

Farmacogenética de la Leucemia Linfoblástica Aguda Pediátrica en Uruguay

Tesis de Doctorado
PEDECIBA Biología
SUBAREA Genética

Lic. Ana María Soler Cantera

Orientador: Dr. Julio Abayubá da Luz

Co-Orientadora: Dra. Leda Roche



Agradecimientos:

- En primer lugar, a Julio y Leda por aceptar ser mis tutores, especialmente a Julio que además de ser mi tutor, me "soporta" todos los días en el laboratorio.
- A Ariela, Mónica y Víctor por aceptar formar parte del tribunal y tomarse el trabajo de leer y evaluar la tesis.
- A todos los niños y familiares que aceptaron formar parte de esta investigación, ya que sin ellos no hubiese sido imposible esta tesis
- A Gaby, mi compañera de trabajo que desde hace 3 años me "aguanta" todos los días en el laboratorio y con quien he compartido momentos interminables analizando historias clínicas y discutiendo resultados
- A Natalia y Yessika por hacer lo imposible por conseguir las muestras y "perseguir" a los pacientes.
- A Cristina, por su inagotable paciencia y su disposición cada vez que iba a buscar las historias clínicas de los pacientes
- A Nico y Majo B. por prestarme sus orejas cada vez que las necesitaba y por las cientos de cervezas compartidas.
- A "las brujas" de Montevideo, Cris, Lu, Majo F. y Vero por estar siempre a pesar de la distancia.
- Al grupo salteño "Sin Tacto" Ana, Dai, Guille, Majo Z. y Pablo por todos los asados, cervezas, daikiris, etc. compartidos
- Por último, y no por eso menos importante sino todo lo contrario a mi familia y mi familia perruna: "Bisbela", "El manolo Houston", "El tío loco", "Tinut", Fúa, Pi, Naza, "Cacharula, la cabeza de alcorcho", "Agus Bicharraco pillo", Floppy, Loki, More, "Negrus", "Pequitipé", "Chiqui Bombón", "Vaquichuli" y "kokolina", por el apoyo incondicional, por estar siempre a pesar de la distancia; en especial a mis padres a quienes dedico enteramente esta tesis.

INDICE

RESUMEN	1
ORGANIZACIÓN DE LA TESIS	3
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	6
1.1 INTRODUCCIÓN	6
1.1.1 Cáncer infantil	6
1.1.2 Diagnóstico y clasificación (Subtipos) de LLA	7
1.1.3 Factores de riesgo y pronóstico de LLA	8
1.1.4 Tratamiento de LLA	11
1.1.5 Reacciones adversas, farmacogenética y ancestralidad	13
1.2 OBJETIVO GENERAL	15
1.3 BIBLIOGRAFÍA	15
2. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA PEDIÁTRICA en URUGUAY: CARACTERÍSTICAS Y ANCESTRALIDAD	20
2.1 INTRODUCCIÓN	20
2.1.1 LLA en Uruguay	20
2.1.2 Ancestralidad en Uruguay	21
2.2 OBJETIVO	22
2.2.1 Objetivos específicos	22
2.3 MATERIALES & MÉTODOS	22
2.3.1 Muestras	22
2.3.2 Datos clínicos	23
2.3.3 Ancestralidad	24
2.3.4 Métodos Estadísticos	24
2.4 RESULTADOS y DISCUSIÓN	25
2.4.1 Características de los pacientes	25
2.4.2 Ancestralidad global e individual	30

2.5 CONCLUSIONES	33
2.6 BIBLIOGRAFÍA	34
3. FARMACOGENÉTICA DE LA 6-MERCAPTOPURINA EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA	
PEDIÁTRICA de URUGUAY	37
3.1 INTRODUCCIÓN	37
3.1.1 6-Mercaptopurina (6-MP)	38
3.1.2 Inosina trifosfato pirofosfohidrolasa (ITPA)	41
3.1.3 Nudix hidrolasa 15 (NUDT15)	44
3.1.4 Tiopurina-S-metil tranferasa (TPMT)	46
3.1.5 Repetidos en Tándem de Número Variable (VNTR) en el gen TPMT	50
3.2 OBJETIVO	51
3.2.1 Objetivos específicos	51
3.3 MATERIALES y MÉTODOS	52
3.3.1 Muestras y genotipado	52
3.3.2 Datos Clínicos	53
3.3.3 Análisis estadísticos	55
3.4 RESULTADOS	58
3.4.1 Frecuencias de las variantes en los genes ITPA, NUDT15 y TPMT	58
3.4.2 Variantes en ITPA, NUDT15 y TPMT vs reducción o suspensión de dosis de 6-MP ..	60
3.4.3 Variantes genéticas y dosis de 6-MP	62
3.4.4 Variantes genéticas y eventos adversos hematológicos	67
3.4.5 Variantes en NUDT15 y/o TPMT y riesgo de leucopenias	68
3.4.6 Variantes genéticas y eventos hepáticos adversos	68
3.4.7 Ancestralidad y variantes en los genes NUDT15 y TPMT	69
3.4.8 Ancestralidad y eventos de leucopenia	70
3.4.9 Ancestralidad y dosis de 6-MP	71
3.4.10 TPMT-VNTR: frecuencias, toxicidad y ancestralidad	71

3.5 DISCUSIÓN.....	72
3.6 CONCLUSIÓN.....	82
3.7 BIBLIOGRAFÍA.....	83
3.8 APÉNDICE CAPÍTULO 3: TPMT-VNTR.....	90
4. FARMACOGENÉTICA DEL METOTREXATO EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA PEDIÁTRICA de URUGUAY.....	101
4.1 INTRODUCCIÓN.....	101
4.1.1 Metotrexato (MTX).....	101
4.1.2 Metilenetetrahidrofolato reductasa (MTHFR).....	103
4.1.3 Transportador de Folato reducido (SLC19A1).....	106
4.1.4 Timidilato sintasa (TYMS).....	107
4.2 OBJETIVO.....	108
4.2.1 Objetivos específicos.....	109
4.3 MATERIALES y MÉTODOS.....	109
4.3.1 Muestras y genotipado.....	109
4.3.2 Datos clínicos.....	110
4.3.3 Análisis estadísticos.....	111
4.4 RESULTADOS.....	112
4.4.1 Frecuencia de las variantes en los genes MTHFR, SLC19A1 y TYMS.....	112
4.4.2 Variantes en MTHFR, SLC19A1 y TYMS vs reducción o suspensión de dosis de MTX.....	114
4.4.3 Variantes genéticas y dosis de MTX.....	115
4.4.4 Variantes de MTHFR, SLC19A1 y TYMS vs eventos de leucopenia y neutropenias.....	115
4.4.5 Variantes genéticas y eventos hepáticos.....	117
4.5 DISCUSIÓN.....	117
4.6 CONCLUSIÓN.....	122
4.7 BIBLIOGRAFÍA.....	123
5. CONCLUSIONES FINALES y PERSPECTIVAS.....	127

5.1 CONCLUSIONES FINALES	127
5.2 PERSPECTIVAS	128
ANEXO I: Lista de AIMS.....	130
ANEXO II. Frecuencia de los 45 AIMS en pacientes y controles	131
ANEXO IIIa: Ancestralidad individual de los pacientes.....	132
ANEXO IIIb: Ancestralidad individual de los Controles	134
ANEXO IV	136

INDICE de ABREVIATURAS

6-MMP	6-metil Mercaptopurina
6-MP	6-Mercaptopurina
6-TG	6-Tioguanina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEAL	Asociación Española de de Afectados por Linfoma, Mieloma y Leucemias
AIEOP	Associazione Italiana di Ematologia e d' Oncologia Pediatrica
AIM	Ancestry Informative Marker
ALB	Albumina
ALLIC	Acute Lymphoblastic Leukemia Intercontinental
ARA-C	Arabinosilcitosina (o Citarabina)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASSE	Administración de los Servicios de Salud del Estado
AZA	Azatioprina
Bd	Bilirrubina directa
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
BT	Bilirrubina Total
CHPR	Centro Hospitalario Pereira Rossell
CPIC	Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium
CPM	Ciclofosfamida
DCOG	Dutch Childhood Oncology Group
DEXA	Dexametasona
DFCI	Dana-Farber Cancer Institute
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DNR	Daunorubicina
DOXO	Doxorubicina
EGIL	Grupo Europeo de Clasificación Inmunológica de Leucemias
EMR	Enfermedad Mínima Residual
FA	Fosfatasa Alcalina
FAB	Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico
FDA	Food and Drug Administration
FPGS	Folilpoliglutamato sintasa
GB	Glóbulos blancos

GGH	Gamma-glutamyl hidrolasa
GMPS	Guanine monophosphate synthase
GOT	Glutamic oxaloacetic transaminase
GPT	Glutamate-Pyruvate Transaminase
GWAS	Genome -wide association study
HGPRT	Hypoxantine-guanine phosphoribosyltransferase
HTO	Hematocrito
IBD	Inflammatory bowel disease
IDP	Inosine diphosphate
IMP	Inosine monophosphate
IMPD	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase
ITP	Inosine triphosphate
ITPA	Inosine triphosphatase
L-ASP	L-Asparaginasa
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LCV	Leucovorina
LDH	Lactato deshidrogenasa
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-B	Leucemia Linfoblástica Aguda de precursores B
LLA-T	Leucemia Linfoblástica Aguda de precursores T
MO	Médula ósea
MTHFD1	Metilentetrahidrofolato dehidrogenasa 1
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
MTX	Metotrexato
MTX-IT	Metotrexato Intratecal
MTX-PG	Metotrexato poliglutamado
NIH-NCI	National Institutes of Health- National Cancer Institute
NOPHO	Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology
NUDT15	Nudix hydrolase 15
OMS	Organización Mundial de la Salud
PRED	Prednisona
RA	Riesgo Alto
RC	Remisión Completa
RE	Riesgo Estándar

RI	Riesgo Intermedio
SHMT1	Serina Hidroximetiltransferasa 1
SHOP	Servicio Hemato Oncológico Pediátrico
SJCRH	St. Jude Children's Research Hospital
SLC19A1	Solute Carrier Family 19 Member 1
SLE	Sobrevida Libre de Enfermedad
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SP	Sangre periférica
THF	Tetrahidrofolato
TPMT	Tiopurina S-metiltransferasa
TU	Thiouric Acid
TYMS	Thymidylate Synthetase
UKALL	United Kingdom Acute Lymphoblastic Leukaemia
UTR	Untranslated Region
VCR	Vincristina
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
XDH	Xantina dehidrogenasa

RESUMEN

En Uruguay, al igual que en el resto del mundo, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer infantil más común, representando cerca del 25% de los mismos. El tratamiento se lleva a cabo principalmente en el Servicio Hemato Oncológico Pediátrico (SHOP) del Centro Hospitalario Pereira Rossell (CHPR), donde se utiliza el protocolo alemán BFM (Berlin-Frankfurt-Münster). Este tratamiento consiste en una poliquimioterapia de dos años de duración, dividido en cinco fases: inducción, intensificación, consolidación, reintensificación y mantenimiento. La tasa de cura de esta enfermedad es similar a la observada en países desarrollados, llegando a aproximadamente 80%. Sin embargo, los efectos adversos relacionados con fármacos como la 6-mercaptopurina (6-MP) o el metotrexato (MTX) siguen siendo una importante complicación. La acumulación de metabolitos de 6-MP o MTX puede causar toxicidades tanto hematológicas como hepáticas que obligan a reducir o suspender parte del tratamiento y, consecuentemente, pueden aumentar la tasa de mortalidad. Muchas de las variantes génicas involucradas en el metabolismo de estos fármacos presentan diferentes frecuencias en las distintas poblaciones. La población uruguaya es una población tri-híbrida formada por un aporte mayoritario de poblaciones europeas, seguido por un aporte de poblaciones nativo americanas y africanas; si bien se observa una heterogeneidad geográfica de estos componentes. El objetivo de esta tesis es analizar variantes génicas involucradas en la distribución y el metabolismo de la 6-MP y el MTX; y determinar su relación con la ancestralidad y con los eventos adversos ocurridos durante la fase de mantenimiento del tratamiento de LLA. Se estudió una muestra de 192 pacientes pediátricos con LLA del SHOP. Para ello se analizaron 9 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) en los genes *ITPA*, *NUDT15*, *TPMT* y una región de Repetidos en Tándem de Número Variable en el promotor del gen *TPMT* (*TPMT*-VNTR); todos ellos vinculados al metabolismo de la 6-MP. A su vez, se estudiaron 3 SNPs en los genes *MTHFR* y *SLC19A1*, y un VNTR en la región 5' UTR del gen *TYMS*; tres genes vinculados al transporte y metabolismo del MTX. Asimismo, se determinaron 45 marcadores de ancestría (AIMs) para determinar la ancestralidad individual y global de los pacientes. A partir de los datos obtenidos de las historias clínicas de los pacientes, se determinó la relación entre la presencia de variantes génicas, la toxicidad hematológica (leucopenias y neutropenias), la toxicidad hepática (bilirrubina, fosfatasa alcalina o transaminasas elevadas) y las dosis acumuladas de 6-MP y MTX; así como también la relación con la ancestralidad. La ancestralidad global de la muestra de pacientes analizada presentó un 69,4% de componente europeo, seguido de 19,7% nativo americano y un 10,9% africano, pero con una gran

variabilidad interindividual. Los resultados indican que el 22% de los pacientes presentan variantes en los genes *TPMT* y/o *NUDT15*. El 40% de la toxicidad hematológica debido a 6-MP en fase de mantenimiento puede ser explicado por variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*. Asimismo, se encontró una correlación significativa entre el número de repetidos "A" del *TPMT*-VNTR y el número de eventos de leucopenias. Por otro lado, existe una correlación negativa entre el número total de leucopenias y la ancestralidad nativo americana en aquellos individuos sin variantes en los genes *TPMT* y *NUDT15*. En relación al MTX, se observó que los pacientes homocigotos GG para la variante A1298G del gen *MTHFR* recibieron una dosis acumulada de MTX mayor que los pacientes portadores del alelo A, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. No se encontró una asociación significativa entre los eventos de toxicidad y/o la dosis acumulada de MTX y las variantes analizadas en los genes *SLC191A1* y *TYMS*.

En conclusión, la ancestralidad global y la variabilidad interindividual de la muestra analizada son concordantes con lo reportado para nuestro país. Una gran proporción de los pacientes presenta variantes génicas vinculadas al metabolismo de 6-MP. La frecuencia de variantes del gen *TPMT* es similar a la reportada para poblaciones europeas, mientras que la frecuencia de variantes de *NUDT15* es similar a la reportada para ciertas poblaciones asiáticas. Existe una asociación significativa entre dichas variantes y la toxicidad hematológica observada durante la fase de mantenimiento del tratamiento de LLA. Un porcentaje importante de los pacientes presenta variantes para los genes vinculados al transporte y metabolismo de MTX. Sin embargo, no se detectó una asociación significativa entre estas y los efectos adversos. Los datos presentados en esta tesis exponen la importancia de la caracterización genética de cada población, en particular de poblaciones híbridas como las de América Latina, para el uso de la farmacogenética como herramienta para la optimización de las terapias.

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Esta tesis presenta un estudio farmacogenético en una muestra de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda de Uruguay. Específicamente, se centra en el análisis farmacogenético de la 6-mercaptopurina y el metotrexato, fármacos centrales del tratamiento de esta enfermedad en Uruguay. Está organizada en 5 capítulos.

El **capítulo 1** es una introducción general del tema. Se describe, a modo general, la situación actual del cáncer infantil a nivel mundial, especificando cuales son los cánceres infantiles más frecuentes. A su vez, se describe la leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica, su diagnóstico y su clasificación en subtipos, así como también los principales factores de riesgo y pronóstico junto con una breve descripción del esquema terapéutico que se utiliza para tratar dicha enfermedad. Finalmente, se plantea el rol que cumplen las variantes genéticas sobre las reacciones adversas provocadas por los fármacos, el impacto de la ancestralidad sobre la frecuencia de dichas variantes y la importancia de la farmacogenética como herramienta para lograr una terapia individualizada. Este capítulo incluye el objetivo general de la tesis, mientras que los objetivos específicos se detallan en cada uno de los tres capítulos siguientes.

En el **capítulo 2** se describe, muy brevemente y a modo de introducción, la situación actual del cáncer infantil en Uruguay, con especial énfasis en la LLA. Se indican las tasas de incidencia, de mortalidad, de recaída y la sobrevida libre de enfermedad a cinco años para nuestro país. A su vez, se señala brevemente la ancestralidad de la población uruguaya y su importancia en estudios farmacogenéticos. En este capítulo se describen las características demográficas (origen, sexo y edad), las características clínicas (subtipo de LLA, riesgo, leucocitosis al debut, estado del SNC, etc.), las características genéticas (cariotipo y traslocaciones) y el componente ancestral de 192 niños y adolescentes (pacientes) con LLA de Uruguay. Los datos demográficos, clínicos y genéticos fueron obtenidos a partir de las historias clínicas de los pacientes, mientras que la ancestralidad fue determinada a partir de 45 AIMs autosómicos. Los resultados indican que la muestra de pacientes está formada por niños y adolescentes provenientes de todos los departamentos del país y que el 45% de ellos tenía entre 1-5 años al momento del diagnóstico, siendo la relación varones/niñas de 1,26. A su vez, aproximadamente 18% de los pacientes sufrieron algún tipo de recaída. Los datos obtenidos son compatibles con lo previamente descrito para Uruguay. Respecto a la ancestralidad, los resultados muestran una ancestralidad global con un componente mayoritario de origen europeo, seguido del componente nativo americano y, en menor proporción, el componente africano. A modo de conclusión, se podría

decir que la muestra es representativa del total de casos de LLA infantil reportados en nuestro país y que presenta una estructura ancestral tri-híbrida.

En el **capítulo 3** se describe la relación entre las variantes génicas vinculadas al metabolismo de la 6-mercaptopurina (6-MP), los efectos adversos (toxicidad) ocurridos durante la fase de mantenimiento del tratamiento y la ancestralidad. Se analizaron un total de nueve polimorfismos en los genes *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT*, vinculados al metabolismo de la 6-MP, así como también un VNTR en el promotor del gen *TPMT* cuya estructura es A_nB_mC . Como parámetros de toxicidad se utilizaron las semanas de reducción y suspensión de dosis, la dosis de 6-MP y el número de eventos de leucopenia y neutropenia. Los resultados indican que 20% de los pacientes son portadores de variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*. A su vez, existe una asociación entre los eventos de toxicidad hematológica y la presencia de variantes en dichos genes. Los pacientes con variantes en *NUDT15* y/o *TPMT* tienen mayor riesgo de presentar leucopenias severas durante el tratamiento. Los resultados no evidencian una asociación entre la presencia de variantes en el gen *ITPA* y los eventos de toxicidad hematológica, excepto cuando los pacientes con variantes en *NUDT15* y *TPMT* son excluidos de la muestra. Por otro lado, los resultados indican que aquellos pacientes sin variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT* pero que son portadores de cinco o más repetidos "A" en VNTR del promotor de *TPMT* presentan más eventos de leucopenias severas. Finalmente, los resultados no muestran ninguna asociación entre la ancestralidad y la presencia de variantes en estos genes, así como tampoco con la dosis de 6-MP. Sin embargo, se detectó una correlación negativa entre la ancestralidad de origen nativo americano y el número de eventos de leucopenia en aquellos pacientes que no presentan variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*. Los resultados ponen de manifiesto la importancia de determinar la presencia de variantes de genes vinculadas al metabolismo de la 6-MP previo al comienzo del tratamiento, con el fin de disminuir los eventos tóxicos ocurridos durante el mismo. Cabe destacar que los resultados obtenidos en este capítulo fueron publicados en dos artículos científicos. El primero, titulado "*TPMT and NUDT15 genes are both related to mercaptopurine intolerance in acute lymphoblastic leukaemia patients from Uruguay*" (se adjunta en el ANEXO IV) fue publicado en la revista *British Journal of Haematology*. El segundo, titulado "*Ancestry and TPMT-VNTR polymorphism: relationship with hematological toxicity in Uruguayan patients with Acute Lymphoblastic Leukemia*" fue publicado en la revista *Frontiers of Pharmacology* (Apéndice 3.8)

El **capítulo 4** aborda la relación entre las variantes de genes vinculados al transporte y metabolismo del metotrexato (MTX) y la toxicidad en la fase de mantenimiento. Se analizaron

tres polimorfismos en los genes *MTHFR* y *SLC19A1*, y un VNTR en la región 5' UTR del gen *TYMS*. Como parámetros de toxicidad se utilizaron las semanas de reducción y suspensión de dosis, la dosis de MTX y el número de eventos de leucopenia y neutropenia. Los resultados indican que todos los pacientes son portadores de al menos una variante en alguno de estos tres genes, siendo la frecuencia de individuos heterocigotos cercana al 50%. Los resultados no muestran asociación entre la presencia de variantes en los genes *MTHFR* y *SLC19A1* y las toxicidades hematológicas o hepáticas. El VNTR del promotor del gen *TYMS* se encontró asociado únicamente con los eventos de leucopenias en las primeras 8 semanas de la fase de mantenimiento. Teniendo en cuenta estos resultados y considerando que la vía metabólica del MTX es compleja, se concluye que es necesario investigar variantes en otros genes que pudiesen explicar las toxicidades debidas al MTX observadas en esta fase del tratamiento.

Finalmente, el **capítulo 5** presenta las conclusiones finales de los resultados presentados en los capítulos anteriores, así como también las perspectivas de trabajo a futuro.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 Cáncer infantil

Aunque el riesgo de padecer cáncer aumenta conforme envejecemos, este puede afectar a personas de todas las edades, incluyendo a niños de corta edad. El cáncer se origina cuando determinadas células empiezan a dividirse sin control, pudiendo desarrollarse en casi cualquier tejido o parte del cuerpo (American Cancer Society, 2021). Cada año cerca de 400 000 niños y adolescentes de entre 0 y 19 años son diagnosticados de cáncer (Steliarova-Foucher et al., 2017).

A lo largo de los años, se han llevado a cabo numerosos estudios para tratar de determinar las causas del cáncer infantil. Sin embargo, en esas edades hay pocos cánceres causados por factores ambientales o relacionados con los hábitos; por lo que, hasta el momento, se desconoce la inmensa mayoría de las causas de dichos cánceres (Organización Mundial de la Salud, 2021). Dicho de otra manera, salvo en algunas situaciones muy poco frecuentes como el síndrome de Li-Fraumeni u otros síndromes de predisposición hereditaria al cáncer en niños, el cáncer infantil no se puede prevenir ni detectar mediante cribado.

Aunque los índices de mortalidad por cáncer infantil han bajado en casi 70% en las últimas cinco décadas (National Institutes of Health- National Cancer Institute, 2021), el cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte en niños y adolescentes de entre 0 y 19 años en todo el mundo (Steliarova-Foucher et al., 2017), y la principal causa de muerte en niños de entre 1 y 14 años en países desarrollados (NIH-NCI, 2021).

A nivel mundial, los cánceres pediátricos más comunes son las leucemias (entre 25% y 35%), seguido de los tumores encefálicos, los linfomas y los tumores sólidos como el neuroblastoma y los tumores de Wilms (Gupta et al., 2015). La incidencia varía considerablemente entre y dentro las distintas regiones del mundo dependiendo del tipo de cáncer, y de factores como el sexo, la edad, y el grupo racial y/o étnico (Steliarova-Foucher et al., 2017). Concretamente, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) constituye entre el 75% y el 80% de las leucemias pediátricas, con un pico de incidencia entre los 2 y los 5 años de vida (Hunger & Mullighan, 2015). No obstante, existe una heterogeneidad geográfica en la incidencia de LLA pediátrica.

Poblaciones hispanas presentan una mayor incidencia, seguidas por poblaciones de origen europeo, mientras que poblaciones asiáticas y africanas presentan valores más bajos (Pisani et al., 1999; Vijayakrishnan & Houlston, 2010; Hunger & Mullighan, 2015; Oksuzyan et al., 2015). Algunas de las diferencias observadas en la incidencia de LLA podrían ser explicadas por un menor diagnóstico y/o registro en países más vulnerables respecto a países desarrollados. Sin embargo, las diferencias observadas tanto en las poblaciones ancestrales como en las poblaciones híbridas parecen indicar que, además de las dificultades de acceso a los servicios de salud, podría haber factores genéticos que influyen en el riesgo de LLA (Oksuzyan et al., 2015).

1.1.2 Diagnóstico y clasificación (Subtipos) de LLA

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) se caracteriza por la expansión clonal, rápida (aguda) y descontrolada de células precursoras de los linfocitos. Estas células inmaduras (blastos), que presentan una diferenciación anormal y una supervivencia prolongada, invaden la médula ósea (MO) y se propagan a la sangre periférica (SP), al bazo, al hígado, a los ganglios linfáticos, al sistema nervioso central (SNC), a los testículos y al resto de los tejidos (Mrozek et al., 2009). La mayoría de los casos (aproximadamente 80%) corresponde a neoplasias de células precursoras de linfocitos B, en tanto que el 15%-20% afecta a los linfocitos T (Noronha et al., 2011; Dorantes-Acosta et al., 2013). Los pacientes que presentan esta neoplasia pueden presentar cuadros clínicos que van desde casi asintomáticos, como cansancio, fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna, dolor óseo e infecciones; hasta muy graves, como hemorragias, anemias, leucopenias, neutropenias y plaquetopenias severas (Atienza, 2012). El diagnóstico de LLA se confirma cuando las células blásticas de origen linfoide representan más del 20% del total de las células nucleadas de la MO o de las células no eritroides cuando el componente eritroide es mayor al 50%. Hasta el momento, la causa de la LLA continúa siendo desconocida (Martínez-Sánchez et al., 2018).

Debido a que la LLA afecta las células de la médula ósea y de la sangre, puede ser considerada como diseminada por todo el cuerpo desde su inicio. Por esta razón, a diferencia de lo que sucede en la mayoría de los tipos de cánceres, no se asignan estadios con números para describir su extensión por el cuerpo. En cambio, la LLA se clasifica en subtipos de acuerdo al grado de maduración y tipo de linfocito que originó la neoplasia (American Cancer Society, 2021).

En la década del 70, el Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB) propuso clasificar la LLA en tres subtipos: L1, L2 y L3, basándose únicamente en la apariencia que tenían las células leucémicas al microscopio luego de una tinción (Bennett et al., 1976; Dorantes-Acosta et al., 2013). Específicamente, esta clasificación considera el tamaño celular, la cromatina nuclear, la forma del núcleo, los nucléolos, y cantidad y basofilia de citoplasma (Bennett et al., 1976).

En 1995, el Grupo Europeo para la Clasificación Inmunológica de las Leucemias (EGIL) creó un sistema de clasificación basado en los antígenos de superficie (o de diferenciación) presentes en cada una de las distintas células precursoras de los linfocitos (Béné et al., 1995). Este sistema de inmunofenotipificación proporciona una información más detallada que la propuesta por el FAB. Sin embargo, actualmente, la clasificación mediante el análisis morfológico-citoquímico propuesto por el FAB sigue siendo un sistema para describir las leucemias agudas (Parra-Ortega et al., 2020). Según los criterios de la OMS, la evaluación morfológica de la médula ósea es el primer paso para el diagnóstico, debido a que permite distinguir una LLA de una leucemia mieloide aguda (Chiaretti et al., 2014; OMS, 2021). Subsiguientemente, la inmunofenotipificación propuesta por EGIL, realizada mediante citometría de flujo, permite confirmar el linaje y subclasificar la LLA de acuerdo al grado de maduración de la célula.

En conjunto, los análisis morfológico-citoquímico, los inmunofenotípicos, junto con la clínica del paciente y los estudios citogenéticos y moleculares permiten clasificar la LLA en seis subtipos, cuatro de ellos del linaje B (LLA-B) y dos del linaje T (LLA-T). Los cuatro subtipos correspondientes al linaje B se denominan LLA-proB (también llamada LLA-preB temprana o EGIL I), LLA-prepreB (también llamada LLA común o EGIL II), LLA-preB (EGIL III) y LLA-B madura (también llamada leucemia de Burkitt). Por otra parte, los correspondientes al linaje T se designan como LLA-preT y LLA-T madura (Atienza, 2012; Chiaretti et al., 2014). Del total de casos, la LLA-proB representa el 10%, mientras que la LLA-prepreB alcanza el 50%, la LLA-preB comprende el 10% y LLA-B madura apenas el 4%. Por otro lado, la LLA-preT constituye el 5%-10% y la LLA-T madura (cortical) entre el 15% y 20% (Chiaretti et al., 2013; Asociación Española de Afectados por Linfoma, Mieloma y Leucemia [AEAL], 2021).

1.1.3 Factores de riesgo y pronóstico de LLA

En países desarrollados, el tratamiento de la LLA presenta altos índices de efectividad; siendo la supervivencia libre de enfermedad (SLE) cercana al 80% (Hunger & Mullighan, 2015). Sin

embargo, existe una gran heterogeneidad, encontrándose desde pacientes que alcanzan la remisión completa y nunca recaen, hasta aquellos que recaen y fallecen a los pocos meses de haber terminado el tratamiento convencional. Existen algunos factores predictivos de riesgo, que permiten clasificar a los pacientes en tres grupos: riesgo estándar (RE), riesgo intermedio (RI) y riesgo alto (RA). Esta clasificación se realiza al momento del diagnóstico, pero puede cambiar según la cantidad de blastos en sangre periférica al día 8 del tratamiento y al estado de la médula ósea en los días 15 y 33 (Figura 1). El grupo de riesgo al cual pertenece un determinado paciente queda establecido de forma definitiva el día 33 del tratamiento (International BFM Study Group [I-BFM-SG], 2010).

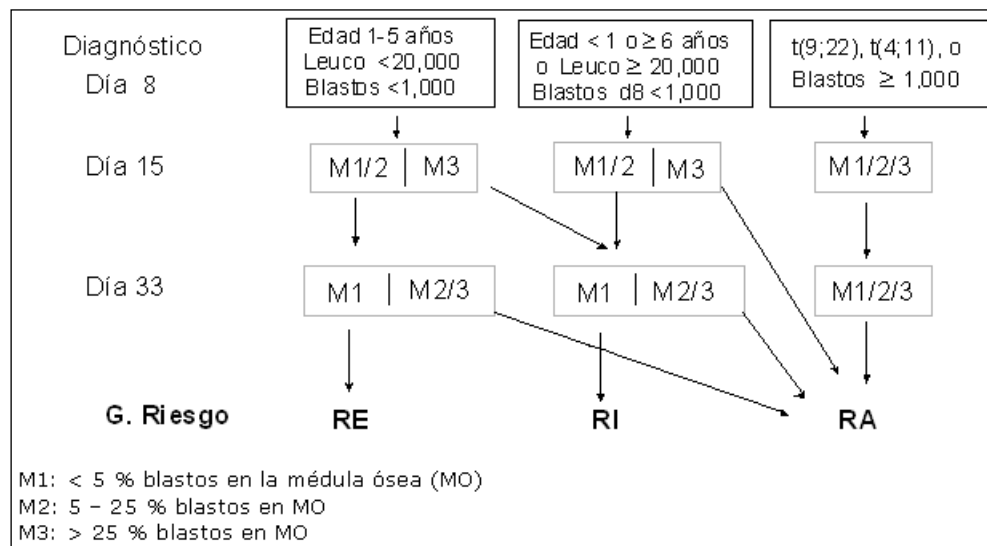


Figura 1. Clasificación grupos de riesgo LLA. Se muestran los criterios para clasificar a los pacientes en los distintos grupos de riesgo. Leuco: Leucocitosis al debut. RE: Riesgo estándar. RI: Riesgo intermedio. RA: Riesgo alto (International BFM Study Group, 2002).

Uno de los factores predictivos de riesgo es la edad del paciente al momento del diagnóstico. Concretamente, los pacientes de entre 1 y 5 años tienen mejor pronóstico que aquellos pacientes menores de 1 año o mayores a 6 años (Chiaretti et al., 2013; Hunger & Mullighan, 2015; Layton-Tovar, 2015). Por esta razón, los pacientes de 1-5 años son considerados de riesgo estándar mientras que el resto son considerados de riesgo intermedio. Otro de los factores predictivos es el recuento inicial de glóbulos blancos (GB). Aquellos pacientes que presentan menos de 20.000 GB (para LLA-B) o 100.000 GB (para LLA-T) al momento del diagnóstico, suelen tener mejor pronóstico (I-BFM-SG, 2010). En consecuencia, la leucocitosis es uno de los factores que el médico tratante tiene en cuenta al momento de determinar el grupo de riesgo al que pertenece de un determinado paciente (Figura 1).

Debido a la proliferación descontrolada de las células leucémicas, las anomalías citogenéticas son considerablemente frecuentes. Dentro de las más frecuentes, encontramos las hiperdiploidías (más de 50 cromosomas), siendo común encontrar cromosomas 4, 10, 17 y 18 adicionales. Estas se ven asociadas a un mejor pronóstico de la enfermedad (Layton-Tovar, 2015). Por el contrario, las hipodiploidias de menos de 44 cromosomas están relacionadas con un mal pronóstico, así como también las traslocaciones que impliquen al cromosoma 14, la amplificación (copias extras) de parte del cromosoma 21, y la presencia de 5 o más cambios cromosómicos, es decir lo que se considera un cariotipo complejo (Harrison, 2013). Asimismo, los pacientes suelen tener un peor pronóstico si las células leucémicas tienen la traslocación $t(9;22)(q34;q11)$, que resulta en la fusión de los genes *BCR* y *ABL* (cromosoma filadelfia o Phi+); la traslocación $t(4;11)(q21;q23)$, que involucra los genes *MLL* y *AF4* y/o la traslocación $t(1;19)(q23;p13)$, que afecta los genes *E2A* (*TCF3*) y *PBX1* (Borowitz et al., 2008; Harrison, 2013; Layton-Tovar, 2015; Chagoy-Vivaldo et al., 2018). Según Atienza (2012) el 3%-5% de los pacientes con LLA presentan la $t(9;22)$, mientras que el 2% presentan la $t(4;11)$ y entre el 5% y 6% la $t(1;19)$. Por otro lado, los pacientes suelen tener un mejor pronóstico si las células leucémicas tienen la traslocación $t(12;21)(p13;q22)$ responsable de la fusión de gen *TEL* (*ETV6*), codificado en el cromosoma 12, y el gen *AML1* (*RUNX1* o *CBFA2*) codificado en el cromosoma 21 (Layton-Tovar et al., 2015). Esta traslocación se encuentra en el 20%-25% de los casos de LLA-B, pero es extremadamente rara en la LLA-T (Layton-Tovar et al., 2015; Harrison, 2013). De todas estas alteraciones citogenéticas, las hipodiploidias, los cariotipos complejos y las traslocaciones $t(9;22)$ y $t(4;11)$ son considerados factores predictivos para clasificar a los pacientes en el grupo de riesgo alto (Figura 1).

El sexo, la infiltración del sistema nervioso central (SNC), el subtipo de LLA y la ancestralidad son factores pronósticos de consideración (Layton-Tovar, 2015; NIH-NCI, 2021). Sin embargo, no son considerados factores predictivos al momento de determinar el grupo de riesgo de los pacientes. Por lo general, las niñas tienen mejor pronóstico que los varones (Castillo et al., 2012; Dufort y Álvarez, 2021). Asimismo, aquellos pacientes que no presentan infiltración del SNC (SNC 1 y 2) tienen un pronóstico más favorable que aquellos que si presentan infiltración (SNC 3) (Burger et al., 2003). A su vez, el subtipo de LLA está vinculado con la respuesta inicial al tratamiento. Las LLA de células T y la LLA-B madura tienen un pronóstico más desfavorable que todas aquellas LLA de células precursoras de linfocitos B (proB, prepreB y preB) (Layton-Tovar, 2015). Finalmente, se ha descrito que pacientes hispanos o de origen africano tiene una tasa de cura más baja que aquellos con un componente ancestral predominantemente europeo (Layton-Tovar, 2015).

La clasificación de los pacientes en grupos de riesgo según los factores predictivos, junto con la optimización de los esquemas terapéuticos, han contribuido notablemente al aumento de la SLE de la LLA. Sin embargo, la recaída de la enfermedad (reaparición de células leucémicas) sigue siendo un problema difícil de resolver. La clasificación de los pacientes en grupos de riesgo no es suficientemente precisa como para predecir una posible recaída. De hecho, un número considerable (cerca del 50%) de las recaídas sucede en niños considerados de riesgo estándar o intermedio (Jaime-Pérez, 2017).

1.1.4 Tratamiento de LLA

A nivel mundial, existen varios esquemas terapéuticos utilizados para el tratamiento contra la LLA. Los más reconocidos son el de l' Associazione Italiana di Ematologia e d' Oncologia Pediatrica (AIEOP), el del grupo alemán Berlin-Frankfurt-Münster (BFM), el del Dutch Childhood Oncology Group (DCOG), el del Dana-Farber Cancer Institute consortium (DFCI), el de la Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO), el del St. Jude Children's Research Hospital (SJCRH) y el del United Kingdom Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia (UKALL). De estos, el protocolo BFM es utilizado en más de veinte países de diferentes continentes, incluyendo a Uruguay. Según este protocolo, el tratamiento consiste en una poliquimioterapia de dos años de duración (104 semanas) y consta de cinco fases: Inducción a la remisión, Intensificación, Consolidación, Reintensificación y Mantenimiento (I-BFM-SG, 2010) (Figura 2).

La fase de inducción está destinada a destruir la mayor cantidad posible de células leucémicas, con el objetivo de alcanzar la remisión completa (RC) de la enfermedad. Tiene una duración de 33 días y durante la misma se administran cinco fármacos: Daunorubicina (DNR), L-Asparaginasa (L-ASP), Metotrexato Intratecal (MTX IT), Prednisona (PRED) y Vincristina (VCR). A excepción de la PRED, que se administra de manera continua durante los 33 días (con una rampa de subida y otra de bajada), el resto de los fármacos es administrado en forma de pulsos y en grandes dosis (I-BFM-SG, 2010). Según el NIH-NCI la RC se alcanza cuando *"todos los signos y síntomas de cáncer han desaparecido, pero el cáncer todavía puede estar en el cuerpo"*; mientras que la enfermedad mínima residual (EMR) se usa para describir *"la presencia de un número muy pequeño de células cancerosas que permanecen en el cuerpo"* (detectada por citometría de flujo). En LLA, la RC se alcanza cuando menos del 5% de la MO está compuesta por células blásticas. Los pacientes que consiguen la RC al día 33 suelen tener un mejor pronóstico que aquellos cuya remisión tarda más (Martínez-Sánchez et al., 2018). Por

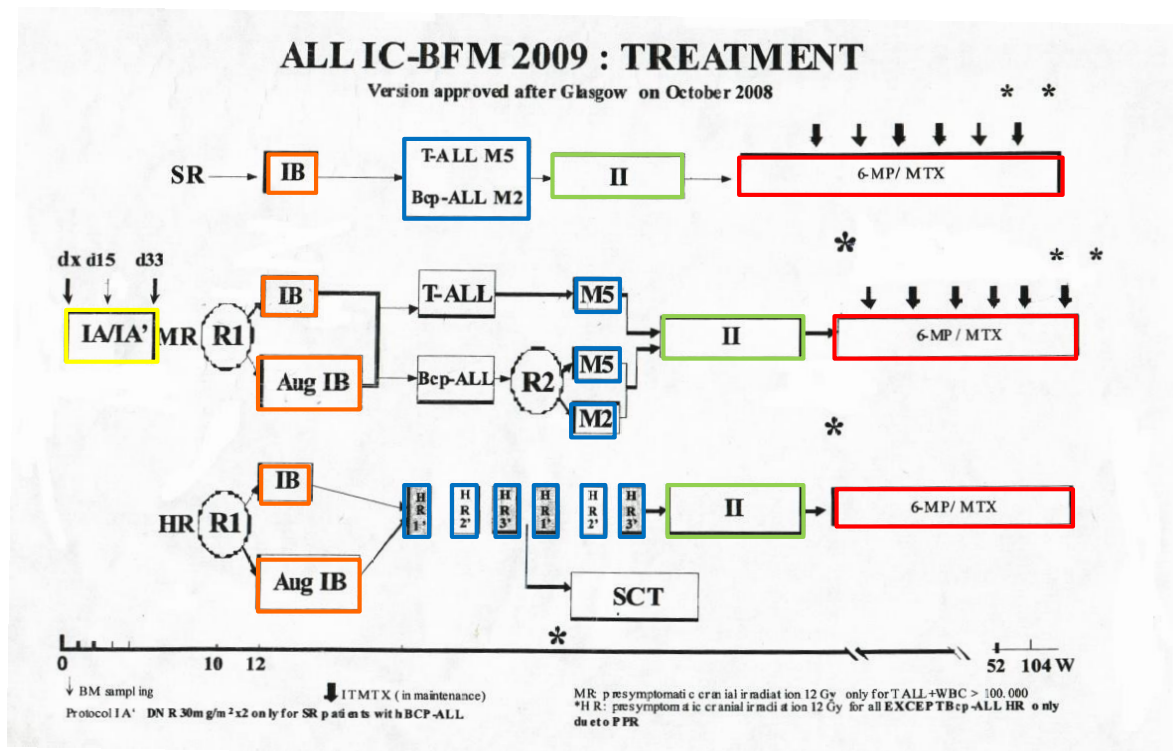


Figura 2. Esquema del Protocolo ALL IC-BFM 2009. Se muestran las diferentes fases del tratamiento según el grupo de riesgo, junto con la duración de cada una. En amarillo la fase de inducción (IA/IA'), en naranja la fase de intensificación (IB/AugIB), en azul la fase de consolidación (M2/M5/HR1'/HR2'/HR3'), en verde la fase de reintensificación (II) y en rojo la fase de mantenimiento (6-MP/MTX). SR: Riesgo estándar. MR: Riesgo intermedio. HR: Riesgo alto. R1/R2: Randomización. *Gy: Radioterapia (Indicada solo para pacientes con LLA-T o con infiltración del SNC) (I-BFM-SG, 2010).

otro lado, se ha visto que los pacientes con EMR al día 33 tienen más probabilidad de sufrir una recaída (Berry et al., 2017).

Las fases de intensificación, consolidación y reintensificación comienzan una vez que la enfermedad entró en remisión. Su objetivo es destruir las células malignas restantes y prevenir un nuevo crecimiento leucémico. Las fases de intensificación y consolidación son las fases más variables en cuanto a duración (entre 27 y 38 semanas) y esquema terapéutico, según el grupo de riesgo al que pertenece el paciente. Concretamente, los pacientes de riesgo alto reciben un régimen terapéutico más intenso con dosis más altas e incluso con fármacos adicionales a los administrados en pacientes de riesgo estándar e intermedio. Durante estas fases, los fármacos utilizados son: Ciclofosfamida (CPM), Citarabina (ARA-C), Dexametasona (DEXA), L-ASP, Leucovorina cálcica (LCV), MTX, VCR, y 6-mercaptopurina (6-MP). La fase de reintensificación es común para todos los pacientes, sin importar al grupo de riesgo al que pertenecen. Tiene

una duración de 49 días, durante los que se administra ARA-C, CPM, DEXA, Doxorubicina (DOXO), L-ASP, MTX IT, VCR y 6-Tioguanina (6-TG) (I-BFM-SG, 2010).

Finalmente, la fase de mantenimiento es la etapa más larga del tratamiento, con una duración de 74 semanas en aquellos pacientes de riesgo estándar y de 63 semanas para los de riesgo alto e intermedio. Esta fase comienza dos semanas después de concluida la fase de reintensificación y durante la misma se utilizan únicamente dos fármacos: la 6-MP ($50\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$) y el MTX ($20\text{mg}/\text{m}^2/\text{semana}$), ambos administrados vía oral (Figura 2, rectángulo rojo). El éxito del tratamiento actual con el protocolo BFM se atribuye, en parte, a los meses de mantenimiento del mismo; el cual prolonga la remisión obtenida durante la fase de inducción (Yang et al., 2015; Moriyama et al., 2016). El tratamiento finaliza una vez que se completa la fase de mantenimiento y el paciente alcanza lo que se denomina estado de "OFF" (I-BFM-SG, 2010).

Sin embargo, una vez terminado este tratamiento, los pacientes deben hacer un seguimiento durante 5 años, en los cuales se controla el estado de la MO con el fin de detectar posibles recaídas de la enfermedad. La evolución clínica y la respuesta al tratamiento de una recaída varían según el lugar donde ocurrió la recaída (MO, SNC y/o testículos), el momento de la recaída (temprana o tardía), las características biológicas del clon leucémico, la respuesta a la re-inducción a la remisión y el estado inmunológico del paciente (Makiya, 2013). De manera general, la recaída aislada del SNC tiene mayor probabilidad de cura que cuando se trata de una recaída que afecta la MO de manera aislada, o combinada con otros sitios (Einsiedel et al., 2005; Masureka et al., 2014). Por otro lado, las recaídas tempranas tienen una evolución menos favorable que las recaídas tardías. Por ejemplo, las recaídas aisladas del SNC tienen una tasa de supervivencia de 40%-50 % cuando la recaída es temprana y de 75%-80 % cuando la recaída es tardía; mientras que las recaídas medulares tempranas tienen una tasa de supervivencia menor a 20% y las tardías entre 40%-60% (Einsiedel et al., 2005; Nguyen et al., 2008).

1.1.5 Reacciones adversas, farmacogenética y ancestralidad

Debido a la acción inespecífica de los fármacos utilizados y al estrecho rango farmacológico de los mismos, un porcentaje importante de los pacientes sufren eventos de toxicidad severa (hematológica, hepática, gastrointestinal, etc.) durante el tratamiento (Yang et al., 2012; Schmiegelow et al., 2014; Moriyama et al., 2016). Estas toxicidades obligan a reducir, y en varias ocasiones a suspender, una o varias semanas del tratamiento. Por lo tanto, una

reducción de los eventos de toxicidad debida a los fármacos resultaría en una menor interrupción de la quimioterapia y como consecuencia un menor número de recaídas de la enfermedad (Adam de Beaumais et al., 2011).

A nivel general, las reacciones adversas provocadas por los fármacos administrados durante un determinado tratamiento constituyen un importante problema tanto para los pacientes y sus familiares como para los servicios de salud y la industria farmacéutica. Muchas veces, esas reacciones adversas son leves y desaparecen si se modifica la dosis. No obstante, otras son más graves y pueden provocar daños irreversibles en los pacientes e incluso su muerte. Hasta el momento, la dosificación de medicamentos antitumorales se ha realizado de forma considerablemente empírica, donde pequeños ensayos fase I predicen una dosis tolerable y estudios posteriores perfeccionan esa predicción. Sin embargo, debido a la variabilidad interindividual, una proporción de los pacientes experimenta inevitablemente una mayor toxicidad frente a dosis de fármacos que son estándar para la mayoría de la población. En este sentido, el tratamiento contra la LLA no es una excepción. Al igual que lo que sucede con el riesgo de LLA, podrían existir factores genéticos que estuvieran influyendo en la respuesta al tratamiento y/o que podrían explicar, en parte, los efectos adversos ocurridos durante el mismo. De hecho, en las últimas décadas se ha determinado que algunas variantes de genes involucrados en las vías de distribución y metabolismo de ciertos fármacos están asociadas con la toxicidad y con la respuesta al tratamiento (Relling *et al.*, 2011; Chrzanowska et al., 2012; Farfan et al., 2014; Ma et al., 2014; Azimi et al., 2015). En efecto, en algunos casos, la agencia del Gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos y medicamentos (FDA) recomienda el genotipado previo a la administración del fármaco (Food and Drug Administration [FDA], 2021).

La farmacogenética permite predecir, en base al genotipo, qué fármacos serán más eficaces y seguros (menor número de efectos adversos) para un individuo en particular. Es decir, propone una medicina personalizada teniendo en cuenta los efectos de las variantes genéticas en la respuesta a fármacos. A partir de la información obtenida de estudios farmacogenéticos, es posible identificar aquellos pacientes con una mayor o menor susceptibilidad a un determinado fármaco, los cuales se beneficiarían con un cambio en el régimen terapéutico, reduciendo así la incidencia de reacciones adversas y/o mejorando la respuesta a la terapia. Por esta razón, la farmacogenómica constituye una herramienta muy valiosa a la hora de seleccionar una terapia en particular, identificando pacientes cuyo perfil genético sugiera incapacidad o severo déficit en la detoxificación de un determinado fármaco. Con el objetivo

de lograr una terapia individualizada, la información genética aporta un dato adicional que puede ser usado en combinación con otras características del individuo como la edad, el sexo, el componente racial y/o étnico, la función hepática, la función renal, el uso concomitante de otros fármacos, etc.

Por otro lado, se ha visto que muchas de las variantes génicas de nuestro genoma presentan frecuencias diferentes en las distintas poblaciones (1000 Genomes Project Consortium, 2015). Estudios recientes han confirmado que la ancestralidad juega un rol importante en la respuesta al tratamiento de LLA, donde las poblaciones hispanas, asiáticas, africanas o afro-americanas y nativo americanas responden de manera menos eficaz al tratamiento en comparación con poblaciones europeas (Yang et al., 2011; Goggins & Lo, 2012; Walsh et al., 2014).

Por lo tanto, determinar la ancestralidad de nuestra población y establecer cuáles son las variantes genéticas vinculadas a los efectos adversos debidos a los fármacos utilizados, permitiría optimizar el tratamiento y minimizar la exposición de los pacientes estos eventos de una manera individualizada.

