO; 2006.
- Zhao R, Goldman D. Folate and Thiamine Transporters mediated by Facilitative Carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and Folate Receptors. *Molecular aspects of medicine*. 2013;34:1-23.
- Lima A, Bernardes M, Sousa H, Azevedo R, Costa L, Ventura F, et al. SLC19A1 80G allele as a biomarker of methotrexate-related gastrointestinal toxicity in Portuguese rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*. 2013;15(6):807-20.

23. Lima A, Bernardes M, Azevedo R, Monteiro J, Sousa H, Medeiros R, et al. SLC19A1, SLC46A1 and SLC01B1 Polymorphisms as Predictors of Methotrexate-Related Toxicity in Portuguese Rheumatoid Arthritis Patients *Toxicol Sci.* 2014;141(2):first published online August 14, 2014.
24. Faganel Kotnik B, Grabnar I, Bohanec Grabar P, Dolzan V, Jazbec J. Association of genetic polymorphism in the folate metabolic pathway with methotrexate pharmacokinetics and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia and malignant lymphoma. *European journal of clinical pharmacology.* 2011;67(10):993-1006.
25. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar S, et al. A "Silent" Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity *Science.* 2007;315(5811):525-8
26. Kim IW, Yun HY, Choi B, Han N, Park SY, Lee ES, et al. ABCB1 C3435T genetic polymorphism on population pharmacokinetics of methotrexate after hematopoietic stem cell transplantation in Korean patients: a prospective analysis. *Clinical therapeutics.* 2012;34(8):1816-26.
27. Stanulla M, Schäffeler E, Arens S, Rathmann A, Schrauder A, Welte K, et al. GSTP1 and MDR1 Genotypes and Central Nervous System Relapse in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *International journal of hematology.* 2005;81(1):39-44.
28. Scheiner MA, Motta-Damasceno A, Ciuvalschi-Maia R. ABCB1 single nucleotide polymorphisms in the Brazilian population. *Molecular Biology Reports.* 2010;37(1):111-18.
29. Zgheib NK, Akra-Ismail M, Aridi C, Mahfouz R, Abboud MR, Solh H, et al. Genetic polymorphisms in candidate genes predict increased toxicity with methotrexate therapy in Lebanese children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics.* 2014;24(8):387-96.
30. Wielinga P, Hooijberg JH, Gunnarsdottir S, Kathmann I, Reid G, Zelcer N, et al. The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. *Cancer Res.* 2005;65(10):4425-30.
31. Guo Y, Ko K, Ritter CA, Chen Z-S, Grube M, Jedlitschky G, et al. Expression of ABCC-Type Nucleotide Exporters in Blasts of Adult Acute Myeloid Leukemia: Relation to Long-term Survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2009;15(5):1762-69.
32. Liu S-G, Chao G, Rui-Dong Z, Ying J, Lei C, Wei-Jing L, et al. FPGS rs1544105 polymorphism is associated with treatment outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell International.* 2013;13(107):1-8.
33. Sharma S, Das M, Kumar A, Marwaha V, Shankar S, Singh P, et al. Purine biosynthetic pathway genes and methotrexate response in rheumatoid arthritis patients among north Indians. *Pharmacogenet Genomics.* 2009;19(10):823-28.
34. den Boer E, de Rotte MCJF, Pluijm SMF, Heil SG, Hazes JM, de Jonge R. Determinants of Erythrocyte Methotrexate Polyglutamate Levels in Rheumatoid Arthritis *J Rheumat.* 2014.
35. Gómez-Gómez Y, Organista-Nava J, Rangel-Rodriguez CA, Illades-Aguar B, Moreno-Godínez ME, Alarcón-Romero LDC, et al. Effect of folylpolyglutamate synthase A22G polymorphism on the risk and survival of patients with acute lymphoblastic leukemia. *Oncology Letters.* 2014;8(2):731-35.
36. Wang S-M, Sun L-l, Zeng W-x, Wu W-s, Zhang G-l. Influence of genetic polymorphisms of FPGS, GGH, and MTHFR on serum methotrexate levels in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014.