1.2 OBJETIVO GENERAL

El objetivo de esta tesis es analizar variantes génicas involucradas en la distribución y el metabolismo de la 6-mercaptopurina y el metotrexato, fármacos fundamentales del tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda pediátrica; y determinar su relación con los eventos de toxicidad en la fase de mantenimiento y la ancestralidad individual.

1.3 BIBLIOGRAFÍA

1000 Genomes Project Consortium, Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Garrison, E. P., Kang, H. M., ... Abecasis, G. R. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526 (7571), 68-74.

Adam de Beaumais, T., Fakhoury, M., Medard, Y., Azougagh S., Zhang, D., Yakouben, K., & Jacqz-Aigrain, E. (2011). Determinants of mercaptopurine toxicity in paediatric acute lymphoblastic leukemia maintenance therapy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 71(4), 575-84. doi: 10.1111/j.1365-2125.2010.03867.x

American Cancer Society. (2021). *¿Qué es la leucemia linfocítica aguda?* Recuperado de: <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-linfocitica-aguda/acerca/que-es-leucemia-linfocitica-aguda.html>

Asociación Española de Afectados por Linfoma, Mieloma y Leucemia (AEAL). (2021). Recuperado de: <http://www.aeal.es/leucemia-linfoblastica-aguda-espana/4-como-se-clasifica-la-leucemia-linfoblastica-aguda>

Atienza, A.L. (2012). Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatría Integral*, 453.

- Azimi, F., Mortazavi, Y., Alavi, S., Khalili, M., & Ramazani, A. (2015). Frequency of ITPA gene polymorphisms in Iranian patients with acute lymphoblastic leukemia and prediction of its myelosuppressive effects. *Leukemia research*, 39(10), 1048-1054. doi: 10.1016/j.leukres.2015.06.016
- Bene, M. C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W. D., Matutes, E., Orfao, A., & Van't Veer, M. B. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 9(10), 1783-1786.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., & Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias French-American-British (FAB) co-operative group. *British journal of haematology*, 33(4), 451-458. doi: 10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x
- Berry, D. A., Zhou, S., Higley, H., Mukundan, L., Fu, S., Reaman, G. H., ... & Radich, J. P. (2017). Association of minimal residual disease with clinical outcome in pediatric and adult acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *JAMA oncology*, 3(7), e170580. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0580
- Bonilla, C., Bertoni, B., González, S., Cardoso, H., Brum-Zorrilla, N., & Sans, M. (2004). Substantial native American female contribution to the population of Tacuarembó, Uruguay, reveals past episodes of sex-biased gene flow. *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Association*, 16(3), 289-297. doi: 10.1002/ajhb.20025
- Bonilla, C., Bertoni, B., Hidalgo, P. C., Artagaveytia, N., Ackermann, E., Barreto, I.,... Kittles, R.A. (2015). Breast cancer risk and genetic ancestry: a case-control study in Uruguay. *BMC women's health*, 15(1), 1-10. doi: 10.1186/s12905-015-0171-8
- Borowitz, M. J., Devidas, M., Hunger, S. P., Bowman, W. P., Carroll, A. J., Carroll, W. L., ... & Camitta, B. M. (2008). Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 111(12), 5477-5485. doi: 10.1182/blood-2008-01-132837
- Burger, B., Zimmermann, M., Mann, G., Kuhl, J., Loning, L., Riehm, H., ... & Schrappe, M. (2003). Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. *Journal of Clinical Oncology*, 21(2), 184-188. doi: 10.1200/JCO.2003.04.096
- Castillo, L., Dabezies, A., Dufort, G., Carracedo, M., Castiglioni, M., Simón, E., ... & Silveira, A. (2012). Evolucion del cáncer pediátrico en Uruguay (1992-2011). *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 83(1), 26-30.
- Chargoy-Vivaldo, E., Martínez-Hernández, C., Cacique-Sánchez, C., Jimaréz-Rodríguez, J. M., & Gómez-Cárdenas, L. (2018). Translocaciones en leucemia linfoblástica aguda y supervivencia a cinco años en niños. *Revista de Hematología*, 19(4), 165-173
- Chiaretti, S., Vitale, A., Cazzaniga, G., Orlando, S. M., Silvestri, D., Fazi, P., ... & Foà, R. (2013). Clinico-biological features of 5202 patients with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the Italian AIEOP and GIMEMA protocols and stratified in age cohorts. *haematologica*, 98(11), 1702. doi: 10.3324/haematol.2012.080432
- Chiaretti, S., Zini, G., & Bassan, R. (2014). Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infec Dis*, 6(1): e2014073. doi: 10.4084/MJHID.2014.073
- Chrzanowska, M., Kuehn, M., Januszkiewicz-Lewandowska, D., Kurzawski, M., & Drożdżik, M. (2012). Thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in children with acute lymphoblastic leukemia. *Acta Pol Pharm*, 69(3), 405-410.
- Dorantes, E., Medina, A., Dávila, K., & López, B. (2013). Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de acuerdo al EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemia). *Gac Mexicana Oncol*, 12(3), 136-42.
- Dufort y Álvarez, G. (2021). Epidemiología del cáncer en niños y adolescentes en Uruguay: 2008-2012. Un estudio de registro poblacional. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 92(1). doi: 10.31134/AP.92.1.3.

- Farfan, M.J., Salas, C., Canales, C., Silva, F., Villarroel, M., Kopp, K., ... & Morales, J. (2014). Prevalence of TPMT and ITPA gene polymorphisms and effect on mercaptopurine dosage in Chilean children with acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer*, 14(1), 299. doi: 10.1186/1471-2407-14-299
- Food and Drug Administration (FDA). (2021). *Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs*. Recuperado de: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&varAppNo=09053>
- Goggins, W. B., & Lo, F. F. (2012). Racial and ethnic disparities in survival of US children with acute lymphoblastic leukemia: evidence from the SEER database 1988–2008. *Cancer Causes & Control*, 23(5), 737-743. doi: 10.1007/s10552-012-9943-8
- Gupta, S., Howard, S. C., Hunger, S. P., Antillon, F. G., Metzger, M. L., Israels, T., ... & Rodriguez-Galindo, C. (2015). Treating childhood cancer in low-and middle-income countries. In: *Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3)*. Washington DC: *The International Bank for Reconstruction and Development/ The World Bank Group*, 121-46. doi: 10.1596/978-1-4648-0349-9_ch7.
- Einsiedel, H. G., von Stackelberg, A., Hartmann, R., Fengler, R., Schrappe, M., Janka-Schaub, G., ... & Henze, G. (2005). Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Munster Group 87. *Journal of Clinical Oncology*, 23(31), 7942-7950. doi: 10.1200/JCO.2005.01.1031
- Harrison C. J. (2013). Targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia: new insights. Hematology. *American Society of Hematology. Education Program*, 2013, 118–125. doi: 10.1182/asheducation-2013.1.118
- Hidalgo, P.C., Bengochea, M., Abilleira, D., Cabrera, A., & Alvarez, I. (2005). Genetic admixture estimate in the Uruguayan population based on the loci LDLR, GYPA, HBG, GC and D7S8. *International Journal of Human Genetics*, 5(3), 217-222
- Hunger, S. P., & Mullighan, C. G. (2015). Acute lymphoblastic leukemia in children. *New England Journal of Medicine*, 373(16), 1541-1552. doi: 10.1056/NEJMra1400972.
- Hunger, S. P., Lu, X., Devidas, M., Camitta, B. M., Gaynon, P. S., Winick, N. J., ... & Carroll, W. L. (2012). 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*, 30(14), 1663. doi: 10.1200/JCO.2011.37.8018
- International BFM Study Group. (I-BFM-SG). <https://bfminternational.wordpress.com/>
- Jaime-Pérez, J. C. (2017). El problema de la recaída en la leucemia linfoblástica aguda de la infancia. *Revista de Hematología*, 18(1), 1-3.
- Layton-Tovar, C. F. (2015). Factores de pronóstico en leucemia linfoblástica aguda pediátrica: posibles marcadores moleculares. *Medicina e Investigación*, 3(1), 85-91. doi: 10.1016/j.mei.2015.02.008
- Li, J., Lao, X., Zhang, C., Tian, L., Lu, D., & Xu, S. (2014). Increased genetic diversity of ADME genes in African Americans compared with their putative ancestral source populations and implications for Pharmacogenomics. *BMC Genetics*, 15(1), 52. doi: 10.1186/1471-2156-15-52
- Ma, X., Zheng, J., Jin, M., Li, W., Gao, C., Zhang, D., ... & Xie, J. (2014). Inosine triphosphate pyrophosphohydrolase (ITPA) polymorphic sequence variants in Chinese ALL children and possible association with mercaptopurine related toxicity. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(7), 4552
- Makiya, M. (2013). Tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda Pediátrica Recaída. *Hematología*, 17, 82-88.
- Martínez-Sánchez, L. M., Jaramillo-Jaramillo, L. I., Álvarez-Hernández, L. F., Hernández-Restrepo, F., Ruiz-Mejía, C., & Villegas-Álzate, J. D. (2018). Enfermedad Mínima Residual en leucemia: rompiendo el paradigma de remisión completa. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 34(1), 21-32.
- Masurekar, A. N., Parker, C. A., Shanyinde, M., Moorman, A. V., Hancock, J. P., Sutton, R., ... & Saha, V. (2014). Outcome of central nervous system relapses in childhood acute lymphoblastic leukaemia–

- prospective open cohort analyses of the ALLR3 trial. *PLoS One*, 9(10), e108107. doi: 10.1371/journal.pone.0108107
- Mörücke, A., Zimmermann, M., Reiter, A., Henze, G., Schrauder, A., Gadner, H., ... & Schrappe, M. (2010). Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia*, 24(2), 265-284. doi: 10.1016/j.ymgme.2005.03.011
- Moriyama, T., Nishii, R., Perez-Andreu, V., Yang, W., Klusmann, F. A., Zhao, X., ... & Hofmann, U. (2016). NUDT15 polymorphisms alter thiopurine metabolism and hematopoietic toxicity. *Nature genetics*, 48(4), 367-373. doi: 10.1038/ng.3508
- Mrózek, K., Harper, D. P., & Aplan, P. D. (2009). Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology/Oncology Clinics*, 23(5), 991-1010. doi: 10.1016/j.hoc.2009.07.001.
- National Institutes of Health (NIH) - National Cancer Institute (NCI). (2021). Cánceres Infantiles. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/infantil#tipos-de-cancer-en-ninos>.
- Nguyen, K., Devidas, M., Cheng, S. C., La, M., Raetz, E. A., Carroll, W. L., ... & Loh, M. L. (2008). Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia*, 22(12), 2142-2150. doi: 10.1038/leu.2008.251
- Noronha, E. P., Marinho, H. T., Thomaz, E. B. A. F., Silva, C. A., Veras, G. L. R., & Oliveira, R. A. G. (2011). Immunophenotypic characterization of acute leukemia at a public oncology reference center in Maranhão, northeastern Brazil. *Sao Paulo Medical Journal*, 129(6), 392-401. doi: 10.1590/S1516-31802011000600005
- Oksuzyan, S., Crespi, C. M., Cockburn, M., Mezei, G., Vergara, X., & Kheifets, L. (2015). Race/ethnicity and the risk of childhood leukaemia: a case-control study in California. *J Epidemiol Community Health*, 69(8), 795-802. doi: 10.1136/jech-2014-204975
- Organización Mundial de la Salud. (2021). *El cáncer infantil*. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer-in-children>
- Parra-Ortega, I., Núñez-Hernández, E., Nájera-Martínez, N., Mendoza-García, E., Cortés-Flores, D. C., Gaytán-Morales, F., ... & López-Martínez, B. (2020). Concordancia entre el análisis morfológico y el inmunofenotipo al momento del diagnóstico y clasificación de leucemias agudas en pacientes pediátricos. *Rev Mex Patol Clin*, 66(4), 193-211.
- Pisani, P., Parkin, D. M., Bray, F., & Ferlay, J. (1999). Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *International journal of cancer*, 83(1), 18-29. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19990924)83:1<18::aid-ijc5>3.0.co;2-m.
- Relling, M.V., Gardner, E.E., Sandborn, W.J., Schmiegelow, K., Pui, C.H., Yee, S.W., ... & Klein, T.E. (2011). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89(3), 387-391. doi: 10.1038/clpt.2010.320
- Sans, M., Salzano, F. M., & Chakraborty, R. (1997). Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. *Human biology*, 69(2), 161-170.
- Schmiegelow, K., Nielsen, S.N., Frandsen, T.L., & Nersting, J. (2014). Mercaptopurine/Methotrexate Maintenance Therapy of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical Facts and Fiction. *Journal of pediatric hematology/oncology*, 36(7), 503-517. doi: 10.1097/MPH.0000000000000206
- Steliarova-Foucher, E., Colombet, M., Ries, L. A., Moreno, F., Dolya, A., Bray, F., ... & Tretarre, B. (2017). International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study. *The Lancet Oncology*, 18(6), 719-731. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30186-9
- Vijayakrishnan, J., & Houlston, R. S. (2010). Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Haematologica*, 95(8), 1405. doi: 10.3324/haematol.2010.022095.
- Walsh, K. M., de Smith, A. J., Welch, T. C., Smirnov, I., Cunningham, M. J., Ma, X., ... & Wiemels, J. L. (2014). Genomic ancestry and somatic alterations correlate with age at diagnosis in Hispanic children

with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *American journal of hematology*, 89(7), 721-725. doi: 10.1002/ajh.23727

Yang, J.J., Cheng, C., Devidas, M., Cao, X., Fan, Y., Campana, D., ... & Relling, M. V. (2011). Ancestry and pharmacogenomics of relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*, 43(3), 237-241. doi: 10.1038/ng.763

Yang, J.J., Cheng, C., Devidas, M., Cao, X., Campana, D., Yang, W., ... & Relling, M.V. (2012). Genome-wide association study identifies germline polymorphisms associated with relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 120(20), 4197-4204. doi: 10.1182/blood-2012-07-440107

Yang, J. J., Landier, W., Yang, W., Liu, C., Hageman, L., Cheng, C., ... & Relling, M. V. (2015). Inherited NUDT15 variant is a genetic determinant of mercaptopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology*, 33(11), 1235. doi: 10.1200/JCO.2014.60.1740

CAPÍTULO 2

LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA PEDIÁTRICA en URUGUAY: CARACTERÍSTICAS Y ANCESTRALIDAD

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 LLA en Uruguay

En Uruguay se detectan aproximadamente 100 nuevos casos de cáncer infantil por año. La mayor tasa de incidencia se observa en varones de 0 a 4 años, siendo la relación varones/niñas de 1,2 (Dufort y Álvarez, 2021). Las leucemias y linfomas representan el 43,4% de todas las neoplasias, mientras que los tumores sólidos representan el 56,6% restante. Al igual que en el resto del mundo (American Cancer Society), las leucemias son el tipo de cáncer más común, alcanzando el 30,2% de los mismos. De entre estas, la LLA representa el 77,5%, es decir 23,4% de todos los casos de cáncer infantil reportados en nuestro país (Dufort y Álvarez, 2021).

En 2001, un estudio sobre la tasa de mortalidad por cáncer infantil en Uruguay, mostró que los valores eran similares, o incluso menores, a los informados para otros países de la región pero que, sin embargo, era el doble de lo reportado en países desarrollados como Estados Unidos, Canadá, Alemania o España. La disparidad más notoria ocurría en la mortalidad por LLA, en la que Uruguay presentaba 1,65 por 100.000 mientras que en Estados Unidos y Canadá era de apenas 0,6 (Castillo et al., 2012). Esta situación ha cambiado notoriamente en las últimas dos décadas. Debido al desarrollo de nuevos esquemas terapéuticos (quimioterapia de varios fármacos, en ocasiones combinada con radiación), a la creación de unidades especializadas, a la colaboración entre diferentes instituciones nacionales e internacionales y al tratamiento multidisciplinario de la enfermedad, los actuales datos de mortalidad por cáncer en la franja entre 0 y 14 años se redujeron a menos de la mitad (Castillo et al., 2012). Específicamente, la sobrevida libre de enfermedad a cinco años (SLE) para la LLA pasó de 65% a casi 80%; no existiendo diferencias de acuerdo al nivel socio-económico-cultural de las familias de los pacientes. Esta cifra es la más alta en toda América Latina y similar a lo observado en países desarrollados (Moricke et al., 2010; Castillo et al., 2012; Hunger et al., 2012; Dufort y Álvarez, 2021). A pesar del éxito del tratamiento, aproximadamente un 20% de los pacientes sufren recaídas tanto hematológicas, como del Sistema Nervioso Central (SNC) o testiculares, luego

de la remisión de la enfermedad (RC). Estas recaídas pueden producir un aumento de la tasa de mortalidad debida LLA.

En Uruguay, el tratamiento de LLA se lleva a cabo principalmente el Servicio Hemato Oncológico Pediátrico (SHOP) del Centro Hospitalario Pereira Rossell (CHPR), centro de referencia para esta enfermedad en nuestro país; donde se utiliza principalmente el protocolo alemán BFM (al presente en su versión 2009). Como excepción, algunos pacientes menores de 1 año, utilizan el protocolo interfant 06. Por otro lado, aquellos pacientes Phi+ reciben, además de los fármacos establecidos en el protocolo BFM, un inhibidor de la tirosina quinasa (imatinib o dasatinib).

2.1.2 Ancestralidad en Uruguay

Como resultado de las acciones de persecución y exterminio de los charrúas y otros indígenas ocurridas durante la primera mitad del siglo XIX en nuestro país, Uruguay es actualmente el único país de Sudamérica que no cuenta con grupos de indígenas nativos que mantengan sus costumbres ancestrales (Bonilla et al., 2004). Debido a las olas migratorias ocurridas entre la segunda mitad del siglo XIX y principios del siglo XX, la población uruguaya ha sido considerada mayoritariamente, o incluso exclusivamente, de origen europeo (Sans, 1997; Bonilla et al., 2004), tanto desde el punto de vista cultural como biológico. Es decir, la contribución de las poblaciones nativo americanas y africanas a la actual población uruguaya han sido, históricamente, pasadas por alto. Sin embargo, varios estudios basados en marcadores genéticos han demostrado que la población uruguaya tiene, al igual que otras poblaciones de América del Sur, una estructura tri-híbrida resultado del flujo de genes procedentes de poblaciones tanto europeas, como nativo americanas y africanas (Sans, 1997; Bonilla et al., 2004; Hidalgo et al., 2005; Bonilla et al., 2015; Sans et al., 2020). Estos estudios han permitido demostrar que, aunque la principal contribución a la actual población uruguaya proviene de poblaciones de origen europeo (aprox. 70-80%), el aporte de poblaciones nativo americanas y africanas no es para nada despreciable, siendo aproximadamente 10-15% y 6-10%, respectivamente (Sans et al., 2020). Asimismo, estos estudios indican que existe una gran heterogeneidad geográfica de estos componentes y que, además, presenta una gran variabilidad interindividual (Sans, 1997; Hidalgo et al., 2005; Bonilla et al., 2015).

Teniendo en cuenta esta estructura tri-híbrida, la frecuencia de las variantes génicas vinculadas al transporte y metabolismo de los fármacos utilizados durante el tratamiento de LLA en nuestra población podría ser diferente a las reportadas para otras poblaciones; tal y

como ha sido demostrado en afro-americanos (Li et al., 2014). Por este motivo, resulta necesario investigar el impacto de la ancestralidad en la frecuencia de las distintas variantes génicas y no extrapolar datos de otras poblaciones que podrían no ser relevantes para nuestro país. Asimismo, para intentar disminuir el porcentaje de pacientes uruguayos que presentan efectos adversos durante el tratamiento de LLA, es necesario conocer sus características genéticas y poder así modificar la terapia en función al genotipo.

2.2 OBJETIVO

Caracterizar una muestra de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda desde un punto de vista demográfico, clínico y genético; así como también determinar la ancestralidad de cada paciente y general de la muestra.

2.2.1 Objetivos específicos

- Determinar, a partir de los datos de las historias clínicas, cuáles son las características demográficas (sexo, edad, departamento de origen) de los pacientes.
- Determinar las características clínicas y genéticas (subtipo de LLA, SNC, riesgo, leucocitosis al debut y presencia de traslocaciones) de los pacientes.
- Determinar la ancestralidad individual de cada paciente.
- Determinar la ancestralidad general de la muestra de pacientes y, mediante su comparación con una muestra control, establecer que es una muestra representativa de la población uruguaya.

2.3 MATERIALES & MÉTODOS

2.3.1 Muestras

Se obtuvo una muestra de sangre periférica de 192 niños y adolescentes de entre 6 meses y 19 años de edad, diagnosticados con LLA, provenientes del SHOP-CHPR. La extracción de sangre fue realizada por técnicos de dicha institución luego de que los padres/tutores firmaran un consentimiento informado y los pacientes un asentimiento informado de acuerdo al concepto de autonomía progresiva. El ADN de las muestras se obtuvo por técnicas estándares de extracción salina y precipitación con alcohol, a partir de sangre periférica previamente obtenida (muestra de pacientes). Las muestras fueron colectadas, durante 2010-2019, en el marco de proyectos de investigación (Fundación Manuel Pérez 2009, CSIC iniciación 2011;

CSIC-VUSP 2017; CSIC I+D 2018, ANII-María Viñas 2018 y CSIC iniciación 2019) del Laboratorio de Genética molecular Humana, Depto. de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte-Sede Salto, Udelar. Todos los proyectos fueron avalados por el comité de ética de la Facultad de Medicina, Udelar (Exp. N° 071140-001267-11) o por el del CENUR Litoral Norte, Udelar (Exp. N° 311170-000332-17; Exp. N° 311170-001762-18; Exp. N° 311170-001142-19).

Para determinar que la muestra de pacientes analizada es representativa de la población uruguaya desde el punto de vista genético, se utilizó una muestra control. Esta muestra está conformada por el ADN de 200 pacientes pediátricos que, en 2006, concurren al CHPR de manera ambulatoria a realizarse exámenes de rutina. Estas muestras fueron obtenidas del banco de ADN del Laboratorio de Genética Molecular Humana, CENUR Litoral Norte.

2.3.2 Datos clínicos

A partir de las historias clínicas (en formato papel) se obtuvieron los datos demográficos, clínicos y genéticos de cada uno de los pacientes. Específicamente los datos relevados fueron:

1. Lugar de procedencia (Departamento)
2. Sexo
3. Edad al debut de la enfermedad (en años y meses)
4. Subtipo de LLA (LLA-proB, LLA-prepreB, LLA-preB, LLA-B, LLA-preT o LLA-T)
5. Riesgo (estándar, intermedio o alto)
6. Leucocitosis al debut (número de GB)
7. Infiltración del SNC (SNC 1, SNC 2 o SNC 3)
8. Protocolo utilizado (BFM versión 1995, 2002, 2009 o interfant 06)
9. Presencia de traslocaciones (t(9;22), t(4;11), t(12;21) y t(1;19))
10. Pacientes con Síndrome de Down
11. Estado de la medula al día 33
12. Estado del tratamiento (en tratamiento, OFF < 5años, OFF > 5años, recaída)
13. Pacientes fallecidos

Para poder analizar los datos relevados de las historias clínicas, aquellos datos no categóricos como la edad o la leucocitosis al debut, fueron subdivididos en categorías. La edad fue subdividida en cinco categorías: menor a 1 año, 1-5 años, 5-10años, 10-15 años y mayor a 15años. A su vez, la leucocitosis al debut fue dividida en tres categorías: hipoleucocitaria ($GB < 4000$), estándar ($4000 \leq GB < 20\ 000$) e hiperleucocitaria ($GB \geq 20\ 000$). A excepción del

departamento de procedencia, para el cual solo se realizó un conteo, para el resto de los datos se realizó un conteo de cada una de las categorías y se calculó su porcentaje.

2.3.3 Ancestralidad

Para determinar la ancestralidad individual de los 192 pacientes y los 200 controles, así como también el componente ancestral global de cada una de las muestras, se genotiparon 45 AIMs (*ancestry informative markers*) autosómicos. Estos AIMs fueron seleccionados a partir de la lista de AIMs publicada por Yaeger et al. (2008) teniendo en cuenta que hubiera al menos un AIM por cada uno de los autosomas. La lista completa de los 45AIMs (rs, cromosoma donde se ubica y frecuencia en las poblaciones parentales) utilizados se muestra en la tabla del ANEXO I. De los 45 AIMs analizados, 19 fueron genotipados mediante la técnica SNaPshot (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts), mientras que 27 de ellos fueron determinados mediante *MassARRAY SNP genotyping* por la empresa CD Genomics (45-1 Ramsey Road, Shirley, NY 11967). Uno de los AIMs (rs10491654) fue utilizado como control interno entre ambas técnicas, por lo que fue genotipado tanto por SNaPshot como por massARRAY.

La ancestralidad global e individual fue determinada mediante el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), utilizando 100 mil iteraciones de *burn-in period* y 1 millón de iteraciones adicionales. Se utilizaron tres poblaciones parentales compuestas por 42 europeos (Panel norteamericano de Coriell), 37 africanos occidentales (africanos que viven en Londres y Carolina del Sur) y 30 nativo americanos (15 Mayas y 15 nahuas), que fueron genotipados mediante *GeneChip Human Mapping 100K* (Affymetrix). Estos datos fueron amablemente proporcionados por el Dr. Bernardo Bertoni (Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo) y la Dra. Laura Fejerman (Universidad de California, San Francisco).

2.3.4 Métodos Estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa IBM SPSS Statistics 22, utilizando un intervalo de confianza del 95%. Para cada uno de los 45 AIMs utilizados, se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas, tanto para la muestra de pacientes como para la muestra control. A su vez, se determinó si se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) mediante la prueba de Chi-cuadrado. Los datos de ancestralidad individual obtenidos mediante el programa STRUCTURE para cada muestra, fueron utilizados para obtener los estadísticos descriptivos (media, desvío estándar, máximo y mínimo) de cada componente

ancestral (europeo, nativo americano y africano). A su vez, se comprobó si los datos tenían una distribución normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y se probó la homocedasticidad mediante el análisis de homogeneidad de varianzas. Finalmente, para comparar si ambas muestras presentaban la misma ancestralidad se aplicó el test de Mann-Whitney.

2.4 RESULTADOS y DISCUSIÓN

2.4.1 Características de los pacientes

El mapa representado en la Figura 3 muestra la cantidad de pacientes provenientes de cada departamento. Como se puede apreciar, la muestra está formada por pacientes provenientes de todos los departamentos del país. Debido a que el SHOP es el centro de referencia para el tratamiento de LLA pediátrica en nuestro país, muchos pacientes que normalmente se atienden en otros centros de salud (especialmente de ASSE) son derivados a esta institución para confirmar el diagnóstico de LLA y su posterior tratamiento. Por esta misma razón, del

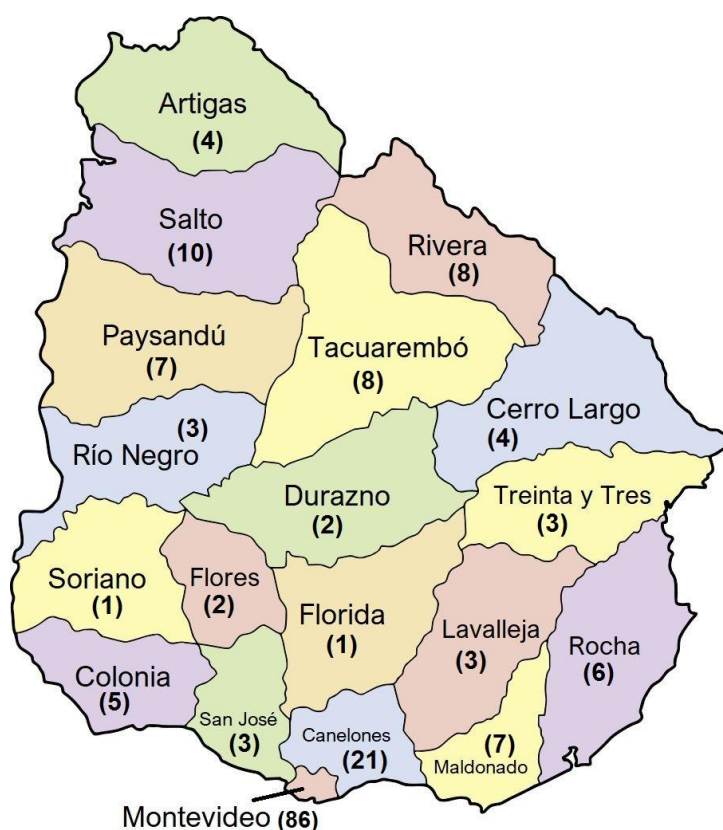


Figura 3. Mapa político del Uruguay con la distribución de casos por departamento.
Se muestra entre paréntesis la cantidad de casos de LLA para cada departamento.

total de la muestra solo se pudo determinar el lugar de procedencia de 184 pacientes, debido a que los ocho restantes pertenecen a centros de salud privados y, aunque su tratamiento es seguido por los médicos del SHOP, su historia clínica permanece en la institución de origen.

Del total de pacientes, el 40,6% (78) cumplieron con el tratamiento completo, llegando al estado de "OFF" hace cinco o más años; es decir, no sufrieron recaída de la enfermedad. A su vez, el 33,3% (64) de los pacientes también alcanzó el estado de "OFF" pero aún se encuentra dentro de los cinco años de seguimiento postratamiento, por lo que no se puede asegurar aun si sufrirán o no algún tipo de recaída tardía (Tabla 1). Si tenemos en cuenta que no se cuenta con las historias clínicas de ocho pacientes, estos dos grupos juntos representan el 77,1% (142 de 184) de los pacientes; es decir un porcentaje de cura levemente inferior al 80% reportado para nuestro país en 2012 (Castillo, 2012; Dufort y Álvarez, 2021). Aunque esta muestra de pacientes está formada por una gran proporción de los casos de LLA pediátrica de nuestro país, no está compuesta por todos los casos reportados, por lo que no se puede confirmar cual sería el porcentaje exacto de cura de LLA pediátrica en Uruguay. En contraste, el 17,7% de los pacientes sufrió al menos una recaída de algún tipo. El 5,2% (10) presentó alguna recaída temprana, es decir durante el tratamiento, mientras que el 12,5% (24) restante experimentó una (o más de una) recaída durante los cinco años de seguimiento (Tabla 1). El porcentaje de pacientes que sufrieron recaídas es similar al reportado para Uruguay (Castillo, 2012; Dufort y Álvarez, 2021) y para países desarrollados (Moricke et al., 2010; Yang et al., 2011; Hunger et al., 2012; Makiya, 2013).

Cuando se analizan en detalle los tipos de recaídas tempranas, se encuentra que tres de ellas fueron recaídas aisladas del SNC, cinco aisladas de la MO y dos combinadas (MO & SNC). La mayoría de las recaídas tardías son medulares (12) o medulares combinadas con SNC (7). En menor medida se encuentran las recaídas testiculares (3) y las recaídas que involucran a la MO y a los testículos simultáneamente (2). Finalmente, cuando se analiza el sexo y el grupo de riesgo de los pacientes que sufrieron recaídas se observa que el 70,6% (24 de 34) de los pacientes son varones y que la mayoría (56%) pertenecían al grupo de riesgo intermedio (datos no mostrados). Puesto que las recaídas pueden ser testiculares, los varones tienen más probabilidad de sufrir recaídas. A su vez, se sabe que la clasificación de los pacientes en grupos de riesgo no es suficiente como para predecir una recaída y que aproximadamente el 50% de los pacientes clasificados como de riesgo estándar o intermedio presentan recaídas (Jaime-Pérez, 2017).

Tabla 1. Características de los pacientes. Se muestran el número de individuos y porcentaje de cada categoría para cada variable. n = número de individuos. NA = Dato no disponible.

Variable	Categoría	n (%)	Variable	Categoría	n (%)
Sexo	Femenino	85 (44,3)	Leucocitosis	Hipo(<4)	54 (28,1)
	Masculino	107 (55,7)		Normal (4-20)	67 (34,9)
Edad	< 1 año	6 (3,1)		Hiper (>20)	52 (27,1)
	1 - 5 años	87 (45,3)		NA	19 (9,9)
	5 - 10 años	57 (29,7)	Subtipo LLA	pro B	6 (3,1)
	10 - 15 años	28 (14,6)		prepre B	132 (68,8)
	> 15a	5 (2,6)		pre B	29 (15,1)
	NA	9 (4,7)		B Madura	2 (1,0)
Protocolo	Interfant 06	4 (2,1)		pre T	4 (2,1)
	BFM 95	5 (2,6)		T Cortical	10 (5,2)
	BFM 2002	54 (28,1)		Mixta (B y T)	1 (0,5)
	BFM 2009	119 (62,0)		NA	8 (4,2)
	NA	10 (5,2)	Traslocaciones	Ninguna	97 (50,5)
Riesgo	Estándar	33 (17,2)		BCR-ABL: t(9;22)	5 (2,6)
	Intermedio	115 (59,9)		MLL-AF4: t(4;11)	3 (1,6)
	Alto	31 (16,1)		TEL-AML1: t(12;21)	41 (21,3)
	NA	13 (6,8)		E2A-PBX1: t(1;19)	9 (4,7)
SNC	SNC 1	149 (77,6)		NA	37 (19,3)
	SNC 2	15 (7,8)	Estado	OFF > 5años	78 (40,6)
	SNC 3	12 (6,3)		OFF < 5 años	64 (33,3)
	NA	16 (8,3)		Recaída Precoz	10 (5,2)
				Recaída	24 (12,5)
				NA ó Fallece s/OFF	16 (8,4)

Como se puede apreciar en la Tabla 1, que resume las características de los pacientes, los varones representan el 55,7% del total de pacientes. Es decir, se observa una mayor incidencia de LLA en varones que en niñas. Esto implica una relación varones/niñas de 1,26. Este valor es similar al reportado para Uruguay (1,2) por Dufort y Álvarez (2021). Asimismo, cuando se considera esta relación dentro de cada uno de los rangos de edad por separado, esta oscila entre 1 (en el grupo menor a 1 año) y 1,5 (en los grupos de 10-15años y mayores a 15 años). Este resultado indica, por un lado, que la muestra obtenida es representativa del total de casos de LLA pediátrica de nuestro país y, por otro lado, que en los últimos 10 años la relación varones/niñas prácticamente no ha cambiado.

Por otro lado, cuando se analizan los datos de edad, se observa que un poco menos de la mitad de los pacientes (45,3%) pertenecen al grupo de 1 a 5 años, seguido de aquellos de entre 5 y 10 años (29,7%) (Tabla 1). Estos datos son concordantes con los reportados tanto a nivel mundial (Hunger & Mullighan, 2015) como para Uruguay (Dufort y Álvarez, 2021), que indican una mayor incidencia de LLA en niños de 2-5 años y de 0-4 años, respectivamente.

Por otra parte, cuando se examina el subtipo de LLA, se observa que la LLA de células precursoras de linfocitos B prevalece sobre las LLA de linfocitos T (88% y 7%, respectivamente), siendo además la LLA-prepreB el subtipo más frecuente, seguido de la LLA-preB (Tabla 1). Estos resultados son compatibles con los reportados en la literatura (Noronha et al., 2011; Chiaretti et al., 2013; Dorantes-Acosta et al., 2013; AEAL, 2021). Sin embargo, aunque los subtipos mayoritarios son los mismos que los reportados en la bibliografía, las proporciones obtenidas son considerablemente distintas. Concretamente, los subtipos LLA-prepreB y LLA-preB se encuentran sobrerrepresentados, mientras que los otros cuatro subtipos se encuentran subrepresentados. La diferencia observada podría ser explicada por la forma en la que se obtuvo la muestra. Cuando se comenzó con el reclutamiento de pacientes, el objetivo era incluir pacientes que, o bien hubiesen terminado el tratamiento y se encontraran en seguimiento de la enfermedad o bien estuviesen en la fase de mantenimiento. Dado que las LLA-T y la LLA-B madura tienen un pronóstico más desfavorable, es posible que en los primeros 100 pacientes reclutados no hubiese prácticamente niños con estos subtipos de LLA. La forma de reclutamiento de los pacientes cambio notoriamente en los últimos seis años. El hecho de que los resultados obtenidos en esta tesis (desarrollados en el capítulo 3) ofrecen un beneficio para los pacientes durante el tratamiento, ha permitido establecer una estrecha relación entre el Laboratorio de Genética Molecular Humana (lugar donde se desarrolló esta tesis) y la Fundación Pérez Scremini. Como consecuencia, desde hace cinco años las muestras de los pacientes son enviadas para su genotipado, en su gran mayoría, en los primeros días posteriores al diagnóstico, a fin de poder contribuir en la reducción efectos adversos ocurridos durante la fase de mantenimiento de manera anticipada.

Respecto al grupo de riesgo al que pertenecen los pacientes, se puede apreciar que la mayoría de los mismos (59,9%) pertenecen al grupo de riesgo intermedio, seguido por los de riesgo estándar (17,2%) y por último por los de riesgo alto, que representan el 16,1% del total (Tabla 1). Puesto que el grupo de riesgo al que pertenece un determinado paciente está, en parte, determinado por la edad del mismo, y considerando que el 45,3% de los pacientes tiene entre 1 y 5 años, se esperaría que la proporción de pacientes correspondiente al riesgo estándar

fuese muy superior al 17,2% observado (Tabla 1). Esta diferencia se explica porque el 28,1% restante presentaban una hiperleucocitosis al debut y/o alteraciones genéticas (traslocaciones, hipodiploidias o cariotipos complejos) que los sitúan en los grupos riesgo intermedio y alto, respectivamente. Por otro lado, el 50% de los pacientes pertenecen al grupo de riesgo intermedio debido simplemente a la edad que tenían al momento del diagnóstico (<1 año o ≥6 años). Esta mayor proporción de pacientes de riesgo intermedio coincide con lo reportado para países tales como Argentina y México (Dorantes -Acosta et al., 2013; Araoz et al., 2014).

En relación a la presencia de alteraciones genéticas, se puede observar que el 12% de los pacientes presenta alguna de las tres traslocaciones consideradas como factores de mal pronóstico. Por el contrario, el 21,3% de los pacientes presenta la traslocación t(12;21)(p13;q22) relacionada con una mejor respuesta al tratamiento (Tabla 1). Ninguno de los pacientes presentó dos (o más) traslocaciones de forma simultánea. El porcentaje de pacientes portadores de cada una de las distintas traslocaciones es semejante a los descritos en la bibliografía a nivel mundial (Borowitz et al., 2008; Atienza, 2012; Harrison, 2013; Layton-Tovar et al., 2015; Chargoy-Vivaldo et al., 2018). Puesto que no existe evidencia de que estas traslocaciones sean más frecuentes en determinadas poblaciones o que estén relacionadas con el sexo del paciente o con el grupo etario, no se esperaba que esta muestra presentase proporciones diferentes a las reportadas en la literatura. Por otra parte, debido a que cerca de la mitad de las historias clínicas carecían de información referente al cariotipo del paciente y que, además, la información incluida en las restantes historias clínicas era extremadamente variable, no se realizó ningún tipo de análisis relativo al cariotipo.

Aun cuando la información relativa al cariotipo era variable, se pudo determinar que siete (3,6%) pacientes presentaban síndrome de Down (SD). Desde hace más de tres décadas, se sabe que la incidencia de LLA es 10%-20% más alta en niños con este síndrome que en la población general (Ragab et al., 1991; Avet-Loiseau et al., 1995; Bermúdez-Cortés et al., 1998); por lo que se esperaba una elevada proporción de pacientes con SD. Si bien los niños con SD tienen mayor riesgo de desarrollar LLA y, además, presentan más efectos adversos durante el tratamiento, no tienen un pronóstico más desfavorable (Bermúdez-Cortés et al., 1998). En este sentido, todos los pacientes con SD de la muestra correspondían al grupo de riesgo intermedio. Según Bermúdez-Cortés et al. (1998) la distribución por edad y sexo de los pacientes con SD es similar al resto de los niños con LLA. Sin embargo, en este caso seis de los siete pacientes eran varones y apenas una era niña. Respecto a la edad, tres de ellos

pertenecían al grupo de 1-5 años, uno (la niña) al grupo de 5-10 años, uno mayor a 15 años y para los 2 restantes no se pudo obtener la información.

Finalmente, del total de la muestra, 23 (12%) pacientes están fallecidos. Esta cifra es considerablemente menor (17,8%) a la reportada para Uruguay (Dufort y Álvarez, 2021). Puesto que el 33,3% de los pacientes aún están en seguimiento postratamiento (Tabla 1, "OFF<5 años") y que aproximadamente 6% se encuentra en tratamiento de recaída, no se puede asegurar cual será el porcentaje correcto de fallecidos en la muestra total. Acerca de las características de los pacientes fallecidos, doce de ellos habían culminado el tratamiento y alcanzado el estado de "OFF", de los cuales diez presentaron al menos una recaída durante los cinco años de seguimiento y fallecieron; mientras que los otros dos fallecieron debido a otras causas (mielodisplasia y cuadro digestivo con deshidratación). De los once que no habían alcanzado el estado de "OFF", siete tuvieron recaídas tempranas y fallecieron durante el tratamiento de recaída, dos fallecieron durante el tratamiento pero por otras causas y dos fallecieron en la fase de inducción, es decir antes de llegar a la remisión de la enfermedad. Estos resultados muestran que, de los 24 pacientes que sufrieron recaídas tardías (Tabla 1, "recaída") solo diez fallecieron (41,6%), mientras que de los diez pacientes que presentaron recaídas tempranas (Tabla 1, "recaída precoz") siete fallecieron (70%). Esto confirma que las recaídas tempranas tienen una evolución más desfavorable que las recaídas tardías (Einsiedel et al., 2005; Nguyen et al., 2008).

2.4.2 Ancestralidad global e individual

Las frecuencias genotípicas y alélicas de cada uno de los 45 AIMs utilizados tanto para la muestra de pacientes como para la muestra de controles se presentan en la tabla del ANEXO II. El análisis del equilibrio de H-W realizado para la muestra de pacientes mostró que seis AIMs (rs249847, rs1451928, rs1898280, rs4013967, rs4762106 y rs10508349) no se ajustaban a lo esperado por el modelo de H-W. A su vez, en la muestra de controles, fueron cinco los AIMs (rs1934393, rs4762106, rs6684063, rs10491097 y rs10501474) que no estaban en equilibrio de H-W. Estas desviaciones del equilibrio de H-W podrían deberse a errores en el genotipado o a que alguno de los supuestos de equilibrio no se esté cumpliendo, como por ejemplo un tamaño de muestra pequeño o cierta selección a favor (o en contra) de alguno de los alelos. Otra posible explicación podría ser que existiera cierta estructura o estratificación dentro de cada una de las muestras. Por este motivo, los análisis de la ancestralidad individual y global de cada muestra fueron realizados tanto incluyendo como excluyendo estos AIMs. En virtud de

que no se evidenciaron diferencias significativas entre ambos análisis, los resultados mostrados en esta tesis comprenden los 45 AIMs.

La proporción de cada componente ancestral (africano, europeo y nativo americano) para cada uno de los pacientes y controles (ancestralidad individual) se detalla en los ANEXOS IIIa y IIIb, respectivamente. Los resultados obtenidos para la ancestralidad individual indican una gran heterogeneidad tanto en la muestra de pacientes como en la muestra control (Figuras 4A y 4B). Por ejemplo, la muestra de pacientes incluye niños cuyo componente ancestral nativo americano es mínimo (1,7%) y al mismo tiempo niños que presentan valores superiores al 50% (Tabla 2). Si se tiene en cuenta la historia que dio origen a la actual población uruguaya y considerando que la muestra de pacientes está compuesta por niños provenientes de todas partes del país, no es de extrañar que la muestra de pacientes sea tan heterogénea. De hecho, varios estudios previos relacionados con la ancestralidad de la población uruguaya han demostrado que existe una gran variabilidad interindividual e incluso una heterogeneidad geográfica (Sans, 1997; Bonilla et al., 2004; Hidalgo et al., 2005; Sans et al., 2006; Sans et al., 2020; Spangenberg et al., 2021).

Tabla 2. Ancestralidad global. Para cada muestra (pacientes y controles), se indica la media y su desvío estándar (s.d.), el valor mínimo (Min) y el valor máximo (Max) de cada componente ancestral. Los valores están expresados en porcentaje. *p-value* = comparación de las muestras mediante el test Mann Whitney.

Componente ancestral	Pacientes			Controles			<i>p-value</i>
	Media $\pm$ s.d.	Min	Max	Media $\pm$ s.d.	Min	Max	
Africana	10,9 $\pm$ 7,6	2,3	41,6	12,5 $\pm$ 8,4	1,6	41,6	0,060
Europea	69,4 $\pm$ 14,0	19,8	94,7	70,5 $\pm$ 11,8	21,8	93,2	0,708
Nativo Americana	19,7 $\pm$ 12,1	1,7	57,5	17,0 $\pm$ 9,9	2,8	47,8	0,058

Respecto a la ancestralidad global de cada muestra, ambas presentaron un componente mayoritario de origen europeo, seguido del componente nativo americano y, en menor proporción, el componente africano. Estos resultados reflejan la estructura tri-híbrida de las muestras analizadas. Aunque los resultados son concordantes con lo reportado para nuestro país, se observa que los componentes nativo americano y africano son levemente superiores a los previamente reportados (Sans, 1997; Bonilla et al., 2004; Bonilla et al., 2015; Sans et al., 2020).

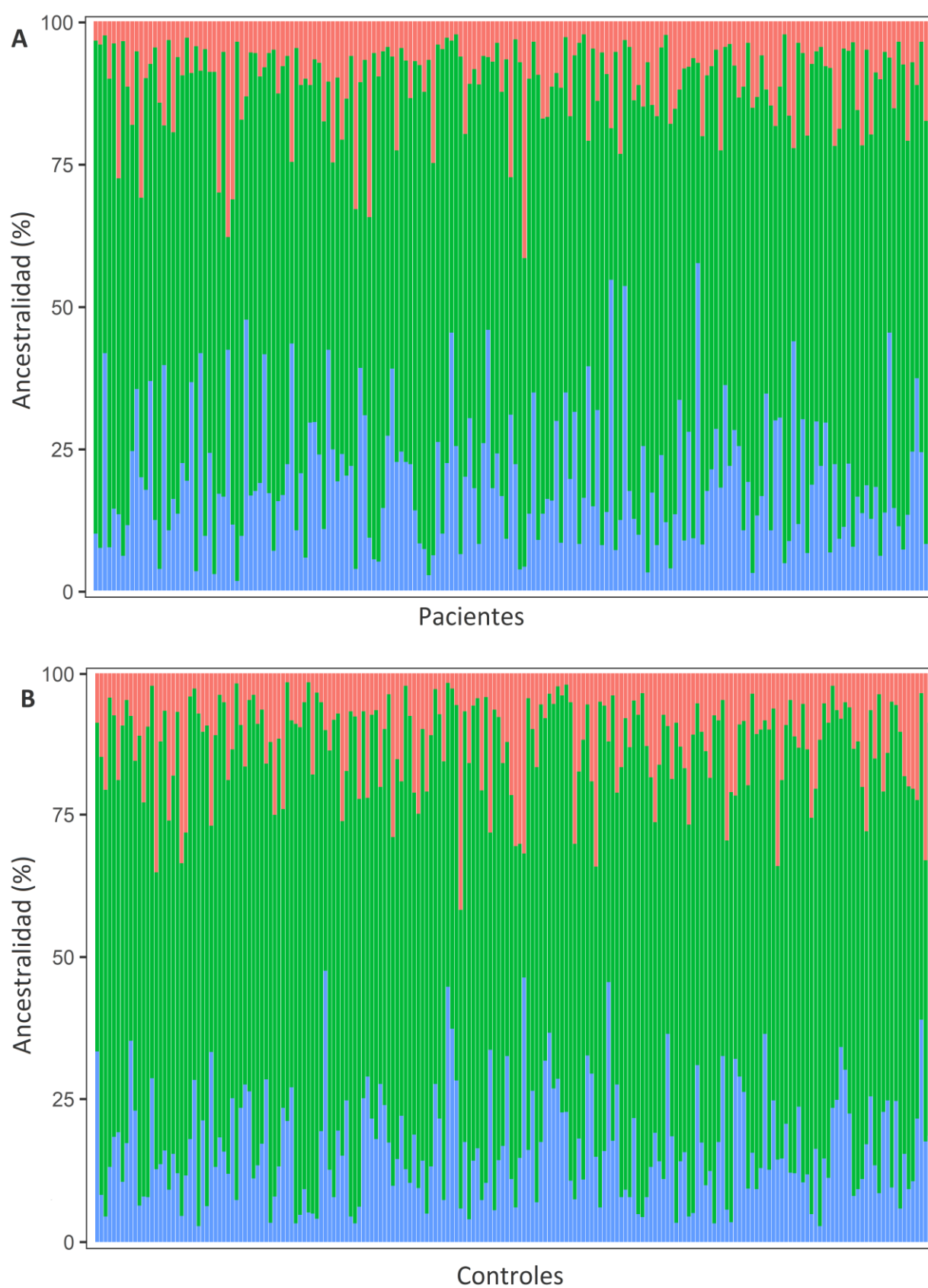


Figura 4. Ancestralidad individual de pacientes y controles. Cada barra representa un individuo. Para cada uno se muestra el porcentaje de cada componente ancestral: **(rojo)** africano. **(verde)** europeo. **(celeste)** nativo americano. **A)** Pacientes. **B)** controles.

Esta diferencia podría deberse a que las muestras analizadas en esta tesis presentan una mayor proporción de pacientes que se atienden en la salud pública. De acuerdo a Bonilla et al. (2015) y Sans et al. (2020) los componentes nativo americano y africano son mayores en aquellos pacientes que se atienden en salud pública, reflejando una heterogeneidad en los componentes ancestrales de acuerdo al nivel socioeconómico.

En ambos casos, el componente de origen europeo presentó menor variabilidad intramuestra, mientras que el componente africano es el que mostró mayor variabilidad. Por otro lado, el análisis comparativo entre las muestras no evidencia diferencias estadísticamente significativas entre ambas (Tabla 2). Este resultado apoya la hipótesis de que la muestra de pacientes analizada es representativa de la población uruguaya desde el punto de vista ancestral. Sin embargo, a pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre ambas muestras, se puede apreciar que la muestra de pacientes tiene un componente nativo americano levemente superior al de la muestra control (Tabla 2).

Si bien las proporciones obtenidas para cada componente ancestral son compatibles con la historia y la cultura de nuestro país, a más de que son concordantes con lo reportado en la literatura para nuestra población; solo indican una noción general de la ancestralidad. Para determinar con mayor exactitud la ancestralidad tanto individual como global sería necesario analizar un mayor número de AIMs y contar con poblaciones ancestrales más representativas de la población uruguaya. Un trabajo sobre ancestralidad en la población argentina mostró que a partir de 30 AIMs se logran indicadores aceptables de ancestralidad, pero que mejores estimaciones se logran usando al menos 50 AIMs (Russo et al., 2016). Además, sería necesario contar con poblaciones ancestrales más representativas de la actual población uruguaya, tales como indígenas del cono sur, africanos que correspondan a los esclavos que llegaron a Uruguay, españoles e italianos.

2.5 CONCLUSIONES

La muestra de pacientes caracterizada en este segundo capítulo, que será analizada desde el punto de vista farmacogenético en los 2 capítulos siguientes, está compuesta por niños y adolescentes provenientes de todos los departamentos del país.

Considerando que cada año en Uruguay aproximadamente 23 niños son diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda, y que la muestra comprende 192 niños y adolescentes reclutados

entre 2010 y 2019; se puede afirmar que la muestra es representativa del total de casos reportados.

Aunque aún hay un 33,3% de los pacientes en seguimiento que podrían presentar una recaída tardía, el porcentaje de pacientes que sufrieron recaídas (17,7%) refleja el 80% de cura para esta enfermedad reportado para nuestro país.

La muestra está compuesta mayoritariamente por niños que tenían entre 1 y 5 años de edad al momento del diagnóstico, siendo la proporción de varones/niñas 1,26. Estos datos reafirman una mayor incidencia en varones de entre 1 y 4 años, reportada para nuestro país.

Al igual que lo que ocurre a nivel mundial, la mayoría de los casos correspondía a una LLA de células precursoras de linfocitos B, siendo el subtipo LLA-prepreB el más frecuente.

La ancestralidad de los pacientes es mayoritariamente de origen europeo (69,4%), seguida de un componente nativo americano de 19,7% y, en menor medida, de un componente africano de 10,9%, pero con una gran variabilidad interindividual. Estos resultados son concordantes con los reportados para nuestro país.

Cuando se compara la muestra de pacientes con una muestra control, no se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre ambas, aunque se observa un componente nativo americano levemente superior en la muestra de pacientes respecto a la muestra control.

2.6 BIBLIOGRAFÍA

American Cancer Society. (2021). *¿Qué es la leucemia linfocítica aguda?* Recuperado de: <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-linfocitica-aguda/acerca/que-es-leucemia-linfocitica-aguda.html>

Aráoz, H.V., D'Aloi, K., Foncuberta, M.E., Sanchez La Rosa, C.G., Alonso, C.N., Chertkoff, L., & Felice, M. (2014). Pharmacogenetic Studies in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in Argentina. *Leukemia & Lymphoma*, (0), 1-24. doi: 10.3109/10428194.2014.951844

Asociación Española de Afectados por Linfoma, Mieloma y Leucemia (AEAL). (2021). Recuperado de: <http://www.aeal.es/leucemia-linfoblastica-aguda-espana/4-como-se-clasifica-la-leucemia-linfoblastica-aguda>

Atienza, A.L. (2012). Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatría Integral*, 453.

Avet-Loiseau, H., Mechinaud, F., & Harousseau, J. L. (1995). Clonal hematologic disorders in Down syndrome. A review. *Journal of pediatric hematology/oncology*, 17(1), 19-24. doi: 10.1097/00043426-199502000-00003

Bermúdez-Cortés, M., Verdeguer-Miralles, A., Jovaní-Casano, C., Cañete-Nieto, A., Fernández, J. M., Ferris-Tortajada, J., & Castel-Sánchez, V. (1998). Síndrome de Down y leucemia. *An Esp Pediatr*, 48, 593-598.

- Bonilla, C., Bertoni, B., González, S., Cardoso, H., Brum-Zorrilla, N., & Sans, M. (2004). Substantial native American female contribution to the population of Tacuarembó, Uruguay, reveals past episodes of sex-biased gene flow. *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Association*, 16(3), 289-297. doi: 10.1002/ajhb.20025
- Bonilla, C., Bertoni, B., Hidalgo, P. C., Artagaveytia, N., Ackermann, E., Barreto, I.,... Kittles, R.A. (2015). Breast cancer risk and genetic ancestry: a case-control study in Uruguay. *BMC women's health*, 15(1), 1-10. doi: 10.1186/s12905-015-0171-8
- Borowitz, M. J., Devidas, M., Hunger, S. P., Bowman, W. P., Carroll, A. J., Carroll, W. L., ... & Camitta, B. M. (2008). Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 111(12), 5477-5485. doi: 10.1182/blood-2008-01-132837
- Castillo, L., Dabiez, A., Dufort, G., Carracedo, M., Castiglioni, M., Simón, E., ... & Silveira, A. (2012). Evolución del cáncer pediátrico en Uruguay (1992-2011). *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 83(1), 26-30.
- Chargoy-Vivaldo, E., Martínez-Hernández, C., Cacique-Sánchez, C., Jimaréz-Rodríguez, J. M., & Gómez-Cárdenas, L. (2018). Translocaciones en leucemia linfoblástica aguda y supervivencia a cinco años en niños. *Revista de Hematología*, 19(4), 165-173
- Chiaretti, S., Vitale, A., Cazzaniga, G., Orlando, S. M., Silvestri, D., Fazi, P., ... & Foà, R. (2013). Clinico-biological features of 5202 patients with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the Italian AIEOP and GIMEMA protocols and stratified in age cohorts. *haematologica*, 98(11), 1702. doi: 10.3324/haematol.2012.080432
- Dorantes, E., Medina, A., Dávila, K., & López, B. (2013). Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de acuerdo al EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemia). *Gac Mexicana Oncol*, 12(3), 136-42.
- Dufort y Álvarez, G. (2021). Epidemiología del cáncer en niños y adolescentes en Uruguay: 2008-2012. Un estudio de registro poblacional. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 92(1). doi: 10.31134/AP.92.1.3.
- Einsiedel, H. G., von Stackelberg, A., Hartmann, R., Fengler, R., Schrappe, M., Janka-Schaub, G., ... & Henze, G. (2005). Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Munster Group 87. *Journal of Clinical Oncology*, 23(31), 7942-7950. doi: 10.1200/JCO.2005.01.1031
- Harrison C. J. (2013). Targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia: new insights. Hematology. *American Society of Hematology. Education Program*, 2013, 118-125. doi: 10.1182/asheducation-2013.1.118
- Hidalgo, P.C., Bengochea, M., Abilleira, D., Cabrera, A., & Alvarez, I. (2005). Genetic admixture estimate in the Uruguayan population based on the loci LDLR, GYPA, HBGG, GC and D7S8. *International Journal of Human Genetics*, 5(3), 217-222
- Hunger, S. P., Lu, X., Devidas, M., Camitta, B. M., Gaynon, P. S., Winick, N. J., ... & Carroll, W. L. (2012). 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*, 30(14), 1663. doi: 10.1200/JCO.2011.37.8018
- Hunger, S. P., & Mullighan, C. G. (2015). Acute lymphoblastic leukemia in children. *New England Journal of Medicine*, 373(16), 1541-1552. doi: 10.1056/NEJMra1400972.
- International BFM Study Group. (I-BFM-SG). <https://bfminternational.wordpress.com/>
- Jaime-Pérez, J. C. (2017). El problema de la recaída en la leucemia linfoblástica aguda de la infancia. *Revista de Hematología*, 18(1), 1-3.
- Layton-Tovar, C. F. (2015). Factores de pronóstico en leucemia linfoblástica aguda pediátrica: posibles marcadores moleculares. *Medicina e Investigación*, 3(1), 85-91. doi: 10.1016/j.mei.2015.02.008
- Makiya, M. (2013). Tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda Pediátrica Recaída. *Hematología*, 17, 82-88.

- Mörücke, A., Zimmermann, M., Reiter, A., Henze, G., Schrauder, A., Gadner, H., ... & Schrappe, M. (2010). Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia*, 24(2), 265-284. doi: 10.1038/leu.2009.257
- Nguyen, K., Devidas, M., Cheng, S. C., La, M., Raetz, E. A., Carroll, W. L., ... & Loh, M. L. (2008). Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia*, 22(12), 2142-2150. doi: 10.1038/leu.2008.251
- Noronha, E. P., Marinho, H. T., Thomaz, E. B. A. F., Silva, C. A., Veras, G. L. R., & Oliveira, R. A. G. (2011). Immunophenotypic characterization of acute leukemia at a public oncology reference center in Maranhão, northeastern Brazil. *Sao Paulo Medical Journal*, 129(6), 392-401. doi: 10.1590/S1516-31802011000600005
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155 (2), 945–959.
- Ragab, A. H., Abdel-Mageed, A., Shuster, J. J., Frankel, L. S., Pullen, J., Van Eys, J., ... & Crist, W. M. (1991). Clinical characteristics and treatment outcome of children with acute lymphocytic leukemia and Down's syndrome. A Pediatric Oncology Group study. *Cancer*, 67(4), 1057-1063. doi: 10.1002/1097-0142(19910215)67:4<1057::aid-cnrcr2820670432>3.0.co;2-k
- Russo, M. G., Di Fabio Rocca, F., Doldán, P., Cardozo, D. G., Dejean, C. B., Seldes, V., & Avena, S. A. (2016). Evaluación del número mínimo de marcadores para estimar ancestría individual en una muestra de la población argentina. *Revista del Museo de Antropología* 9(1), 49-56.
- Sans, M., Salzano, F. M., & Chakraborty, R. (1997). Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. *Human biology*, 69(2), 161-170.
- Sans, M., Merriwether, D. A., Hidalgo, P. C., Bentancor, N., Weimer, T. A., Franco, M. H. L., ... & Salzano, F. M. (2006). Population structure and admixture in Cerro Largo, Uruguay, based on blood markers and mitochondrial DNA polymorphisms. *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Association*, 18(4), 513-524. doi: 10.1002/ajhb.20520
- Sans, M., Figueiro, G., Bonilla, C., Bertoni, B., Cappetta, M., Artagaveytia, N., ... & Hidalgo, P. C. (2020). Ancestría genética y estratificación social en Montevideo, Uruguay. *Revista argentina de antropología biológica*, 23(1). doi: 10.24215/18536387e029
- Spangenberg, L., Fariello, M. I., Arce, D., Illanes, G., Greif, G., Shin, J. Y., ... & Naya, H. (2021). Indigenous ancestry and admixture in the Uruguayan population. *bioRxiv*. doi: 10.1101/2021.06.09.447750
- Yaeger, R., Avila-Bront, A., Abdul, K., Nolan, P.C., Grann, V.R., Birchette, M.G., ... & Joe, A.K. (2008). Comparing genetic ancestry and self-described race in african americans born in the United States and in Africa. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 17(6), 1329-1338. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-2505
- Yang, J. J., Cheng, C., Devidas, M., Cao, X., Fan, Y., Campana, D., ... & Relling, M. V. (2011). Ancestry and pharmacogenomics of relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*, 43(3), 237-241. doi: 10.1038/ng.763

CAPÍTULO 3

FARMACOGENÉTICA DE LA 6-MERCAPTOPURINA EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA PEDIÁTRICA de URUGUAY

3.1 INTRODUCCIÓN

Como se mencionó previamente en el capítulo 1, a nivel mundial, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia más común en niños (Hunger & Mullighan, 2015). Concretamente, en Uruguay, representa el 23,4% de todos los casos de cáncer infantil (Dufort y Álvarez, 2021). Puesto que en Uruguay, el SHOP-CHPR es el centro de referencia para esta patología en niños, la mayoría de los casos son derivados a dicha institución para confirmar el diagnóstico y, posteriormente, llevar a cabo su tratamiento. El régimen terapéutico aplicado (protocolo BFM) implica la administración concomitante de diversos fármacos a lo largo de 104 semanas. Según este protocolo, los pacientes son clasificados en tres grupos de riesgo y el tratamiento completo para llegar a lo que se denomina "estado de OFF" comprende cinco fases (ver detalles en capítulo 1). La fase de mantenimiento, última fase del tratamiento, consiste en la administración simultánea (por vía oral) de $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$ de 6-mercaptopurina (6-MP) y de $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{semana}$ de metotrexato (MTX), sin importar el grupo de riesgo al que pertenece el paciente. La duración de la misma varía según el grupo de riesgo, siendo de 63 semanas para aquellos pacientes de riesgo intermedio y alto, y de 74 semanas para los de riesgo estándar. Durante esta fase, los pacientes permanecen aislados en sus hogares y concurren de forma ambulatoria cada dos o tres semanas para realización de un hemograma (y en algunos casos un funcional hepático) y el correspondiente ajuste de dosis de acuerdo a los resultados del mismo. Cabe destacar que, la dosis debe ser reducida si el paciente presenta leucopenia Gdo. 3 ($1,0 \times 10^9/\text{L} < \text{GB} < 2,0 \times 10^9/\text{L}$) o Neutropenia febril Gdo.3 ($0,5 \times 10^9/\text{L} < \text{Neu} < 1,0 \times 10^9/\text{L}$ + fiebre) y suspendida en el caso que la toxicidad sea grave (Gdo. 4).

La optimización del régimen terapéutico ha permitido que, actualmente, Uruguay presente la tasa de cura de LLA infantil más alta en toda Latinoamérica, siendo aproximadamente 75%-80% (Morick et al., 2010; Castillo et al., 2012; Hunger et al., 2012; Dufort y Álvarez, 2021). No obstante, teniendo en cuenta que los fármacos utilizados durante el tratamiento tienen una acción inespecífica y un estrecho rango farmacológico, más del 20% de los pacientes sufren toxicidades severas por causa de la quimioterapia (Yang et al., 2012; Schmiegelow et al., 2014;

Moriyama et al., 2016). Como consecuencia, la calidad de vida de los pacientes disminuye y, a su vez, el tratamiento debe ser suspendido por un cierto período de tiempo o la dosis administrada reducida en determinado porcentaje; pudiendo aumentar el riesgo de sufrir recaídas. Estudios previos han demostrado que ciertas variantes génicas relacionadas con la distribución y el metabolismo de los fármacos están asociadas a la toxicidad y a la respuesta al tratamiento (Relling et al., 2011; Chrzanowska et al., 2012; Farfan et al., 2014; Ma et al., 2014; Azimi et al., 2015; Relling et al., 2019). Al mismo tiempo, se ha establecido que la frecuencia de estas variantes no es igual en todas las poblaciones (Yang et al., 2011; Goggins & Lo, 2012; Walsh et al., 2014), sugiriendo que la ancestralidad podría influir tanto en la respuesta al tratamiento como en la manifestación de efectos adversos.

Como se describió en el capítulo 2, la actual población uruguaya tiene una estructura tri-híbrida formada por un componente principal de origen europeo cercano al 70%, una contribución nativo americana de aproximadamente 20% y un aporte de origen africano del 10%. Este "mestizaje" podría tener un impacto sobre la frecuencia de las variantes génicas vinculadas al metabolismo de los fármacos en nuestra población. Por consiguiente, es importante establecer cuál es la frecuencia de estas variantes en nuestro país y determinar su relación con los efectos adversos ocurridos durante el tratamiento de LLA.

Puesto que la fase de mantenimiento es la fase más larga del tratamiento, la más homogénea (no varía según el grupo de riesgo del paciente) y que durante la misma solo se administran 6-MP y MTX, esta tesis se centra en los efectos adversos ocurridos durante esta fase. Específicamente, este capítulo incluye el análisis farmacogenético referente al metabolismo de la 6-MP y su relación con los efectos adversos; mientras que el estudio farmacogenético que involucra el transporte y metabolismo de MTX será desarrollado en el capítulo 4.

3.1.1 6-Mercaptopurina (6-MP)

La 6-mercaptopurina (6-MP) es un antimetabolito, análogo estructural de la purina hipoxantina. Es un profármaco inactivo que requiere del anabolismo intracelular para convertirse en nucleótidos de tioguanina activos (TGNs) para generar citotoxicidad (Cheok & Evans, 2006; Meggitt et al., 2011). Es un antagonista de las purinas, que actúa como falso sustrato en el proceso de síntesis de ADN o ARN. Los metabolitos de la 6-MP, inhiben la síntesis de purinas y la interconversión de sus nucleótidos. Sin embargo, el efecto citotóxico de este fármaco es producido principalmente por la incorporación de nucleótidos de 6-tioguanina

(6-TGTP y 6-TdGTP) a los ácidos nucleicos, deteniendo el ciclo celular y generando apoptosis (Cheok & Evans, 2006; Adam de Beaumais & Jacqz-Agrain, 2012; López-López et al., 2014).

La 6-MP entra a la célula mediante transportadores de membrana de la superfamilia SLC (SLC28 y SLC29) y, mediante un proceso gradual que involucra numerosas enzimas, es metabolizada a TGNs. Intracelularmente, la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (HGPRT, codificada por el gen HPRT1) convierte la 6-MP en nucleótidos de tioinosina monofosfato (TIMP) utilizando fosforribosilpirofosfato (PRPP) como co-sustrato (Torres-Jimenez et al., 1998; Cheok & Evans, 2006). Posteriormente, TIMP es convertida en tioxantosina monofosfato (TXMP) mediante la enzima inosin-monofosfato deshidrogenasa (IMPD, codificada por el gen IMPDH1), y luego en tioguanosina monofosfato (TGMP) por la enzima guanosina monofosfato sintasa (GMPS). Finalmente, mediante la acción de las nucleósido difosfato quinasas NME1 y NME2, la TGMP es fosforilada para convertirse en tioguanosina difosfato (TGDP) y tioguanosina trifosfato (TGTP), metabolitos activos que se incorporan al ARN y producen apoptosis. A su vez, las enzimas ribonucleosido reductasas RRM1 y RRM2 convierten la TGDP en tiodeoxiguanosina difosfato (TdGDP) y tiodeoxiguanosina trifosfato (TdGTP), que se incorporan al ADN y desencadenan la muerte celular por apoptosis (Cheok & Evans, 2006; Meggitt et al., 2011; Whirl-Carrillo et al., 2021). La enzima nudix hidrolasa 15 (NUDT15) tiene la capacidad de catalizar la hidrólisis de nucleósidos difosfato y nucleósidos trifosfato, tales como TGTP, TGDP, TdGDP y TdGTP; evitando su incorporación a los ácidos nucleicos y disminuyendo el efecto citotóxico. El detalle de toda la vía metabólica de la 6-MP se muestra en la Figura 5. La 6-MP se elimina fundamentalmente en forma de 6-metil-mecaptopurina (6-meMP) o de ácido tioúrico (TU), un metabolito oxidado e inactivo. En el primer caso, la 6-MP es metilada intracelularmente por la acción de la enzima tiopurina S-metiltransferasa (TPMT); mientras que en el segundo caso la oxidación se lleva a cabo a nivel hepático mediante la enzima xantina deshidrogenasa (XDH). Los metabolitos inactivos salen al espacio extracelular mediante transportadores de membrana de la superfamilia ABC (ABCC4 y ABCC5) dependientes de ATP (Figura 5). Numerosos estudios han demostrado que la acumulación de estos metabolitos inactivos están asociados con hepatotoxicidad (Adam de Beaumais et al., 2011; Meggitt et al., 2011; Gervasini et al., 2012; van Asseldonk et al., 2012; Moon & Loftus, 2016).

Al presente, más de 40 variantes del gen *TPMT* han sido descritas (Thiopurine methyltransferase nomenclature website, 2021). Estudios previos en otros países, han demostrado que algunas de estas variantes explican parte de la variabilidad interindividual en

la respuesta a la 6-MP (Lennard, 2014; Lennard et al., 2015). Concretamente, se ha observado que pacientes con actividad deficiente o intermedia de esta enzima, que son tratados con

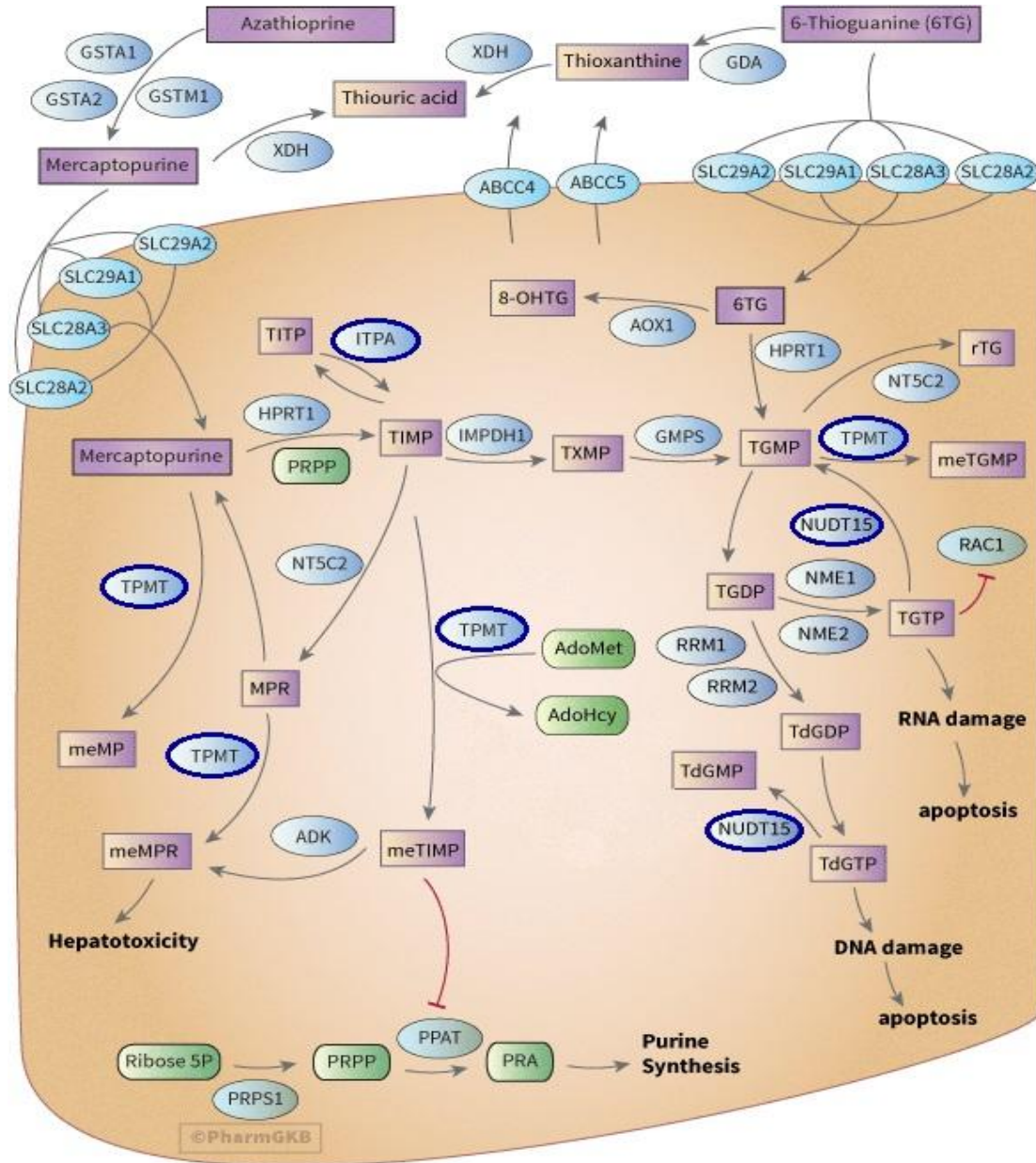


Figura 5. Vía metabólica de la 6-mercaptopurina. Las elipses azules remarcan las enzimas estudiadas en esta tesis. 6TG: 6-tioguanina. 8-OHTG: 8-hidroxitioguanina. ABCC4, ABCC5: transportadores de membrana superfamilia ABC dependientes de ATP (ATP binding cassette). ADK: adenilato quinasa. AOK1: Alcohol oxidasa. GDA: guanina desaminasa. GMPs: guanosina monofosfato sintasa. GSTA1, GSTA2, GSTM: glutatión S-transferasa. HPRT1: hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa. IMPDH1: inosin-monofosfato deshidrogenasa. ITPA: inosina trifosfatasa. meMP: metilmercaptopurina. meTGMP: metiltioguanosina monofosfato. meTIMP: metiltioinosina monofosfato. NME1, NME2: nucleósido difosfato quinasa. NT5C2: 5'-nucleotidasa II. NUDT15: nudix hidrolasa 15. PRPP: fosforribosilpirofosfato. RRM1, RRM2: ribonucleosido reductasas. SLC28A2, SLC28A3, SLC29A1, SLC29A2: transportadores de membrana superfamilia SLC (*solute carrier*). TdGDP: tiodeoxiguanosina difosfato. TdGMP: tiodeoxiguanosina monofosfato. TdGTP: tiodeoxiguanosina trifosfato. TGDP: tioguanosina difosfato. TGMP: tioguanosina monofosfato. TGTP: tioguanosina trifosfato. TIMP: tioinosina monofosfato. TITP: tioinosina trifosfato. TPMT: tiopurina S-metiltransferasa. TXMP: tioxantosa monofosfato. XDH: xantina deshidrogenasa. (Zaza et al., 2010 - Recuperado y modificado de PharmGKB.org).

dosis estándares de tiopurinas, tienen un riesgo elevado de desarrollar toxicidad hematopoyética severa (Tai et al., 1996; McLeod et al., 2000; Rocha et al., 2005; Kager & Evans, 2006; Ujiie et al., 2008; Yang et al., 2015; Moriyama et al., 2016). A su vez, se ha visto que la frecuencia de estas variantes es considerablemente diferente entre poblaciones (Ameyaw et al, 1998; Hon et al., 1998; Araoz et al, 2014; Farfan et al., 2014). Asimismo, se ha descrito que ciertas variantes en el gen *NUDT15* están asociadas a una mayor susceptibilidad de desarrollar leucopenias inducidas por tiopurinas (Yang et al., 2015; Moriyama et al., 2016; Koutsilieri et al., 2019; Schaeffeler et al., 2019).

Al igual que sucede con las variantes del gen *TPMT*, las variantes reportadas para *NUDT15* tienen frecuencias muy disímiles en poblaciones con diferente origen étnico, siendo más frecuentes en algunas poblaciones de origen asiático y raras en poblaciones de origen europeo. Finalmente, algunos autores encontraron una asociación entre variantes del gen *ITPA* y el riesgo de presentar reacciones adversas cuando los pacientes son tratados con tiopurinas, así como también una mayor probabilidad de desarrollar mielosupresión o de presentar hepatotoxicidad después del tratamiento con 6-MP (Bakker et al., 2011; Simone et al., 2013; Azimi et al., 2015).

La vía metabólica de la 6-MP es compleja e involucra muchas enzimas. Sin embargo, teniendo en cuenta los datos previamente reportados en la bibliografía respecto a la cantidad de variantes génicas de las enzimas involucradas en la vía metabólica de la 6-MP, las frecuencias de dichas variantes en las distintas poblaciones estudiadas y su posible asociación con los eventos de toxicidad; en esta tesis se analizarán únicamente los genes *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT*.

3.1.2 Inosina trifosfato pirofosfohidrolasa (ITPA)

El gen *ITPA*, localizado en el cromosoma 20 (20p13), codifica para la enzima inosina trifosfato pirofosfohidrolasa (ITPA). Esta enzima, de 194 aminoácidos, hidroliza los inosin-trifosfatos (ITP) y los deoxinosin-trifosfatos (dITP) a nucleótidos monofosfatos (IMP) y difosfatos (IDP), protegiendo a la célula de los nucleótidos no canónicos. Los nucleótidos IMP son un intermediario central en el metabolismo de las purinas y pueden convertirse en nucleótidos de adenina o guanina (Stocco et al., 2009). En células normales, los ITP se forman por fosforilación de los IMP y la enzima ITPA convierte nuevamente los ITP en IMP, evitando la acumulación de ITP y consecuentemente su incorporación en los ácidos nucleicos. La deficiencia de ITPA interrumpe este ciclo, lo que lleva a una acumulación de ITP. Esta enzima está presente en varios tipos de tejidos humanos, así como también en los eritrocitos y en los glóbulos blancos

(Maeda et al., 2005). La deficiencia de ITPA es una afección clínicamente benigna, caracterizada por la acumulación marcada y anormal de ITP en los eritrocitos (Marinaki et al., 2004). Asimismo, se ha visto que los niveles de IDP también se encuentran aumentados en los eritrocitos de pacientes con ITPA deficiente, por un mecanismo aún desconocido (Marinaki et al., 2004). Como se describió previamente, la 6-MP se activa a través del intermediario TIMP; por lo que pacientes tratados con fármacos de tiopurina que presenten una ITPA con actividad deficiente, tendrían una mayor acumulación de TIMP, lo que resultaría en una mayor toxicidad (Bakker et al., 2011; Smid et al., 2014).

El primer indicio de la existencia de una deficiencia en la enzima ITPA en seres humanos se produjo en 1965, cuando Vanderheiden observó niveles elevados de ITP en los eritrocitos de dos hermanos (Maeda et al., 2005). Durante varios años, diversos autores intentaron determinar las causas genéticas subyacentes de la deficiencia de la enzima ITPA. Sumi et al. (2002) encontraron cinco SNPs en la secuencia del gen *ITPA* que podían explicar esta deficiencia. De estos cinco SNPs, dos eran cambios silenciosos (exón 3: c.138G>A y exón 8: c.561G>A) y un tercero estaba ubicado en la región 3'UTR (708G>A). En ninguno de los tres casos se pudo establecer una asociación entre los polimorfismos encontrados y la presencia de la enzima ITPA deficiente (Sumi et al., 2002; Simone et al., 2013). Sin embargo, estos autores pudieron establecer una asociación entre los otros dos SNPs y la deficiencia de actividad de ITPA.

El primero de ellos (rs1127354), es una mutación de cambio de sentido, una transversión de C a A en la posición 94, en el exón 2 (c.94C>A), que resulta en el cambio de una prolina por una treonina en el codón 32 (p.Pro32Thr). Según Simone et al. (2013) este cambio aminoacídico desestabiliza la enzima ITPA debido a la formación de una "cavidad" en su núcleo hidrofóbico, provocando una disminución en la actividad enzimática. Individuos heterocigotos para esta mutación presentan una actividad ITPA promedio de 22,5%, mientras los homocigotos presentan una actividad menor al 1% (Sumi et al., 2002; Maeda et al., 2005; Stocco et al., 2009; Simone et al., 2013). La asociación entre esta variante y la presencia de efectos adversos debido a la administración de tiopurinas es cuestionable. Mientras algunos autores reportan que pacientes portadores del alelo A (tanto homocigotos como heterocigotos) presentan mayor toxicidad hepática (Marinaki et al., 2004; Azimi et al., 2015); otros describen que estos pacientes presentan un menor riesgo de desarrollar toxicidad debida a la 6-MP en comparación con los homocigotos CC (Ma et al., 2014). Por otro lado, Stocco et al. (2009) observaron que los pacientes con variantes de *ITPA* tienen una mayor probabilidad de

presentar neutropenia febril solamente cuando la dosis de 6-MP es ajustada por el genotipo de *TPMT*. Este polimorfismo presenta frecuencias diferentes entre las distintas poblaciones estudiadas, siendo la frecuencia del alelo variante (A) cercana al 5%-7% en poblaciones caucásicas (Cao & Hegele, 2002; Marsh et al., 2004; Atanasova et al., 2007), 3%-5% en poblaciones de origen africano (Cao & Hegele, 2002; Marsh et al., 2004) y 11%-15% en poblaciones asiáticas (Cao & Hegele, 2002; Marsh et al., 2004; Maeda et al., 2005; Azimi et al., 2015). Las frecuencias reportadas para poblaciones latinoamericanas varían entre 2% y 4% (Marsh et al. 2004; 1000 Genomes Project Consortium, 2015).

El segundo SNP consiste en una transversión de A a C, localizada en el intrón 2 (IVS2 +21 A>C), que afecta la eficacia del *splicing* (Atanasova et al., 2007; Azimi et al., 2015). Este polimorfismo (rs7270101) tiene un efecto menos marcado sobre la actividad enzimática, ya que los heterocigotos presentan en promedio un 60% de la actividad observada en controles normales (Sumi et al., 2002; Atanasova et al., 2007; Azimi et al., 2015), mientras que los homocigotos para la variante presentan una actividad similar a la de los heterocigotos para la variante c.94C>A (Azimi et al., 2015). La actividad enzimática de los heterocigotos compuestos para estos dos últimos SNPs es cercana al 10% de la observada en controles normales (Sumi et al., 2002; Marinaki et al., 2004; Simone et al., 2013; Azimi et al., 2015). La frecuencia de este polimorfismo en poblaciones europeas es aproximadamente 11%-13% (Marinaki et al., 2004; Shipkova et al., 2006; Atanasova et al., 2007), mientras que en poblaciones africanas y latinoamericanas es cercana al 7%-8% (1000 Genomes Project Consortium, 2015) y en poblaciones asiáticas prácticamente no está presente (Maeda et al., 2005; Ma et al., 2014; 1000 Genomes Project Consortium, 2015).

Posteriormente, otros dos SNPs en el intrón 2 fueron reportados, ambos asociados a deficiencia de ITPA. El primero, una transversión de T por G (IVS2 +68T>G), en la que los heterocigotos presentan 30% de la actividad respecto a la media de los controles (Maeda et al., 2005) y el segundo, una transición de T por C (IVS2 +68T>C), en la que los heterocigotos presentan 60% de la actividad (Shipkova et al., 2006).

Atanasova et al. (2007) detectaron, en un individuo que presentaba 30% de la actividad enzimática, una nueva variante (rs863225424). Esta variante consiste en una duplicación de 8pb en el exón 6 (c.359_366dupTCAGCACC), que resulta en un cambio en el marco de lectura y en la formación de una proteína de mayor tamaño. Esta proteína mutante mostró un 60 % de homología con la proteína *wild type* y probablemente sea no funcional, ya que los aminoácidos del extremo C-terminal involucrados en la formación del sitio catalítico y la estabilización de

grupo pirofosfato se han perdido (Atanasova et al., 2007). Lamentablemente, ningún otro estudio ha reportado esta variante, por lo que su frecuencia es prácticamente nula en todas las poblaciones.

Finalmente, Bakker et al. (2011) identificaron otros dos SNPs. El primero es una transición de A a G en la posición 122, que no pudo ser asociada con una deficiencia en la actividad enzimática de ITPA. El segundo consiste en una transición de T a C en la posición 97 en el exón 2 (c.97T>C), que resulta en el cambio de una cisteína por una arginina en el codón 33 (p.Cis32Arg). Este polimorfismo tiene un efecto similar a la mutación c.94C>A previamente reportada (Bakker et al., 2011; Simone et al., 2013).

3.1.3 Nudix hidrolasa 15 (NUDT15)

El gen *NUDT15*, localizado en el cromosoma 13 (13q14.2), codifica para la enzima nudix hidrolasa 15 que pertenece a la superfamilia de hidrolasas Nudix. La función normal de los miembros de esta superfamilia es catalizar la hidrólisis de nucleósidos difosfato (NDP) y nucleósidos trifosfato (NTP), produciendo nucleósidos monofosfato (NMP). Dentro de estos se incluyen ciertos sustratos resultantes del daño oxidativo, como la 8-oxo-dGTP, que puede inducir errores en el apareamiento de bases durante la replicación del ADN y causar transversiones (Yang et al., 2014). Hasta el presente, en el genoma humano, se han descrito 24 genes que codifican para hidrolasas nudix y al menos cinco pseudogenes (Carter et al., 2015; Carreras-Puigvert et al., 2017). Específicamente, se ha reportado que NUDT15 convierte 8-oxo-dGTP y 8-oxo-dGDP en 8-oxo-dGMP, contribuyendo de manera muy importante a la eliminación de dNTPs oxidados y dañados que podrían incorporarse al ADN (Cai et al., 2003). Sin embargo, esta hipótesis ha sido cuestionada. Datos más recientes muestran que la enzima NUDT15 tiene una mayor preferencia por los metabolitos de tiopurinas que por los oxo-dGTP (Valerie et al., 2016; Carreras-Puigvert et al., 2017). Por esta razón, se postula que NUDT15 es un regulador negativo de la activación de las tiopurinas. NUDT15 desfosforila los metabolitos activos de tiopurinas TGTP y TdGTP, impidiendo su incorporación al ADN y al ARN, afectando negativamente los efectos citotóxicos deseados de las tiopurinas (Chiengthong et al., 2015; Moriyama et al., 2016). Se ha visto que, pacientes portadores de variantes en el gen de *NUDT15* presentan un metabolismo deficiente de las tiopurinas y que dichas mutaciones están asociadas a leucopenias inducidas por tiopurinas (Yang et al., 2014; Yang et al., 2015; Moriyama et al., 2016; Shah et al., 2016; Suzuki et al., 2016; Wong et al., 2016).

Estudios de asociación de genoma completo (GWAS, *genome-wide association studies*) permitieron describir una variante (rs116855232) en el gen *NUDT15* fuertemente asociada con los eventos de leucopenia inducidos por tiopurinas en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (Yang et al., 2014) y en niños con LLA (Yang et al., 2015). Este polimorfismo consiste en una transición de C a T en el exón 3 en la posición 415 (c.415C>T), que resulta en el cambio de una arginina por una cisteína en el codón 139 (p.Arg139Cys). Yang et al. (2015) observaron que los individuos homocigotos para esta variante eran muy sensibles a la mercaptopurina y toleraban aproximadamente el 8% de la dosis estándar, mientras que los individuos heterocigotos presentaban una dosis promedio de 63% y los individuos con genotipo *wild type* un promedio superior al 83%. Asimismo, otros estudios realizados en poblaciones de Hong Kong, Japón, Taiwan, Tailandia, el Líbano y la India, han demostrado una asociación entre esta variante y toxicidad hematológica en pacientes tratados con mercaptopurina (Shah et al., 2016; Suzuki et al., 2016; Wong et al., 2016; Singh et al., 2017; Moradveisi et al., 2019; Puangpetch et al., 2020). La frecuencia de este polimorfismo varía considerablemente entre poblaciones. En poblaciones asiáticas oscila entre 4% (sur de Asia) y 13% (este asiático), mientras que poblaciones africanas o de origen europeo su frecuencia es menor al 1% (1000 Genomes Project Consortium, 2015; Yang et al., 2015; Shah et al., 2016; Singh et al., 2017; Puangpetch et al., 2020). Los datos reportados para poblaciones latinoamericanas son considerablemente escasos y ampliamente variables que van desde 4% en la población mexicana y 12% en peruanos (1000 Genomes Project Consortium, 2015; Moriyama et al., 2016; Taxis et al., 2021).

Moriyama et al. (2016) describen otras tres variantes para este gen, localizadas en los exones 1 y 3, asociadas con eventos de toxicidad hematológica debido a la mercaptopurina. La primera (rs147390019), localizada en el exón 3, es una transición de G a A en la posición 416 (c.416G>A), que produce un cambio de una arginina por una histidina exactamente en el mismo codón que el polimorfismo previamente reportado (p.Arg139His). Las otras dos variantes están localizadas en el exón 1 e involucran al codón 18. Una (rs186364861) es una transición de G a A en la posición 52 (c.52G>A) que resulta en un cambio de una valina por una isoleucina (p.Val18Ile), mientras que la otra (rs554405994 o rs869320766) consiste en una inserción de seis nucleótidos (c.36_37insGGAGTC) que produce la inserción de una glicina y una valina entre las valinas 18 y 19 (p.Val18_Val19insGlyVal). Particularmente, esta última variante se encontró en desequilibrio de ligamiento (LD) con la variante p.Arg139Cys inicialmente reportada (Moriyama et al., 2016). En base a estas variantes Moriyama et al. (2016) proponen seis haplotipos o alelos (Figura 6).

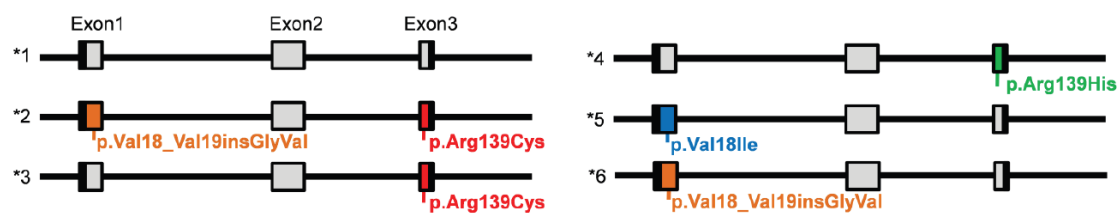


Figura 6. Esquema gen *NUDT15* con sus variantes. Se muestra las distintas variantes del gen (en color) y los haplotipos (*1 a *6) (Moriyama et al., 2016)

Al presente, de acuerdo al CPIC (*Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*) existen nueve haplotipos (* alelos) basados en siete variantes conocidas (dos indels y cinco SNPs), siendo los alelos más frecuentes *NUDT15**3 y *NUDT15**2 (Relling et al., 2019). Cabe destacar que, gracias a los estudios que evidencian la asociación entre las variantes génicas de *NUDT15* y los efectos adversos inducidos por tiopurinas, desde 2018, la FDA ha incorporado en el "etiquetado" de dichos fármacos la recomendación de realizar el genotipado de este gen previo a la administración de los mismos (FDA, 2021).

3.1.4 Tiopurina-S-metil transferasa (TPMT)

El gen *TPMT*, de 34Kb, está localizado en el cromosoma 6 (6p22.3) y está formado por 10 exones (Wang et al., 2010). Un pseudogen procesado con 96% de homología de secuencia al ADNc de *TPMT* se encuentra en el cromosoma 18 (18q21.1) (Lee et al., 1995; Yates). Este gen codifica la enzima tiopurina S-metil transferasa (TPMT), de 245 aminoácidos, que cataliza la S-metilación de la 6-MP y de alguno de los intermediarios (TIMP y TGMP) de la vía metabólica de la misma, convirtiéndolos en sus formas inactivas meMP, meTIMP y meTGMP (Figura 5). Esta metilación permite la eliminación de los mismos, evitando la acumulación de metabolitos activos y disminuyendo el efecto citotóxico de la 6-MP.

Sin embargo, la actividad catalítica de esta enzima es variable debido, en mayor parte, a la presencia de variantes en el gen que la codifica. La presencia de estas variantes génicas (alelos) conduce a la formación de una enzima con actividad reducida o deficiente, lo que provoca un aumento de los metabolitos activos. Este aumento de metabolitos activos genera una mayor actividad farmacológica pero a su vez, produce un aumento del riesgo de presentar efectos adversos. Se ha visto que pacientes homocigotos o heterocigotos compuestos para estos alelos desarrollan toxicidad hematopoyética grave, a veces mortal, cuando son tratados con dosis estándares de tiopurinas (Relling et al., 1999; Evans et al., 2001; Efrati et al., 2009; Kapoor et

al., 2010; Almoguera et al., 2014; Relling et al., 2019). Aproximadamente, 1 de cada 300 individuos (0,3%) son homocigotos o heterocigotos compuestos para estos alelos y muestran actividad baja o nula de la enzima; mientras que un 10% son heterocigotos y presentan una actividad enzimática intermedia (Evans, 2004; Lee et al., 2005).

Según el CPIC, hasta el momento se han descrito 41 alelos para el gen *TPMT*, de los cuales 11 (*2, *3A, *3B, *3C, *4, *11, *14, *15, *23, *29 y *41) producen enzimas con baja, media o nula actividad (Evans, 2004; Appell et al., 2013; Relling et al., 2019). De estas, las variantes *TPMT**2, *TPMT**3A, y *TPMT**3C (Figura 7) son las más frecuentes en poblaciones de origen africano, europeo y asiático, representando más del 90% de los casos reportados (McLeod et al., 2000; Weinshilboum, 2001; Evans, 2004; Lee et al., 2005; Almoguera et al., 2014; Relling et al., 2019). Cada una de estas tres variantes produce un enzima que es rápidamente degradada a través de una vía proteasomal dependiente de ATP, que conlleva a que los individuos portadores de estos alelos presenten niveles muy bajos (o indetectables) de esta enzima (Tai et al., 1997; Tai et al., 1999).

El primer alelo descrito para este gen fue *TPMT**2 (rs1800462). Consiste en una transversión de G a C en el exón 5, en la posición 238 (c.238G>C), que conlleva a la sustitución de una prolina "rígida" por alanina "más flexible" en el codón 80 (p.Ala80Pro) (Figura 7). En consecuencia, la estructura terciaria de la enzima resultante es más inestable, lo que provoca una disminución de la actividad catalítica (Evans, 2004; Wang et al., 2010). La expresión heteróloga de este alelo en levaduras mostró niveles de S-metilación 100 veces menores que la del alelo *wild type* (*TPMT**1) (Collie-Duguid et al., 1999; Hongeng et al., 2000). Esta variante se encuentra en baja frecuencia en poblaciones de origen africano y europeo (Hongeng et al., 2000; Weinshilboum, 2001; Engen et al., 2006; Efrati et al., 2009; 1000 Genomes Project Consortium, 2015); mientras que en poblaciones asiáticas prácticamente no está presente (Ayesh et al., 2013; Zhou et al., 2018). Investigaciones llevadas a cabo en Brasil, Chile y Argentina, indican que este alelo es extremadamente raro (<1%) en poblaciones latinoamericanas (Boson et al., 2003; Silva et al., 2008; Araoz et al., 2014; Farfan et al., 2014).

El segundo alelo descrito para este gen fue el *TPMT**3A. Este alelo presenta dos SNPs (rs1800460 y rs1142345) en la secuencia codificante (Figura 7). El primer SNP, localizado en el exón 7, consiste en una transición de G a A en la posición 460 (c.460G>A) que da lugar a un cambio de una alanina por una tirosina en el codón 154 (p.Ala154Thr). El segundo SNP, ubicado en el exón 10, es una transición de A a G en la posición 719 (c.719A>G) que produce un cambio de una tirosina por una cisteína en el codón 240 (p.Tyr240Cys) (Evans, 2004; Wang

et al., 2010). Tai et al. (1996) demostraron que los niveles de ARNm obtenidos de la expresión de este alelo eran similares a los del alelo *wild type*, y determinaron, como se mencionó previamente, que la disminución de la actividad catalítica era debida a una rápida degradación de la enzima. *TPMT*3A* es el alelo más común asociado a una baja actividad enzimática de TPMT en caucásicos, con una frecuencia aproximada del 5% (Hongeng et al., 2000; Evans, 2004; Wang et al. 2010; Almoguera et al., 2014). Sin embargo, al igual que para *TPMT*2*, este alelo no es detectado en poblaciones asiáticas (Ayesh et al., 2013; Zhou et al., 2018). Según los datos reportados en la bibliografía, la frecuencia de este alelo en poblaciones de América Latina es extremadamente variable. Mientras que, para poblaciones de Minas Gerais (Brasil), Boson et al. (2003) y Silva et al. (2008) reportan frecuencias de 1,5% y 3,9%, respectivamente; Farfan et al. (2014) presentan una frecuencia de 7% para una población de Santiago de Chile (Chile).

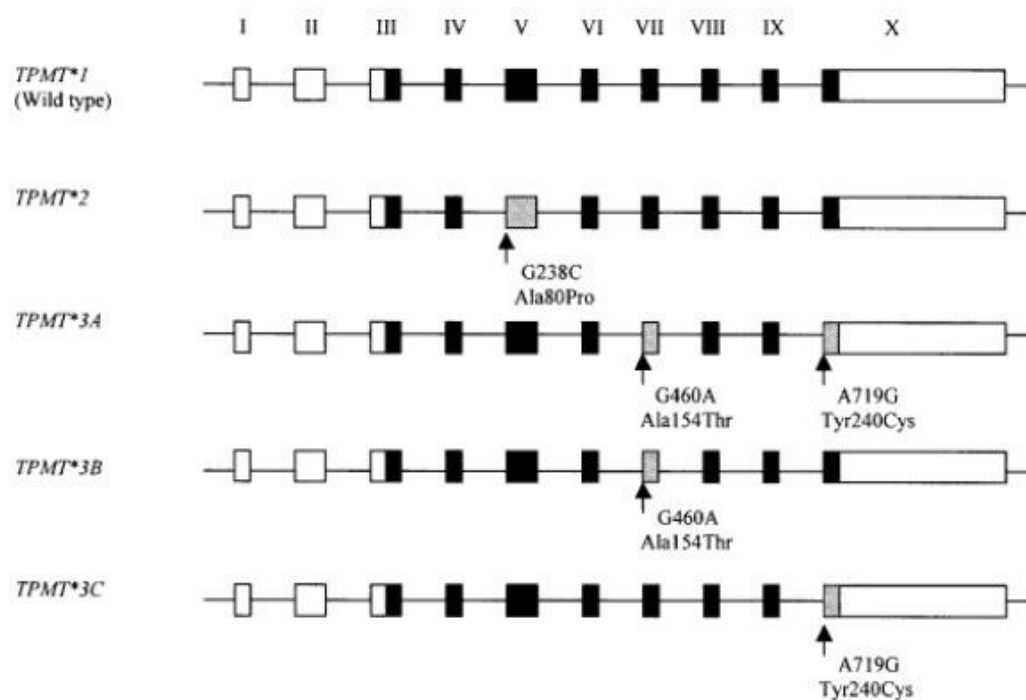


Figura 7. Esquema de los alelos más frecuentes del gen *TPMT*. Se muestran esquemáticamente los 10 exones del gen *TPMT* para el alelo salvaje (*1) y los cuatro alelos variantes más frecuentes (*2, *3A, *3B y *3C). En cada caso se indica el cambio nucleotídico y aminoacídico que caracterizan a cada alelo variante (modificado de Hon et al., 1999).

El alelo *TPMT*3B* presenta únicamente uno de los dos SNP previamente descriptos para el alelo *TPMT*3A*, específicamente la transición c.460G>A (Figura 7). Aunque este alelo es de

baja frecuencia en todas las poblaciones estudiadas, la determinación de la mutación es necesaria para la identificación del alelo *TPMT*3A* (Hongeng et al., 2000; Silva et al., 2008; Wang et al., 2010; Ayeshe et al., 2013; Farfan et al., 2014).

Finalmente, el alelo *TPMT*3C* presenta únicamente la transición c.719A>G descrita anteriormente para el alelo *TPMT*3A*. Mediante ensayos de inmunodetección, se ha visto que individuos heterocigotos para esta mutación presentan una reducción de 50% en la cantidad de enzima. Es decir, a diferencia de lo que sucede para los alelos *TPMT*3A* y *TPMT*3B*, en los que la disminución de la actividad enzimática está dada por la rápida degradación de la enzima; la baja actividad de la enzima codificada por este alelo, está dada tanto por la rápida degradación de la misma como por la cantidad de enzima producida. Este es el alelo más frecuente en poblaciones de origen africano y del este asiático (Tai et al., 1996; Collie-Duguid et al., 1999; Hon et al., 1999; Hongeng et al., 2000; Evans, 2004; Gurwitz et al., 2009; Wang et al., 2010).

Estudios previos mostraron que, en una población de pacientes que presentaron toxicidades durante el tratamiento con tiopurinas, la incidencia de heterocigotos para este gen era seis veces mayor que la de la población normal (Evans et al., 2001). Tanto en los pacientes homocigotos como en los heterocigotos, una reducción de la dosis de tiopurinas permitió seguir el tratamiento sin toxicidad dependiente de la dosis. La reducción media de la dosis en pacientes homocigotos fue de 90,8%, mientras que la reducción media en individuos heterocigotos fue de 67% (Evans et al., 2001). Según Evans (2004), los pacientes homocigotos para alelos de baja actividad de TPMT deben tratarse con el 5%-10% de la dosis estándar de tiopurinas, mientras que los individuos heterocigotos generalmente pueden comenzar con el 100% de la dosis, pero tiene una mayor probabilidad de necesitar una reducción de la misma para evitar las toxicidades.

Dada la importancia de la actividad de esta enzima en individuos que reciben tratamientos con tiopurinas y la frecuencia relativamente alta de individuos homocigotos y heterocigotos para alelos asociados con deficiencia de TPMT (aprox. 11%) en todas las poblaciones estudiadas hasta el momento (Tai et al., 1999; Wang et al., 2010); la determinación del genotipo previo al comienzo del tratamiento permitiría reducir la incidencia de efectos adversos. De hecho, desde hace más de 15 años, la FDA recomienda la determinación del genotipo para *TPMT* previo a la administración de tiopurinas (Relling et al., 2011; FDA, 2021).

3.1.5 Repetidos en Tándem de Número Variable (VNTR) en el gen *TPMT*

Dentro del promotor del gen *TPMT*, existe una región de repetidos en tándem de número variable (VNTR) rica en GC (Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998; Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1999). Esta región (*TPMT*-VNTR) tiene una arquitectura de tres elementos, dos de los cuales tienen un número de copias variable (AmBnC). La cantidad de elementos "A" varía entre 1 y 7, mientras que el número de elementos "B" varía entre 1 y 6. Puesto que la longitud total de este VNTR varía entre tres y nueve elementos, según los criterios de Vergnaud y Denoeud (2000), es considerado un minisatélite. Hasta el momento, se han descrito 19 alelos diferentes (Urbančič et al., 2018), siendo los alelos más frecuentes el *4a y *5a (Alves et al., 2002; Marinaki et al., 2003; Zukic et al., 2010; Kotur et al., 2012; Urbančič et al., 2018)

Algunos estudios han mostrado que la expresión del gen *TPMT* está influida por la composición y número de repetidos de este VNTR (Zukic et al., 2010; Kotur et al., 2012; Kotur et al., 2015). Por consiguiente, este VNTR podría influir en la incidencia de efectos adversos y en la respuesta al tratamiento con 6-MP. Concretamente, Spire-Vayron de la Moureyre et al. (1998) y Alves et al. (2002) encontraron una asociación entre una menor actividad enzimática de *TPMT* y los alelos del VNTR formados por cinco o más elementos, sin precisar cuántos de estos elementos eran A y B. Posteriormente, Zukic et al. (2010) y Kotur et al. (2012) reportaron una correlación negativa entre el número de elementos A y la tasa de transcripción de *TPMT*.

En resumen, tres variantes del gen *TPMT* han sido fuertemente asociadas con los eventos adversos ocurridos durante el tratamiento con tiopurinas (Evans, 2004; Appell et al., 2013; Almoguera et al., 2014; Araoz et al., 2014; Farfan et al., 2014; Relling et al., 2019). Asimismo, algunas de las variantes del gen *ITPA* han sido vinculadas con una disminución de la actividad enzimática y con un mayor riesgo de presentar toxicidades. (Sumi et al., 2002; Farfan et al., 2014; Ma et al., 2014; Azimi et al., 2015). Del mismo modo, se ha reportado que ciertas variantes en el gen *NUDT15* explican una porción importante de la toxicidad observada en pacientes asiáticos y con ancestralidad nativo americana (Chienghthong et al., 2015; Liang et al., 2015; Moriyama et al., 2016). En poblaciones asiáticas la frecuencia de variantes del gen *ITPA* puede alcanzar el 15% (Maeda et al., 2005), mientras que las variantes de baja o nula actividad del gen *TPMT* no superan el 3%. Por el contrario, en poblaciones europeas la frecuencia de variantes del gen *ITPA* no superan el 6% (Simone et al., 2013) y las del gen *TPMT* se encuentra entre el 6% y el 10% (Sumi et al., 2002; Marinaki et al., 2004; Marsh et al., 2004; Efrati et al.,

2009). Las frecuencias de las variantes del gen *NUDT15* presentan diferencias significativas entre las distintas poblaciones, observándose frecuencias de heterocigotos mayores al 10% en poblaciones asiáticas y nativo americanas, mientras que en poblaciones de origen europeo y africano estas frecuencias no alcanzan el 1% (Yang et al., 2015; Moriyama et al., 2016).

Como se mencionó previamente, la población uruguaya está formada por el aporte desigual de poblaciones de origen europeo, nativo americano y africano; por lo que es posible que la frecuencia de las variantes de estos tres genes sea diferente a las reportadas para otras poblaciones. Por esta razón, es importante determinar la frecuencia de dichas variantes y de los alelos de *TPMT*-VNTR en nuestra población; y definir su posible rol en el tratamiento de LLA infantil, de manera de poder predecir anticipadamente que pacientes pueden presentar efectos adversos. Esto permitirá ajustar el tratamiento de una forma más personalizada. Hasta el momento, no existe registro alguno sobre la frecuencia de estas variantes en nuestra población (con excepción del artículo de Soler et al. (2018) que reporta parte de los resultados obtenidos en esta tesis y que se adjunta en el ANEXO IV).

3.2 OBJETIVO

Analizar variantes génicas vinculadas al metabolismo de la 6-mercaptopurina y determinar su relación con la ancestralidad y con los eventos adversos ocurridos en la fase de mantenimiento del tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda infantil.

3.2.1 Objetivos específicos

- Determinar las frecuencias de las variantes de los genes *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT* vinculadas al metabolismo de la 6-mercaptopurina, en la muestra de pacientes y controles.
- Comparar las frecuencias las variantes génicas obtenidas para ambas muestras.
- Releva, a partir de las historias clínicas de los pacientes, los datos de clínicos, paraclínicos y los efectos adversos en la fase de mantenimiento del tratamiento.
- Establecer la relación entre la dosis de 6-MP administrada durante la fase de mantenimiento y los polimorfismos de *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT*.
- Analizar el efecto de las variantes de los genes *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT* sobre los eventos de toxicidad (hematológica y hepática) observados en la fase de mantenimiento.

- Determinar la relación entre la ancestralidad y las variantes génicas de *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT*.
- Determinar la relación entre la ancestralidad y la dosis de 6-MP, así como también con los eventos de toxicidad hematológica
- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del VNTR localizado dentro del promotor del gen *TPMT* (*TPMT*-VNTR).
- Determinar la posible asociación entre los alelos del *TPMT*-VNTR y la dosis de 6-MP administrada, así como también con los efectos adversos de la fase de mantenimiento.
- Examinar la relación entre ancestralidad y los alelos del *TPMT*-VNTR

3.3 MATERIALES y MÉTODOS

3.3.1 Muestras y genotipado

Para determinar la relación entre las variantes génicas y los eventos de toxicidad producidos por la 6-MP en la fase de mantenimiento del tratamiento de LLA, la muestra utilizada fue la previamente descriptas en los "Materiales y Métodos" (sección 2.3.1) del Capítulo 2; que comprenden 192 niños y adolescentes de entre seis meses y 19 años de edad diagnosticados con LLA provenientes del SHOP-CHPR.

Se analizaron un total de nueve polimorfismos. Concretamente, se analizó un polimorfismo exónico y una variante intrónica del gen *ITPA*, cuatro polimorfismos en el gen *NUDT15* (dos en el exón 1 y dos en el exón 3) y tres polimorfismos correspondientes al gen *TPMT* (exones 5, 7 y 10). La descripción de los mismos junto con la metodología utilizada se detalla en la Tabla 3. Aquellos polimorfismos que fueron determinados mediante la técnica de PCR-RFLP fueron posteriormente confirmados mediante secuenciación por Sanger.

La muestra control de 200 niños cuyo componente ancestral fue determinado en el capítulo 2, fue genotipada y utilizada para determinar que las frecuencias genéticas obtenidas en la muestra de pacientes son representativas de la población.

Por otro lado, la determinación de los genotipos del *TPMT*-VNTR se realizó mediante la amplificación por PCR del primer exón del gen *TPMT*, incluyendo la región promotora, seguida de secuenciación Sanger. La determinación de los genotipos del *TPMT*-VNTR solo se llevó a cabo en la muestra de pacientes, es decir, los genotipos del *TPMT*-VNTR no fueron determinados en la muestra control. Posteriormente, los genotipos del *TPMT*-VNTR y los

genotipos obtenidos para el gen *TPMT* fueron utilizados para estimar los haplotipos mediante el software Arlequin v3.5.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Para cada haplotipo se estimó el desequilibrio de ligamiento (D').

Tabla 3. Genes, polimorfismos y método de genotipado. Se muestran, para cada gen, los polimorfismos analizados (rs), la metodología utilizada, el cambio nucleotídico, la variante alélica correspondiente, el tamaño esperado del amplicon y de los fragmentos de restricción, y las referencias de las cuales se obtuvieron las condiciones de amplificación.

Gen	rs	Método	Polimorfismo	Alelo	Amplicon (pb)	Fragmentos restricción (pb)	Referencia
ITPA	rs1127354	PCR & Secuenciación	c.94 C>A		328		Cao 2002
	rs7270101		IVS2 +21 A>C				
NUDT15	rs186364861	PCR & Secuenciación	c. 52 G>A	*5	629		Moriyama 2016
	rs554405994		c. 36_37insGGAGTC	*2			
	rs116855232	PCR & Secuenciación	c. 415 C>T	*3	450		Moriyama 2016
	rs147390019		c. 416 G>A	*4			
TPMT	rs1800462	PCR alelo específico	c. 238 G>C	*2	245		Ameyaw 1999
	rs1800460	PCR-RFLP (Mwo I)	c.460 G>A	*3B	694	G: 694 A: 443 + 251	Ameyaw 1999
	rs1142345	PCR-RFLP (Acc I)	c.719 A>G	*3A	373	A: 373 G: 283 + 90	Ameyaw 1999

3.3.2 Datos Clínicos

A partir de las historias clínicas se relevaron los siguientes datos de la fase de mantenimiento:

1. Duración total (en semanas)
2. Cantidad de GB al día del inicio
3. Área de la superficie corporal (BSA)
4. Para cada semana del tratamiento:
 - a. Dosis de 6-mercaptopurina administrada
 - b. Porcentaje y motivo de reducción de la dosis de 6-MP
 - c. Motivo de suspensión de la dosis de 6-MP
 - d. Datos de hemograma: hematocrito (HTO), niveles de hemoglobina (Hb), recuento de leucocitos (GB), porcentaje de neutrófilos (Neu), porcentaje de linfocitos (Linf),

porcentaje de Monocitos (Mono), porcentaje de Eosinófilos (Eos), porcentaje de blastos y recuento de plaquetas

- e. Datos de funcional renal: urea, creatinina y ácido úrico
- f. Datos de funcional hepático: bilirrubina total (BT) y directa (Bd), transaminasas (GPT y GOT), fosfatasa alcalina (FA), albumina (ALB) y lactato deshidrogenasa (LDH)
- g. Otros datos clínicos relevantes: Vómitos, Diarreas, Infecciones Respiratorias Agudas (IRA), Fiebre, Crisis Broncoobstructivas (CBO), etc.

Los datos obtenidos de Hb, Leu, Neu, plaquetas, BT, GPT, GOT y FA fueron clasificados en grados de toxicidad (1 a 4) de acuerdo al *Common Toxicity Criteria* (CTC) versión 4.0 del NIH-NCI.

Cabe destacar que en esta fase del tratamiento, que dura entre 63 y 74 semanas, los pacientes concurren a consulta cada dos o tres semanas, por lo que el total de hemogramas relevados por cada paciente oscila entre 30 y 35. Sin embargo, salvo en aquellos pacientes que presentaron toxicidades hepáticas durante el tratamiento, la cantidad de funcionales hepáticos por cada paciente es aproximadamente de seis registros. Por este motivo, solo se realizaron análisis teniendo en cuenta el número total de toxicidades hepáticas. Por otra parte, la cantidad de registros de funcional renal por paciente es muy baja (1 o 2), o incluso inexistente para algunos pacientes, por lo que no fueron considerados en los análisis de la relación entre las variantes génicas y los eventos de toxicidad.

En base a los datos obtenidos de las historias clínicas se calcularon:

1. La dosis acumulada de 6-MP (por m^2 de superficie corporal) a las semanas 8, 16, 24, 32 y total
2. La dosis promedio diaria de 6-MP (por m^2 de superficie corporal)
3. La cantidad total (y porcentaje) de semanas de reducción de dosis de 6-MP
4. La cantidad (y porcentaje) de semanas de reducción de dosis de 6-MP debidas a eventos de toxicidad Hematológica
5. La cantidad total (y porcentaje) de semanas de suspensión de dosis de 6-MP
6. La cantidad (y porcentaje) de semanas de suspensión de dosis de 6-MP debidas a eventos de toxicidad Hematológica

7. La presencia/ausencia de leucopenias Gdo.3 y 4 ($GB < 2,0 \times 10^9/L$) en intervalos de 8 semanas hasta la semana 32 (1-8, 9-16, 17-24 y 25-32) y total
8. La presencia/ausencia de neutropenias Gdo.3 y 4 ($Neu < 1,0 \times 10^9/L$) en intervalos de 8 semanas hasta la semana 32 (1-8, 9-16, 17-24 y 25-32) y total
9. El número de leucopenias Gdo.3 y 4 en intervalos de 8 semanas hasta la semana 32 (1-8, 9-16, 17-24 y 25-32) y total
10. El número de neutropenias Gdo.3 y 4 en intervalos de 8 semanas hasta la semana 32 (1-8, 9-16, 17-24 y 25-32) y total
11. El número total de eventos de toxicidad hepática (Gdo.3 y 4)

2.3.3 Análisis estadísticos

Todos los datos fueron analizados estadísticamente mediante el programa IBM SPSS Statistics 22, utilizando un intervalo de confianza del 95%. Los gráficos fueron realizados mediante el programa RStudio versión 4.0.0.

Para cada uno de los polimorfismos, se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas, tanto para la muestra de pacientes como para la muestra control. Se determinó, mediante la prueba de Chi-cuadrado, si cada uno de los polimorfismos se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W). A su vez, mediante este mismo test, se determinó si existían diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos obtenidos para la muestra de pacientes y la muestra de controles.

Por otro lado, se comprobó si los datos obtenidos de las historias clínicas tenían una distribución normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y se probó la homocedasticidad mediante el análisis de homogeneidad de varianzas.

Con los genotipos obtenidos y los datos derivados de las historias clínicas, se determinó la posible asociación entre la presencia de variantes en los genes *ITPA*, *NUDT15* o *TPMT* y los eventos de toxicidad durante la fase de mantenimiento. Los datos utilizados como indicadores de toxicidad fueron: semanas de reducción de dosis, semanas de suspensión del tratamiento, dosis acumulada de 6-MP administrada, leucopenias (Gdo. 3 y 4), neutropenias (Gdo. 3 y 4) y eventos de toxicidad hepática totales (Gdo.3 y 4). Para los genes *NUDT15* y *TPMT* se consideró como "paciente con mutación" a aquellos que presentaban una variante, sin importar de cuál de ellas se tratara. En cambio, para el gen *ITPA* los análisis fueron realizados considerando

cada una de las variantes por separado y teniendo en cuenta el genotipo completo (ambas variantes a la vez).

La posible asociación entre las semanas de reducción/suspensión de dosis y la presencia de variantes en los genes *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT* fue llevada a cabo mediante el test de Mann-Whitney. Debido a que la duración de la fase de mantenimiento varía según el riesgo al que pertenece el paciente, los análisis que involucraban semanas de suspensión o reducción de dosis fueron realizados usando el porcentaje de semanas respecto al total. A su vez, dado que el tratamiento puede ser reducido/suspendido por diversas causas no relacionadas con la administración de los fármacos, estos análisis también se realizaron considerando solamente aquellas semanas en las que el tratamiento fue reducido/suspendido por causas hematológicas.

Para los análisis de dosis de 6-MP se utilizaron los test de ANOVA y post-hoc Tukey en aquellos casos en que los datos clínicos presentaban una distribución normal y, en caso contrario, los test Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. Con los registros de la dosis de 6-MP administrada en cada semana de la fase de mantenimiento, se calculó la dosis acumulada (por m² de superficie corporal) a las semanas 8, 16, 24 y 32, así como también el promedio diario. Estos datos, junto con los genotipos previamente determinados fueron utilizados para analizar la posible asociación entre la dosis de 6-MP y la presencia de variantes en los genes *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT* por separado. A su vez, los análisis también se realizaron por pares de genes, considerando como "paciente con mutación" a aquellos que presentaban al menos una variante en *TPMT* o *ITPA*, en *TPMT* o *NUDT15* y en *NUDT15* o *ITPA*. Por último, se analizó la relación entre las dosis y la presencia de una o más variantes en el par de genes *TPMT* y/o *NUDT15*. Para esto, los pacientes fueron clasificados en 4 grupos: (0) no presentaban ninguna variante, (1) con variantes únicamente en *TPMT*, (2) con variantes solamente en *NUDT15* y (3) con variantes tanto en *TPMT* como en *NUDT15*.

Por otro lado, se analizó la posible asociación entre el número de eventos adversos hematológicos (leucopenia y neutropenias grados 3 y/o 4) y la presencia de variantes en los genes *ITPA*, *NUDT15*, *TPMT* por separado y en el par *TPMT-NUDT15*. Los análisis se realizaron en períodos de 8 semanas (1-8, 9-16, 17-24 y 25-32) y en el total de semanas de la fase de mantenimiento. Estos análisis fueron realizados mediante el test de Mann-Whitney.

Por otra parte, mediante *odds ratio*, se estableció el riesgo de presentar algún evento de leucopenia en aquellos pacientes portadores de al menos una variante en los genes *NUDT15* y *TPMT* respecto a pacientes sin variantes. Este análisis se realizaron en períodos de 8 semanas

hasta la semana 32 (1-8, 9-16, 17-24 y 25-32) y en el total de semanas de la fase de mantenimiento.

Para determinar la posible asociación entre la toxicidad hepática y las variantes en los genes *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT*, se tuvo en cuenta únicamente número total de toxicidades hepáticas Gdo. 3 y Gdo.4 ocurridas durante toda la fase de mantenimiento. Este análisis se llevó a cabo mediante el test de Mann-Whitney.

Posteriormente, se estudió la posible asociación entre la ancestralidad y las variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*. Para esto, la muestra fue subdividida en 3 subgrupos: (0) no presentaban ninguna variante, (1) con variantes únicamente en *TPMT*, (2) con variantes en *NUDT15*. Los datos de ancestralidad individual obtenidos en el capítulo 2 fueron utilizados para obtener la media y desvío estándar de cada componente ancestral en cada subgrupo. Finalmente, para comparar los subgrupos presentaban la misma ancestralidad se aplicó el test de Mann-Whitney.

Adicionalmente, se estudió la relación entre la ancestralidad y los eventos de leucopenia, así como también con los eventos de neutropenia. Por un lado, mediante el test de Mann-Whitney, se determinó la posible asociación entre la presencia o ausencia de leucopenias/neutropenias y cada uno de los componentes ancestrales. Este análisis se realizó en el total de la muestra, sin diferenciar aquellos pacientes que presentaban variantes de los que no; en cada uno de los intervalos de tiempo previamente descritos (1-8, 9-16, 17-24, 25-32 y total). Por otro lado, se estableció el coeficiente de correlación de Spearman entre cada componente ancestral y el número de eventos de leucopenia Gdo. 3, Gdo.4 y la suma de ambos en el total de semanas de la fase de mantenimiento. Este análisis se llevó a cabo en el total de la muestra y en el subgrupo de pacientes que no eran portadores de alelos variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*.

Finalmente, mediante correlación de Spearman se estableció la relación entre la dosis acumulada de 6-MP y cada componente ancestral. Este análisis se realizó en el total de la muestra y en el subgrupo de pacientes que no eran portadores de variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*.

Cabe destacar que, aquellos pacientes portadores de alelos de baja actividad cuyo genotipo fue notificado al médico tratante previo al inicio de la fase de mantenimiento, fueron excluidos de todos estos análisis. Del mismo modo, los pacientes portadores de síndrome de Down no

fueron tenidos en cuenta al momento de determinar la relación entre las variantes y la toxicidad.

Por último, los análisis estadísticos realizados para establecer la relación entre los genotipos/alelos del *TPMT*-VNTR y los eventos de toxicidad, junto con la ancestralidad se detallan en el Apéndice del Capítulo 3 (sección 3.8).

3.4 RESULTADOS

Parte de los resultados que se presentan a continuación fueron publicados en la revista *British Journal of Haematology* (Soler et al., 2018). El artículo completo se presenta en el ANEXO IV.

3.4.1 Frecuencias de las variantes en los genes *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT*

Todos los polimorfismos analizados se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (p -value >0,05, datos no mostrados). Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos analizados para los genes *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT* se muestran en la Tabla 4. Como se puede observar, cerca del 20% de los pacientes presentan variantes en estos genes.

Respecto al gen *ITPA*, se encontró un único paciente homocigoto para el alelo C de la variante IVS2+21 y ningún individuo homocigoto para el alelo A del polimorfismo c.94C>A. La frecuencia de heterocigotos para el polimorfismo c.94C>A fue cercana al 8%. Esta frecuencia es similar a la reportada para poblaciones africanas y levemente inferior a las reportadas para poblaciones europeas (Marsh et al., 2004; 1000 Genomes Project Consortium, 2015). Por otro lado, la frecuencia del alelo C de la variante intrónica IVS2+21 fue cercana al 8%, siendo similar a las descritas para otras poblaciones latinoamericanas (1000 Genomes Project Consortium, 2015). Las frecuencias obtenidas para ambos polimorfismos del gen *ITPA* en pacientes y controles resultaron ser estadísticamente similares (Tabla 4).

En relación al gen *NUDT15*, no se identificó ningún individuo homocigoto para las variantes estudiadas. La frecuencia de portadores de alelos de baja actividad fue de 10,5%, siendo el alelo *NUDT15**2 el más frecuente. Esta frecuencia es similar a las reportadas para las poblaciones del este asiático y para ciertas poblaciones latinoamericanas (Yang et al., 2015; Moriyama et al., 2016; Taxis et al., 2021). La variante c.36_37insGGAGTC del exón 1 (*NUDT15**6) se encontró en desequilibrio de ligamiento con la variante c.415C>T del exón 3 (*NUDT15**3). No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de la muestra de pacientes y la muestra de controles (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencias genotípicas y alélicas de *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT*. Se muestran los genes (polimorfismos) analizados, el número (N) y porcentaje de individuos por cada genotipo, junto con las frecuencias de cada alelo; para la muestra de pacientes y de controles.

Gen	Genotipo	N (%)		<i>p-value</i> *	Alelo	Frecuencias Alélicas	
		Pacientes	Controles			Pacientes	Controles
ITPA 94 C>A	CC	175 (91,6)	92 (92,0)	0,912	C	0,958	0,960
	CA	16 (8,4)	8 (8,0)		A	0,042	0,040
	AA	0	0				
ITPA IVS2 +21 A>C	AA	159 (83,3)	77 (77,0)	0,421	A	0,914	0,880
	AC	31 (16,2)	22 (22,0)		C	0,086	0,120
	CC	1 (0,5)	1 (1,0)				
NUDT15	*1/*1	170 (89,5)	181 (90,5)	0,943	*1	0,947	0,952
	*1/*2	12 (6,3)	12 (6,0)		*2	0,032	0,030
	*1/*3	1 (0,5)	2 (1,0)		*3	0,003	0,005
	*1/*4	4 (2,1)	3 (1,5)		*4	0,010	0,008
	*1/*5	0	0		*5	0,000	0,000
	*1/*6	3 (1,6)	2 (1,0)		*6	0,008	0,005
TPMT	*1/*1	167 (88,4)	190 (95,0)	0,174	*1	0,939	0,975
	*1/*2	2 (1,1)	1 (0,5)		*2	0,008	0,003
	*1/*3A	18 (9,5)	8 (4,0)		*3A	0,050	0,020
	*1/*3B	0	0		*3B	0,000	0,000
	*1/*3C	1 (0,5)	1 (0,5)		*3C	0,003	0,002
	*2/*3A	1 (0,5)	0				

* Test de Chi cuadrado (comparación de la muestra de pacientes y controles)

En cuanto al gen *TPMT*, la frecuencia de portadores de alelos de baja actividad fue 11,6%, siendo el alelo *TPMT**3A el más frecuente. Esta frecuencia es similar a las reportadas para poblaciones europeas (Ameyaw et al., 1999; Hon et al., 1999), así como también para Argentina (Araoz et al., 2014), Brasil (Silva et al., 2008) y Chile (Farfan et al., 2014). Cabe señalar que, el individuo heterocigoto compuesto (*TPMT**2/*TPMT**3A) observado en la muestra de pacientes corresponde a una niña que se atendía en un centro de salud privado de Montevideo. Debido a que presentaba toxicidades extremas cuando era tratada con 6-MP, su médico tratante solicitó asesoramiento al SHOP-CHPR, donde le aconsejaron que enviara una muestra a nuestro laboratorio para determinar si presentaba alguna variante del gen *TPMT*. Finalmente, como se muestra en la Tabla 4, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de pacientes y controles.

3.4.2 Variantes en *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT* vs reducción o suspensión de dosis de 6-MP

Se analizó la posible asociación entre la presencia de variantes en los genes *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT* y las semanas de reducción y suspensión de dosis de 6-MP en la fase de mantenimiento. Los resultados obtenidos no mostraron una asociación entre la presencia de variantes en el gen *ITPA* y las semanas de reducción de dosis o de suspensión del tratamiento (Tabla 5). Por el contrario, la presencia de variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT* presentó una asociación significativa tanto con el porcentaje de semanas de reducción total como con el porcentaje de semanas de reducción debido a causas hematológicas. Es decir, los pacientes portadores de variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT* tuvieron un mayor porcentaje de semanas con dosis reducida.

Tabla 5. Variantes genéticas de *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT* vs semanas de suspensión y reducción de dosis de 6-MP. Se muestran los p-valores (test Mann-Whitney) del análisis de asociación entre las variantes genéticas y el porcentaje de semanas de reducción de dosis, de reducción de dosis por toxicidad hematológica, de suspensión de dosis, y de suspensión de dosis por toxicidad hematológica.

Gen	<i>p-value*</i>			
	Semanas Reducción	Sem. Reducción Hematológica	Semanas Suspensión	Sem. Suspensión Hematológica
ITPA 94 C>A	0,379	0,599	0,270	0,310
ITPA IVS2 +21 A>C	0,596	0,763	0,067	0,232
ITPA	0,198	0,140	0,306	0,317
NUDT15	0,000	0,000	0,339	0,020
TPMT	0,012	0,020	0,230	0,017

* Test Mann-Whitney

Por otro lado, la presencia de variantes en estos dos genes se vio asociada al porcentaje de semanas de suspensión del tratamiento únicamente cuando la suspensión era debida a toxicidades hematológicas (Tabla 5). Las Figuras 8 y 9 muestran gráficamente los resultados obtenidos del análisis entre la presencia de variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT* y las semanas de reducción y suspensión de dosis de 6-MP por causas hematológicas, respectivamente.

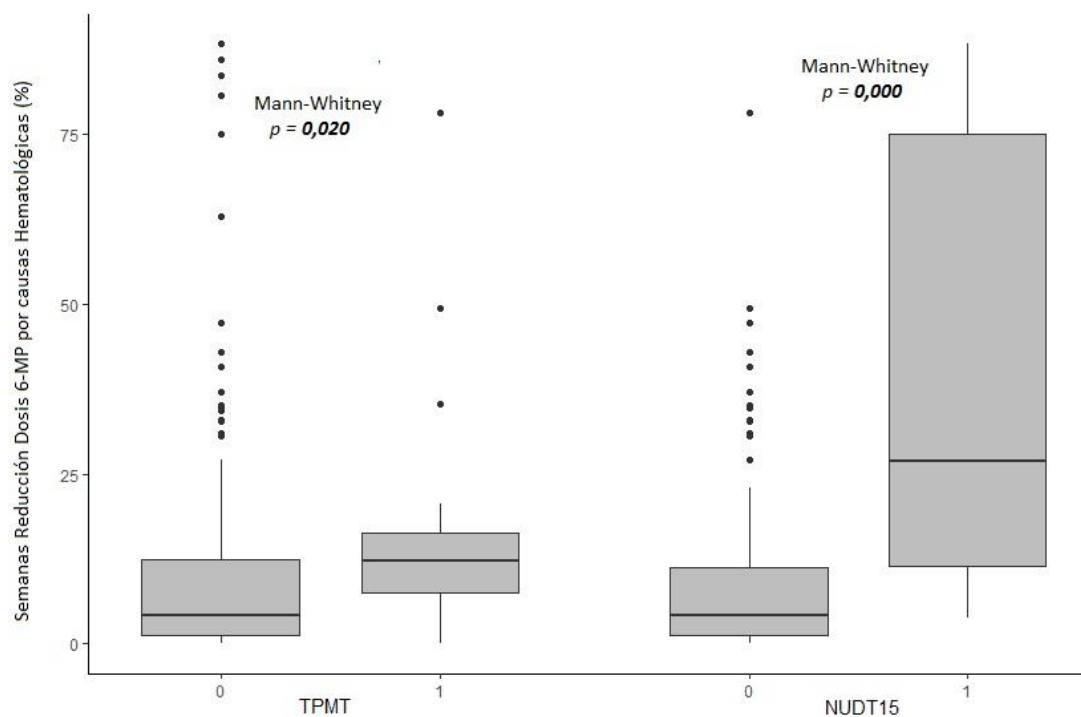


Figura 8. Presencia de variantes en *NUDT15* y *TPMT* vs semanas de reducción de dosis de 6-MP por causas hematológicas. Se muestra la relación entre las semanas de reducción de dosis de 6-MP debidas a causas hematológicas (%) y la presencia (1) o ausencia (0) de variantes en los genes *TPMT* (izq.) y *NUDT15* (der).

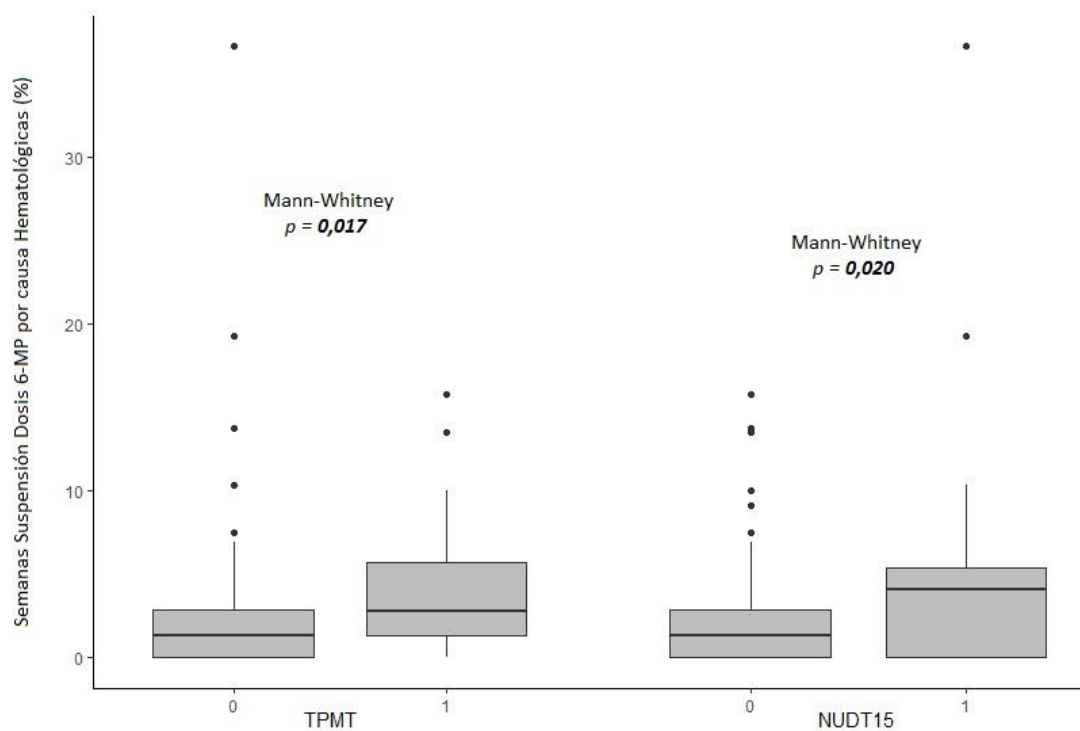


Figura 9. Presencia de variantes en *NUDT15* y *TPMT* vs semanas de suspensión de dosis de 6-MP por causas hematológicas. Se muestra la relación entre las semanas de suspensión de dosis de 6-MP debidas a causas hematológicas (%) y la presencia (1) o ausencia (0) de variantes en los genes *TPMT* (izq.) y *NUDT15* (der.).

3.4.3 Variantes genéticas y dosis de 6-MP

La dosis acumulada de 6-MP a las semanas 8, 16, 24, 32 y el promedio diario junto con los genotipos previamente determinados fueron utilizados para analizar la posible asociación entre la dosis de 6-MP y la presencia de variantes en los genes *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT* por separado. Los resultados muestran una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de variantes del gen *TPMT* y la dosis acumulada de 6-MP en las semanas 8, 16, 24 (Figura 10A-C) y 32, así como también con la dosis promedio diaria (Figura 10D). Los resultados muestran que los pacientes portadores de alelos variantes para el gen *TPMT* recibieron menos dosis de 6-MP.

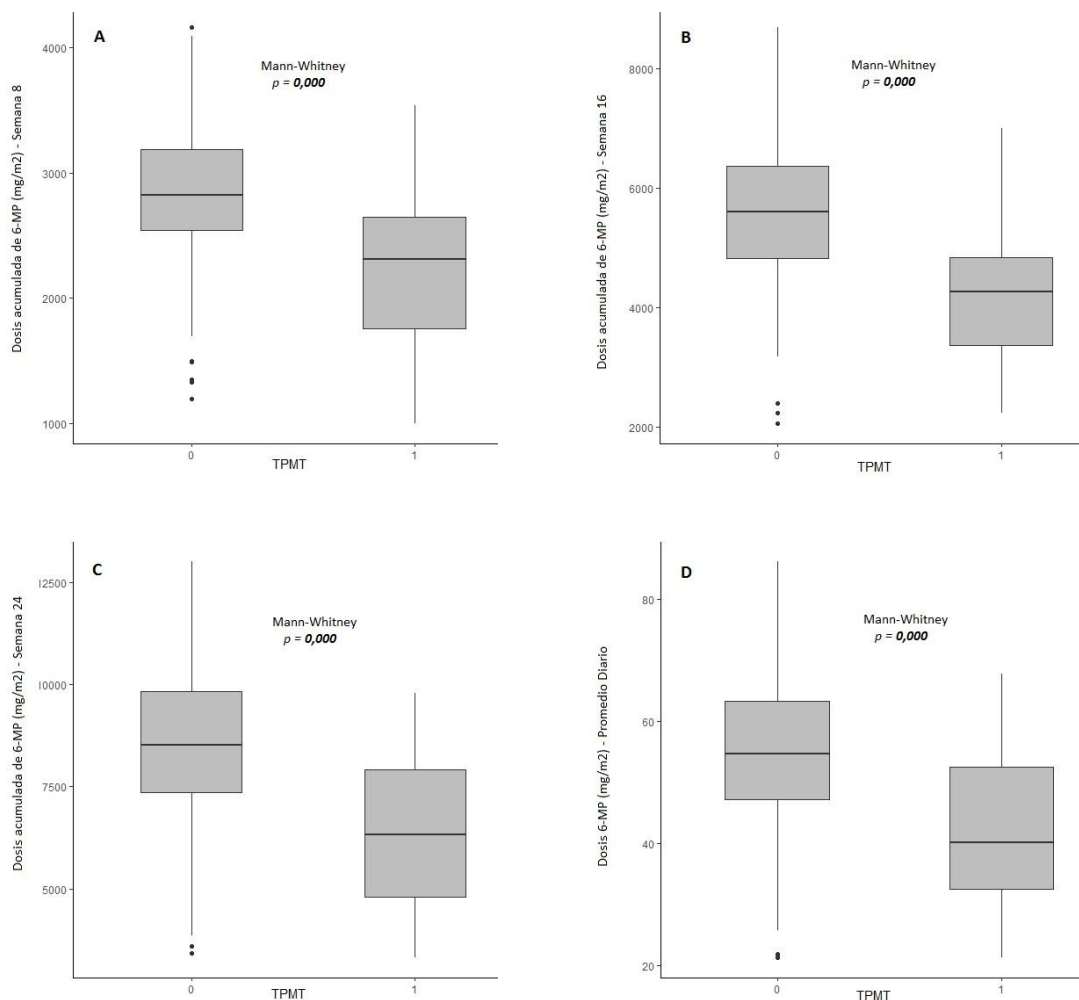


Figura 10. Variantes en *TPMT* vs Dosis de 6-MP. En las abscisas se muestra ausencia (0) o presencia (1) de alguna de las variantes de *TPMT* y en el eje de las ordenadas, la dosis acumulada de 6-MP (por m²). **(A)** Semana 8. **(B)** Semana 16. **(C)** Semana 24. **(D)** Promedio diario. En cada caso se muestra el test estadístico utilizado y el p-valor obtenido.

Al Igual que para el gen *TPMT*, los resultados obtenidos para el gen *NUDT15* indican una asociación estadísticamente significativa ente la presencia de variantes en este gen y la dosis acumulada en las semanas 8, 16, 24 (Figura 11A-C) y 32, así como también con la dosis promedio diaria (Figura 11D). Es decir, aquellos pacientes portadores de alelos variantes para el gen *NUDT15* recibieron menos dosis de 6-MP. Como se puede apreciar en la Figura 11D, los pacientes con alelos variantes para *NUDT15* recibieron una dosis promedio diario por inferior a la dosis estándar (39,64mg/m²/día), mientras que los pacientes sin variantes recibieron una dosis promedio diaria levemente superior a la dosis estándar (54,62mg/m²/día).

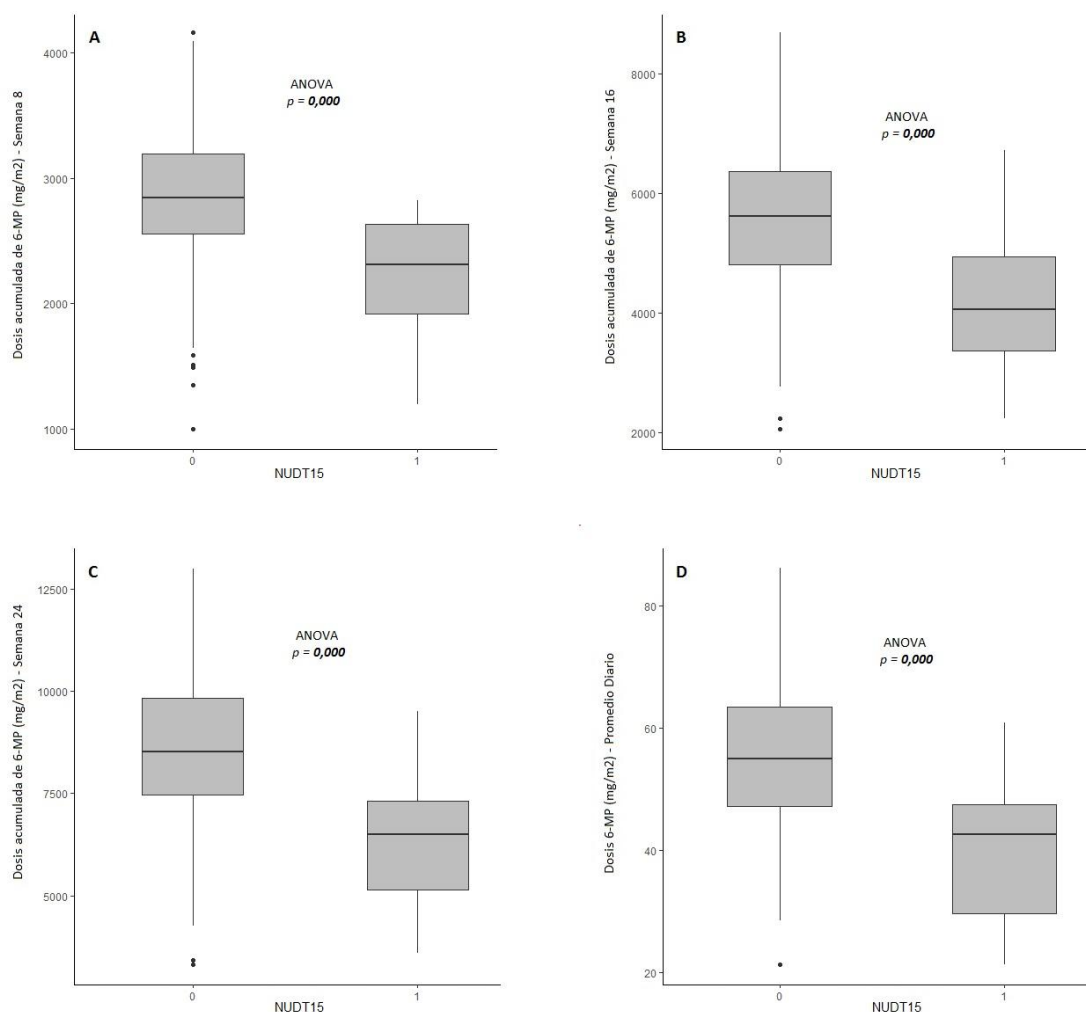


Figura 11. Variantes en *NUDT15* vs Dosis de 6-MP. En las abscisas se muestra ausencia (0) o presencia (1) de alguna de las variantes de *NUDT15* y en las ordenadas, la dosis acumulada de 6-MP (por m²). **(A)** Semana 8. **(B)** Semana 16. **(C)** Semana 24. **(D)** Promedio diario. En cada caso se muestra el test estadístico utilizado y el p-valor obtenido.

A diferencia de lo encontrado para los genes *TPMT* y *NUDT15*, los resultados no muestran una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de variantes del gen *ITPA* y la dosis acumulada de 6-MP o la dosis promedio diario. Sin embargo, cuando este análisis se realiza excluyendo de la muestra aquellos pacientes portadores de variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*, se evidencia una asociación entre la variante exónica 94C>A del gen *ITPA* y la dosis acumulada de 6-MP a las semanas 8 y 16, así como también con el promedio diario (Tabla 6).

Tabla 6. Variantes de *ITPA* y dosis de 6-MP. Se muestran los p-valores (test Mann-Whitney o Kruskal-Wallis) del análisis de asociación entre las variantes del gen *ITPA* y la dosis acumulada de 6-MP a las semanas 8, 16, 24 y 32, junto con el promedio diario. *ITPA* = Genotipo considerando ambos polimorfismos a la vez.

Muestra	Gen/variante	<i>p-value</i> *				
		Semana 8	Semana 16	Semana 24	Semana 32	Promedio diario
Total	<i>ITPA</i> 94 C>A	0,230	0,244	0,277	0,338	0,296
	<i>ITPA</i> IVS2 +21	0,466	0,418	0,690	0,651	0,976
	<i>ITPA</i>**	0,237	0,121	0,098	0,146	0,371
s/variantes	<i>ITPA</i> 94 C>A	0,032	0,032	0,053	0,058	0,050
<i>NUDT15</i>	<i>ITPA</i> IVS2 +21	0,966	0,892	0,821	0,976	0,462
y/o <i>TPMT</i>	<i>ITPA</i>**	0,151	0,079	0,062	0,118	0,148

* Test Mann-Whitney. ** Prueba de Kruskal-Wallis

Los resultados obtenidos de los análisis de variantes por pares de genes muestran una asociación entre las dosis acumuladas (y promedio diario) y la presencia de variantes en el par *TPMT-NUDT15* (Figura 12A-D). Por el contrario, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre las dosis y la presencia de variantes en los pares *TPMT-ITPA* y *NUDT15-ITPA* (datos no mostrados).

Por último, basándose en los resultados obtenidos hasta este momento y teniendo en cuenta que hay pacientes que presentan variantes para ambos genes (*NUDT15* y *TPMT*), se analizó la relación entre las dosis y la presencia de una o más variantes en el par de genes *TPMT* y/o *NUDT15*.

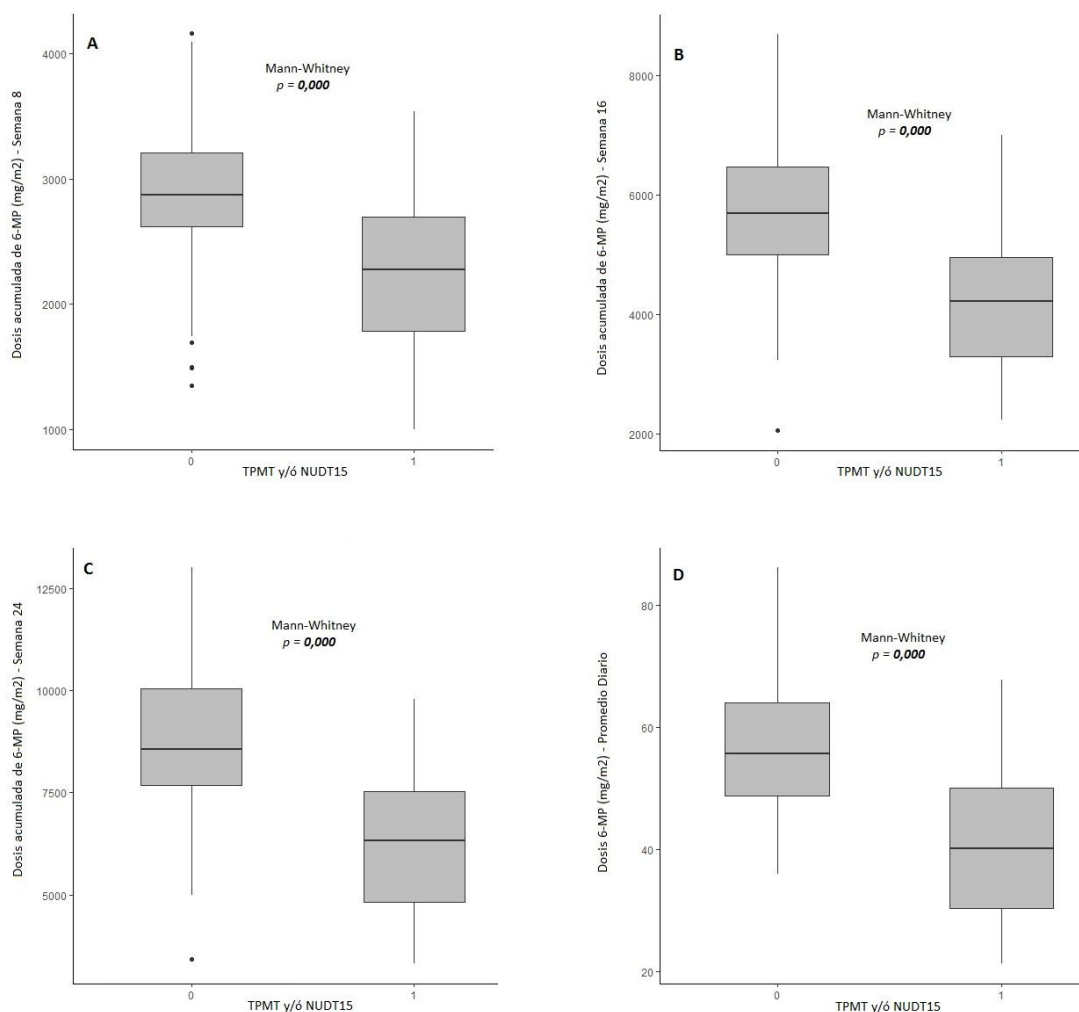


Figura 12. Variantes en *TPMT* y *NUDT15* vs Dosis de 6-MP. En las abscisas se muestra ausencia (0) o presencia (1) de alguna variante en *TPMT* y/o *NUDT15* y, en el eje de las ordenadas la dosis de 6-MP. **(A)** Semana 8. **(B)** Semana 16. **(C)** Semana 24. **(D)** Promedio diario. En cada caso se muestra el test estadístico utilizado y el p-valor obtenido.

Para esto, los pacientes fueron clasificados en 4 grupos: (0) no presentaban ninguna variante, (1) con variantes únicamente en *TPMT*, (2) con variantes solamente en *NUDT15* y (3) con variantes tanto en *TPMT* como en *NUDT15*. Los resultados obtenidos (Tabla 7) muestran, para todas las dosis, diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes sin variantes (0) y los que presentan únicamente variantes para el gen *TPMT* (1), así como también con el grupo que solo presenta variantes en el gen *NUDT15* (2). Sin embargo, la presencia concomitante de variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT* (grupo 3) presenta asociación únicamente con la dosis acumulada de 6-MP a la semana 8, 16 y 24, pero no a la semana 32 o con el promedio diario. Finalmente, no se evidenciaros diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que presentaban variantes en uno de los genes (1 vs 2), ni entre estos y el grupo que presentaba variantes en ambos genes (1 vs 3 y 2 vs 3).

Tabla 7. Variantes *NUDT15* y/o *TPMT* y dosis de 6-MP. Se muestran los p-valores del análisis de asociación entre las variantes en *NUDT15* y/o *TPMT* y la dosis acumulada de 6-MP a las semanas 8, 16, 24 y 32, junto con el promedio diario. **(0)** Ausencia de variantes en *NUDT15* y *TPMT*. **(1)** Presencia de variantes únicamente en *TPMT*. **(2)** Presencia de variantes solamente en *NUDT15*. **(3)** presencia simultánea de variantes en *NUDT15* y *TPMT*.

	<i>p-value</i> *				
	Semana 8	Semana 16	Semana 24	Semana 32	Promedio diario
Todos**	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0 vs 1	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000
0 vs 2	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
0 vs 3	0,050	0,042	0,045	0,069	0,182
1 vs 2	0,927	0,923	0,758	0,505	0,635
1 vs 3	0,705	0,459	0,470	0,186	0,257
2 vs 3	0,529	0,614	0,529	0,737	0,257

* Mann-Whitney. ** Kruskal Wallis.

A modo de ejemplo, la Figura 13 muestra gráficamente los resultados obtenidos del análisis entre la dosis promedio diaria y la presencia de una o más variantes en el par de genes *NUDT15* y/o *TPMT*

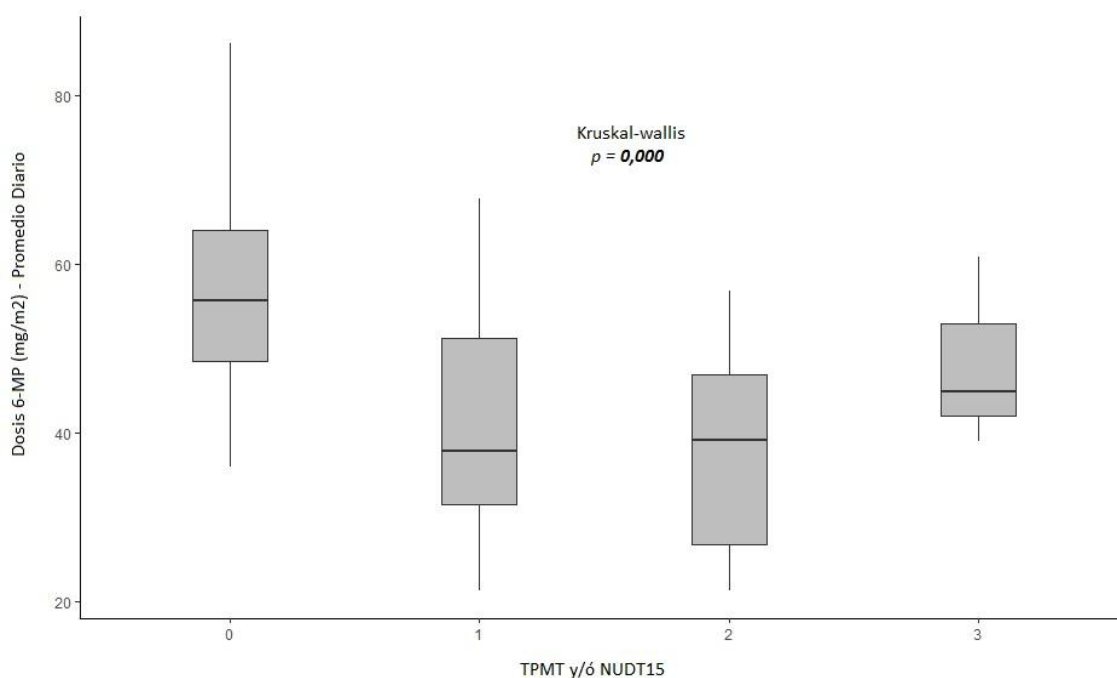


Figura 13. Grafica Variantes *NUDT15* y/o *TPMT* vs Dosis promedio diario de 6-MP. En las abscisas se muestra ausencia (0) de variantes en los genes *TPMT* y *NUDT15*, la presencia de alguna variante solo en *TPMT* (1), solo en *NUDT15* (2) y presencia concomitante de variantes en ambos genes (3). En el eje de las ordenadas, la dosis promedio diario de 6-MP (mg/m²).

Los resultados obtenidos de los análisis entre las dosis de 6-MP y la presencia de variantes son concordantes con los previamente obtenidos para las semanas de reducción y suspensión de dosis.

3.4.4 Variantes genéticas y eventos adversos hematológicos

Se analizó la posible asociación entre el número de eventos adversos hematológicos (leucopenia y neutropenias grados 3 y/o 4) y la presencia de variantes en los genes *ITPA*, *NUDT15*, *TPMT* y en el par *TPMT-NUDT15*. Los resultados obtenidos para ambas variantes de *ITPA* no evidenciaron ninguna asociación estadísticamente significativa con la cantidad de eventos de leucopenia, tanto cuando se analizaron por separado como teniendo en cuenta ambas variantes como un único genotipo (datos no mostrados). Los resultados de los análisis entre el número de leucopenia y las variantes de *TPMT*, *NUDT15* y el par *TPMT-NUDT15* se muestran en la Tablas 8. Como se puede apreciar la única asociación estadísticamente significativa entre la presencia de variantes del gen *TPMT* y el número de leucopenias ocurre en las primeras 8 semanas, tanto cuando se tienen en cuenta únicamente aquellas grado 3 o grado 4 por separado, como cuando se considera la suma de ambas. Por el contrario, los resultados evidencian una fuerte asociación entre la presencia de variantes en *NUDT15* y las leucopenias de grado 3 (o la suma de ambas) en todos los intervalos analizados salvo en el de semana 25 a 32 (Tabla 8). Es decir, los pacientes portadores de alelos variantes para el gen *NUDT15* sufrieron más eventos de leucopenias que aquellos sin variantes.

Tabla 8. Eventos de leucopenia y variantes en *TPMT-NUDT15*. Se muestran los p-valores obtenidos del análisis entre la presencia de variantes genéticas (*TPMT*, *NUDT15* y el par *TPMT-NUDT15*) y el número de leucopenias grado 3 (G3), grado 4 (G4) y grado 3 y/o grado 4 (G3 + G4) para cada uno de los intervalos de 8 semanas (1-8, 9-16, 17-24 y 25-32) y el total de la fase de mantenimiento.

	Leucopenias (<i>p-value</i> *)								
	TPMT			NUDT15			TPMT y/o NUDT15		
	G3	G4	G3 + G4	G3	G4	G3 + G4	G3	G4	G3 + G4
Sem 1 a 8	0,049	0,003	0,006	0,004	0,279	0,008	0,003	0,091	0,001
Sem 9 a 16	0,223	0,253	0,205	0,000	0,214	0,000	0,001	0,045	0,000
Sem 17 a 24	0,100	0,224	0,086	0,003	0,222	0,003	0,001	0,041	0,001
Sem 25 a 32	0,449	0,434	0,467	0,136	0,431	0,173	0,232	0,182	0,266
Total	0,132	0,116	0,091	0,000	0,249	0,000	0,000	0,016	0,000

* Mann-Whitney

Respecto a los eventos de neutropenia, no se evidenció ninguna asociación estadísticamente significativa entre las variantes de *ITPA* y el número de eventos de neutropenia, así como tampoco con las variantes del gen *TPMT*. Los p-valores obtenidos de los análisis entre el

número de neutropenias y las variantes de *TPMT*, *NUDT15* y el par *TPMT-NUDT15* se muestran en la Tabla 9.

3.4.5 Variantes en *NUDT15* y/o *TPMT* y riesgo de leucopenias

Tabla 9. Eventos de neutropenia y variantes *TPMT-NUDT15*. Se muestran los p-valores obtenidos del análisis entre la presencia de variantes genéticas (*TPMT*, *NUDT15* y el par *TPMT-NUDT15*) y el número de neutropenias grado 3 (G3), grado 4 (G4) y grado 3 y/o grado 4 (G3 + G4) para cada uno de los intervalos de 8 semanas (1-8, 9-16, 17-24 y 25-32) y el total de la fase de mantenimiento

	Neutropenias (<i>p-value</i> *)								
	TPMT			NUDT15			TPMT y/o NUDT15		
	G3	G4	G3 + G4	G3	G4	G3 + G4	G3	G4	G3 + G4
Sem 1 a 8	0,215	0,446	0,134	0,204	0,004	0,018	0,079	0,057	0,018
Sem 9 a 16	0,511	0,578	0,540	0,001	0,563	0,000	0,006	0,213	0,001
Sem 17 a 24	0,328	0,853	0,231	0,034	0,379	0,044	0,039	0,275	0,022
Sem 25 a 32	0,323	0,597	0,504	0,481	0,135	0,199	0,832	0,211	0,539
Total	0,640	0,665	0,616	0,000	0,074	0,000	0,003	0,141	0,004

* Mann-Whitney

Por último, teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente de la asociación entre la presencia de variantes en los genes *TPMT* y/o *NUDT15* y el número de leucopenias; se calculó, mediante *odds ratio*, el riesgo de presentar un evento de leucopenia en los pacientes que presentan variantes para estos genes. Los resultados obtenidos se ilustran en la Tabla 10. Como se puede observar, los pacientes que presentan variantes en los genes *TPMT* y/o *NUDT15* tienen aproximadamente 3 veces más riesgo de presentar un evento de leucopenia que aquellos individuos sin variantes. Sin embargo, este "riesgo" no aparece estadísticamente significativo ni en el intervalo que va desde la semana 25 a la semana 32 ni en el total de semanas de la fase de mantenimiento (Tabla 10).

3.4.6 Variantes genéticas y eventos hepáticos adversos

Los resultados obtenidos de los análisis de asociación entre el número de eventos de toxicidad hepática (grado 3 y 4) y la presencia de variantes en los genes *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT*, no evidenciaron ningún tipo de asociación estadísticamente significativa, tanto cuando se analizaron los genes de manera individual como de a pares (datos no mostrados).

Tabla 10. Análisis de riesgo de leucopenia. Se muestra el resultado del análisis de riesgo de leucopenia en función del genotipo *TPMT-NUDT15*, para los períodos de 1 a 8, 9 a 16, 17 a 24, 25-32 y total de semanas. Los individuos con uno o más alelos de riesgo en el gen *TPMT* y/o *NUDT15* fueron asignados a la categoría ≥ 1 .

	Grado Leucopenia	Alelos <i>NUDT15</i> y/o <i>TPMT</i>		OR* (95% IC)	<i>p-value</i>
		0 N (%)	≥ 1 N (%)		
Sem 1 a 8	≤ 2	91 (66,4)	13 (39,4)	3,043	0,005
	≥ 3	46 (33,6)	20 (60,6)	(1,391-6,660)	
Sem 9 a 16	≤ 2	71 (51,8)	9 (28,1)	2,749	0,018
	≥ 3	66 (48,2)	23 (71,9)	(1,186-6,370)	
Sem 17 a 24	≤ 2	99 (72,3)	13 (41,9)	3,607	0,002
	≥ 3	38 (27,7)	18 (58,1)	(1,612-8,072)	
Sem 25 a 32	≤ 2	105 (77,2)	20 (69,0)	1,524	0,349
	≥ 3	31 (22,8)	9 (31,0)	(0,630-3,685)	
Total	≤ 2	25 (18,2)	3 (9,1)	2,232	0,213
	≥ 3	112 (81,8)	30 (90,9)	(0,631-7,897)	

* *odds ratio*. IC = intervalo de confianza

3.4.7 Ancestralidad y variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*

La Tabla 11 resume los estadísticos descriptivos de cada componente ancestral en cada uno de los 3 subgrupos de pacientes analizados. Como se puede apreciar, todos los subgrupos presentan un componente ancestral mayoritario europeo, seguido del componente nativo americano y por último el componente ancestral africano.

De los tres subgrupos analizados, el subgrupo de pacientes portadores de variantes en el gen *NUDT15* (2) es el que presenta el componente nativo americano más elevado y el menor componente africano. Por otro lado, el subgrupo con variantes en el gen *TPMT* (1) es el que muestra el componente ancestral europeo más bajo y el componente africano más alto. El subgrupo de pacientes sin variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT* (0) presenta una ancestralidad global muy similar a la muestra total de pacientes (Tabla 2). Sin embargo, cuando se compara estadísticamente la ancestralidad de estos tres subgrupos, no se evidencian diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tres componentes ancestrales

Tabla 11. Ancestralidad global por subgrupo. Se muestra la media, el desvío estándar (s.d.), el valor mínimo (Min) y el valor máximo (Max) de cada componente ancestral en cada una de los tres subgrupos de pacientes: (0) sin variantes en *NUDT15* y *TPMT*, (1) con variantes únicamente en *TPMT* y (2) con variantes en *NUDT15*.

Componente ancestral	s/ variantes (0)			TPMT (1)			NUDT15 (2)		
	Media $\pm$ s.d.	Min	Max	Media $\pm$ s.d.	Min	Max	Media $\pm$ s.d.	Min	Max
Africana	10,9 $\pm$ 7,9	2,3	41,6	11,8 $\pm$ 8,6	2,5	33,0	8,2 $\pm$ 4,0	2,4	16,7
Europea	70,0 $\pm$ 14,2	19,8	94,7	65,9 $\pm$ 11,1	47,1	83,0	68,0 $\pm$ 14,0	35,2	85,6
Nativo Americana	19,1 $\pm$ 12,0	1,7	54,6	22,3 $\pm$ 14,9	3,8	45,3	23,8 $\pm$ 13,3	6,1	57,5

(Tabla 12). Cabe destacar que estos análisis también se realizaron dividiendo la muestra de pacientes en dos subgrupos de dos maneras diferentes: a) Pacientes portadores de variantes en *NUDT15* vs el resto de los pacientes y b) pacientes portadores de variantes en *TPMT* vs el resto de los pacientes. Ninguno de los resultados obtenidos evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (datos no mostrados).

Tabla 12. Ancestralidad y variantes en *NUDT15* y/o *TPMT*. Se muestran los p-valores obtenidos del análisis entre cada componente ancestral y presencia de variantes en *NUDT15* y *TPMT*. **(0)** Ausencia de variantes en *NUDT15* y *TPMT*. **(1)** Presencia de variantes únicamente en *TPMT*. **(2)** Presencia de variantes en *NUDT15*.

	p-value*		
	Africana	Europea	Nativo americana
Todos**	0,629	0,317	0,290
0 vs 1	0,792	0,164	0,507
0 vs 2	0,387	0,476	0,136
1 vs 2	0,341	0,483	0,680

Mann-Whitney. Kruskal Wallis

3.4.8 Ancestralidad y eventos de leucopenia

Los resultados obtenidos de los análisis realizados entre la ancestralidad y los eventos de toxicidad hematológica (test de Mann-Whitney), no mostraron ninguna asociación estadísticamente significativa entre cada uno de los componentes ancestrales y la presencia/ausencia de eventos de leucopenia y de neutropenia en ninguno de los cinco intervalos analizados (1-8, 9-16, 17-24, 25-32 y total de semanas) (datos no mostrados). Asimismo, no se evidenció una correlación entre el número de eventos de leucopenia (Tabla 13) o neutropenias (datos no mostrados) y la ancestralidad cuando se analiza el total de la muestra de pacientes. Sin embargo, cuando se excluyen de la muestra aquellos pacientes

portadores de variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*, se evidencia una correlación negativa estadísticamente significativa entre el número de eventos de leucopenia y el componente ancestral nativo americano (Tabla 13). Por el contrario, los resultados obtenidos entre la ancestralidad y los eventos de neutropenia en este subgrupo de pacientes no muestran ninguna correlación estadísticamente significativa (datos no mostrados).

Tabla 13. Correlación entre ancestralidad y los eventos de leucopenia. Se muestra el coeficiente de correlación de Spearman (r) y el p-valor (p) para cada componente ancestral y los eventos de leucopenia totales de grado 3 (G3), de grado 4 (G4) y la suma de ambos (G3+G4); en el total de la muestra de pacientes y en el subgrupo de pacientes sin variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*.

Muestra	Componente Ancestral	Leucopenia total					
		G3		G4		G3 + G4	
		r	p	r	p	r	p
Total	Africana	0,004	0,955	0,041	0,602	0,01	0,899
	Europea	0,064	0,412	0,091	0,247	0,071	0,364
	Nativo Americana	-0,133	0,088	-0,132	0,091	-0,143	0,067
s/variantes	Africana	0,048	0,581	0,089	0,310	0,053	0,545
NUDT15	Europea	0,134	0,123	0,146	0,093	0,151	0,083
y TPMT	Nativo Americana	-0,238	0,006	-0,240	0,005	-0,258	0,003

r = Coeficiente de correlación de Spearman. p = p-value

3.4.9 Ancestralidad y dosis de 6-MP

Los resultados obtenidos de los análisis entre la ancestralidad y la dosis de 6-MP no mostraron ningún tipo de correlación estadísticamente significativa entre ninguno de los componentes ancestrales y las dosis acumuladas a la semana 8, 16, 24, 32 y el promedio diario. Asimismo, cuando se excluyeron de la muestra aquellos pacientes con variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*, tampoco se evidenció una correlación entre cada componente ancestral y las dosis acumuladas de 6-MP (datos no mostrados).

3.4.10 TPMT-VNTR: frecuencias, toxicidad y ancestralidad

Todos los resultados (y su discusión) referentes al *TPMT*-VNTR fueron publicados en el artículo "Ancestry and *TPMT*-VNTR Polymorphism: Relationship with Hematological Toxicity in Uruguayan Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia" en la revista *Frontiers in*

Pharmacology (Burgueño-Rodríguez et al., 2020), y ha sido incluida como apéndice de este capítulo (Sección 3.8). Cabe mencionar que, previo a la determinación de los genotipos del *TPMT*-VNTR, se descartó la presencia de otras posibles mutaciones en los genes *NUDT15* y *TPMT*. Para esto, el gen *TPMT* se caracterizó completamente por la amplificación y secuenciación de sus nueve exones, mientras que para *NUDT15* se secuenció el exón 2. Ninguno de los pacientes analizados presentó mutaciones en los exones de *TPMT*. Respecto a *NUDT15*, se encontró un único paciente portador de una mutación (C>T) en el exón 2, cuya predicción *in silico* según el software Polyphen-2 (Glu57Gln) indica que posiblemente altere la función de la proteína. Desafortunadamente, no se cuenta con la historia clínica de dicho paciente.

A modo de resumen, en dicho trabajo se identificaron un total de 10 alelos (A_mB_nC) y 18 genotipos diferentes del *TPMT*-VNTR en 130 pacientes analizados. El genotipo más frecuente fue A_2BC/A_2B_2C (33,8%), seguido de los genotipos A_2BC/A_2BC (25,4%) y A_2B_2C/A_2B_2C (11,5%). El número total de repetidos del VNTR ($A+B+C$) osciló entre seis (ABC/ABC) y 14 (A_5BC/A_5BC). Las frecuencias alélicas obtenidas fueron similares a las previamente reportadas para poblaciones de Portugal, Mozambique (Alves et al., 2002) y Serbia (Zukic et al., 2010; kotur et al., 2012). Al igual que lo previamente reportado, los alelos *TPMT**2 y *TPMT**3C se encontraron asociados a los alelos A_2BC y AB_2C del *TPMT*-VNTR, respectivamente (Alves et al., 2002; Marinaki et al., 2003; Urbancic et al., 2018). Sin embargo, a diferencia de lo previamente reportado (Yan et al., 2000; Alves et al., 2001; Marinaki et al., 2003; Urbancic et al., 2018), el alelo *TPMT**3A se encontró asociado a seis alelos diferentes del *TPMT*-VNTR. Por otra parte, los resultados muestran que aquellos pacientes sin variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT* pero que son portadores de cinco o más repetidos "A" en *TPMT*-VNTR presentan más eventos de leucopenias severas. Finalmente, se encontró una correlación negativa entre el componente ancestral nativo americano y el número de eventos de leucopenia en el subgrupo de pacientes que no presentan alelos variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*.

3.5 DISCUSIÓN

Los resultados indican que cerca del 20% de los pacientes presentan alguna de las variantes estudiadas en los genes *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT*. Las frecuencias obtenidas para cada uno de los alelos analizados no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre la muestra de pacientes y la de controles (Tabla 4).

La frecuencia del alelo A para el polimorfismo c.94C>A del gen *ITPA*, tanto en pacientes como en controles, fue de 4% (Tabla 4). Esta frecuencia es similar a las reportadas para poblaciones africanas (Cao & Hegele, 2002; Marsh et al., 2004) y para ciertas poblaciones europeas (Atanasova et al., 2007), siendo muy inferior al 13%-15% especificado para poblaciones asiáticas (Marsh et al., 2004; Maeda et al., 2005). Sin embargo, esta frecuencia es mayor a las informadas para poblaciones de Perú y México, donde apenas alcanzan al 1% y 2%, respectivamente (Marsh et al., 2004). Asimismo, es superior a la reportada para la población chilena, donde la frecuencia de heterocigotos fue de tan solo 3% (Farfan et al., 2014). Teniendo en cuenta que la población uruguaya está formada por el aporte desigual de poblaciones de origen europeo, africano y nativo americano, y que el componente mayoritario es europeo; se esperaba que la frecuencia de esta variante fuese similar o ligeramente menor a las reportadas para poblaciones europeas. Las diferencias observadas entre nuestra población y las otras poblaciones latinoamericanas podrían ser explicadas por el aporte desigual de las poblaciones ancestrales minoritarias (africana y nativo americana). Por otro lado, la frecuencia del alelo C de la variante intrónica IVS2+21 de este mismo gen en pacientes y controles fue de 8,6% y 12%, respectivamente. Aunque los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas entre ambas muestras, se puede apreciar que la frecuencia de este alelo es ligeramente mayor en controles (Tabla 4). Mientras que la frecuencia observada en pacientes se asemeja más a la reportada para poblaciones africanas o latinoamericanas (1000 Genomes Project Consortium, 2015), la de los controles es similar a la descrita para poblaciones europeas (Marinaki et al., 2004; Shipkova et al., 2006; Atanasova et al., 2007). Puesto que ambas muestras presentan una ancestralidad global semejante (Capítulo 2), no se esperaba, *a priori*, encontrar diferencias entre ambas muestras. Sin embargo, el hecho de que la ancestralidad global sea equiparable, no significa que necesariamente ambas muestras presenten la misma ancestralidad a lo largo de todo el genoma (Colistro et al., 2020). Además, como se describió en el Capítulo 2, ambas muestras presentan una gran variabilidad interindividual, que podría explicar la ligera diferencia entre pacientes y controles.

Respecto al gen *NUDT15*, la frecuencia de portadores de alelos de baja actividad fue de 10,5% (Tabla 4). Esta frecuencia es similar a las reportadas para Guatemala (Moriyama et al., 2016), para poblaciones de "nativos mexicanos" de Oaxaca, Durango y Campeche (Taxis et al., 2021) y levemente inferior a las descritas para poblaciones del sur de Asia (Wong et al., 2015; Yang et al., 2015; Suzuki et al. 2016; Wang et al., 2020). Sin embargo, esta frecuencia es muy superior a las descritas para poblaciones europeas o africanas, que prácticamente no presentan variantes en el gen *NUDT15* (1000 Genomes Project Consortium, 2015; Moriyama et al., 2016). Teniendo

en cuenta que el componente ancestral de origen europeo en nuestra población es cercano al 70% (Capítulo 2) y que la frecuencia de variantes de *NUDT15* en poblaciones europeas no supera el 1% (1000 Genomes Project Consortium, 2015; Moriyama et al., 2016), llama la atención la proporción de individuos portadores de alelos de baja actividad para *NUDT15* observada tanto en la muestra de pacientes como en la muestra de controles. Al igual que como se sugirió para la frecuencia de la variante IVS2+21 del gen *ITPA*, el hecho de que la ancestralidad global tenga un componente mayoritario de origen europeo, no significa que todas las regiones del genoma mantengan esta proporción (Colistro et al., 2020). Cabe la posibilidad de que la región donde está ubicado el gen *NUDT15* presente, en nuestra población, un componente nativo americano mayor al determinado a nivel global para todo el genoma. Otra posible explicación podría ser que la frecuencia de variantes para este en poblaciones europeas esté subestimada, tal y como sugiere Schaeffeler et al. (2019). Según estos autores, los datos sobre variantes de *NUDT15* en pacientes con ascendencia europea son limitados. De hecho, en su investigación, ellos detectan un 13% de individuos portadores de variantes para *NUDT15* en una cohorte de 107 pacientes con ancestralidad europea que presentaron hematotoxicidad grave asociada a tiopurinas. Según Schaeffeler et al. (2019), sus resultados proporcionan una "evidencia convincente" sobre la necesidad de determinar, previo al tratamiento con tiopurinas, la presencia de variantes en el gen *NUDT15* en pacientes de origen europeo. Por otra parte, en relación a las frecuencias obtenidas para cada uno de los genotipos por separado, se observa que el genotipo *NUDT15**1/*NUDT15**2 es el más frecuente (entre los genotipos que presentan variante) tanto en la muestra de pacientes como en la muestra de controles. Este resultado difiere de lo descrito para poblaciones del este de Asia (Moriyama et al., 2016; Wang et al., 2020), en las que el genotipo más frecuente es *NUDT15**1/*NUDT15**3. Puesto que el alelo *NUDT15**2 es la combinación de las variantes *NUDT15**3 y *NUDT15**6 (Figura 6), los individuos que fueron genotipados como *NUDT15**1/*NUDT15**2 podrían ser heterocigotos compuestos *NUDT15**3/*NUDT15**6. Sin embargo, este genotipo es extremadamente raro, encontrándose únicamente en poblaciones del este asiático en una frecuencia cercana al 0,2% (Moriyama et al., 2016).

En relación al gen *TPMT*, la frecuencia de portadores de alelos de baja actividad para este gen fue de 11,6%, siendo el alelo *TPMT**3A el más frecuente. No se encontró ningún individuo homocigoto para las variantes de este gen, así como tampoco ningún individuo portador de la variante *TPMT**3B aislada (Tabla 4). Estas frecuencias son similares a las reportadas para poblaciones europeas (Ameyaw et al., 1999; Hon et al., 1999; 1000 Genomes Project Consortium, 2015), así como también para Argentina (Araoz et al., 2014), Brasil (Boson et al.,

2003; Silva et al., 2008) y Chile (Farfan et al., 2014). Dado que el componente ancestral mayoritario de la población uruguaya es europeo, no sorprende que la frecuencia de variantes del gen *TPMT* sea similar al de las poblaciones europeas y a la de Argentina, Chile y Brasil. Al igual que lo que sucede con la variante *NUDT15*6*, como el alelo *TPMT*3A* resulta de la combinación de las variantes *TPMT*3B* y *TPMT*3C*, la técnica utilizada no permite distinguir entre individuos heterocigotos *TPMT*1/TPMT*3A* e individuos heterocigotos compuestos *TPMT*3B/TPMT*3C*. Sin embargo, teniendo en cuenta que el alelo *TPMT*3B* presenta una frecuencia muy baja en todas las poblaciones estudiadas hasta el momento (Ameyaw et al., 1999; Hon et al., 1999; Hongeng et al., 2000; Boson et al., 2003; Silva et al., 2008; Aráoz et al., 2014; Farfan et al., 2014; Wu et al., 2019), es más probable que estos individuos sean heterocigotos *TPMT*1/TPMT*3A*.

En suma, dada la naturaleza híbrida de la población uruguaya y la variabilidad interindividual que presenta, no es de extrañar que en nuestra población co-existan variantes de los genes *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT* a frecuencias diferente a las reportadas para otras poblaciones.

Los resultados obtenidos de los análisis entre las semanas de reducción de dosis y las variantes en los genes estudiados indican que existe una fuerte asociación entre el porcentaje de semanas de reducción de dosis y la presencia de variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT* (Tabla 5, Figura 8). Esta asociación fue estadísticamente significativa tanto cuando se consideraron las semanas reducidas sin tener en cuenta el motivo de reducción como cuando se tuvo en cuenta únicamente las semanas con dosis reducida debida a toxicidades hematológicas. Luego de analizar exhaustivamente los motivos por los cuales el médico tratante reduce la dosis durante la fase de mantenimiento, se pudo constatar que en la mayoría de los casos la reducción de dosis se debe a eventos de hematotoxicidad. Es decir, no existe una gran diferencia entre el número total de semanas con dosis reducida y el número de semanas reducidas por causas hematológicas. Estos resultados son compatibles con los reportados para varias poblaciones (Shah et al., 2016; Suzuki et al., 2016; Wong et al., 2016; Singh et al., 2017; Moradveisi et al., 2019; Puangpetch et al., 2020), donde se expone que las variantes en *NUDT15* y *TPMT* están asociadas con los eventos de leucopenias (Hongeng et al., 2000; Evans, 2004; Wang et al. 2010; Almoguera et al., 2014). Asimismo, es concordante con lo reportado por Yang et al. (2015), quienes demuestran que los individuos heterocigotos para variantes de *NUDT15* toleran en promedio un 63% de la dosis estándar de tiopurinas. Por otro lado, los resultados obtenidos para las variantes de *ITPA* indican que no existe asociación entre estas y las semanas de reducción de dosis. Teniendo en cuenta que la mayoría de los pacientes son heterocigotos

para la variante intrónica IVS2 +21, que la actividad enzimática de ITPA en individuos heterocigotos para esta variante es aproximadamente 60% (Sumi et al., 2002; Atanasova et al., 2007; Azimi et al., 2015) y que las asociaciones entre la toxicidad y la variante c.94C>A de este gen reportadas por diferentes autores es contradictoria (Marinaki et al., 2004; Ma et al., 2014; Azimi et al., 2015), era factible no detectar una asociación estadísticamente significativa. Sin embargo, cuando se estudia esta posible asociación en el subgrupo de pacientes que no presentan variantes para los genes *NUDT15* y *TPMT*, se detecta una asociación ($p\text{-value} = 0,026$) entre el genotipo de *ITPA* (teniendo en cuenta ambas variantes a la vez) y el porcentaje de semanas de reducción de dosis debidas a causas hematológicas (dato no mostrado en los resultados). Este resultado es concordante con lo reportado por Stocco et al. (2009), quienes observan que los pacientes con variantes de *ITPA* tienen una mayor probabilidad de presentar neutropenia febril solamente cuando la dosis de 6-MP es ajustada por el genotipo de *TPMT*. En otras palabras, el efecto de las variantes de *ITPA* sobre las semanas de suspensión de dosis queda enmascarado por la presencia de variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*.

Por otra parte, los análisis entre las variantes y las semanas de suspensión del tratamiento muestran que existe una asociación estadísticamente significativa entre las variantes de los genes *NUDT15* y *TPMT* únicamente cuando se consideran las semanas de suspensión debidas a causas hematológicas (Tabla 5, Figura 9). A diferencia de lo que sucede con las semanas de reducción de dosis, los motivos por los cuales el médico tratante suspende el tratamiento no son mayoritariamente causas de toxicidad hematológica, encontrándose suspensiones debidas a herpes zoster, dermatitis atópica, diarrea intensa o de larga duración, fiebre alta, edemas, toxicidad hepática, etc. En consecuencia, existe una diferencia considerable entre el número total de semanas suspendidas y aquellas suspendidas por hematotoxicidad. Por este motivo, no sorprende haber encontrado una asociación únicamente cuando se consideran las semanas de suspensión debidas a toxicidad hematológica. Al igual que en el análisis de reducción de dosis, no se evidencia asociación entre las variantes del gen *ITPA* y las semanas de suspensión del tratamiento cuando se analiza el total de los pacientes. En cambio, cuando los pacientes portadores de variantes para los genes *NUDT15* y *TPMT* son excluidos de la muestra, se detecta una asociación ($p\text{-value} = 0,036$) entre la variante c.94C>A de *ITPA* y el porcentaje de semanas de suspensión de tratamiento debida a causas hematológicas (dato no mostrado en los resultados).

Los resultados obtenidos para las semanas de reducción y suspensión de dosis muestran que existe una fuerte asociación entre estas y la presencia de variantes en los genes *NUDT15* y

TPMT. Esta asociación podría estar indicando que existe en una mayor probabilidad de presentar efectos hematológicos adversos en aquellos individuos portadores de variantes en dichos genes. Sin embargo, las semanas de reducción y suspensión de dosis son medidas indirectas de los efectos adversos. En primer lugar, el análisis de semanas de reducción de dosis no considera cual fue el porcentaje de reducción de la misma. Por ejemplo, un paciente al cual se le redujo la dosis al 80% durante dos semanas y un paciente al cual se le redujo la dosis al 50% la primera semana y al 30% la segunda, son considerados como "iguales" en el análisis de reducción de dosis, siendo que uno toleró una dosis menor que el otro. En segundo lugar, la cantidad de semanas de reducción o suspensión de dosis no siempre indican la cantidad exacta de eventos de toxicidad hematológica, incluso si se tienen en cuenta solo las semanas debidas a hematotoxicidad. Por ejemplo, supongamos dos pacientes que presentan una leucopenia Gdo. 4 y a los que se les suspende el tratamiento por una semana. A la semana siguiente, basándose en los datos de un nuevo hemograma, el médico tratante puede indicar a uno de los pacientes retomar el tratamiento con una dosis del 100%, mientras que para el otro paciente decidir un "reinicio lento" e indicarle una semana al 50% de la dosis. En consecuencia, con un único evento de toxicidad hematológica, uno de los pacientes suspendió una semana, mientras que el otro tuvo una semana de suspensión y una de reducción. Por lo tanto, los análisis realizados con las semanas de reducción y suspensión de dosis son un primer indicio de la relación que existe entre las variantes de estos genes y los efectos adversos. Para reafirmar esta relación fue necesario identificar parámetros de toxicidad más directos tales como la dosis acumulada de 6-MP administrada y el número de eventos de leucopenias/neutropenias, cuyos resultados se discuten a continuación.

Respecto a la relación entre la dosis administrada de 6-MP y la presencia de variantes en los genes *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT*, los resultados señalan que existe una asociación entre la presencia de alelos variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT* cuando estos son analizados por separado y la dosis acumulada de 6-MP (Figuras 10 y 11). Concretamente, los pacientes portadores de alelos variantes para el gen *TPMT* recibieron una dosis promedio diaria de $42,4\text{mg}/\text{m}^2$, mientras que aquellos pacientes sin variantes en este gen recibieron $54,7\text{mg}/\text{m}^2$. Estos resultados son compatibles con los previamente reportado, donde se describe que los individuos heterocigotos para este gen presentan una actividad enzimática intermedia (Evans, 2004; Lee et al., 2005) o que la enzima resultante es más inestable y es rápidamente degradada, disminuyendo su actividad catalítica (Tai et al., 1997; Tai et al., 1999; Evans, 2004; Wang et al., 2010). A su vez, los pacientes portadores de alelos variantes para el gen *NUDT15* recibieron una dosis promedio diaria de $39,6\text{mg}/\text{m}^2$, mientras que aquellos pacientes sin

variantes en este gen recibieron $54,6\text{mg}/\text{m}^2$. Al igual que para el gen *TPMT*, este resultado es concordante con lo previamente reportados por Yang et al. (2015), quienes observaron que los individuos heterocigotos para variantes de *NUDT15* toleraban aproximadamente el 63% de la dosis estándar. Puesto que en ambos casos, la dosis promedio diaria fue menor a la dosis estándar ($50\text{mg}/\text{m}^2$), se podría decir que la presencia de variante en *TPMT* y *NUDT15* tiene el mismo tipo de efecto. Por este motivo, se analizó la relación entre las dosis y la presencia de variantes en el par de genes *TPMT-NUDT15*. Los resultados obtenidos (Figura 12) confirman la asociación previamente detectada cuando se analizan los genes por separado. Específicamente, los pacientes "mutados" para *TPMT* y/o *NUDT15* presentaron una dosis promedio diaria de $40,4\text{mg}/\text{m}^2$, mientras que los que no tenían variantes en estos genes tuvieron una dosis promedio diaria de $56,1\text{mg}/\text{m}^2$ (Figura 12).

Puesto que, cuando se analiza la relación entre la dosis de 6-MP y las variantes en los genes por separado, la dosis promedio diaria es más baja en aquellos pacientes portadores de variantes en *NUDT15* que en aquellos con alelos variantes para *TPMT*, se podría decir que, *a priori*, las variantes de *NUDT15* tienen un efecto mayor que las de *TPMT*. Cabe destacar que cuando se analizan los genes por separado, en el grupo de pacientes "sin variantes de *TPMT*" están incluidos aquellos pacientes portadores de variantes en *NUDT15*. Del mismo modo, en el grupo de pacientes "sin variantes en *NUDT15*" están incluidos aquellos pacientes portadores de variantes en *TPMT*. Por lo tanto, la hipótesis de que las variantes de *NUDT15* tienen un efecto mayor que las variantes de *TPMT* podría ser errónea. De hecho, los resultados obtenidos de relación entre la dosis y la presencia de una o más variantes en el par de genes *TPMT* y/o *NUDT15* (Tabla 7, Figura 13), no muestran diferencias significativas entre los pacientes que son portadores de variantes solo en *TPMT* (grupo 1) y aquellos que son portadores de variantes únicamente en *NUDT15* (grupo 2). La dosis promedio diaria de los pacientes que son portadores únicamente de variantes en *TPMT* fue de $40,6\text{mg}/\text{m}^2$, mientras que para aquellos portadores de variantes de *NUDT15* fue de $37,8\text{mg}/\text{m}^2$. Por último, un resultado que llama la atención de este último análisis es que los pacientes portadores de variantes en ambos genes (grupo 3) recibieron una dosis promedio semanal más alta ($48,2\text{mg}/\text{m}^2$) que aquellos que solo son portadores de variantes en uno u otro de los genes (Tabla 7, Figura 13). Una posible explicación para este resultado inesperado es que se deba a un problema estadístico, debido a que solamente hay tres pacientes portadores de variantes en ambos genes y que uno de ellos es un paciente "outsider" con una dosis promedio semanal de $60,8\text{mg}/\text{m}^2$.

Por otro lado, los resultados obtenidos no muestran una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de variantes del gen *ITPA* y la dosis de 6-MP, cuando este gen es analizado por separado. Sin embargo, cuando este análisis se realiza excluyendo de la muestra aquellos pacientes portadores de variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*; se evidencia una asociación entre la variante exónica 94C>A del gen *ITPA* y la dosis de 6-MP (Tabla 6). Al igual que para los resultados obtenidos para las semanas de reducción de dosis, este resultado es concordante con lo reportado con Stocco et al. (2009), quienes plantean que es necesario corregir la dosis de acuerdo al genotipo de *TPMT* para evidenciar el efecto de las variantes de *ITPA*. Esto sugiere las variantes en el gen *ITPA* tienen un efecto sobre la toxicidad, pero que este efecto es menor que el de los alelos de *TPMT* y *NUDT15*.

Estos resultados reafirman los resultados previamente obtenidos entre la presencia de estas variantes y las semanas de reducción/suspensión de dosis. Sin embargo, como la dosis acumulada de 6-MP y las semanas de reducción/suspensión de dosis son dos parámetros de toxicidad parcialmente relacionados, también se analizó la relación entre los eventos de toxicidad hematológica y la presencia de variantes.

Los resultados obtenidos entre los eventos de leucopenia y las variantes genéticas muestran una asociación entre las variantes de *NUDT15* (y el par *TPMT-NUDT15*) y las leucopenias G3 y G3+G4 (Tabla 8). Es decir, los pacientes portadores de alelos variantes de *NUDT15* sufrieron más eventos de leucopenias. Este resultado es concordante con lo previamente reportado para otras poblaciones que han demostrado una asociación entre la presencia de variantes en *NUDT15* y los eventos de toxicidad hematológica en pacientes tratados con mercaptopurina (Shah et al., 2016; Suzuki et al., 2016; Wong et al., 2016; Singh et al., 2017; Moradveisi et al., 2019; Puangpetch et al., 2020). La falta de asociación entre las variantes genéticas y las leucopenias G4 no llama la atención. Por lo general, el médico tratante reduce la dosis o suspende el tratamiento antes de que el paciente presente una leucopenia tan severa, de manera que la cantidad de registros con leucopenias G4 es baja. Por otro lado, la falta de asociación en el periodo que va de la semana 25 a la 32 puede deberse a un ajuste de la dosis de 6-MP administrada durante ese periodo de tiempo. Cabe recordar que los análisis de dosis se realizaron con la dosis de 6-MP acumulada a lo largo de las 32 semanas y no en intervalos discretos, de manera que no se cuenta con la dosis administrada durante ese periodo, la cual debería ser calculada a partir de los datos de las historias clínicas. Este mismo razonamiento podría explicar la falta de asociación entre las variantes del gen *TPMT* y los eventos de leucopenias en los periodos 9-16, 17-24, 25-32 y total (Tabla 8).

Respecto a los eventos de neutropenia los resultados muestran una asociación entre las variantes de *NUDT15* (y el par *TPMT-NUDT15*) y las neutropenias G3 y G3+G4, pero solo en determinados intervalos de tiempo (Tabla 9). Estos resultados no son concluyentes. Puesto que, el número de neutrófilos es calculado a partir del número de GB, las neutropenias no son un buen indicador de toxicidad hematológica. Muchas veces ocurre que, como el paciente presenta niveles bajos de GB (toxicidad Gdo. 3), el médico tratante decide, en base a ese dato, reducir el tratamiento y simplemente no anota los datos del resto del hemograma. A su vez, cabe destacar que si el paciente presenta leucopenia Gdo. 4 ($GB < 1,0$), indefectiblemente el paciente tendrá una neutropenia Gdo. 3 ($0,5 < Neu < 1,0$).

Finalmente, el análisis de riesgo de leucopenias indica que los pacientes portadores de variantes en *TPMT* y/o *NUDT15* tienen 3 veces más riesgo de sufrir eventos de leucopenia severos que aquellos que no tienen variantes (Tabla 10). Este resultado es compatible con la asociación detectada entre estos polimorfismos y el número de leucopenias previamente descrita en este capítulo y con los reportados por otros autores (Relling et al., 1999; Evans et al., 2001; Efrati et al., 2009; Kapoor et al., 2010; Almoguera et al., 2014; Yang et al., 2014; Yang et al., 2015; Moriyama et al., 2016; Shah et al., 2016; Suzuki et al., 2016; Wong et al., 2016; Relling et al., 2019). Sin embargo, este riesgo "desaparece" en el intervalo que va de la semana 25 a la 32 y en el total del tratamiento. Cuando se observa detalladamente el número de pacientes que presentaron al menos un evento de leucopenia (Tabla 10), se puede apreciar que en el intervalo 25-32, solo el 31% de los pacientes "mutados" presentaron leucopenias, mientras que en los otros intervalos varía entre el 58% y el 72%. Este resultado sugiere nuevamente que la dosis de 6-MP administrada a esos pacientes durante ese intervalo fue ajustada. Respecto al total del tratamiento, se puede apreciar que cerca del 82% de los pacientes sin variantes presentaron al menos un evento de leucopenia. Es decir, además de presentar más eventos de leucopenias, los pacientes portadores de variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT* presentan leucopenias tempranamente. Sin embargo, a lo largo de las 63-74 semanas que dura la fase de mantenimiento, eventualmente, la mayoría de los pacientes sufrirán al menos un evento de leucopenia

Las variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT* explican el 40% de las toxicidades hematológicas ocurridas durante la fase de mantenimiento del tratamiento de LLA pediátrica. Los resultados obtenidos en este capítulo muestran el rol que juegan ciertas variantes genéticas en el metabolismo de la mercaptopurina y su relación con los efectos adversos ocurridos durante el tratamiento. Remarcan la importancia de realizar el genotipado de los pacientes previo al

inicio del tratamiento. De hecho, la Figura 14 ilustra gráficamente, a modo de ejemplo, la dosis y el número de GB de un paciente heterocigoto para el gen *NUDT15* y cuyo genotipo fue informado al médico tratante en la semana 46 de la fase de mantenimiento. Se puede ver que hasta la semana 46 (flecha roja), la dosis de 6-MP administrada fluctúa entre el 0% y el 100% (línea azul) y, en consecuencia, el número de GB (triángulos) también fluctúa, llegando en muchas ocasiones a niveles de toxicidad Gdo. 3 (zona rosa). Luego de que el genotipo es informado al médico tratante, este decide mantener la dosis al 40% de la dosis estándar. En consecuencia, el número de GB se mantiene estable y en niveles de toxicidad Gdo. 2 ($2,0 < \text{GB} < 3,0$), es decir en los niveles de citotoxicidad deseados.

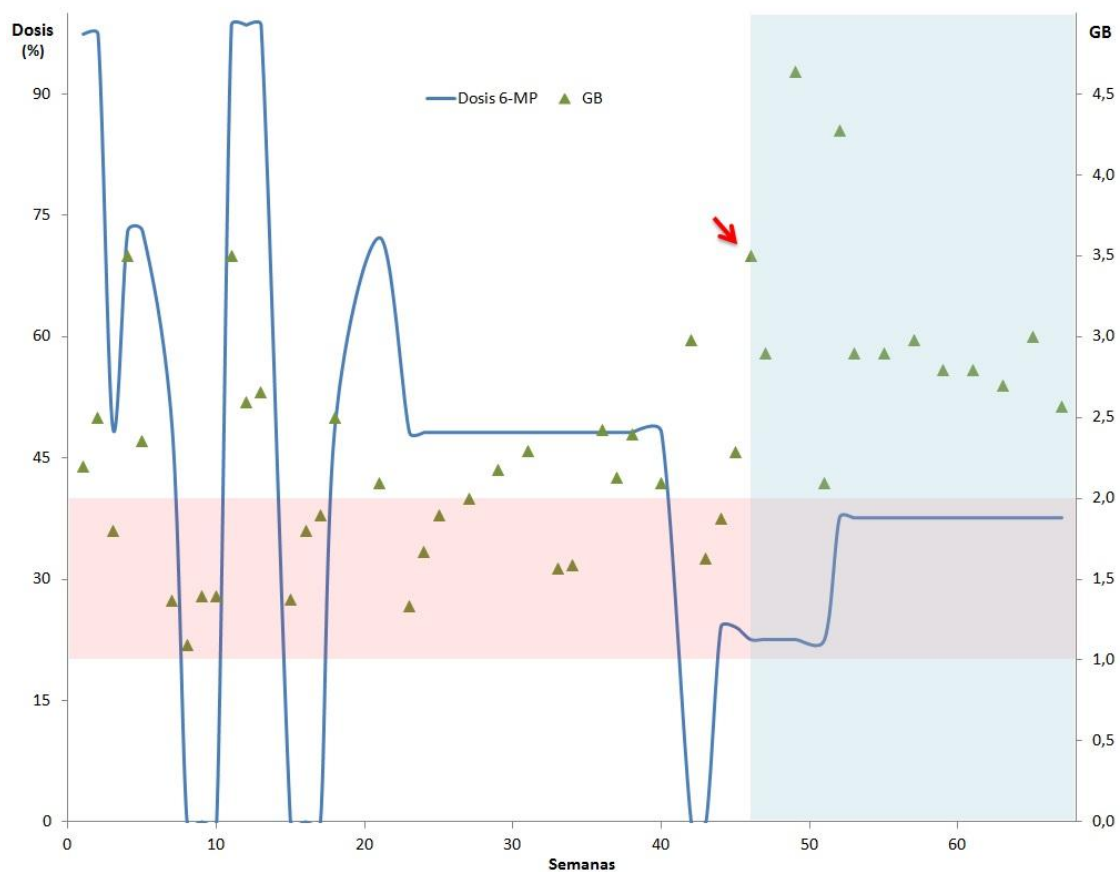


Figura 14. Dosis y GB de un paciente heterocigoto para *NUDT15*. En las abscisas se muestra las semanas de la fase de mantenimiento. En las ordenadas se muestra el porcentaje de dosis de 6-MP administrada (izq.) y el número de glóbulos blancos (der.). La zona rosa indica el nivel de toxicidad Gdo. 3. La fecha roja indica la semana en que el genotipo del paciente fue informado al médico tratante. La zona celeste muestra el periodo en que el paciente es tratado teniendo en cuenta su genotipo.

Respecto a los resultados obtenidos de la posible asociación entre la ancestralidad y la presencia de variantes, no se detectó ninguna asociación significativa entre la presencia de

variantes en los genes *NUDT15* o *TPMT* y los tres componentes ancestrales. Asimismo, no se evidenció ninguna asociación entre la ancestralidad y la dosis de 6-MP o la presencia/ausencia de eventos de leucopenia/neutropenias. Sin embargo, se encontró una correlación negativa entre el componente ancestral nativo americano y el número de eventos de leucopenias G3, G4 y G3+G4 en el subgrupo de pacientes sin variantes en los genes *TPMT* y *NUDT15* (Tabla 13). Esta correlación ya había sido identificada cuando se analizó la ancestralidad y el *TPMT*-VNTR (Sección 3.8, Apéndice del Capítulo 3, Tabla Suplementaria 4). Sin embargo, cuando se realizó ese análisis fueron considerados únicamente el total de eventos de leucopenias (G3+G4) en un número menor de pacientes y el p-valor obtenido (0,032) fue mayor a los obtenidos en este análisis (Tabla 13). Estos nuevos resultados reafirmar la correlación previamente detectada en dichos análisis. Debido a que esa correlación ocurre en el subgrupo de pacientes sin variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*, sería necesario realizar otros estudios para determinar cuáles son los factores genéticos que están asociados a un número mayor de eventos de leucopenias. Una asociación similar, pero con la sobrevida libre de enfermedad en lugar de con los eventos de leucopenia, fue descrita por Yang et al. (2011). Estos autores encontraron una asociación negativa entre el componente nativo americano y la sobrevida libre de enfermedad, tanto cuando la variable ancestralidad fue considerada como una variable continua como cuando fue considerada como variable dicotómica (baja vs alta, con un *cut off* de 10%). Esta misma aproximación podría ser aplicada a nuestros datos para ver si la correlación se mantiene utilizando un *cut off*. Por otro lado, se podría estudiar la posible asociación entre los genotipos de cada uno de los 45 AIMs utilizados, con el fin de detectar alguna región del genoma donde potencialmente hubiese algún gen/variante que pudiese explicar un mayor número de leucopenias en esos pacientes sin variantes en *NUDT15* y *TPMT*.

3.6 CONCLUSIÓN

Las frecuencias observadas en los genes analizados muestran que un porcentaje no despreciable (aprox. 20%) de la población presenta alelos variantes relevantes en el tratamiento con 6-MP contra la Leucemia Linfoblástica Aguda.

La frecuencia de pacientes portadores de alelos variantes del gen *TPMT* (aprox. 11%) son similares a las reportadas para poblaciones europeas y para otros países latinoamericanos.

La frecuencia de pacientes con variantes del gen *NUDT15* (aprox. 10%) son similares a las reportadas para poblaciones latinoamericanas y para algunas poblaciones asiáticas.

Existe una asociación entre los eventos de toxicidad hematológica y la presencia de variantes en los genes *TPMT* y *NUDT15*. Es decir, pacientes con mutaciones en dichos genes, tienen un mayor riesgo de presentar eventos de toxicidad hematológica durante el tratamiento.

Los análisis para el gen *ITPA* no muestran una asociación entre la presencia de variantes y los eventos de toxicidad hematológica en el tratamiento con 6-MP, excepto cuando los pacientes con variantes en *NUDT15* y *TPMT* son excluidos de la muestra.

No se encontró una asociación significativa entre los eventos de hepatotoxicidad y la presencia de variantes en los genes *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT*.

La ancestralidad global no presenta ninguna asociación estadísticamente significativa con la presencia de variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*, así como tampoco con la dosis de 6-MP administrada.

Existe una correlación negativa entre la ancestralidad de origen nativo americano y el número de eventos de leucopenia en aquellos pacientes que no presentan variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*.

Existe una asociación entre la cantidad de repetidos "A" en el *TPMT*-VNTR y el número de eventos de leucopenias. Esto sugiere que la cantidad de repetidos en este VNTR podría ser un factor de riesgo durante el tratamiento con 6-MP (Apéndice capítulo 3).

Aunque las variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT* no explican el total de efectos adversos ocurridos durante la fase de mantenimiento del tratamiento de la LLA con 6-MP, la determinación previa del genotipo para estos genes disminuiría considerablemente los eventos tóxicos durante el tratamiento.

3.7 BIBLIOGRAFÍA

1000 Genomes Project Consortium, Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Garrison, E. P., Kang, H. M., ... Abecasis, G. R. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526 (7571), 68-74.

Adam de Beaumais, T., Fakhoury, M., Medard, Y., Azougagh, S., Zhang, D., Yakouben, K., & Jacqz-Aigrain, E. (2011). Determinants of mercaptopurine toxicity in paediatric acute lymphoblastic leukemia maintenance therapy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 71(4), 575-584. doi: 10.1111/j.1365-2125.2010.03867.x

Adam de Beaumais, T., & Jacqz-Aigrain, E. (2012). Pharmacogenetic determinants of mercaptopurine disposition in children with acute lymphoblastic leukemia. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 68, 1233-1242. doi: 10.1007/s00228-012-1251-4

Almoguera, B., Vazquez, L., Connolly, J. J., Bradfield, J., Sleiman, P., Keating, B., & Hakonarson, H. (2014). Imputation of TPMT defective alleles for the identification of patients with high-risk phenotypes. *Frontiers in Genetics*, 5. doi: 10.3389/fgene.2014.00096

- Alves, S., Amorim, A., & Prata, M. (2002). Evolution of a VNTR located within the promoter region of the thiopurine methyltransferase gene: inferences from population and sequence data. *Human genetics*, 111(2), 172-178. doi: 10.1007/s00439-002-0784-5
- Ameyaw, M.M., Collie-Duguid, E.S., Powrie, R.H., Ofori-Adjei, D., & McLeod, H.L. (1999). Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanaian populations. *Human Molecular Genetics*, 8(2), 367-370. doi: 10.1093/hmg/8.2.367
- Appell, M. L., Berg, J., Duley, J., Evans, W. E., Kennedy, M. A., Lennard, L., ... & Coulthard, S. A. (2013). Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenetics and Genomics*, 23(4), 242. doi: 10.1097/FPC.0b013e32835f1cc0
- Aráoz, H. V., D'Aloi, K., Foncuberta, M. E., Sanchez La Rosa, C. G., Alonso, C. N., Chertkoff, L., & Felice, M. (2014). Pharmacogenetic Studies in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in Argentina. *Leukemia & Lymphoma*, (0), 1-24. doi: 10.3109/10428194.2014.951844
- Atanasova, S., Shipkova, M., Svinarov, D., Mladenova, A., Genova, M., Wieland, E., ... & von Ahsen, N. (2007). Analysis of ITPA phenotype-genotype correlation in the Bulgarian population revealed a novel gene variant in exon 6. *Therapeutic drug monitoring*, 29(1), 6-10. doi: 10.1097/FTD.0b013e3280308554
- Ayesh, B. M., Harb, W. M., & Abed, A. A. (2013). Thiopurine methyltransferase genotyping in Palestinian childhood acute lymphoblastic leukemia patients. *BMC Hematology*, 13(1), 3. doi: 10.1186/2052-1839-13-3
- Azimi, F., Mortazavi, Y., Alavi, S., Khalili, M., & Ramazani, A. (2015). Frequency of ITPA gene polymorphisms in Iranian patients with acute lymphoblastic leukemia and prediction of its myelosuppressive effects. *Leukemia research*, 39(10), 1048-1054. doi: 10.1016/j.leukres.2015.06.016
- Bakker, J. A., Lindhout, M., Habets, D. D., van den Wijngaard, A., Paulussen, A. D., & Bierau, J. (2011). The effect of ITPA polymorphisms on the enzyme kinetic properties of human erythrocyte inosine triphosphatase toward its substrates ITP and 6-Thio-ITP. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 30(11), 839-849. doi: 10.1080/15257770.2011.606789
- Boson, W. L., Romano-Silva, M. A., Correa, H., Falcao, R. P., Teixeira-Vidigal, P. V., & De Marco, L. (2003). Thiopurine methyltransferase polymorphisms in a Brazilian population. *The pharmacogenomics journal*, 3(3), 178-182. doi: 10.1038/sj.tpj.6500175
- Cai, J. P., Ishibashi, T., Takagi, Y., Hayakawa, H., & Sekiguchi, M. (2003). Mouse MTH2 protein which prevents mutations caused by 8-oxoguanine nucleotides. *Biochemical and biophysical research communications*, 305(4), 1073-1077. doi: 10.1016/S0006-291X(03)00864-7
- Cao, H., & Hegele, R.A. (2002). DNA polymorphisms in ITPA including basis of inosine triphosphatase deficiency. *Journal of human genetics*, 47(11), 620-622. doi: 10.1007/s100380200095
- Carreras-Puigvert, J., Zitnik, M., Jemth, A. S., Carter, M., Unterlass, J. E., Hallström, B., ... & Helleday, T. (2017). A comprehensive structural, biochemical and biological profiling of the human NUDIX hydrolase family. *Nature communications*, 8(1), 1-17. doi: 10.1038/s41467-017-01642-w
- Carter, M., Jemth, A. S., Hagenkört, A., Page, B. D., Gustafsson, R., Griesse, J. J., ... & Stenmark, P. (2015). Crystal structure, biochemical and cellular activities demonstrate separate functions of MTH1 and MTH2. *Nature communications*, 6(1), 1-10. doi: 10.1038/ncomms8871
- Castillo, L., Dabiezies, A., Dufort, G., Carracedo, M., Castiglioni, M., Simón, E., ... & Silveira, A. (2012). Evolucion del cáncer pediátrico en Uruguay (1992-2011). *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 83(1), 26-30.
- Cheok, M. H., & Evans, W. E. (2006). Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 6(2), 117-129. doi: 10.1038/nrc1800
- Chiangthong, K., Ittiwut, C., Muensri, S., Sophonphan, J., Sosothikul, D., Seksan, P., ... & Shotelersuk, V. (2015). NUDT15 c. 415C> T increases risk of 6-mercaptopurine induced myelosuppression during maintenance therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *haematologica*, 101(1), e24. doi: 10.3324/haematol.2015.134775

- Chrzanowska, M., Kuehn, M., Januszkiewicz-Lewandowska, D., Kurzawski, M., & Drożdżik, M. (2012). Thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in children with acute lymphoblastic leukemia. *Acta Pol Pharm*, 69(3), 405-410.
- Colistro, V., Mut, P., Hidalgo, P. C., Carracedo, A., Quintela, I., Rojas-Martínez, A., & Sans, M. (2020). Differential admixture in Latin American populations and its impact on the study of colorectal cancer. *Genetics and Molecular Biology*, 43. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2020-0143
- Collie-Duguid, E. S., Pritchard, S. C., Powrie, R. H., Sludden, J., Collier, D. A., Li, T., & McLeod, H. L. (1999). The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics*, 9(1), 37-42. doi: 10.1097/00008571-199902000-00006
- Dufort y Álvarez, G. (2021). Epidemiología del cáncer en niños y adolescentes en Uruguay: 2008-2012. Un estudio de registro poblacional. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 92(1). doi: 10.31134/AP.92.1.3.
- Efrati, E., Adler, L., Krivoy, N., & Sprecher, E. (2009). Distribution of TPMT risk alleles for thiopurine toxicity in the Israeli population. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 65(3), 257-262. doi: 10.1007/s00228-008-0590-7
- Engen, R. M., Marsh, S., Van Booven, D. J., & McLeod, H. L. (2006). Ethnic differences in pharmacogenetically relevant genes. *Current drug targets*, 7(12), 1641-1648. doi: 10.2174/138945006779025446
- Evans, W. E., Hon, Y. Y., Bomgaars, L., Coutre, S., Holdsworth, M., Janco, R., ... & Relling, M. V. (2001). Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *Journal of Clinical Oncology*, 19(8), 2293-2301. doi: 10.1200/JCO.2001.19.8.2293
- Evans, W. E. (2004). Pharmacogenetics of thiopurine S-methyltransferase and thiopurine therapy. *Therapeutic Drug Monitoring*, 26(2), 186-191. doi: 10.1097/00007691-200404000-00018
- Excoffier, L., y Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Farfan, M. J., Salas, C., Canales, C., Silva, F., Villarroel, M., Kopp, K., ... & Morales, J. (2014). Prevalence of TPMT and ITPA gene polymorphisms and effect on mercaptopurine dosage in Chilean children with acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer*, 14(1), 299. doi: 10.1186/1471-2407-14-299
- Food and Drug Administration (FDA). (20 agosto de 2021). *Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs*. Recuperado de: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&varApplNo=09053>
- Gervasini, G., & Vagace, J. M. (2012). Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in Genetics*, 3. doi: 10.3389/fgene.2012.00249
- Goggins, W. B., & Lo, F. F. (2012). Racial and ethnic disparities in survival of US children with acute lymphoblastic leukemia: evidence from the SEER database 1988–2008. *Cancer Causes & Control*, 23(5), 737-743. doi: 10.1007/s10552-012-9943-8
- Gurwitz, D., Rodríguez-Antona, C., Payne, K., Newman, W., Gisbert, J. P., de Mesa, E. G., & Ibarreta, D. (2009). Improving pharmacovigilance in Europe: TPMT genotyping and phenotyping in the UK and Spain. *European Journal of Human Genetics*, 17(8), 991-998. doi: 10.1038/ejhg.2009.10
- Hon, Y. Y., Fessing, M. Y., Pui, C. H., Relling, M. V., Krynetski, E. Y., & Evans, W. E. (1999). Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Human Molecular Genetics*, 8(2), 371-376
- Hongeng, S., Sasanakul, W., Chuansumrit, A., Pakakasama, S., Chattananon, A., & Hathirat, P. (2000). Frequency of thiopurine S-methyltransferase genetic variation in Thai children with acute leukemia. *Medical and Pediatric Oncology: The Official Journal of SIOP—International Society of Pediatric Oncology (Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique)*, 35(4), 410-414. doi: 10.1002/1096-911x(20001001)35:4<410::aid-mpo3>3.0.co;2-r

- Hunger, S. P., Lu, X., Devidas, M., Camitta, B. M., Gaynon, P. S., Winick, N. J., ... & Carroll, W. L. (2012). 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*, 30(14), 1663. doi: 10.1200/JCO.2011.37.8018
- Hunger, S. P., & Mullighan, C. G. (2015). Acute lymphoblastic leukemia in children. *New England Journal of Medicine*, 373(16), 1541-1552. doi: 10.1056/NEJMra1400972.
- Kager, L., & Evans, W. E. (2006). Pharmacogenomics of acute lymphoblastic leukemia. *Current opinion in hematology*, 13(4), 260-265. doi: 10.1097/01.moh.0000231424.46148.f9.
- Kapoor, G., Sinha, R., Naithani, R., & Chandgothia, M. (2010). Thiopurine S-methyltransferase gene polymorphism and 6-mercaptopurine dose intensity in Indian children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research*, 34(8), 1023-1026. doi: 10.1016/j.leukres.2010.01.029
- Kotur, N., Stankovic, B., Kassela, K., Georgitsi, M., Vicha, A., Leontari, I., ... & Zukic, B. (2012). 6-mercaptopurine influences TPMT gene transcription in a TPMT gene promoter variable number of tandem repeats-dependent manner. *Pharmacogenomics*, 13(3), 283-295. doi: 10.2217/PGS.11.153
- Kotur, N., Dokmanovic, L., Janic, D., Stankovic, B., Krstovski, N., Tosic, N., ... & Pavlovic, S. (2015). TPMT gene expression is increased during maintenance therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia patients in a TPMT gene promoter variable number of tandem repeat-dependent manner. *Pharmacogenomics*, 16(15), 1701-1712. doi: 10.2217/pgs.15.109
- Koutsilieris, S., Caudle, K. E., Alzghari, S. K., Monte, A. A., Relling, M. V., & Patrinos, G. P. (2019). Optimizing thiopurine dosing based on TPMT and NUDT15 genotypes: It takes two to tango. *American journal of hematology*, 94(7), 737-740. doi: 10.1002/ajh.25485
- Lee, D., Szumlanski, C., Houtman, J., Honchel, R., Rojas, K., Overhauser, J., ... & Weinshilboum, R. M. (1995). Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Cloning of human liver cDNA and a processed pseudogene on human chromosome 18q21. 1. *Drug metabolism and disposition*, 23(3), 398-405.
- Lee, W., Lockhart, A. C., Kim, R. B., & Rothenberg, M. L. (2005). Cancer pharmacogenomics: powerful tools in cancer chemotherapy and drug development. *The Oncologist*, 10(2), 104-111. doi: 10.1634/theoncologist.10-2-104
- Lennard, L. (2014). Implementation of TPMT testing. *British journal of clinical pharmacology*, 77(4), 704-714. doi: 10.1111/bcp.12226
- Lennard, L., Cartwright, C. S., Wade, R., & Vora, A. (2015). Thiopurine dose intensity and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukaemia: the influence of thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. *British journal of haematology*, 169(2), 228-240. doi: 10.1111/bjh.13240
- Liang, D. C., Yang, C. P., Liu, H. C., Jaing, T. H., Chen, S. H., Hung, I. J., ... & Shih, L. Y. (2015). NUDT15 gene polymorphism related to mercaptopurine intolerance in Taiwan Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *The pharmacogenomics journal*, 16(6), 536-539. doi: 10.1038/tpj.2015.75
- Lopez-Lopez, E., Gutierrez-Camino, A., Bilbao-Aldaiturriaga, N., Pombar-Gomez, M., Martin-Guerrero, I., & Garcia-Orad, A. (2014). Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics*, 15(10), 1383-1398. doi: 10.2217/PGS.14.106
- Ma, X., Zheng, J., Jin, M., Li, W., Gao, C., Zhang, D., ... & Xie, J. (2014). Inosine triphosphate pyrophosphohydrolase (ITPA) polymorphic sequence variants in Chinese ALL children and possible association with mercaptopurine related toxicity. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(7), 4552.
- Maeda, T., Sumi, S., Ueta, A., Ohkubo, Y., Ito, T., Marinaki, A. M., ... & Togari, H. (2005). Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in the Japanese population. *Molecular genetics and metabolism*, 85(4), 271-279. doi: 10.1016/j.ymgme.2005.03.011
- Marinaki, A. M., Arenas, M., Khan, Z. H., Lewis, C. M., Shobowale-Bakre, E. M., Escuredo, E., ... & Duley, J. A. (2003). Genetic determinants of the thiopurine methyltransferase intermediate activity phenotype

in British Asians and Caucasians. *Pharmacogenetics and Genomics*, 13(2), 97-105. doi: 10.1097/00008571-200302000-00006

Marinaki, A. M., Ansari, A., Duley, J. A., Arenas, M., Sumi, S., Lewis, C. M., ... & Sanderson, J. D. (2004). Adverse drug reactions to azathioprine therapy are associated with polymorphism in the gene encoding inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase). *Pharmacogenetics and Genomics*, 14(3), 181-187. doi: 10.1097/01.fpc.0000114709.42625.5d

Marsh, S., King, C. R., Ahluwalia, R., & McLeod, H. L. (2004). Distribution of ITPA P32T alleles in multiple world populations. *Journal of human genetics*, 49(10), 579-581. doi: 10.1007/s10038-004-0183

McLeod, H. L., Krynetski, E. Y., Relling, M. V., & Evans, W. E. (2000). Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 14(4), 567-572. doi: 10.1038/sj.leu.2401723

Meggitt, S. J., Anstey, A. V., Mohd Mustapa, M. F., Reynolds, N. J., Wakelin, S., Tidman, M. J., ... & Haveron, S. E. (2011). British Association of Dermatologists' guidelines for the safe and effective prescribing of azathioprine 2011. *British Journal of Dermatology*, 165(4), 711-734. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10575.x

Moon, W., & Loftus Jr, E. V. (2016). recent advances in pharmacogenetics and pharmacokinetics for safe and effective thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 43(8), 863-883. doi: 10.1111/apt.13559

Moradveisi, B., Muwakkit, S., Zamani, F., Ghaderi, E., Mohammadi, E., & Zgheib, N. K. (2019). ITPA, TPMT, and NUDT15 genetic polymorphisms predict 6-mercaptopurine toxicity in Middle Eastern children with acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in pharmacology*, 10, 916. doi: 10.3389/fphar.2019.0091

Mörücke, A., Zimmermann, M., Reiter, A., Henze, G., Schrauder, A., Gadner, H., ... & Schrappe, M. (2010). Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia*, 24(2), 265-284. doi: 10.1038/leu.2009.257

Moriyama, T., Nishii, R., Perez-Andreu, V., Yang, W., Klussmann, F. A., Zhao, X., ... & Hofmann, U. (2016). NUDT15 polymorphisms alter thiopurine metabolism and hematopoietic toxicity. *Nature genetics*, 48(4), 367-373. doi: 10.1038/ng.3508

Puangpetch, A., Tiyasirichokchai, R., Pakakasama, S., Wiwattanagul, S., Anurathapan, U., Hongeng, S., & Sukasem, C. (2020). NUDT15 genetic variants are related to thiopurine-induced neutropenia in Thai children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics*, 21(6), 403-410. doi: 10.2217/pgs-2019-0177

Relling, M. V., Hancock, M. L., Rivera, G. K., Sandlund, J. T., Ribeiro, R. C., Krynetski, E. Y., ... & Evans, W. E. (1999). Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(23), 2001-2008.

Relling, M. V., Gardner, E. E., Sandborn, W. J., Schmiegelow, K., Pui, C. H., Yee, S. W., ... & Klein, T. E. (2011). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89(3), 387-391. doi: 10.1038/clpt.2010.320

Relling, M. V., Schwab, M., Whirl-Carrillo, M., Suarez-Kurtz, G., Pui, C. H., Stein, C. M., ... & Yang, J. J. (2019). Clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline for thiopurine dosing based on TPMT and NUDT 15 genotypes: 2018 update. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 105(5), 1095-1105. doi: 10.1002/cpt.1304

Rocha, J. C. C., Cheng, C., Liu, W., Kishi, S., Das, S., Cook, E. H., ... & Relling, M. V. (2005). Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 105(12), 4752-4758. doi: 10.1182/blood-2004-11-4544

Schaeffeler, E., Jaeger, S. U., Klumpp, V., Yang, J. J., Igel, S., Hinze, L., ... & Schwab, M. (2019). Impact of NUDT15 genetics on severe thiopurine-related hematotoxicity in patients with European ancestry. *Genetics in Medicine*, 21(9), 2145-2150. doi: 10.1038/s41436-019-0448-7

- Schmiegelow, K., Nielsen, S. N., Frandsen, T. L., & Nersting, J. (2014). Mercaptopurine/Methotrexate Maintenance Therapy of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical Facts and Fiction. *Journal of pediatric hematology/oncology*, 36(7), 503-517. doi: 10.1097/MPH.0000000000000206
- Shah, S. A., Paradkar, M., Desai, D., & Ashavaid, T. F. (2017). Nucleoside diphosphate-linked moiety X-type motif 15 C415T variant as a predictor for thiopurine-induced toxicity in Indian patients. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 32(3), 620-624. doi: 10.1111/jgh.13494
- Shipkova, M., Lorenz, K., Oellerich, M., Wieland, E., & von Ahsen, N. (2006). Measurement of erythrocyte inosine triphosphate pyrophosphohydrolase (ITPA) activity by HPLC and correlation of ITPA genotype-phenotype in a Caucasian population. *Clinical chemistry*, 52(2), 240-247. doi: 10.1373/clinchem.2005.059501
- Silva, M. R., de Oliveira, B. M., Viana, M. B., Murao, M., & Romanha, A. J. (2008). Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene polymorphism in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: association with clinical and laboratory data. *Therapeutic drug monitoring*, 30(6), 700-704. doi: 10.1097/FTD.0b013e31818b0f31
- Simone, P. D., Pavlov, Y. I., & Borgstahl, G. E. (2013). ITPA (inosine triphosphate pyrophosphatase): from surveillance of nucleotide pools to human disease and pharmacogenetics. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 753(2), 131-146. doi: 10.1016/j.mrrev.2013.08.001
- Singh, M., Bhatia, P., Khera, S., & Trehan, A. (2017). Emerging role of NUDT15 polymorphisms in 6-mercaptopurine metabolism and dose related toxicity in acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia research*, 62, 17-22. doi: 10.1016/j.leukres.2017.09.012
- Smid, A., Karas-Kuzelicki, N., Milek, M., Jazbec, J., & Mlinaric-Rascan, I. (2014). Association of ITPA Genotype with Event-Free Survival and Relapse Rates in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia Undergoing Maintenance Therapy. *PloS one*, 9(10), e109551. doi: 10.1371/journal.pone.0109551
- Spire-Vayron de la Moureyre, C., Debuysere, H., Mastain, B., Vinner, E., Marez, D., Lo Guidice, J. M., ... & Broly, F. (1998). Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *British journal of pharmacology*, 125(4), 879-887. doi: 10.1038/sj.bjp.0702152
- Spire-Vayron de la Moureyre, C., Debuysère, H., Fazio, F., Sergent, E., Bernard, C., Sabbagh, N.,... & Broly, F. (1999). Characterization of a variable number tandem repeat region in the thiopurine S-methyltransferase gene promoter. *Pharmacogenetics*, 9 (2), 189–198.
- Stocco, G., Cheok, M. H., Crews, K. R., Dervieux, T., French, D., Pei, D., ... & Evans, W. E. (2009). Genetic polymorphism of inosine triphosphate pyrophosphatase is a determinant of mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 85(2), 164-172. doi: 10.1038/clpt.2008.154
- Sumi, S., Marinaki, A. M., Arenas, M., Fairbanks, L., Shobowale-Bakre, M., Rees, D. C., ... & Duley, J. A. (2002). Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency. *Human genetics*, 111(4-5), 360-367. doi: 10.1007/s00439-002-0798-z
- Suzuki, H., Fukushima, H., Suzuki, R., Hosaka, S., Yamaki, Y., Kobayashi, C., ... & Sumazaki, R. (2016). 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*, 61(9), 797-801. doi: 10.1038/jhg.2016.55
- Tai, H. L., Krynetski, E.Y., Yates, C. R., Loennechen, T., Fessing, M. Y., Krynetskaia, N. F., & Evans, W. E. (1996). Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *American journal of human genetics*, 58(4), 694.
- Tai, H. L., Krynetski, E. Y., Schuetz, E. G., Yanishevski, Y., & Evans, W. E. (1997). Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT* 3A, TPMT* 2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(12), 6444-6449. doi: 10.1073/pnas.94.12.6444

- Tai, H. L., Fessing, M. Y., Bonten, E. J., Yanishevsky, Y., d'Azzo, A., Krynetski, E. Y., & Evans, W. E. (1999). Enhanced proteasomal degradation of mutant human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) in mammalian cells: mechanism for TPMT protein deficiency inherited by TPMT* 2, TPMT* 3A, TPMT* 3B or TPMT* 3C. *Pharmacogenetics*, 9(5), 641-650. doi: 10.1097/01213011-199910000-00011
- Taxis, T., Guzmán-Cruz, C., Rodríguez-Dorantes, M., Sánchez-García, S., Mino-León, D., & Gonzalez-Covarrubias, V. (2021). Genotyping NUDT15*3 rs1166855232 reveals higher frequency of potential adverse effects of thiopurines in Natives and Mestizos from Mexico. *Pharmacological Reports*, 1-6. doi: 10.1007/s43440-021-00287-3
- Thiopurine methyltransferase nomenclature website. (2021). *TPMT nomenclature committee (TPMT Alleles)*. Recuperado de: <https://liu.se/en/research/tpmt-nomenclature-committee>.
- Torres-Jiménez, R., Mateos-Antón, F., Ramos-Hernández, T., Arcas-Martínez, J., Buño-Soto, A. B., & García-Puig, J. (1998). Estudio bioquímico, enzimático y genético de la deficiencia de hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HPRT). *An Esp pediatr*, 48(4), 355-362.
- Urbančič, D., Šmid, A., Stocco, G., Decorti, G., Mlinarič-Raščan, I., & Karas Kuželički, N. (2018). Novel motif of variable number of tandem repeats in TPMT promoter region and evolutionary association of variable number of tandem repeats with TPMT* 3 alleles. *Pharmacogenomics*, 19(17), 1311-1322. doi: 10.2217/pgs-2018-0123
- Valerie, N. C., Hagenkort, A., Page, B. D., Masuyer, G., Rehling, D., Carter, M., ... & Helleday, T. (2016). NUDT15 hydrolyzes 6-thio-deoxyGTP to mediate the anticancer efficacy of 6-thioguanine. *Cancer research*, 76(18), 5501-5511. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0584
- van Asseldonk, D. P., Seinen, M. L., de Boer, N. K., van Bodegraven, A. A., & Mulder, C. J. (2012). Hepatotoxicity associated with 6-methyl mercaptopurine formation during azathioprine and 6-mercaptopurine therapy does not occur on the short-term during 6-thioguanine therapy in IBD treatment. *Journal of Crohn's and Colitis*, 6(1), 95-101. doi: 10.1016/j.crohns.2011.07.009
- Walsh, K. M., de Smith, A. J., Welch, T. C., Smirnov, I., Cunningham, M. J., Ma, X., ... & Wiemels, J. L. (2014). Genomic ancestry and somatic alterations correlate with age at diagnosis in Hispanic children with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *American journal of hematology*, 89(7), 721-725. doi: 10.1002/ajh.23727
- Wang, L., Pellemounter, L., Weinshilboum, R., Johnson, J.A., Hebert, J.M., Altman, R.B., & Klein, T.E. (2010). Very important pharmacogene summary: thiopurine S-methyltransferase. *Pharmacogenetics and genomics*, 20(6), 401. doi: 10.1097/FPC.0b013e3283352860
- Wang, D. S., Yu, C. H., Lin, C. Y., Chang, Y. H., Lin, K. H., Lin, D. T., ... & Yang, Y. L. (2020). Childhood acute lymphoblastic leukemia mercaptopurine intolerance is associated with NUDT15 variants. *Pediatric research*, 89(1), 217-222. doi: 10.1038/s41390-020-0868-8
- Weinshilboum, R. (2001). Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. *Drug metabolism and disposition*, 29(4), 601-605.
- Whirl-Carrillo, M., McDonagh, E. M., Hebert, J. M., Gong, L., Sangkuhl, K., Thorn, C. F., ... & Klein, T. E. (2012). Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 92(4), 414-417. doi: 10.1002/cpt.2350
- Wong, F. C., Leung, A. W., Kwok, J. S., Chan, M. H., Li, C. K., & Yuen, Y. P. (2016). NUDT15 variant and thiopurine-induced leukopenia in Hong Kong. *Hong Kong Med J*, 22(2), 185-7. doi: 10.12809/hkmj154783
- Wu, F., Melis, R., McMillin, G. A., & Johnson-Davis, K. L. (2019). Retrospective data analysis of the influence of age and sex on TPMT activity and its phenotype-genotype correlation. *The journal of applied laboratory medicine*, 3(5), 827-838. doi: 10.1373/jalm.2018.027276
- Yang, J. J., Cheng, C., Devidas, M., Cao, X., Fan, Y., Campana, D., ... & Relling, M. V. (2011). Ancestry and pharmacogenomics of relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*, 43(3), 237-241. doi: 10.1038/ng.763

- Yang, J. J., Cheng, C., Devidas, M., Cao, X., Campana, D., Yang, W., ... & Relling, M. V. (2012). Genome-wide association study identifies germline polymorphisms associated with relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 120(20), 4197-4204. doi: 10.1182/blood-2012-07-440107
- Yang, S. K., Hong, M., Baek, J., Choi, H., Zhao, W., Jung, Y., ... & Song, K. (2014). A common missense variant in NUDT15 confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia. *Nature genetics*, 46(9), 1017-1020. doi: 10.1038/ng.3060
- Yang, J. J., Landier, W., Yang, W., Liu, C., Hageman, L., Cheng, C., ... & Relling, M. V. (2015). Inherited NUDT15 variant is a genetic determinant of mercaptopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology*, 33(11), 1235. doi: 10.1200/JCO.2014.60.1740
- Zaza, G., Cheok, M., Krynetskaia, N., Thorn, C., Stocco, G., Hebert, J. M., ... & Altman, R. B. (2010). Thiopurine pathway. *Pharmacogenetics and genomics*, 20(9), 573-574. doi: 10.1097/FPC.0b013e328334338f. Recuperado de: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA2040>
- Zhou, H., Li, L., Yang, P., Yang, L., Zheng, J. E., Zhou, Y., & Han, Y. (2018). Optimal predictor for 6-mercaptopurine intolerance in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia: NUDT15, TPMT, or ITPA genetic variants?. *BMC cancer*, 18(1), 1-9. doi: 10.1186/s12885-018-4398-2
- Zukic, B., Radmilovic, M., Stojiljkovic, M., Tomic, N., Pourfarzad, F., Dokmanovic, L., ... & Pavlovic, S. (2010). Functional analysis of the role of the TPMT gene promoter VNTR polymorphism in TPMT gene transcription. *Pharmacogenomics*, 11(4), 547-557. doi: 10.2217/PGS.10.7

3.8 APÉNDICE CAPÍTULO 3: TPMT-VNTR



Ancestry and TPMT-VNTR Polymorphism: Relationship with Hematological Toxicity in Uruguayan Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia

Gabriela Burgueño-Rodríguez¹, Yessika Méndez², Natalia Olano², Agustín Dabezies², Bernardo Bertoni³, Jorge Souto³, Luis Castillo², Julio da Luz^{1*} and Ana María Soler^{1*}

¹Laboratorio de Genética Molecular Humana, Centro Universitario Regional (CENUR) Litoral Norte-Sede Salto, Universidad de la República (Udelar), Salto, Uruguay, ²Servicio Hemato Oncológico Pediátrico (SHOP), Centro Hospitalario Pereira Rossell (CHPR), Montevideo, Uruguay, ³Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

OPEN ACCESS

Edited by:

Andrés López-Cortés,
Universidad UTE, Ecuador

Reviewed by:

Yang Shu,
Sichuan University, China
Lucía Taja-Chayeb,
National Institute of Cancerology
(INCAN), Mexico

*Correspondence:

Ana María Soler
anamasoler@gmail.com
Julio da Luz
jda@fmed.edu.uy

Specialty section:

This article was submitted to
Pharmacogenetics and
Pharmacogenomics,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 12 August 2020

Accepted: 24 September 2020

Published: 09 November 2020

Citation:

Burgueño-Rodríguez G, Méndez Y, Olano N, Dabezies A, Bertoni B, Souto J, Castillo L, da Luz J and Soler AM (2020) Ancestry and TPMT-VNTR Polymorphism: Relationship with Hematological Toxicity in Uruguayan Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front. Pharmacol.* 11:594262. doi: 10.3389/fphar.2020.594262

6-Mercaptopurine (6-MP) is a thiopurine drug widely used in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) therapy. Genes such as *TPMT* and *NUDT15* have an outstanding role in 6-MP metabolism. Mutations in both genes explain a significant portion of hematological toxicities suffered by ALL Uruguayan pediatric patients. A variable number tandem repeat in the *TPMT* promoter (*TPMT*-VNTR) has been associated with *TPMT* expression. This VNTR has a conservative architecture (AnBmC). To explore new causes of hematological toxicities related to ALL therapy, we genotyped the *TPMT*-VNTR of 130 Uruguayan pediatric patients. Additionally, individual genetic ancestry was estimated by 45 ancestry-informative markers (AIMs). Hematological toxicity was measured as the number of leukopenia events and 6-MP dose along the maintenance phase. As previously reported, we found *TPMT**2 and *TPMT**3C alleles were associated to *TPMT*-VNTR A2BC and AB2C, respectively. However, contrasting with other reports, *TPMT**3A allele was found in a heterogeneous genetic background in linkage equilibrium. Patients carrying more than 5 A repeats present a significant higher number of leukopenia events among patients without *TPMT* and/or *NUDT15* variants. Native American ancestry and the number of A repeats were significantly correlated with the number of leukopenia events. However, the correlation between Native American ancestry and the number of leukopenia events was lost when the number of A repeats was considered as covariate. This suggests that *TPMT*-VNTR alleles are more relevant than Native American ancestry in the hematological toxicity. Our results emphasize that *TPMT*-VNTR may be used as a pharmacogenetic biomarker to predict 6-MP-related hematological toxicity in ALL childhood therapy.

Keywords: Acute Lymphoblastic Leukemia, *TPMT*, *TPMT*-VNTR, *NUDT15*, 6-MP, Pharmacogenomics, Ancestry, Hematological toxicity

INTRODUCTION

Childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent children cancer worldwide. Uruguay is not an exception. The 5-year disease-free survival (DFS) in this country is similar to that observed in developed countries (Castillos et al., 2012). Although ALL treatments have been improved, approximately 20% of the patients suffer a diversity of adverse side effects due to the nonspecific action and the narrow therapeutic range of the drugs.

In Uruguay, Berlin-Frankfurt-Münster (IC-BFM) protocol is used to treat ALL pediatric patients. In this protocol, patients are classified as standard, intermediate, and high risk according to age of diagnosis, white blood cell (WBC) count, blast number in peripheral blood at day 8, blast percentage in the bone marrow at days 15 and 33, and the presence of translocations. The overall chemotherapy consists in a two-year (104 weeks) treatment encompassing many phases. According to the risk group, the maintenance phase varies between 63 and 74 weeks. In this phase, patients received 50 mg/m²/day of 6-mercaptopurine (6-MP) and 20 mg/m²/week of methotrexate (MTX). During the maintenance phase, complete blood count (CBC) is performed weekly along the first two months and then every two or three weeks.

Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) is a cytosolic enzyme, in which physiological function remains uncertain. TPMT catalyzes the S-methylation of thiopurine drugs such as azathioprine, 6-MP, and 6-thioguanine (6-TG), which are widely used in autoimmune, inflammatory, and cancer diseases (Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998; Appell et al., 2013; Chouchana et al., 2014).

Normally, 6-MP and 6-TG are considered as purines and are metabolized to thioguanine nucleotides (TGNs) which will be incorporated into DNA, causing damage and triggering further cellular apoptosis (Pan and Nelson, 1990; Kotur et al., 2012). In the hematopoietic tissue, TPMT has an outstanding role in the downregulation of TGN formation due to its S-methyltransferase activity. There is therefore an inverse relationship between the activity of TPMT and active TGN metabolites' concentration (Relling et al., 2011).

TPMT illustrates one of the most characteristic examples of pharmacogenetics utility, attempting to a personalized drug therapy. To date, more than 44 *TPMT* mutant alleles have been described (<https://www.hmv.liu.se/tpmtalleles>), but *TPMT**2, *TPMT**3A, and *TPMT**3C alleles represent more than 95% of inherited *TPMT* deficiency (Ameyaw et al., 1999; Chrzanowska et al., 2012). Furthermore, within the *TPMT* gene promoter, there is a variable number tandem repeat (VNTR) region (Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998; Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1999), whose composition and number of repeats have been associated with *TPMT* expression (Zukic et al., 2010; Kotur et al., 2012; Kotur et al., 2015). This GC-rich VNTR region (*TPMT*-VNTR) has a three-element architecture, two of them being variable in their copy number (AmBnC). According to Vergnaud and Denoeud (2000) criteria, this VNTR is considered a minisatellite, and, hitherto, 19 different alleles have been described (Urbančič et al., 2018).

It has already been reported that, in Uruguayan pediatric patients under ALL therapy, approximately 30% of the

hematological toxicities are explained by SNPs at *TPMT* and *NUDT15* genes (Soler et al., 2018). This result demonstrates once again the importance of specific studies for each population, especially in admixed ones such as Uruguayan population. The aim of this work is to analyze the *TPMT*-VNTR in ALL pediatric patients from Uruguay and determine its association with 6-MP hematological toxicity (measured as the number of leukopenia events and 6-MP cumulative dose) in the maintenance phase; taking individual genetic ancestry into account.

METHODOLOGY

Patients and Clinical Data

DNA samples of 130 ALL Uruguayan pediatric patients aged between 1 and 15 years were analyzed. All patients were followed up at the Servicio Hemato Oncológico Pediátrico—Centro Hospitalario Pereira Rossell, Montevideo, Uruguay, and treated with the IC-BFM protocol (58 according to ALL-IC-BFM 2002 and 72 according to ALL-IC-BFM 2009). The collected clinical data were 6-MP dose and the number of leukopenia events along the first 32 weeks of the maintenance phase. The cumulative 6-MP dose was calculated at weeks 8, 16, 24, and 32. Additionally, we calculated the mean weekly 6-MP dose (mg/m²). On the contrary, the hematological toxicity (leukopenia events' grades 3 and 4) was analyzed as a whole and within eight-week intervals (1–8, 9–16, 17–24, and 25–32 weeks). The data analyzed in this study were collected blinded to genotypes from the patients' medical files by the two corresponding researchers.

The protocol and procedure employed in this study was approved by the CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, institutional ethics committee, and informed consent was obtained from parents, guardians, and/or patients, as required (Exp. N° 311170-000332-17, www.expe.edu.uy).

TPMT, TPMT-VNTR, and NUDT15 Genotyping

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by the saline extraction method (Miller et al., 1988). Patients were previously genotyped for *TPMT* and *NUDT15* genes which are the most common variants (Soler et al., 2018). The number and type of tandem repeats were determined by *TPMT* first-exon PCR amplification, including the promoter region, followed by Sanger sequencing. Furthermore, in order to discard other possible mutations, the *TPMT* gene was completely characterized by the amplification and sequencing of its nine exons. In addition, since *NUDT15* variants analyzed by Soler et al. (2018) were in exons 1 and 3, we also sequenced *NUDT15* exon 2. Amplification primers and PCR conditions are shown in **Supplementary Table S1**.

Linkage Disequilibrium

TPMT-VNTR genotypes and *TPMT* genotypic data previously reported by Soler et al. (2018) were used to estimate the gametic phase, applying Arlequin software v3.5.2 (Excoffier and Lischer, 2010). For each haplotype, we estimated the normalized linkage disequilibrium (D').

TABLE 1 | *TPMT*-VNTR genotype frequencies and *TPMT* genotype.

<i>TPMT</i> -VNTR	<i>n</i>	Freq. (%)	<i>TPMT</i> (<i>n</i>)	Group*
3/3 ABC/ABC	1	0.77	1/*3A	1
3/4a ABC/A2BC	1	0.77	*1/*1	1
3/5a ABC/A2B2C	1	0.77	*1/*1	1
4a/4a A2BC/A2BC	33	25.38	*1/*1 (29) *1/*2 (1) *1/*3A (3)	1
4a/4b A2BC/AB2C	4	3.08	*1/*1	1
4a/5a A2BC/A2B2C	44	33.85	*1/*1 (43) *1/*3A (1)	1
4a/5b A2BC/A3BC	1	0.77	*1/*1	2
4a/6a A2BC/A2B3C	11	8.46	*1/*1	1
4a/6b A2BC/AB4C	2	1.54	*1/*1	1
4a/6c A2BC/A4BC	2	1.54	*1/*1	2
4a/7a A2BC/A5BC	3	2.31	*1/*1	2
4b/5a AB2C/A2B2C	2	1.54	*1/*1 (1) *1/*3C (1)	1
5a/5a A2B2C/A2B2C	15	11.54	*1/*1 (13) *1/*3A (2)	1
5a/5b A2B2C/A3BC	1	0.77	*1/*1	2
5a/6a A2B2C/A2B3C	5	3.85	*1/*1	1
5a/7a A2B2C/A5BC	2	1.54	*1/*1	2
6b/8a AB4C/A6BC	1	0.77	*1/*3A	2
7a/7a A5BC/A5BC	1	0.77	*1/*3A	2
Total	130	—	—	—

Freq.: *TPMT*-VNTR genotype frequency. *1): number of A repeats < 5; 2): number of A repeats ≥ 5.

Ancestry

A total of 45 ancestry-informative markers (AIMs) located along all autosomes were genotyped (Supplementary Table S2). These AIMs were selected from the SNP panel published by Yaeger et al. (2008). Nineteen of them were performed by the SNaPshot multiplex system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States) and 26 by MassARRAY SNP genotyping (Agena Bioscience Inc., San Diego, United States). In order to estimate the European, Amerindian, and African ancestry, Structure software (Pritchard et al., 2000) was used with 100,000 iterations for the burn-in period and 1,000,000 additional iterations. The parental populations included 42 Europeans (Coriell's North American panel), 37 West Africans (nonadmixed Africans living in London, United Kingdom, and South Carolina, United States), and 30 Native Americans (15 Mayans and 15 Nahuas), who were genotyped on an Affymetrix 100 K SNP chip (data were kindly provided by Dr. Laura Fejerman (University of California, San Francisco)).

Statistical Analysis

Allele and genotype frequencies were estimated by gene counting. Correlation between clinical data and the number of repeats (A, B, and A + B) was analyzed by Spearman correlation test. Additionally, patients were classified into two groups according to the number of A repeats (A < 5 and A ≥ 5). The association between these two groups with 6-MP cumulative dose and the number of leukopenia events was analyzed by variance analyses (ANOVA) and Mann-Whitney test, respectively. Furthermore, association between individual ancestry, clinical data, and genetic information was analyzed by ANOVA, Spearman, and partial

correlation. Classification tree was built to cluster the patients according to the number of leukopenia events, using the chi-squared automatic interaction detection (CHAID) algorithm. The categorical variables considered were the presence or absence of *TPMT* and/or *NUDT15* variants, A repeats' groups, and Native American ancestry (cutoff 15%). All analyzes were carried out in the total sample and in the sample subdivided by the presence or absence of *TPMT* and *NUDT15* variants. Statistical analysis was performed in R statistical package with a CI of 95%, with exception of the classification tree which was carried on SPSS 22.0.

RESULTS

TPMT-VNTR Genotypic and Allelic Frequencies

TPMT and *NUDT15* exon sequencing did not reveal any other mutation to those previously reported by Soler et al. (2018). Regarding *TPMT*-VNTR, we identified 18 different genotypes and 10 different alleles. The total number of VNTR repeats (A + B + C) ranged from 6 (ABC/ABC) to 14 (A5BC/A5BC) (Table 1).

The most frequent *TPMT*-VNTR genotypes were *4a/*5a (33.85%), *4a/*4a (25.38%), *5a/*5a (11.54%), and *4a/*6a (8.46%). Therefore, *TPMT*-VNTR alleles *4a (51.54%), *5a (32.59%), and *6a (6.15%) explain more than 90% of variability (Table 1 and 2).

Six different *TPMT*-VNTR genotypes (*3/*3, *4a/*4a, *4a/*5a, *5a/*5a, *6b/*8a, and *7a/*7a) were found in the nine heterozygous *TPMT**3A/*1 patients. The *TPMT**2/*1 and *TPMT**3C/*1 patients have the *4a/*4a and *4b/*5a *TPMT*-VNTR genotypes, respectively (Table 1).

Estimation of the gametic phase showed the *TPMT**3A allele associated to five *TPMT*-VNTR alleles (*3, *4a, *5a, *7a, and *8a), whereas *TPMT**2 and *TPMT**3C alleles were associated to *TPMT*-VNTR alleles *4a and *4b, respectively. With exception

TABLE 2 | Linkage disequilibrium between *TPMT*-VNTR alleles and *TPMT* alleles obtained from estimated haplotype combinations.

<i>TPMT</i> -VNTR alleles	Freq. (%)	<i>TPMT</i> allele	<i>n</i>	D'	r ²	χ ²	P
*3 ABC	1,54	*1	3	-0.217	0.017	4,325	0.038
		*3A	1	0.223	0.022	5,640	0.018
*4a A2BC	51,54	*1	130	0.118	0.001	0.170	0.680
		*2	1	1,000	0.004	0.944	0.331
		*3A	3	-0.138	0.001	0.188	0.665
*4b AB2C	2,31	*1	5	-0.130	0.009	2,344	0.126
		*3C	1	1,000	0.163	42,497	<0.0001
*5a A2B2C	32,69	*1	82	0.444	0.004	1,099	0.295
		*3A	3	-0.320	0.002	0.464	0.496
*5b A3BC	0,77	*1	2	1,000	0.000	0.089	0.765
*6a A2B3C	6,15	*1	16	1,000	0.003	0.753	0.386
*6b AB4C	1,15	*1	3	1,000	0.001	0.134	0.714
*6c A4BC	0,77	*1	2	1,000	0.000	0.089	0.765
*7a A5BC	2,69	*1	6	-0.105	0.007	1,795	0.180
		*3A	1	0.112	0.010	2,522	0.112
*8a A6BC	0,38	*3A	1	-1,000	0.087	22,724	<0.0001

Freq.: *TPMT*-VNTR allele frequency. D': normalized linkage disequilibrium coefficient. r²: correlation coefficient. χ²: chi-square. p = p value.

TABLE 3 | Association between the number of leukopenia events and 1) the number of A, B, and A + B repeats and 2) risk groups.

Interval (weeks)		Spearman correlation (1)						Mann-Whitney (2)					
		Number of A repeats		Number of B repeats		A + B repeats		Number of leukopenia events				p	
								Risk group 1		Risk group 2			
		R	p	R	p	r	P	N	Mean	N	Mean		
1–8	Total	0.245	0.008	-0.122	0.116	-0.007	0.474	88	0.61	8	1.63	0.010	
	wt							72	0.54	6	1.50	0.044	
	mut							16	0.94	2	2	0.105	
9–16	Total	0.112	0.140	0.056	0.294	0.106	0.151	88	0.85	8	1.62	0.105	
	wt							72	0.71	6	1.17	0.328	
	mut							16	1.50	2	3	0.163	
17–24	Total	0.166	0.054	-0.170	0.050	-0.070	0.250	87	0.48	8	1.25	0.025	
	wt							71	0.41	6	1.17	0.068	
	mut							16	0.81	2	1.50	0.216	
25–32	Total	0.137	0.093	0.099	0.172	0.126	0.114	86	0.34	8	0.63	0.154	
	wt							71	0.28	6	0.67	0.148	
	mut							15	0.60	2	0.50	0.669	
Total (32 weeks)	Total	0.240	0.009	-0.075	0.233	0.044	0.336	88	2.27	8	5.13	0.002	
	wt							72	1.93	6	4.50	0.012	
	mut							16	3.81	2	7	0.078	

1) Association between the number of leukopenia events and the number of A, B, and A + B repeats was done by Spearman test. 2) The number of leukopenia events between risk groups was compared by Mann-Whitney test. Total: total sample; wt: patients without TPMT or NUDT15 variants; mut: patients with TPMT and/or NUDT15 variants. r: Spearman correlation coefficient. p: p value. N: number of individuals. Risk group 1: A < 5. Risk group 2: A ≥ 5. Mean: mean number of leukopenia events' grade 3 or 4.

of haplotypes *3-TPMT*1, *3-TPMT*3A, *4a-TPMT*3C, and *8a-TPMT*3A, the remaining haplotypes were found in linkage equilibrium (Table 2).

Association of TPMT-VNTR with Hematological Toxicity

We found a significant correlation between the number of A repeats and the number of leukopenia events in the interval 1–8 ($p = 0.008$) and when the 32 weeks were analyzed as a whole ($p = 0.009$) (Table 3). Graphical representation of total leukopenia events at week 32 showed a trend toward a greater number of leukopenia events when the number of A repeats was equal or higher than five (Supplementary Figure S1). Therefore, patients were classified into two groups according to the number of A repeats: risk group 1 with less than five A repeats and risk group 2 with five or more A repeats. When the number of leukopenia events was compared among the risk groups by the Mann-Whitney test, the number of leukopenia events was significantly greater in risk group 2 than that in risk group 1 at intervals 1–8 and 17–24 and considering the 32 weeks as a whole (Table 3).

As the number of leukopenia events is strongly associated with TPMT and NUDT15 variants (Relling et al., 2011; Cargnin et al., 2018; Soler et al., 2018), we also subdivided the sample according to the presence or absence of TPMT and/or NUDT15 variants. The association between risk groups and the number of leukopenia events remains significant only in the subsample without TPMT and/or NUDT15 variants. This association was observed in the interval 1–8 and in the total number of leukopenia events at week 32 (Table 3).

We did not detect significant correlations between 6-MP cumulative dose and the TPMT-VNTR length (A + B) as well

as with the number of A or B repeats separately (Supplementary Table S3). Moreover, 6-MP cumulative dose did not show an association with risk groups by ANOVA neither in the total sample nor in the sample subdivided by the presence and absence of TPMT and/or NUDT15 variants (data not shown).

Ancestry, Hematological Toxicity, and TPMT-VNTR

Ancestry was determined in 111 of 130 patients. European, Native American, and African ancestral proportions were $73.9 \pm 14.8\%$, $16.9 \pm 11.7\%$, and $9.12 \pm 7.4\%$ (mean $\pm$ SD), respectively (Supplementary Figure S2).

There is a significant negative correlation between the number of leukopenia events and Native American ancestry in patients without TPMT and/or NUDT15 variants (Supplementary Table S4). Moreover, risk group 2 patients showed a significantly higher European and lower Native American ancestry than patients from risk group 1 among patients without TPMT and/or NUDT15 variants (Supplementary Figures 2C,D). In order to analyze the relevance of the abovementioned variables, we additionally performed a partial correlation analysis between the number of leukopenia events and patients' Native American ancestry using risk groups as covariate. This analysis did not show a significant correlation ($p = 0.120$). Furthermore, classification tree first divided the sample by the presence or absence of TPMT and/or NUDT15 variants and then by risk groups resulting in three groups (two nodes). Native American ancestry was not a significant variable to explain the number of leukopenia events (Figure 1).

6-MP cumulative dose does not show a significant correlation with European, Native American, or African ancestry in the total sample.

DISCUSSION

As it has been widely reported, *TPMT* and *NUDT15* genes have an outstanding role in the 6-MP metabolic pathway. Variants in both genes induce loss of their enzymatic activity and the subsequent accumulation of TGNs, resulting in the presence of adverse drug reaction due to 6-MP (Fabre et al., 2004; Yang et al., 2014; Moriyama et al., 2016; Soler et al., 2018; Cao et al., 2020). However, patients without *TPMT* and/or *NUDT15* variants also suffer 6-MP adverse effects. A VNTR region in the *TPMT* promoter has been postulated to modulate *TPMT* activity (Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998) and hence may explain part of the hematological toxicity due to 6-MP.

In our study population, an admixed one, overall *TPMT*-VNTR allele frequencies did not differ significantly from the previously reported for Portuguese and Mozambique (Alves et al., 2002), Asian British (Marinaki et al., 2003), and Serbian populations (Zukic et al., 2010; Kotur et al., 2012). The most frequent alleles found were *4a and *5a followed by *6a, which were similar to those observed in other populations (Alves et al., 2002; Marinaki et al., 2003; Zukic et al., 2010; Urbančič et al., 2018). Interestingly, alleles *3 and *4b were found at higher frequencies than those observed in European populations and similar to those reported for Mozambique and Asian British populations, respectively (Alves et al., 2002; Marinaki et al., 2003; Urbančič et al., 2018). This fact could be explained by the contribution of Native American and African populations to the Uruguayan genetic pool (Sans et al., 1997; Buchelli and Cabella, 2010; Bonilla et al., 2015).

Genotypic and linkage disequilibrium (LD) analyses showed that, with exception to the *8a allele, the functional *TPMT**1 allele is linked to the rest of the *TPMT*-VNTR alleles. In concordance with the previous reports, *TPMT**2 and *TPMT**3C alleles were found linked to *TPMT*-VNTR *4a and *4b alleles, respectively (Alves et al., 2001; Marinaki et al., 2003; Urbančič et al., 2018).

On the contrary, *TPMT**3A (the most common deficient allele) was linked to six different *TPMT*-VNTR alleles. Six out of nine *TPMT**3A alleles were linked in equilibrium to the most frequent *TPMT*-VNTR alleles (*4a and *5a), similar to what Spire-Vayron de la Moureyre et al. (1998) reported for a European population. Moreover, the *7a allele (the fourth most frequent *TPMT*-VNTR allele) was also found in linkage equilibrium with the *TPMT**3A allele. Different to previous studies, we did not observe linkage between *TPMT**3A and *6b (Alves et al., 2001; Marinaki et al., 2003). Additionally, *TPMT**3A allele was in LD only with *TPMT*-VNTR alleles found in low frequencies (*3 and *8a). This result contrasts with previous studies, where *TPMT**3A was found in LD with *5a, *6a, and ABnC ($n > 2$) alleles (Yan et al., 2000; Alves et al., 2001; Marinaki et al., 2003; Urbančič et al., 2018) (Table 2).

The linkage between *TPMT*-VNTR with the variable number of A repeats and *TPMT**3A allele, added to the absence of LD when all alleles were considered ($p = 0.198$), does not adjust to the evolutionary model proposed by Urbančič et al. (2018). These differences may be explained by several reasons: 1) the loss of LD by recombination between the *TPMT**3A allele and the common *TPMT*-VNTR alleles as suggested by Marinaki et al.

(2003); 2) the heterogeneity in the Caucasian population that contributes to the Uruguayan genetic pool; and 3) microevolutionary events as genetic drift or founder effects occurring in the Uruguayan population.

Several studies had reported that *TPMT*-VNTR modulates the expression of the *TPMT* gene, possibly at the transcriptional level. Some authors had reported an inverse correlation between the overall repeat number of *TPMT*-VNTR and *TPMT* activity (Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998; Yan et al., 2000; Fabre et al., 2004), whereas other authors found a correlation between the number of A or B repeats with *TPMT* activity and/or with hematological toxicities (Alves et al., 2001; Zukic et al., 2010; Kotur et al., 2012; Kotur et al., 2015). Most of these studies had analyzed the relationship between *TPMT*-VNTR alleles and *TPMT* expression/activity at the molecular or biochemical level. In our study, we focus on the leukopenia events and on 6-MP dose, two indirect clinical measures of *TPMT* expression/activity.

We found a negative correlation between the number of A repeats and the number of leukopenia events (Table 3). These results agree with *TPMT* gene expression data previously reported by Zukic et al. (2010) and Kotur et al. (2012), Kotur et al. (2015). Interestingly, we did not find any significant correlation between either the total overall repeat number or the number of B repeats with the two clinical measures analyzed, as described by Spire-Vayron de la Moureyre et al. (1998) and Alves et al. (2001). Other study, with kidney transplant recipients receiving azathioprine, reported that patients with *TPMT*-VNTR genotypes composed of more than ten repeats showed a significant reduction in azathioprine dose compared to those with ten or less repeats (Fabre et al., 2004). Although this study does not discriminate between the number of A and B repeats, those individuals (>10 repeats) must have at least one *TPMT*-VNTR allele carrying more than six repeats. These alleles may show a bias toward a higher number of A than B repeats according to reported *TPMT*-VNTR allele frequencies (Urbančič et al., 2018).

According to Kotur et al. (2015), carriers of the *7a allele had the lowest average of *TPMT* gene expression level and the least increase in its expression level during chemotherapy. Interestingly, six of our 11 patients, belonging to risk group 2 ($A \geq 5$), carry the *7a allele. Unfortunately, there are no other studies about *TPMT* expression in patients carrying the other *TPMT*-VNTR alleles belonging to risk group 2 (*5b, *6c, and *8a).

The relevance of genetic ancestry in 6-MP therapy has been demonstrated by several examples such as hematological toxicity observed in patients carrying *NUDT15* variants, which is more frequent in Asian and South American populations (Yang et al., 2014; Soler et al., 2018). Global ancestry proportions were similar to those observed in previous studies and confirmed the trihybrid structure of the Uruguayan population (Sans et al., 1997; Sans et al., 2006; Bonilla et al., 2015). At the individual level, the observed wide variation was also similar to the previous report (Bonilla et al., 2015) (Supplementary Figure S2A).

Even though we found a significant negative correlation between the total number of leukopenia events and Native American ancestry in patients without *TPMT* and/or *NUDT15* variants (Supplementary Table S4), this correlation was no longer significant when risk groups were taken into consideration ($p =$

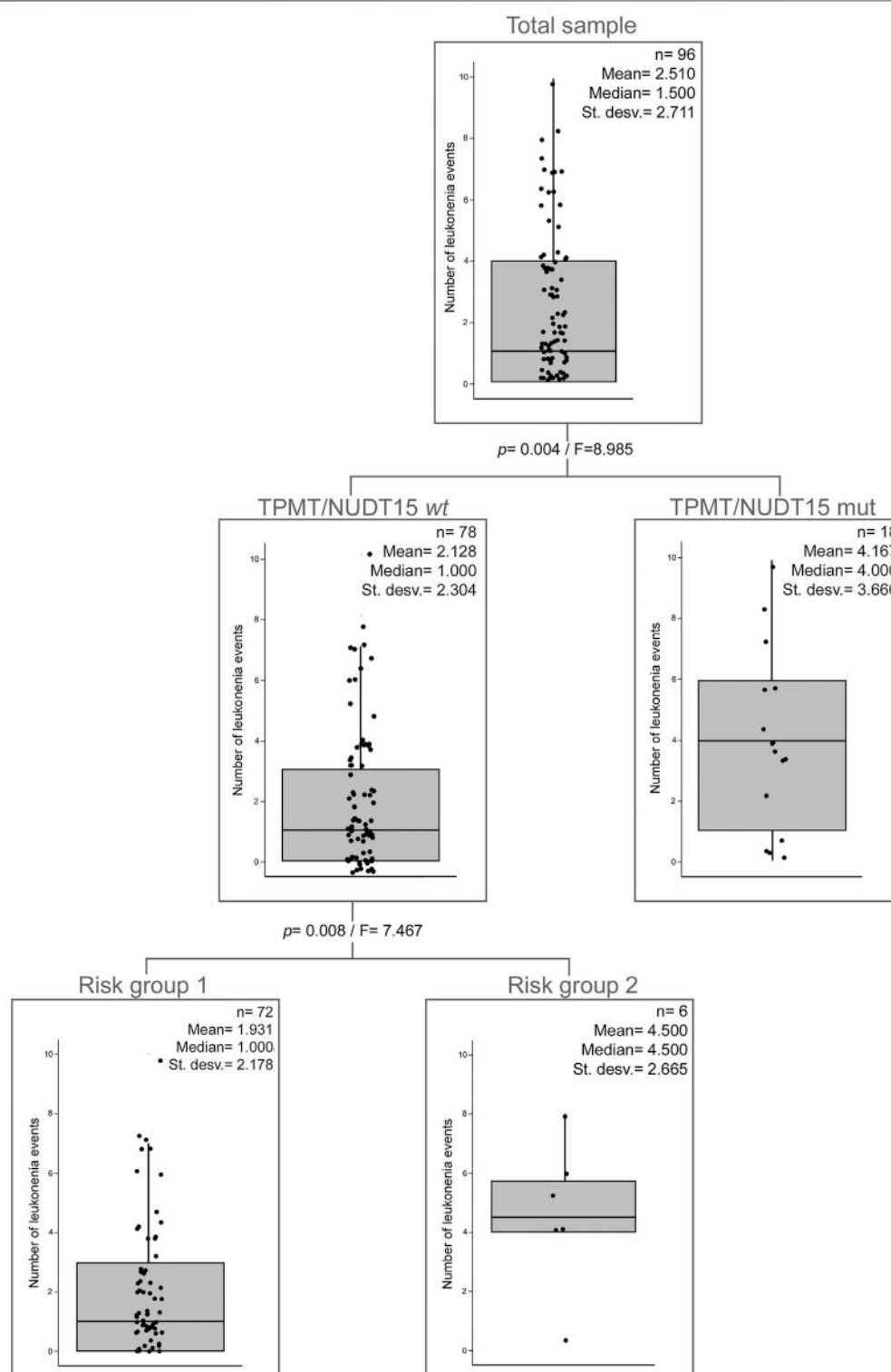


FIGURE 1 | Classification tree of the number of leukopenia events. Presence/absence of *TPMT* and/or *NUDT15* mutations, risk groups, and Native American ancestry (cutoff = 15%) were taken as categorical variables. *TPMT/NUDT15wt*: *TPMT**1 and *NUDT15**1. *TPMT/NUDT15mut*: *TPMT* and/or *NUDT15* mutated. Risk group 1: $A < 5$. Risk group 2: $A \geq 5$.

0.120). This may show that *TPMT*-VNTR alleles are more relevant than Native American ancestry. A heterogeneous distribution of *TPMT*-VNTR alleles among ancestral populations may explain the loss of the correlation between Native American ancestry and the total number of leukopenia events. However, although *TPMT*-VNTR frequencies in Asian and Native American populations are scarce, these data do not support this hypothesis (Marinaki et al., 2003; Urbančič et al., 2018). Another possible explanation is microevolutionary factors as genetic drift or founder effects, causing different levels of ancestry between risk groups.

Despite the significant association between the number of leukopenia events and risk group 2, as visualized at the classification tree and consistent with previous reports (Zukic et al., 2010; Kotur et al., 2012; Kotur et al., 2015), we must be cautious with this result due to the small sample size and the low number of patients with five or more A repeats analyzed in this study. Nevertheless, considering that Uruguay has only 3.5 million inhabitants and presents approximately 25 new ALL pediatric patients per year, a 130-individual sample represents more than 5 years of ALL patients in our country.

Furthermore, additionally to *NUDT15* and *TPMT*, there are other genes involved in 6-MP metabolism, like *ITPA* or *ABCC4*, which may influence in the hematological toxicity (Hareedy et al., 2015; Tanaka et al., 2015; Tanaka et al., 2018).

Although we found a clear association between risk group 2 and the number of leukopenia events, this association was not reflected in 6-MP dose. This could be due to a weaker effect of *TPMT*-VNTR compared with other genetic factors such as *TPMT* and *NUDT15* variants. Additionally, the decision to modify 6-MP dose is based on empirical information, and thus relative to the patient general state and to medical staff.

To our knowledge, this is the first report that studied the relationship between *TPMT*-VNTR alleles and clinical data, stratifying the sample by *TPMT* and/or *NUDT15* mutations.

In summary, we confirm the previous reported association between *4a and *4b *TPMT*-VNTR alleles with *TPMT**2 and *TPMT**3C, respectively. However, we did not find the reported association between *TPMT*-VNTR pattern ABnC ($n \geq 2$) and *TPMT**3A, suggesting a greater heterogeneity in the genetic background of patients carrying this variant. Moreover, a higher number of A repeats might be a risk factor for suffering leukopenia events. Finally, our results support the hypothesis that transcriptional genetic modifiers, such as the VNTR region in the *TPMT* promoter, may be used as a pharmacogenetic biomarker and could contribute to the design of personalized ALL childhood therapy.

REFERENCES

- Alves, S., Amorim, A., Ferreira, F., and Prata, M. J. (2001). Influence of the variable number of tandem repeats located in the promoter region of the thiopurine methyltransferase gene on enzymatic activity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 70 (2), 165–174. doi:10.1067/mcp.2001.117284
- Alves, S., Amorim, A., and Prata, M. (2002). Evolution of a VNTR located within the promoter region of the thiopurine methyltransferase gene: inferences from population and sequence data. *Hum. Genet.* 111 (2), 172–178. doi:10.1007/s00439-002-0784-5

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusion of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Comité de Ética en Investigación Institucional, Centro Universitario Regional (CENUR) Litoral Norte, Universidad de la República (UdelaR). Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AS, JL, and GB-R designed the study, analyzed clinical and genetic data, and drafted the manuscript. BB and JS participated in the ancestry analyses. LC, AD, YM, and NO were responsible for patients' recruitment and helped in the analyses of clinical data.

FUNDING

Financial support from Centro Universitario Regional (CENUR) Litoral Norte, Universidad de la República (UdelaR) (2017–2019), and Comisión Sectorial de Investigación Científica-Vinculación Universidad Sociedad y Producción Modalidad 2, Universidad de la República (CSIC-VUSP-Mod. 2 2016, UdelaR).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to all the patients and parents who kindly participated in this study, as well as the Servicio Hemato Oncológico Pediátrico (SHOP)-Centro Hospitalario Pereira Rossell (CHPR) staff.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.594262/full#supplementary-material>

- Ameyaw, M. M., Collie-Duguid, E. S., Powrie, R. H., Ofori-Adjei, D., and McLeod, H. L. (1999). Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanaian populations. *Hum. Mol. Genet.* 8 (2), 367–370. doi:10.1093/hmg/8.2.367
- Appell, M. L., Berg, J., Duley, J., Evans, W. E., Kennedy, M. A., Lennard, L., et al. (2013). Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenetics Genom.* 23 (4), 242. doi:10.1097/FPC.0b013e32835f1cc0
- Bonilla, C., Bertoni, B., Hidalgo, P. C., Artagaveytia, N., Ackermann, E., Barreto, I., et al. (2015). Breast cancer risk and genetic ancestry: a case-control study in Uruguay. *BMC Women's Health* 15 (1), 11. doi:10.1186/s12905-015-0171-8.

- Bucheli, M., and Cabella, W. (2010). El perfil demográfico y socioeconómico de la población uruguaya según su ascendencia racial. *Notas de población*, Año XXXVII, N° 91, Naciones Unidas, Santiago de Chile.
- Cao, M., Yin, D., Qin, Y., Liao, F., Su, Y., Xia, X., et al. (2020) Screening of novel pharmacogenetic candidates for mercaptopurine-induced toxicity in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Front. Pharmacol.* 11, 267. doi:10.3389/fphar.2020.00267
- Cargnin, S., Genazzani, A. A., Canonico, P. L., and Terrazzino, S. (2018). Diagnostic accuracy of NUDT15 gene variants for thiopurine-induced leukopenia: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacol. Res.* 135, 102–111. doi:10.1016/j.phrs.2018.07.021
- Castillo, L., Dabiez, A., Dufort, G., Carracedo, M., Castiglioni, M., Simón, E., et al. (2012). Evolucion del cáncer pediátrico en Uruguay (1992–2011). *Arch. Pediatr. del Urug.* 83 (1), 26–30.
- Chouchana, L., Narjoz, C., Roche, D., Golmard, J. L., Pineau, B., Chatellier, G., et al. (2014). Interindividual variability in TPMT enzyme activity: 10 years of experience with thiopurine pharmacogenetics and therapeutic drug monitoring. *Pharmacogenomics* 15 (6), 745–757. doi:10.2217/pgs.14.32
- Chrzanowska, M., Kuehn, M., Januszkiewicz-Lewandowska, D., Kurzawski, M., and Drożdżik, M. (2012). Thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in children with acute lymphoblastic leukemia. *Acta Pol. Pharm.* 69 (3), 405–410.
- Excoffier, L., and Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under linux and windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10 (3), 564–567. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Fabre, M. A., Jones, D. C., Bunce, M., Morris, P. J., Friend, P. J., Welsh, K. I., et al. (2004). The impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphisms on azathioprine dose 1 year after renal transplantation. *Transpl. Int.* 17 (9), 531–539. doi:10.1111/j.1432-2277.2004.tb00483.x
- Hareedy, M. S., El Desoky, E. S., Woillard, J. B., Thabet, R. H., Ali, A. M., Marquet, P., et al. (2015). Genetic variants in 6-mercaptopurine pathway as potential factors of hematological toxicity in acute lymphoblastic leukemia patients. *Pharmacogenomics* 16 (10), 1119–1134. doi:10.2217/pgs.15.62
- Kotur, N., Dokmanovic, L., Janic, D., Stankovic, B., Krstovski, N., Tosic, N., et al. (2015). TPMT gene expression is increased during maintenance therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia patients in a TPMT gene promoter variable number of tandem repeat-dependent manner. *Pharmacogenomics* 16 (15), 1701–1712. doi:10.2217/pgs.15.109
- Kotur, N., Stankovic, B., Kassela, K., Georgitsi, M., Vicha, A., Leontari, I., et al. (2012). 6-mercaptopurine influences TPMT gene transcription in a TPMT gene promoter variable number of tandem repeats-dependent manner. *Pharmacogenomics* 13 (3), 283–295. doi:10.2217/pgs.11.153
- Marinaki, A. M., Arenas, M., Khan, Z. H., Lewis, C. M., Shobowale-Bakre, E. M., Escuredo, E., et al. (2003). Genetic determinants of the thiopurine methyltransferase intermediate activity phenotype in British Asians and Caucasians. *Pharmacogenetics Genom.* 13 (2), 97–105. doi:10.1097/00008571-200302000-00006
- Miller, S. A., Dykes, D. D., and Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16 (3), 1215. doi:10.1093/nar/16.3.1215
- Moriyama, T., Nishii, R., Perez-Andreu, V., Yang, W., Klusmann, F. A., Zhao, X., et al. (2016). NUDT15 polymorphisms alter thiopurine metabolism and hematopoietic toxicity. *Nat. Genet.* 48 (4), 367–373. doi:10.1038/ng.3508
- Pan, B. F., and Nelson, J. A. (1990). Characterization of the DNA damage in 6-thioguanine-treated cells. *Biochem. Pharmacol.* 40 (5), 1063–1069. doi:10.1016/0006-2952(90)90494-6
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155 (2), 945–959.
- Relling, M. V., Gardner, E. E., Sandborn, W. J., Schmiegelow, K., Pui, C. H., Yee, S. W., et al. (2011). Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89 (3), 387–391. doi:10.1038/clpt.2010.320
- Sans, M., Merriwether, D. A., Hidalgo, P. C., Bentancor, N., Weimer, T. A., Franco, M. H. L., et al. (2006). Population structure and admixture in Cerro Largo, Uruguay, based on blood markers and mitochondrial DNA polymorphisms. *Am. J. Hum. Biol.* 18 (4), 513–524. doi:10.1002/ajhb.20520
- Sans, M., Salzano, F. M., and Chakraborty, R. (1997). Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. *Hum. Biol.* 69 (2), 161–170.
- Soler, A. M., Olano, N., Méndez, Y., Lopes, A., Silveira, A., Dabiez, A., et al. (2018). TPMT and NUDT 15 genes are both related to mercaptopurine intolerance in acute lymphoblastic leukaemia patients from Uruguay. *Br. J. Haematol.* 181 (2), 252–255. doi:10.1111/bjh.14532
- Spire-Vayron de la Moureyre, C., Debuysère, H., Fazio, F., Sergeant, E., Bernard, C., Sabbagh, N., et al. (1999). Characterization of a variable number tandem repeat region in the thiopurine S-methyltransferase gene promoter. *Pharmacogenetics* 9 (2), 189–198.
- Spire Vayron de la Moureyre, C., Debuysere, H., Mastain, B., Vinner, E., Marez, D., Lo Guidice, J. M., et al. (1998). Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *Br. J. Pharmacol.* 125 (4), 879–887. doi:10.1038/sj.bjp.0702152
- Tanaka, Y., Manabe, A., Fukushima, H., Suzuki, R., Nakadate, H., Kondoh, K., et al. (2015). Multidrug resistance protein 4 (MRP4) polymorphisms impact the 6-mercaptopurine dose tolerance during maintenance therapy in Japanese childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* 15 (4), 380–384. doi:10.1038/tpj.2014.74
- Tanaka, Y., Nakadate, H., Kondoh, K., Nakamura, K., Koh, K., and Manabe, A. (2018). Interaction between NUDT15 and ABCC4 variants enhances intolerance of 6-mercaptopurine in Japanese patients with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* 18 (2), 275–280. doi:10.1038/tpj.2017.12
- Urbančič, D., Šmid, A., Stocco, G., Decorti, G., Mlinarič-Raščan, I., and Karas Kuželički, N. (2018). Novel motif of variable number of tandem repeats in TPMT promoter region and evolutionary association of variable number of tandem repeats with TPMT* 3 alleles. *Pharmacogenomics* 19 (17), 1311–1322. doi:10.2217/pgs-2018-0123
- Vergnaud, G., and Denoeud, F. (2000). Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Res.* 10 (7), 899–907. doi:10.1101/gr.10.7.899
- Yaeger, R., Avila-Bront, A., Abdul, K., Nolan, P. C., Grann, V. R., Bichette, M. G., et al. (2008). Comparing genetic ancestry and self-described race in African Americans born in the United States and in Africa. *Cancer Epidemiol.* 17 (6), 1329–1338. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-2505
- Yan, L., Zhang, S., Eiff, B., Szumlanski, C. L., Powers, M., O'Brien, J. F., et al. (2000). Thiopurine methyltransferase polymorphic tandem repeat: genotype-phenotype correlation analysis. *Clin. Pharmacol. Ther.* 68 (2), 210–219. doi:10.1067/mcp.2000.108674
- Yang, S. K., Hong, M., Baek, J., Choi, H., Zhao, W., Jung, Y., et al. (2014). A common missense variant in NUDT15 confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia. *Nat. Genet.* 46 (9), 1017. doi:10.1038/ng.3060
- Zukic, B., Radmilovic, M., Stojiljkovic, M., Tosic, N., Pourfarzad, F., and Dokmanovic, L., et al. (2010). Functional analysis of the role of the TPMT gene promoter VNTR polymorphism in TPMT gene transcription. *Pharmacogenomics* 11 (4), 547–557. doi:10.2217/pgs.10.7

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Burgueño-Rodríguez, Méndez, Olano, Dabiez, Bertoni, Souto, Castillo, da Luz Pereira and Soler. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Table 3. Spearman correlation between 6-MP cumulative dose and the number of A, B and A + B repeats.

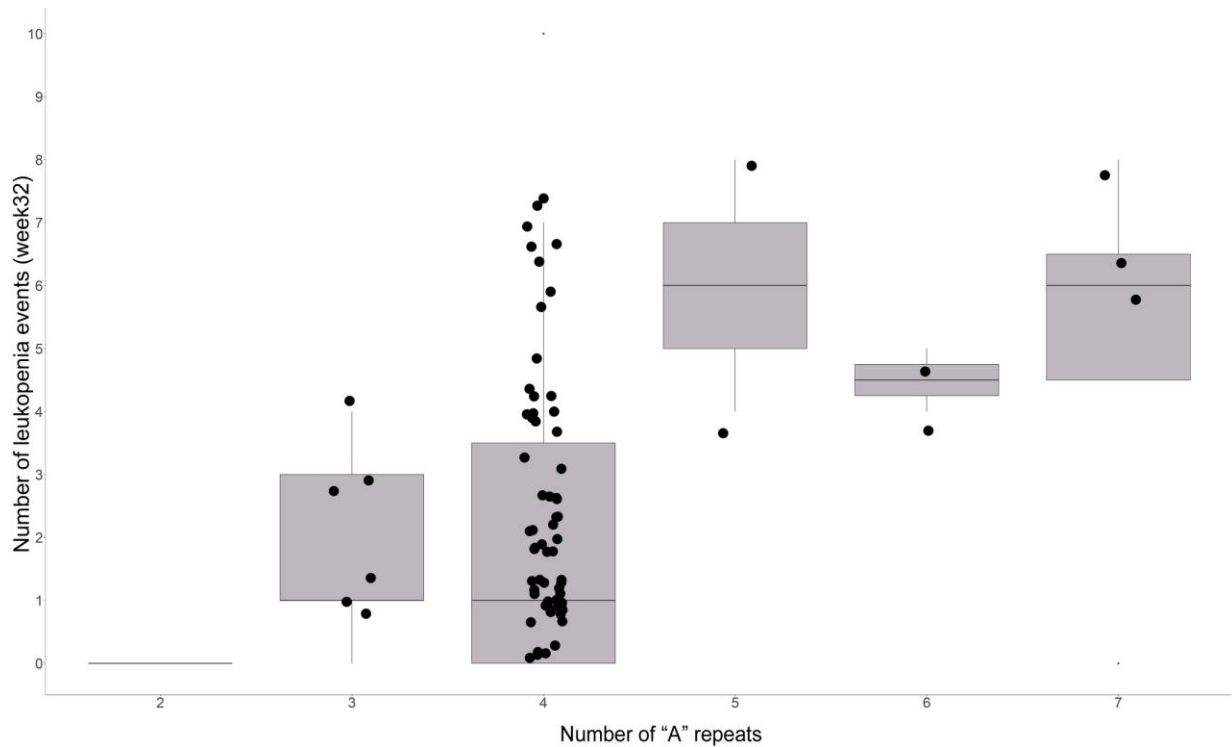
	A		B		A + B	
	r	p	r	p	r	p
Week 8	-0.077	0.227	0.010	0.461	-0.045	0.333
Week 16	0.051	0.312	-0.040	0.348	-0.025	0.405
Week 24	0.026	0.402	-0.029	0.390	-0.023	0.411
Week 32	0.010	0.461	-0.043	0.341	-0.040	0.352
Mean weekly dose	0.064	0.265	-0.044	0.335	-0.010	0.460

r: Spearman correlation coefficient. p: p-value

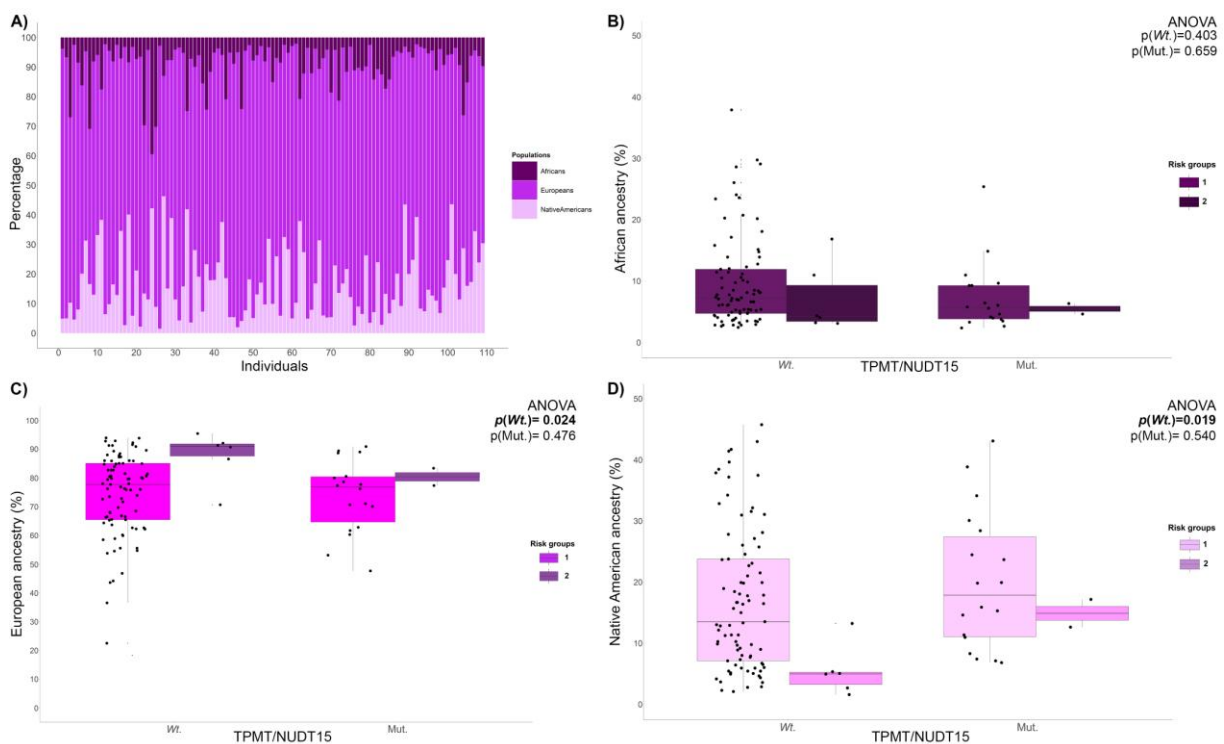
Supplementary Table 4. Spearman correlation between number leukopenia events and individual ancestry.

Interval (weeks)		European		Native American		African	
		r	p	r	p	r	p
1-8	Total	-0.045	0.665	-0.004	0.967	0.053	0.615
	wt	-0.011	0.922	-0.071	0.540	0.053	0.648
	mut	-0.105	0.689	0.211	0.417	0.155	0.551
9-16	Total	0.092	0.375	-0.134	0.199	-0.035	0.737
	wt	0.100	0.388	-0.192	0.095	0.034	0.770
	mut	-0.087	0.739	0.121	0.644	-0.079	0.763
17-24	Total	0.160	0.124	-0.170	0.102	-0.037	0.721
	wt	0.167	0.147	-0.219	0.056	0.016	0.889
	mut	0.130	0.619	-0.070	0.790	-0.179	0.491
25-32	Total	0.094	0.367	-0.046	0.660	-0.060	0.566
	wt	0.090	0.436	-0.069	0.549	-0.038	0.740
	mut	0.165	0.527	-0.032	0.902	-0.102	0.698
Total (32 weeks)	Total	0.149	0.153	-0.187	0.070	-0.029	0.780
	wt	0.154	0.181	-0.243	0.032	0.011	0.927
	mut	0.038	0.884	0.032	0.902	-0.028	0.915

Total: all patients; wt: Patients without *TPMT* or *NUDT15* variants; mut: Patients with *TPMT* and/or *NUDT15* variants. r: Spearman correlation coefficient. p: p-value.



Supplementary Figure 1. Number of leukopenia events at week 32 vs the amount of A repeats within the *TPMT*-VNTR.



Supplementary Figure 2. Ancestry and risk groups. **A)** Ancestral genetics proportions of 111 patients with ALL. Each vertical bar along the x axis represents an individual and the bars are colored according to the individual genetic ancestry (dark purple: African, violet: European and pink: Native American). **B, C and D)** ANOVA of ancestral component (**B**: African, **C**: European, **D**: Native American) for each risk group in *TPMT* and/or *NUDT15* mutated (Mut) and not mutated (Wt) patients.

CAPÍTULO 4

FARMACOGENÉTICA DEL METOTREXATO EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA PEDIÁTRICA de URUGUAY

4.1 INTRODUCCIÓN

4.1.1 Metotrexato (MTX)

El metotrexato (MTX) es un antimetabolito de la familia de los folatos, con actividad antiproliferativa e inmunosupresora. Debido a su eficacia, desde la década del 50, es ampliamente utilizado en tratamientos contra el cáncer y enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (Rudin et al., 2017). Actualmente, es uno de los principales fármacos del tratamiento de LLA infantil, puesto que es administrado en todas las fases del mismo mediante diferentes vías (intratecal, intravenosa u oral) y a diferentes dosis (alta, mediana y baja). Sin embargo, los tratamientos con MTX están asociados a un gran número de efectos adversos, incluyendo hepatotoxicidad, toxicidad renal, pulmonar, hematológica y neurológica, que pueden conducir incluso a la interrupción del tratamiento (Cortese & Motii, 2001; Gibody et al., 2007; Yang et al., 2012; Kaluzna et al., 2015). La incidencia máxima de mucositis, mielosupresión y plaquetopenia ocurre entre 5 y 10 días después de su administración.

El MTX es un análogo estructural del ácido fólico que se encuentra cargado negativamente y que posee escasa solubilidad en agua (Lima, 2014). El ácido fólico es un factor esencial de los alimentos. De él derivan una serie de cofactores de tetrahidrofolato (THF) que aportan grupos de carbono únicos para la síntesis de precursores del ADN (timidilato y purinas) y del ARN (Cheok & Evans, 2006; Radtke et al., 2013). Por lo tanto, la correcta regulación de la vía metabólica del ácido fólico y de todos sus intermediarios es esencial para mantener la síntesis de purinas y pirimidinas, así como también la interconversión de ciertos aminoácidos (Chango et al., 2000). Para actuar como cofactor en reacciones de transferencia de un carbono, el ácido fólico debe ser reducido a tetrahidrofolato por la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR).

El MTX ingresa a las células por el transportador de folato reducido SLC19A1 o por transportadores de aniones orgánicos como el SLC01B1 (Levy et al., 2003; Radtke et al., 2013; Kodidela et al., 2014). Sin embargo, cuando las concentraciones plasmáticas de MTX son elevadas, este puede entrar a la célula por difusión pasiva. Una vez dentro de la célula, el MTX se metaboliza dando lugar a su forma de mayor actividad, la poliglutamada (MTX-PG_n) (Salazar

et al., 2014). El balance entre las dos formas se debe a las enzimas gamma glutamil hidrolasa (GGH) y folilpoliglutamato sintetasa (FPGS). El MTX y su forma poliglutamada inhiben competitivamente a la enzima DHFR (Figura 15) (Levy et al., 2003; Cheok & Evans, 2006; Eektimmerman et al., 2019). Esta inhibición impide la formación de THF (Radtko et al., 2013) y como consecuencia la inhibición de la síntesis de purinas (López-López et al., 2014; Salazar et

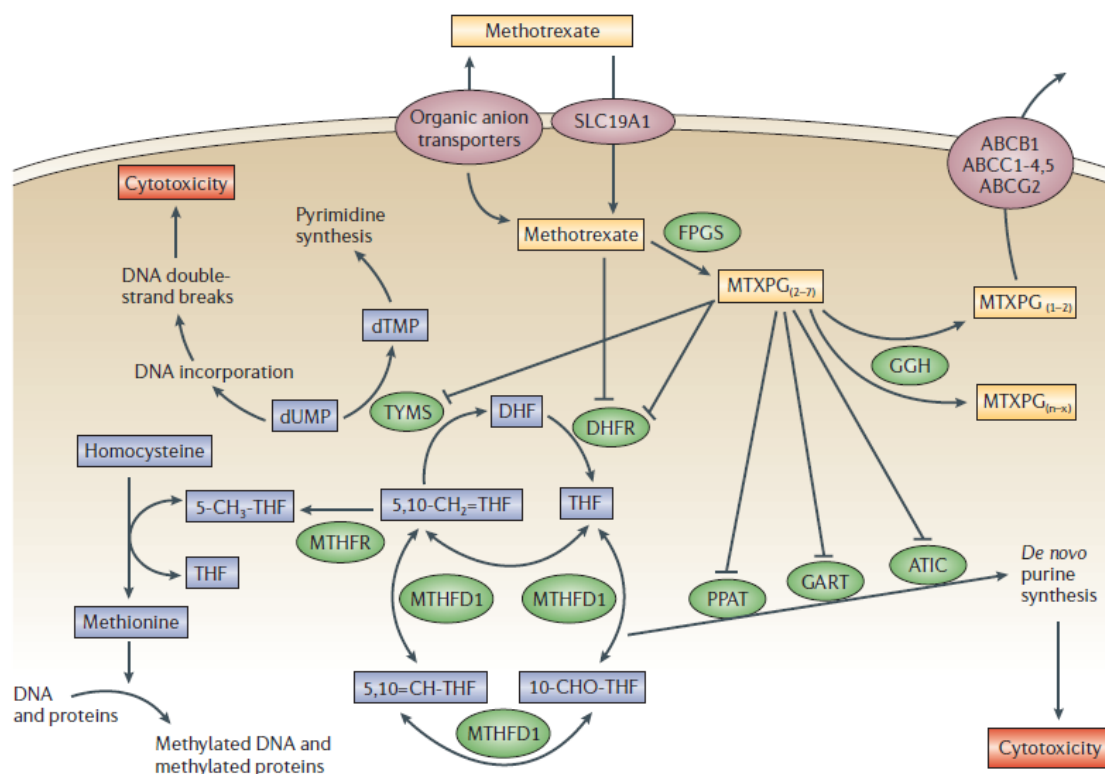


Figura 15. Vía metabólica del folato y metabolismo del Metotrexato. 5-CH₃-THF: 5-metiltetrahidrofolato. 5,10-CH-THF: 5,10-meteniltetrahidrofolato. 5,10-CH₂-THF: 5,10-metiltetrahidrofolato. 10-CHO-THF: 10-formiltetrahidrofolato. ABCB1; ABCC1-4,5; ABCG2: transportadores de membrana superfamilia ABC dependientes de ATP (ATP binding cassette). DHF: dihidrofolato. DHFR: dihidrofolato reductasa. dTMP: desoxitimidina monofosfato. dUMP: desoxiuridina monofosfato. FPGS: folilpoliglutamato sintetasa. GGH: gamma glutamil hidrolasa. MTHFD1: metilpentahidrofolato deshidrogenasa 1. MTHFR: metilpentahidrofolato reductasa. MTXPG_(n): metotrexato poliglutamado. SLC19A1: transportador de membrana de la superfamilia SLC. THF: tetrahidrofolato. TYMS: timidilato sintasa (Cheok & Evans, 2006).

al., 2014) y la muerte celular por apoptosis (Levy et al., 2003). Los efectos inhibidores del MTX dependen de sus concentraciones intracelulares, siendo los tejidos con mayor metabolismo celular y con crecimiento más rápido, como por ejemplo las células tumorales o las del epitelio gastrointestinal, los más afectados (Gorlick et al., 1997).

A su vez, el MTX-PG_n inhibe la enzima timidilato sintasa (TYMS) (Kodidela et al., 2014). Esta enzima cataliza la metilación de deoxiuridina monofosfato (dUMP) en deoxitimidina monofosfato (dTMP), que es un precursor de la síntesis de pirimidinas. Por tanto, la inhibición de TYMS por parte del MTX-PG disminuye la síntesis de pirimidinas (Salazar et al., 2014). Asimismo, esta inhibición aumenta relativamente el pool de dUMP, que se incorpora al ADN y produce citotoxicidad (Cheok & Evans, 2006).

El metabolismo del ácido fólico (y del MTX) es complejo e involucra muchas enzimas. Por ejemplo, la metilentetrahidrofolato deshidrogenasa 1 (MTHFD1), la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y la serina hidroximetiltransferasa 1 (SHMT1) suministran cofactores y/o sustratos en varias reacciones enzimáticas de dicha vía metabólica (Cheok & Evans, 2006; López-López et al., 2011; Radtke et al. 2013; López-López et al., 2014; Salazar et al., 2014). Estas enzimas no son inhibidas directamente por el MTX, pero son fundamentales para la correcta regulación del mismo. De manera simplificada, la figura 15 ilustra la vía metabólica del folato y del MTX. Por último, el MTX es eliminado de la célula mediante transportadores de membrana de la superfamilia ABC (ABCB1, ABCC1-4 y ABCG2) dependientes de ATP (Cheok & Evans, 2006; Radtke et al. 2013).

Estudios previos han demostrado que diversos polimorfismos en los genes que codifican para las enzimas involucradas en el transporte y metabolismo del MTX podrían influir en la respuesta al tratamiento, en el riesgo de recaída y/o producir eventos de toxicidad (Pietrzyk et al., 2011; Yang et al., 2012; Radtke et al., 2013; Salazar et al., 2014; te Loo et al., 2014). Sin embargo, hasta el momento, no existe ninguna guía farmacogenética aprobada por la FDA para el uso de este fármaco (Rudin et al., 2017; FDA, 2021). Por esta razón, determinar la asociación entre las variantes génicas y la toxicidad debido a este fármaco, permitiría optimizar la terapia y minimizar la exposición de los pacientes a eventos tóxicos. Teniendo en cuenta los datos previamente reportados en la bibliografía, en esta tesis se analizarán únicamente los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS*.

4.1.2 Metilenetetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

El gen *MTHFR*, de 2,2 Kb, está compuesto por 11 exones y se encuentra localizado en el cromosoma 1 (1p36.22) (Kaluzna et al., 2015). Codifica para la enzima 5,10-metilenetetrahidrofolato reductasa (MTHFR) de 656 aminoácidos, que cataliza de manera irreversible la conversión del 5,10-Metilenetetrahidrofolato (5,10-CH₂=THF) en 5-metiltetrahidrofolato (5-CH₃-THF). Este compuesto sirve como donador de grupos metilo para

la remetilación de la homocisteína en metionina, aminoácido esencial en la síntesis de proteínas (Figura 15) (Chango et al., 2000; Balta et al., 2003; Cheok & Evans, 2006; Tanaka et al., 2014; Kaluzna et al., 2015; Pei et al., 2015).

Este gen presenta un polimorfismo (rs1801133), una transición de C a T en la posición 677 (c.677C>T) en el exón 5, que resulta en el cambio de una alanina por una valina en el codón 222 (p.Ala222Val) (Robien & Ulrich, 2003). Se ha visto que individuos homocigotos TT presentan niveles de homocisteína plasmática significativamente mayores a los que presentan individuos con genotipos CT y CC (Chango et al., 2000; Balta et al., 2003; Kaluzna et al., 2015). Estudios previos han reportado que esta variante produce una enzima menos estable y con una actividad reducida, lo que altera el metabolismo del folato y la síntesis de ADN (Kaluzna et al., 2015; Pei et al., 2015). Individuos heterocigotos CT para este polimorfismo presentan 60% de actividad en comparación con aquellos de genotipo *wild type* CC; mientras que los individuos homocigotos TT presentan solamente 30% de actividad (Robien & Ulrich 2003; Tanaka et al., 2014; Kaluzna et al., 2015; Pei et al., 2015). Este polimorfismo ha sido ampliamente estudiado debido a que se ha visto asociado con problemas cardiovasculares (Cortese & Motti, 2001; Tripathi et al., 2010), protrombóticos (Frosst et al., 1995) y psiquiátricos (Gilbody et al., 2006). A su vez, algunos autores señalan que este polimorfismo influye en la respuesta a agentes antifolato, como el MTX, o que se encuentra asociado a una mayor toxicidad hepática, gastrointestinal y hematológica debida al MTX (Imanishi et al., 2007; Ongaro et al., 2009; Haase et al., 2012; Kaluzna et al., 2015; Esmaili et al., 2020). Sin embargo, otros autores reportan que no existe una asociación entre esta variante y los eventos de toxicidad debidas a MTX (Shimasaki et al., 2006; López-López et al. 2011; Chiusolo et al., 2012). Por otro lado, se ha reportado que el genotipo TT influye en la supervivencia libre de enfermedad y la toxicidad hepática en pacientes con LLA tratados con MTX (Krajinovic et al., 2004; Chiusolo et al., 2007; Tanaka et al., 2014; te Loo et al., 2014; Kaluzna et al., 2015).

La prevalencia del genotipo TT varía entre diferentes grupos étnicos. Según Cortese & Motti (2001) en poblaciones africanas la prevalencia de este genotipo es muy baja, mientras que en poblaciones europeas o de América del Norte varía entre 5% y 15%. Sin embargo, en algunas regiones de Italia alcanza el 21% (Cortese & Motti, 2001). Otros estudios realizados en poblaciones de Japón y la India reportan una frecuencia de homocigotos TT de 35% y 2,8%, respectivamente (Imanishi et al., 2007; Tripathi et al., 2010). Según la base de datos "1000 genomas", la frecuencia del alelo T en poblaciones africanas es cercana al 12%, en poblaciones

del sur de Asia es aproximadamente 17%, mientras que en poblaciones europeas, de Asia o del este asiático alcanzan el 33%-38% (1000 Genomes Project Consortium, 2015).

Este gen presenta otro polimorfismo (rs1801131), una transición de A a C en la posición 1298 (c. 1298 A>C) en el exón 8, que resulta en el cambio de un ácido glutámico por una alanina en el condón 429 (p.Glu429Ala) (Robien & Ulrich, 2003). Los individuos homocigotos CC presentan 60% de actividad enzimática respecto a los individuos de genotipo AA (Kaluzna et al., 2015; Pei et al., 2015). Por otro lado, se ha visto que pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), enfermedades gastrointestinales y LLA, que son tratados con MTX y son homocigotos CC para este polimorfismo, tendrían un mayor riesgo de presentar efectos adversos en comparación a aquellos con genotipo AA (Kaluzna et al., 2015). Sin embargo, otros autores reportan que pacientes portadores de esta variante presentan menos toxicidad hematológica y hepática (Chiusolo et al., 2012; Esmaili et al., 2020).

Al igual que lo reportado para el polimorfismo c.677C>T, la frecuencia de este polimorfismo varía entre las diferentes poblaciones estudiadas. La frecuencia del alelo variante (C) en poblaciones caucásicas es aproximadamente 31% (Robien et al., 2003; Haase et al., 2012; Kaluzna et al., 2015), mientras que en poblaciones africanas varía entre 13% y 16%, y en poblaciones asiáticas o del este asiático es cercana al 20% (Kim et al., 2012; Tanaka et al., 2014; 1000 Genomes Project Consortium, 2015). Las frecuencias reportadas para poblaciones de Latinoamérica son cercanas al 20%, mientras que las poblaciones del sur de Asia son las que presentan la frecuencia más alta, alcanzando el 41% (1000 Genomes Project Consortium, 2015).

Otros cuatro polimorfismos han sido descritos para este gen en las posiciones 1059, 1289, 1317 y 1793. Sin embargo, estos son menos frecuentes que los polimorfismos 677C>T o 1298A>C, y su posible asociación con los eventos de toxicidad debida a MTX aun no ha sido estudiada en detalle (Robien & Ulrich, 2003).

MTHFR es una enzima fundamental de la vía metabólica del folato. Por tanto, la variabilidad del gen que la codifica podría influir sobre la toxicidad debida al MTX en el tratamiento de LLA infantil. Considerando que, los datos reportados por diferentes autores sobre la posible asociación entre las variantes de este gen y los eventos de toxicidad son discordantes, se decidió analizar dichos polimorfismos en nuestros pacientes.

4.1.3 Transportador de Folato reducido (SLC19A1)

El gen *SLC19A1*, localizado en el cromosoma 21 (21q22.32), está formado por 17 exones y codifica para el transportador de membrana de 591 aminoácidos homónimo (Niedzielska et al., 2013). Este transportador es el responsable de la captación celular y transporte de folato reducido; es decir, regula las concentraciones intracelulares de folato (Chango et al., 2000). Se expresa en todos los órganos del cuerpo y es utilizado por el MTX para ingresar a las células (Zhao & Goldman, 2013). Por lo tanto, la concentración plasmática de MTX y la cantidad de MTX residual en el hígado está determinada, en parte, por este transportador. Además, se piensa que la distribución de MTX hacia los tejidos también estaría mediada por *SLC19A1* (Zhao & Goldman, 2013).

Este gen presenta un polimorfismo (rs1051266), una transición de G a A en la posición 80, en el exón 2 (c.80G>A), que resulta en el cambio de una arginina por una histidina en el codón 27 (p.Arg27His) (Chango et al., 2000; Whetstine et al., 2001). Este polimorfismo ha sido asociado con niveles alterados de folato y homocisteína (Chango et al., 2000; Ashton et al., 2009) y con concentraciones plasmáticas de MTX más altas (Laverdière et al., 2002; Cwiklinska et al., 2020). Sin embargo, en un estudio donde se comparó directamente la funcionalidad del transportador formado con histidina (alelo G) y aquel formado con arginina (alelo A), no se encontraron diferencias significativas en la capacidad de transportar MTX y MTX-PG_n (Whetstine et al., 2001).

Por otro lado, este polimorfismo se ha visto asociado con un aumento de la tasa de recaída de LLA pediátrica (Laverdière et al., 2002; Cheok & Evans, 2006). Específicamente, se ha reportado que pacientes con niveles más bajos de expresión del gen *SLC19A1* presentan un transporte de MTX deficiente y que tienen una menor sobrevida libre de enfermedad (Gorlick et al., 1997; Levy et al., 2003; Ge et al., 2007). Asimismo, se ha visto que la frecuencia de este polimorfismo es mayor en el subgrupo de pacientes que presentaron algún evento de recaída (o desenlace fatal) que en aquellos que no tuvieron ningún evento (Laverdière et al., 2002).

Finalmente, se ha visto que los pacientes portadores del alelo A tienen mayor riesgo de presentar algún evento de hepatotoxicidad (Laverdière et al., 2002; Imanishi et al., 2007; Qiu et al., 2017; Cwiklinska et al., 2020; Esmaili et al., 2020). Debido a la reducción de la actividad de la enzima *SLC19A1*, los pacientes homocigotos AA tienen una mayor cantidad de MTX residual, lo que provoca un aumento significativo de hepatotoxicidad y toxicidad gastrointestinal inducida por MTX (Imanishi et al., 2007).

A diferencia de los polimorfismos previamente descritos en esta tesis para otros genes, la frecuencia de este polimorfismo no varía mucho entre las distintas poblaciones, siendo considerablemente frecuente en todas las poblaciones estudiadas hasta el momento. La frecuencia del alelo A en poblaciones europeas, latinoamericanas y del sur de Asia es 41%-46%, mientras que en poblaciones africanas, asiáticas y del este asiático varía entre el 55% y 64% (1000 Genomes Project Consortium, 2015). Estudios realizados en poblaciones de Francia, Estados Unidos, Polonia, Australia/Nueva Zelanda y Japón reportan frecuencias de homocigotos AA de 22%, 33%, 29%, 13,5% y 31%, respectivamente (Chango et al, 2000; Whetstine et al., 2001; Imanishi et al., 2007; Ashton et al 2009; Cwiklinska et al., 2020).

4.1.4 Timidilato sintasa (TYMS)

El gen *TYMS* está compuesto por 8 exones y se encuentra localizado en el cromosoma 18 (18p11.32). Codifica para la enzima timidilato sintasa (TYMS), una metiltransferasa de 312 aminoácidos y 35,5KDa, que cataliza la conversión de desoxiuridina monofosfato (dUMP) a dextimidina monofostato (dTMP), compuesto esencial para la síntesis de pirimidinas (Marsh et al., 2000; Mandola et al., 2003; Cheok & Evans, 2006; Nief et al., 2007; Kodidela et al., 2014). Estudios previos han mostrado que el nivel de expresión de este gen influye sobre el efecto de los agentes antifolatos tales como el MTX (Krajinovic et al., 2004; Cheok & Evans, 2006) y el 5-fluorouracilo (5-FU) (Danenberg, 2004). Una mayor expresión de este gen implicaría un aumento significativo de la cantidad de enzima, haciendo necesario un aumento de la dosis de estos antifolatos para poder inhibirla y, de esta manera, lograr la citotoxicidad terapéutica deseada.

Este gen presenta un polimorfismo (rs45445694) localizado en el promotor (región 5'UTR), denominado TSER 2R/3R, que consiste en 2 o 3 copias de un repetido en tándem (VNTR) de 28pb. Estudios previos han demostrado que existe una asociación significativa entre la presencia del alelo 3R y la expresión del ARNm de TYMS (Nief et al., 2007). Además, este VNTR presenta también un polimorfismo simple, un cambio de G por C (rs183205964) dentro del segundo repetido del tándem, que influyen en la expresión del gen (Ulrich et al., 2002) y por lo tanto en la respuesta terapéutica al MTX (Lauten et al., 2003; Mandola et al., 2003; Kodidela et al., 2014). Se ha visto que la actividad transcripcional del alelo 3R es 2,6 veces más que la del alelo 2R (Danenberg, 2004).

Algunos estudios previos indican que una alta expresión intratumoral de este gen, tanto a nivel de ARNm (Mandola et al., 2003) como a nivel proteico (Kawakami & Watanabe, 2003), predice

generalmente una mala respuesta al tratamiento y una menor sobrevida (Mandola et al., 2003); mientras que niveles bajos de expresión predicen una buena respuesta (Danenberg, 2004). Concretamente, se ha reportado que el alelo denominado 3R provoca un aumento de la expresión del gen y, por consiguiente, mayores cantidades de la enzima. Como consecuencia, son necesarias mayores dosis de antifolatos para inhibirla (Marsh et al., 2000). Asimismo, se ha reportado que individuos homocigotos 3R/3R tienen un mayor riesgo de presentar recaídas o que la enfermedad tenga un desenlace fatal (Pietrzyk et al., 2011; Kodidela et al., 2014). Por otro lado, se ha visto que aquellos pacientes que presentan el alelo 3R y que reciben altas dosis de MTX, tienen más riesgo de presentar vómitos y/o eventos de toxicidad hepática (Cwiklinska et al., 2020).

Hasta el momento, los alelos más frecuentes para este VNTR en todas las poblaciones estudiadas son los que presentan 2 y 3 repetidos (2R y 3R). Sin embargo, se han encontrado algunos individuos portadores de alelos con 4, 5 y 9 repetidos (4R, 5R y 9R) (Danenberg, 2004). Concretamente, el alelo 9R fue encontrado exclusivamente, en baja frecuencia, en una población de Ghaneses; mientras que el alelo 4R se encontró en varias poblaciones africanas (Marsh et al., 2000). El origen de estos alelos fue atribuido a presiones ambientales que favorecerían una mejor supervivencia a aquellos individuos con una mayor expresión del gen *TYMS* (Horie et al., 1995),

Según Marsh et al. (2000), la frecuencia del genotipo 3R/3R varía entre los diferentes grupos étnicos, siendo más frecuente en poblaciones asiáticas y africanas que en poblaciones caucásicas. Según estos autores, la frecuencia de este genotipo en poblaciones caucásicas es de 28%, en el sur de Asia el del 40%, mientras que en poblaciones africanas (Kenia y Ghana) oscila entre el 49% y el 56% (Marsh et al., 2000). Sin embargo, la frecuencia más alta se observa en poblaciones de China, donde alcanza el 67% (Marsh et al., 1999). Según Danenberg (2004), la frecuencia de este genotipo en la población de China es casi el doble que aquella descrita para poblaciones caucásicas (67% vs. 38%, respectivamente), mientras que la frecuencia del genotipo 2R/2R en la población de China es del 2% y aproximadamente 20% en caucásicos (Danenberg, 2004).

4.2 OBJETIVO

Analizar variantes genéticas vinculadas al transporte y metabolismo del metotrexato, y determinar su relación con la ancestralidad y con los eventos adversos ocurridos durante la fase de mantenimiento del tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda infantil.

4.2.1 Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia de las variantes de los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS*, vinculadas al transporte y metabolismo del metotrexato, en la muestra de pacientes con LLA y en la muestra control.
- Comparar las frecuencias genotípicas obtenidas para ambas muestras.
- Releva, a partir de las historias clínicas de los pacientes, la dosis de MTX administrada, las semanas de reducción o suspensión de dosis y el motivo de dichas reducciones/suspensiones, en la fase de mantenimiento del tratamiento.
- Establecer la relación entre las variantes de los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS* y las semanas de reducción o suspensión de dosis.
- Determinar la relación entre la dosis de MTX administrada y los polimorfismos en los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS*.
- Analizar el efecto de las variantes de los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS* sobre los eventos de toxicidad hematológica (leucopenias y neutropenias) y hepática observados en la fase de mantenimiento.

4.3 MATERIALES y MÉTODOS

4.3.1 Muestras y genotipado

Para determinar la relación entre las variantes genéticas y los eventos de toxicidad producidos por el MTX en la fase de mantenimiento del tratamiento de LLA infantil, al igual que en el capítulo 3, la muestra de pacientes utilizada fue la previamente descrita en los "Materiales y Métodos" del Capítulo 2 (sección 2.3.1). Esta muestra está formada por 192 niños y adolescentes de entre 6 meses y 19 años de edad diagnosticados con LLA en el CHOP-CHPR.

Para determinar que las frecuencias genotípicas obtenidas para la muestra de pacientes eran representativas de la población, se utilizó como muestra control 100 de los 200 niños pertenecientes a la muestra control descrita en el capítulo 2.

En total, se investigaron cuatro polimorfismos vinculados al transporte y metabolismo del MTX. Específicamente, se analizaron dos polimorfismos exónicos en el gen *MTHFR* (uno en el exón 5 y otro en el exón 8), un polimorfismo en el gen que codifica para el transportador *SLC19A1* y un VNTR en la región 5'UTR del gen *TYMS*. La descripción de cada variante y la metodología utilizada para su genotipado se detalla en la Tabla 14.

Tabla 14. Genes, polimorfismos y técnica de genotipado. Se muestra, para cada gen, los polimorfismos estudiados (rs), la metodología utilizada, el cambio nucleotídico (o cantidad de repetidos), el tamaño esperado del amplicon, y de los fragmentos de restricción, junto con las referencias bibliográficas de las que se obtuvo la metodología.

Gen	rs	Método	Polimorfismo	Amplicon (pb)	Fragmentos restricción (pb)	Referencia
MTHFR	rs1801133	PCR-RFLP (Hinf I)	c.677 C>T	198	C: 198 T: 175 + 23	Chango 2000
	rs1801131	PCR real Time & HRM	c.1298 A>C	138		Pei 2015
SLC19A1	rs1051266	PCR - RFLP (Hha I)	c.80 G>A	230	G: 125 + 68 +37 A: 162 + 68	Chango 2000
TYMS	rs45445694	PCR	2 repetidos	215		Urlich 2002
			3 repetidos	243		

4.3.2 Datos clínicos

A partir de las historias clínicas de cada paciente se relevaron, para cada semana de la fase de mantenimiento, los siguientes datos:

1. Dosis de metotrexato administrada
2. Porcentaje y motivo de reducción de la dosis de MTX
3. Motivo de suspensión de dosis de MTX (cuando el tratamiento estaba suspendido)
4. Otros datos relevantes: Por ejemplos, vómitos o diarreas luego de tomar la medicación, olvido de la medicación, etc.

En base a los datos obtenidos de las historias clínicas en la fase de mantenimiento se calculó:

1. La dosis acumulada de MTX (por m² de superficie corporal) a las semanas 8, 16, 24, 32 y total
2. La dosis promedio semanal de MTX (por m² de superficie corporal)
3. La cantidad total (y porcentaje) de semanas de reducción de dosis de MTX
4. La cantidad (y porcentaje) de semanas de reducción de dosis de MTX debidas a eventos de toxicidad hematológica.

5. La cantidad (y porcentaje) de semanas de reducción de dosis de MTX debidas a eventos de toxicidad hepática.
6. La cantidad total (y porcentaje) de semanas de suspensión de dosis de MTX
7. La cantidad (y porcentaje) de semanas de suspensión de dosis de MTX debida a eventos de toxicidad hematológica.
8. La cantidad (y porcentaje) de semanas de suspensión de dosis de MTX debida a eventos de toxicidad hepática.

A su vez, para realizar los análisis entre la presencia de variantes en los genes vinculados al transporte y metabolismo de MTX y los eventos de toxicidad, se utilizaron todos los parámetros calculados (presencia/ausencia de leucopenias y neutropenias Gdo. 3 y 4 para cada uno de los intervalos; número de leucopenias y neutropenias Gdo. 3, Gdo. 4 para cada intervalo y número total de eventos de toxicidad hepática Gdo.3 y 4) a partir de los hemogramas y funcionales hepáticos previamente obtenidos en el capítulo 3 .

4.3.3 Análisis estadísticos

Todos los datos fueron analizados estadísticamente mediante el programa IBM SPSS Statistics 22, utilizando un intervalo de confianza del 95%.

Con el objetivo de determinar si los datos derivados de las historias clínicas presentaban una distribución normal, estos fueron analizados mediante el test Kolmogorov Smirnov. A su vez, se evaluó la homocedasticidad mediante el análisis de homogeneidad de varianzas.

Para cada uno de los polimorfismos (Tabla 14), se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas, tanto para la muestra de pacientes como para la muestra control. Posteriormente, mediante la prueba de Chi-cuadrado, se estableció si cada una de las variantes analizadas se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg. Por otro lado, mediante esta misma prueba, se estableció si existían diferencias estadísticamente significativas entre ambas muestras.

Con los genotipos obtenidos y los datos calculados a partir de las historias clínicas, se analizó la posible asociación entre las toxicidades observadas en la fase de mantenimiento y la presencia de variantes en los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS*. Al igual que en el capítulo 3, los datos utilizados como parámetros de toxicidad fueron: semanas de reducción de dosis de MTX; semanas de suspensión de dosis de MTX; dosis acumulada de MTX a las semanas 8, 16, 24, 32 y promedio semanal; eventos de leucopenias y neutropenias (Gdo. 3 y 4) en intervalos de 8 semanas (1-8, 9-16, 17-24 y 25-32) y en el total de semanas; y eventos de toxicidad hepática

(Gdo. 3 y 4) totales. Para los parámetros de semanas de reducción y suspensión de dosis, los análisis fueron realizados considerando: 1) el total de semanas, 2) semanas reducidas o suspendidas por causas hematológicas y, 3) semanas reducidas o suspendidas por causas hepáticas. En todos los casos se utilizó el porcentaje de semanas respecto al total de semanas de la fase de mantenimiento.

Los análisis de asociación entre cada uno de los parámetros de toxicidad y las variantes genéticas fueron realizados para cada uno de los cuatro polimorfismos por separado. Puesto que para cada polimorfismo existen tres genotipos diferentes posibles, la asociación entre los parámetros de toxicidad y las variantes genéticas se llevó a cabo mediante el test de Kruskal-Wallis. Para el gen *MTHFR*, además de analizar cada una de las variantes por separado, también se consideró el genotipo completo teniendo en cuenta ambos polimorfismos ("MTHFR comb."). Concretamente, los individuos fueron clasificados en cuatro grupos en base a la actividad enzimática reportada en la bibliografía para cada polimorfismo (C677T; A1298C):

- 1) Grupo 0: CC;AA (sin variantes)
- 2) Grupo 1: CC;AC o CC;CC o CT;AA
- 3) Grupo 2: CT;AC o CT;CC
- 4) Grupo 3: TT;AA o TT;AC o TT;CC

Estas asociaciones también fueron estudiadas subdividiendo la muestra en dos. Por un lado, los pacientes homocigotos para el alelo normal versus los otros dos genotipos juntos (heterocigotos y homocigotos para el alelo variante); y por otro lado los pacientes homocigotos para el alelo variante versus los restantes genotipos. En estos dos últimos casos, el análisis se realizó mediante el test de Mann-Whitney.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Frecuencia de las variantes en los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS*

Todos los polimorfismos analizados para los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS* se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p\text{-value} > 0,05$; datos no mostrados). Las frecuencias genotípicas y alélicas de dichos polimorfismos tanto para la muestra de pacientes como para la muestra control se muestran en la Tabla 15. Como se puede apreciar, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas muestras. En la muestra de pacientes, todos los polimorfismos analizados presentaron una frecuencia de individuos heterocigotos que varía

Tabla 15. Frecuencias genotípicas y alélicas de *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS*. Se muestran los genes (polimorfismos) analizados, el número (N) y porcentaje de individuos por cada genotipo, junto con las frecuencias de cada alelo; para la muestra de pacientes y de controles.

Gen	Genotipo	N (%)		<i>p-value</i> *	Alelo	Frecuencias Alélicas	
		Pacientes	Controles			Pacientes	Controles
MTHFR 677 C>T	CC	69 (35,9)	45 (45,0)	0,297	C	0,607	0,670
	CT	95 (49,5)	44 (44,0)		T	0,393	0,330
	TT	28 (14,6)	11 (11,0)				
MTHFR 1298 A>C	AA	94 (51,1)	61 (61,0)	0,188	A	0,723	0,790
	AC	78 (42,4)	36 (36,0)		C	0,277	0,210
	CC	12 (6,5)	3 (3,0)				
MTHFR comb (C677T;A1298C)	CC;AA	22 (12,0)	22 (22,0)	0,289			
	CC;AC	32 (17,4)	20 (20,0)				
	CC;CC	11 (6,0)	3 (3,0)				
	CT;AA	47 (25,5)	28 (28,0)				
	CT;AC	44 (23,9)	16 (16,0)				
	CT;CC	1 (0,5)	0				
	TT;AA	25 (13,6)	11 (11,0)				
	TT;AC	2 (1,1)	0				
	TT;CC	0	0				
SLC19A1	GG	54 (28,1)	30 (30,0)	0,807	G	0,531	0,530
	GA	96 (50,0)	46 (46,0)		A	0,469	0,470
	AA	42 (21,9)	24 (24,0)				
TYMS	3R/3R	59 (30,9)	30 (30,0)	0,179	1R	0,000	0,005
	3R/2R	97 (50,8)	43 (43,0)		2R	0,432	0,455
	2R/2R	34 (17,8)	24 (24,0)		3R	0,565	0,530
	3R/1R	0	1 (1,0)		4R	0,003	0,010
	3R/4R	1 (0,5)	2 (2,0)				

* Test de Chi cuadrado (comparación de la muestra de pacientes y controles)

entre el 43% y el 51%. Asimismo, la frecuencia de individuos homocigotos para los alelos variantes fue de entre 6,5% y 22% (Tabla 15).

Todos los pacientes resultaron ser portadores de al menos un alelo variante en alguno de los cuatro polimorfismos estudiados, mientras que en la muestra control únicamente tres individuos no presentaron ningún alelo variante para dichos polimorfismos (datos no mostrados).

Como se puede observar en la Tabla 15 se detectaron 3 individuos (1 paciente y 2 controles) portadores del alelo de origen africano 4R del gen *TYMS*. A su vez, se encontró un individuo perteneciente a la muestra control que era portador de un alelo con un único repetido (1R).

4.4.2 Variantes en *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS* vs reducción o suspensión de dosis de MTX

Los resultados obtenidos de los análisis realizados entre la presencia de variantes en los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS*, y las semanas de reducción de dosis de MTX, no evidenciaron ninguna asociación estadísticamente significativa entre las variantes y este parámetro de toxicidad (Tabla 16).

Por otro lado, los resultados obtenidos de los análisis entre el porcentaje de semanas de suspensión de dosis de MTX (total, por causa hematológicas y por causas hepáticas) y la presencia de las variantes en los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS*, indican una única asociación estadísticamente significativa entre las semanas de suspensión debidas a causas hematológicas y la variante 677C>T del gen *MTHFR* (Tabla 16), cuando los tres genotipos para esta variante (CC, CT y TT) son analizados simultáneamente. Cuando esta asociación es analizada por pares de genotipos (CC vs CT; CC vs TT y CT vs TT), los resultados obtenidos muestran una asociación estadísticamente significativa cuando se compran los genotipos CT y TT, pero no cuando se comparan los genotipos CC vs CT y CC vs TT. Es decir, los resultados muestran que los pacientes con genotipo TT presentan estadísticamente menos semanas de suspensión de dosis que los pacientes de genotipo CT, pero no menos que los pacientes de genotipo CC (datos no mostrados).

Tabla 16. Variantes de *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS* vs semanas de suspensión y reducción de dosis de MTX. Se muestran los p-valores (Kruskal-Wallis) del análisis de asociación entre las variantes genéticas y el porcentaje de semanas de reducción de dosis, de reducción de dosis por toxicidad hematológica, de reducción de dosis por toxicidad hepática, de suspensión de dosis, de suspensión de dosis por toxicidad hematológica y de suspensión de dosis por toxicidad hepática.

Gen o Polimorfismo	<i>p-value*</i>					
	Porcentaje semanas de reducción			Porcentaje semanas de suspensión		
	Total	Hematológica	Hepática	Total	Hematológica	Hepática
MTHFR 677 C>T	0,804	0,393	0,709	0,234	0,049	0,268
MTHFR 1298 A>C	0,924	0,980	0,443	0,721	0,850	0,410
MTHFR comb.	0,830	0,488	0,114	0,513	0,455	0,354
SLC19A1	0,967	0,985	0,173	0,719	0,946	0,882
TYMS	0,322	0,297	0,084	0,255	0,092	0,325

* Test Kruskal-Wallis

4.4.3 Variantes genéticas y dosis de MTX

La dosis acumulada de MTX a las semanas 8, 16, 24, 32 y el promedio semanal junto con los genotipos previamente determinados fueron utilizados para analizar la posible asociación entre la dosis de MTX y la presencia de variantes en los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS* por separado. Los resultados obtenidos no indican ninguna asociación estadísticamente significativa entre la presencia de variantes en estos genes y la dosis acumulada de MTX ni cuando se analizan todos los genotipos juntos para cada gen (Tabla 17) ni cuando se analizan, para cada gen, los genotipos de a pares (datos no mostrados).

Tabla 17. Variantes de *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS* vs dosis de MTX. Se muestran los p-valores (Kruskal-Wallis) del análisis de asociación entre las variantes genéticas y la dosis acumulada de MTX a las semanas 8, 16, 24 y 32, junto con el promedio semanal.

Gen o polimorfismo	<i>p-value*</i>				
	Semana 8	Semana 16	Semana 24	Semana 32	Promedio Semanal
MTHFR 677 C>T	0,494	0,440	0,298	0,531	0,772
MTHFR 1298 A>C	0,115	0,735	0,629	0,326	0,818
MTHFR comb.	0,178	0,392	0,753	0,957	0,994
SLC19A1	0,648	0,367	0,427	0,358	0,971
TYMS	0,245	0,149	0,289	0,433	0,481

* Test Kruskal-Wallis

4.4.4 Variantes de *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS* vs eventos de leucopenia y neutropenias

Los resultados obtenidos de los análisis entre la presencia de variantes en los genes vinculados al transporte y metabolismo de MTX y el número de eventos de leucopenia, no muestran una asociación estadísticamente significativa entre estos eventos adversos y la presencia de variantes en los genes *MTHFR* y *SLC19A1* en ninguno de los cuatro intervalos analizados, así como tampoco en el total de semanas de la fase de mantenimiento (Tabla 18). Sin embargo, estos resultados señalan que existe una asociación entre el genotipo del VNTR del gen *TYMS* y el número de leucopenias Gdo. 3 o total (G3+G4), en el intervalo que comprende las primeras 8 semanas de la fase de mantenimiento (Tabla 18). Concretamente, los pacientes de genotipo

2R/2R presentaron más eventos de leucopenias que los pacientes heterocigotos 2R/3R o los homocigotos 3R/3R.

Tabla 18. Eventos de leucopenia y variantes de *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS*. Se muestran los p-valores obtenidos del análisis entre la presencia de variantes genéticas y el número de leucopenias grado 3 (G3), grado 4 (G4) y grado 3 y/o grado 4 (G3 + G4) para cada uno de los intervalos de 8 semanas (1-8, 9-16, 17-24 y 25-32) y el total de la fase de mantenimiento.

	Leucopenias (<i>p-value</i> *)								
	MTHFR comb.			SLC19A1			TYMS		
	G3	G4	G3 + G4	G3	G4	G3 + G4	G3	G4	G3 + G4
Sem 1 a 8	0,901	0,470	0,943	0,665	0,452	0,533	0,013	0,288	0,008
Sem 9 a 16	0,513	0,150	0,521	0,289	0,925	0,252	0,395	0,427	0,407
Sem 17 a 24	0,099	0,740	0,093	0,623	0,980	0,594	0,671	0,265	0,582
Sem 25 a 32	0,225	0,073	0,325	0,941	0,121	0,991	0,902	0,939	0,928
Total	0,361	0,782	0,266	0,995	0,766	0,996	0,147	0,341	0,107

* Kruskal-Wallis

Respecto a la asociación entre los eventos de neutropenia y la presencia de variantes en los genes analizados, los resultados no muestran una asociación entre los genotipos del gen *TYMS* y el número de neutropenias (Tabla 19). Por otro lado, los resultados indican que existe una asociación entre los genotipos del gen *MTHFR* (considerando ambos polimorfismos) y el número de neutropenias G3 y G3+G4 en el período comprendido entre las semanas 17 y 24, así como también en el total de semanas del tratamiento (Tabla 19). Concretamente, los resultados muestran que los pacientes del grupo 0 (genotipo CC;AA) presentan menos eventos de neutropenia G3 y G3+G4 que los pacientes de los grupos 1, 2 y 3 (todos los otros genotipos). Cabe mencionar que no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre los eventos de neutropenia y los dos polimorfismos del gen *MTHFR* cuando estos se analizan por separado. Por otro lado, se observó una asociación entre los eventos de neutropenia G4 y el genotipo AA del gen *SLC19A1* en los intervalos 1-8 y 9-16 (Tabla 19).

Tabla 19. Eventos de neutropenia y variantes de *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS*. Se muestran los p-valores obtenidos del análisis entre la presencia de variantes genéticas y el número de neutropenias grado 3 (G3), grado 4 (G4) y grado 3-grado 4 juntos (G3 + G4) para cada uno de los intervalos de 8 semanas (1-8, 9-16, 17-24 y 25-32) y el total semanas de la fase de mantenimiento.

	Neutropenias (<i>p-value</i> *)								
	MTHFR comb.			SLC19A1			TYMS		
	G3	G4	G3 + G4	G3	G4	G3 + G4	G3	G4	G3 + G4
Sem 1 a 8	0,373	0,805	0,245	0,594	0,048	0,152	0,402	0,194	0,228
Sem 9 a 16	0,771	0,614	0,507	0,155	0,046	0,203	0,729	0,597	0,658
Sem 17 a 24	0,005	0,325	0,005	0,469	0,436	0,744	0,254	0,386	0,171
Sem 25 a 32	0,521	0,801	0,594	0,440	0,899	0,421	0,474	0,837	0,583
Total	0,047	0,242	0,037	0,715	0,149	0,545	0,310	0,153	0,218

* Kruskal-Wallis

4.4.5 Variantes genéticas y eventos hepáticos

Al igual que lo observado para los genes vinculados al metabolismo de 6-MP (Capítulo 3), los resultados obtenidos de los análisis de asociación entre el número de eventos de toxicidad hepática (grado 3 y 4) y la presencia de variantes en los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS*, no evidenciaron ninguna asociación estadísticamente significativa (datos no mostrados).

4.5 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que, para cada uno de los cuatro polimorfismos vinculados al transporte y metabolismo del MTX analizados, la frecuencia del alelo variante varía entre el 28% y 56% (Tabla 15). A su vez, todos los polimorfismos analizados presentaron una frecuencia de individuos heterocigotos cercana al 43%-51%. Es decir, la presencia de alelos variantes en estos genes es considerablemente frecuente. De hecho, todos los pacientes son portadores de al menos un alelo variante para alguno de los cuatro polimorfismos.

Concretamente, la frecuencia de homocigotos TT para el polimorfismo 677C>T del gen *MTHFR* fue de 14,6% (Tabla 15). Esta frecuencia es similar a la reportada para poblaciones europeas o de América del Norte (Cortese & Motti, 2001), siendo muy inferior a la reportada para poblaciones de Japón y más de 5 veces la reportada para poblaciones de la India (Imanishi et al., 2007; Tripathi et al., 2010). La frecuencia del alelo T para este polimorfismo fue de 39,3%, similar a la descrita para poblaciones europeas (1000 Genomes Project Consortium, 2015). Respecto al otro polimorfismo de este mismo gen, la frecuencia del alelo variante fue de 27,7%

(Tabla 15). Esta frecuencia es similar a la descrita para poblaciones caucásicas (Haase et al., 2012; Kaluzna et al., 2015) y el doble de la reportada para poblaciones africanas (Kim et al., 2012; Tanaka et al., 2014; 1000 Genomes Project Consortium, 2015). Sin embargo, es ligeramente superior a las informadas para poblaciones de Latinoamérica, donde alcanza el 20% (1000 Genomes Project Consortium, 2015). Si se tiene en cuenta que la población uruguaya está compuesta mayoritariamente de poblaciones de origen europeo, no sorprende que las frecuencias de estos polimorfismos sean similares a las reportadas para poblaciones europeas o caucásicas. Al igual que para las variantes de *ITPA* (Capítulo 3), las diferencias observadas entre nuestra población y las descritas para otras poblaciones de Latinoamérica podría deberse al aporte desigual de las poblaciones ancestrales africana y nativo americanas.

Respecto al polimorfismo 80G>A al gen *SLC19A1*, la frecuencia de homocigotos AA fue del 21,9% (Tabla 15). Esta frecuencia es igual a la reportada para poblaciones de Francia (Chango et al., 2000). A su vez, la frecuencia del alelo A para este polimorfismo fue de 46,9%, similar a las descritas en la base de datos "1000 genomas" para poblaciones europeas, latinoamericanas y del sur de Asia (1000 Genomes Project Consortium, 2015). Considerando que este polimorfismo es bastante frecuente en prácticamente todas las poblaciones estudiadas hasta el momento (Chango et al., 2000; Whetstine et al., 2001; Imanishi et al., 2007; Ashton et al., 2009; Cwiklinska et al., 2020) y, teniendo en cuenta la estructura ancestral de nuestra población, los resultados obtenidos son conforme a lo previsto.

Finalmente, las frecuencias genotípicas observadas para el VNTR del gen *TYMS* son similares a las reportadas para poblaciones caucásicas (Marsh et al., 2000; Ulrich et al., 2002; Gast et al., 2007). Al igual que para los otros polimorfismos, no sorprende que estas frecuencias sean similares a las descritas para poblaciones europeas. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que un paciente y dos individuos control son portadores del alelo 4R, cuyo origen es africano y que no ha sido descrito en poblaciones europeas, asiáticas o latinoamericanas (Marsh et al., 2000; Danenberg, 2004). Teniendo en cuenta que la ancestralidad global de los pacientes presentó un componente ancestral africano de 10,9%, con un máximo de 41,6% (Capítulo 2), era factible encontrar el alelo 4R en muy baja frecuencia en la muestra de pacientes. Esta misma consideración puede aplicarse a la población control, cuyo componente ancestral africano fue del 12,5% (Capítulo 2).

Respecto a la posible asociación entre la toxicidad debida al MTX y la presencia de variantes en los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS*, los resultados obtenidos no muestran ninguna asociación estadísticamente significativa entre las variantes y el porcentaje de semanas de reducción de

dosis de MTX. Asimismo, tampoco se encontró una asociación cuando se consideraron únicamente las semanas de reducción debidas a causas hematológicas o hepáticas (Tabla 16). Respecto a la relación entre la presencia de variantes en estos genes y el porcentaje de suspensión de dosis de MTX, se detectó una única asociación estadísticamente significativa entre la variante 677C>T del gen *MTHFR* y el porcentaje de semanas de suspensión debidas a causas hematológicas (Tabla 16). Sin embargo, este resultado podría ser discutible por varias razones. En primer lugar, el p-valor obtenido (0,049) se encuentra justo en el límite de significancia. En segundo lugar, este resultado no es compatible con los obtenidos para los otros parámetros de toxicidad utilizados, puesto que no se detectó una asociación entre esta variante ni con la dosis de MTX administrada, (Tabla 17) ni con los eventos de leucopenia o neutropenia (Tablas 18 y 19). En tercer lugar, los resultados indican que los pacientes homocigotos para la variante (TT) presentan significativamente menos semanas de suspensión que los pacientes heterocigotos CT, pero no menos que los pacientes homocigotos para el alelo normal (CC). Por último, cuando se estudia esta relación excluyendo de la muestra a aquellos pacientes portadores de alelos variantes para los genes *NUDT15* y/o *TPMT*, esta asociación desaparece, tanto cuando se analizan todos los genotipos juntos como cuando se analizan de a pares (CC vs CT; CC vs TT y CT vs TT).

Por otro lado, no se evidenció ninguna asociación estadísticamente significativa entre la presencia de variantes genéticas y la dosis acumulada de MTX a las semanas 8, 16, 24, 32 o en el total de semanas (Tablas 17).

Teniendo en cuenta la función que cumple cada una de las enzimas codificadas por estos genes en la vía metabólica del MTX y que, estudios previos han demostrado que estos polimorfismo genéticos alteran la expresión y/o actividad de dichas enzimas (Chango et al., 2000; Laverdière et al., 2002; Balta et al., 2003; Robien & Ulrich 2003; Danenberg, 2004; Ashton et al., 2009; Tanaka et al., 2014; Kaluzna et al., 2015; Pei et al., 2015; Cwiklinska et al., 2020), se esperaba poder detectar alguna asociación entre la presencia de las variantes y los parámetros de toxicidad utilizados. Existen varias razones que podrían explicar porque los resultados obtenidos no son concordantes con los esperados.

En primer lugar, la vía metabólica del MTX involucra muchas enzimas e intermediarios que actúan como sustratos en varias reacciones enzimáticas (Cheok & Evans, 2006). Es una vía compleja, en la que una misma enzima puede participar en más de una reacción enzimática o un intermediario actuar como sustrato en diferentes reacciones (Figura 15). Es decir, existe una gran interacción entre cada uno de los componentes de la vía. En esta tesis se analizaron

apenas cuatro polimorfismos en tres genes, lo que representa una pequeña fracción de todo el espectro de posibles polimorfismos que podrían estar afectando la correcta regulación de la vía metabólica del MTX.

Por ejemplo, en esta tesis se analizó un único polimorfismo del transportador SLC19A1. Como se mencionó previamente, este transportador no es la única vía de entrada del MTX a la célula. Existen otros transportadores que permiten la entrada de este fármaco como, por ejemplo, el transportador SLC1B1 (Levy et al., 2003; Radtke et al., 2013; Kodidela et al., 2014; Salazar et al., 2014). Por lo tanto, en aquellos pacientes con niveles más bajos de expresión del gen *SLC19A1* (debida a la presencia del alelo variante), la entrada de MTX a la célula podría verse "compensada" por el transportador SLC1B1. Incluso, en este transportador (SLC1B1) se ha descrito un polimorfismo que aumenta su actividad (Ramsey et al., 2012), que no fue analizado en esta tesis. Adicionalmente, cabe mencionar que los parámetros utilizados para medir la toxicidad (semanas de reducción o suspensión de dosis, dosis de acumulada de MTX y eventos adversos) son una medida indirecta de la entrada de MTX a la célula. Para poder determinar con más exactitud que la presencia del alelo variante de este polimorfismo afecta la actividad de dicho transportador, sería necesario, por un lado, utilizar un parámetro más directo, como por ejemplo la concentración plasmática de MTX; y por otro lado, analizar la presencia de polimorfismos en los otros transportadores que permiten la entrada de MTX a la célula. Este es apenas un ejemplo que refleja la necesidad de analizar más polimorfismos en otros genes vinculados al transporte y metabolismo de MTX.

Otra posible explicación para los resultados obtenidos podría ser que la dosis de MTX administrada durante esta fase del tratamiento es una dosis baja ($20\text{mg}/\text{m}^2/\text{semana}$). Posiblemente, alguna (o más de una) de las variantes analizadas tenga un efecto sobre el metabolismo del MTX y, consecuentemente, con los eventos de toxicidad o la respuesta al tratamiento. Sin embargo, si el efecto de cada polimorfismo por separado es pequeño, la asociación entre estas variantes y los eventos tóxicos solo podría ser evidenciada cuando las dosis administradas son altas. De hecho, varios de los estudios previos describen una asociación entre las variantes y los efectos tóxicos, la respuesta al tratamiento o el riesgo de recaída cuando se utilizan altas dosis de MTX (Radtke et al., 2003; Shimasaki et al., 2006; Imanishi et al., 2007; D'Angelo et al., 2011; Salazar et al., 2012; Kaluzna et al., 2015; Cwiklinska et al., 2020; Esmaili et al., 2020). Para poner a prueba esta hipótesis, se podría analizar la asociación entre la presencia de estas variantes y los eventos tóxicos ocurridos durante la fase de consolidación, puesto que en esa fase la dosis administrada es de $2000\text{mg}/\text{m}^2$ o

5000mg/m², según el riesgo al que pertenece el paciente. Además, en la fase de consolidación el MTX es administrado por infusión durante 24hrs y no por vía oral como en la fase de mantenimiento, por lo que la biodisponibilidad de dicho fármaco difiere entre ambas fases. Adicionalmente, la concentración plasmática de MTX es medida a las 48hrs de dicha infusión.

Otro factor que podría estar influyendo en los resultados obtenidos para los genes vinculados al transporte y metabolismo de MTX es la presencia de variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*. Como se describió en el Capítulo 3, la presencia de variantes en estos dos genes está asociada con un mayor porcentaje de semanas de reducción y/o suspensión de dosis, así como también con un mayor número de eventos de leucopenia. Por ejemplo, podría suceder que alguno de los pacientes que no sea portador de variantes en los genes *MTHFR*, *SLC19A1* o *TYMS* presente más eventos de leucopenia debido a que es portador de variantes en los genes *NUDT15* y/o *TPMT*. De hecho, al igual que la asociación detectada entre las semanas de suspensión y la variante 677C>T, la asociación observada entre los genotipos del gen *MTHFR* y el número de neutropenias G3 y G3+G4 en el período comprendido entre las semanas 17 y 24, y en el total de semanas del tratamiento (Tabla 19) desaparece cuando los pacientes portadores de variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT* son eliminados de la muestra (datos no mostrados). Del mismo modo, la asociación detectada entre el genotipo AA del gen *SLC19A1* y los eventos de neutropenia en los intervalos 1-8 y 9-16 (Tabla 19) se pierde cuando se excluyen de la muestra los pacientes portadores de variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT* (datos no mostrados).

Por último, basándose en los resultados de hemograma y/o funcional hepático, el médico tratante puede decir reducir o suspender la dosis de 6-MP, la dosis de MTX o ambas. Debido a que, *a priori*, el médico no sabe cuál es la causa de los valores alterados en el hemograma o funcional hepático, en la mayoría de los casos se reduce/suspende ambos fármacos. Esto genera que la dosis acumulada de MTX sea menor a la dosis estándar incluso en aquellos pacientes que no presentan variantes en los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS*.

Finalmente, los resultados muestran una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo del VNTR del gen *TYMS* y el número de leucopenias G3 y G3+G4 en las primeras 8 semanas (Tabla 18). Específicamente, los pacientes con genotipo 2R/2R sufrieron más eventos de leucopenia que los pacientes con los otros dos genotipos. Este resultado es compatible con los reportado en la bibliografía (Marsh et al., 2000; Danenberg, 2004; Krajcinovic et al., 2004; Cheok & Evans, 2006; Nief et al., 2007), ya que el alelo 2R tendría menos actividad transcripcional y en consecuencia una menor actividad enzimática. Por lo tanto, una misma

dosificación de MTX inhibiría de manera más eficiente la enzima en aquellos pacientes de genotipo 2R/2R que en aquellos con el alelo 3R, produciendo una mayor citotoxicidad. Sin embargo, esta asociación no fue detectada ni en los otros tres intervalos analizados ni en el total del tratamiento. Esta falta de asociación podría deberse a que hubo un ajuste de dosis luego de la semana 8, o a que el efecto de esta variante sobre la toxicidad es pequeño y solo se ve reflejado en las primeras 8 semanas porque los pacientes llegan a la fase de mantenimiento con valores de hemograma al límite. Esta posible asociación debería ser confirmada con otros análisis, como por ejemplo ser estudiada en cualquiera de las otras fases del tratamiento donde se administra MTX.

4.6 CONCLUSIÓN

Todos los pacientes resultaron ser portadores de al menos un alelo variante en los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS*.

Los polimorfismos analizados presentaron una frecuencia de individuos heterocigotos cercana al 50% y una frecuencia del alelo variante que oscila entre el 28% y el 56%. En todos los casos, las frecuencias son similares a las reportadas para poblaciones europeas.

No se evidenció ninguna asociación estadísticamente significativa entre la presencia de variantes en los genes *MTHFR* y *SLC19A1* y las toxicidades hematológicas o hepáticas.

El VNTR del promotor del gen *TYMS* se encontró asociado únicamente con los eventos de leucopenias en las primeras 8 semanas de la fase de mantenimiento. Esta asociación debería ser confirmada mediante análisis en otras fases del tratamiento.

Puesto que la vía metabólica del MTX es compleja e involucra muchas enzimas, polimorfismos en otros genes vinculados al transporte y metabolismo de dicho fármaco podrían estar influyendo en las toxicidades observadas durante la fase de mantenimiento del tratamiento de LLA. Por lo tanto, sería necesario investigar otros genes y determinar si la "acumulación" de variantes en distintos genes explica, en parte, las toxicidades observadas en esta fase del tratamiento.

Por otro lado, teniendo en cuenta que la dosis de MTX administrada durante la fase de mantenimiento es baja y que se ha visto que el MTX produce más efectos tóxicos cuando es administrado en altas dosis, sería preciso analizar los efectos de estas variantes en la fase de consolidación del tratamiento, donde el MTX es administrado en altas dosis.

4.7 BIBLIOGRAFÍA

- 1000 Genomes Project Consortium, Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Garrison, E. P., Kang, H. M., ... Abecasis, G. R. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526 (7571), 68-74.
- Ashton, L.J., Gifford, A.J., Kwan, E., Lingwood, A., Lau, D.T.T., Marshall, G. M., ... & Norris, M. D. (2009). Reduced folate carrier and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: associations with clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 23(7), 1348-1351. doi: 10.1038/leu.2009.67
- Balta, G., Yuksek, N., Ozyurek, E., Ertem, U., Hicsonmez, G., Altay, C., & Gurgey, A. (2003). Characterization of MTHFR, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes in childhood acute leukemia. *American Journal of Hematology*, 73(3), 154-160. doi: 10.1002/ajh.10339
- Chango, A., Emery-Fillon, N., de Courcy, G.P., Lambert, D., Pfister, M., Rosenblatt, D.S., & Nicolas, J.P. (2000). A polymorphism (80G-> A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Molecular Genetics and Metabolism*, 70(4), 310-315. doi:10.1006/mgme.2000.3034
- Cheok, M.H., & Evans, W.E. (2006). Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 6(2), 117-129. doi:10.1038/nrc1800
- Chiusolo, P., Reddiconto, G., Farina, G., Mannocci, A., Fiorini, A., Palladino, M., ... & Sica, S. (2007). MTHFR polymorphisms' influence on outcome and toxicity in acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia Research*, 31(12), 1669-1674. doi: 10.1016/j.leukres.2007.03.028
- Chiusolo, P., Giammarco, S., Bellesi, S., Metafuni, E., Piccirillo, N., De Ritis, D., ... & Sica, S. (2012). The role of MTHFR and RFC1 polymorphisms on toxicity and outcome of adult patients with hematological malignancies treated with high-dose methotrexate followed by leucovorin rescue. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 69(3), 691-696. doi: 10.1007/s00280-011-1751-4
- Cortese, C., & Motti, C. (2001). MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease. *Public health nutrition*, 4(2b), 493-497. doi: 10.1079/phn2001159
- Cwiklinska, M., Czogala, M., Kwiecinska, K., Madetko-Talowska, A., Szafarz, M., Pawinska, K., ... & Skoczen, S. (2020). Polymorphisms of SLC19A1 80 G> A, MTHFR 677 C>T, and Tandem TS Repeats Influence Pharmacokinetics, Acute Liver Toxicity, and Vomiting in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With High Doses of Methotrexate. *Frontiers in pediatrics*, 8, 307. doi: 10.3389/fped.2020.00307
- D'Angelo, V., Ramaglia, M., Iannotta, A., Crisci, S., Indolfi, P., Francese, M., ... & Casale, F. (2011). Methotrexate toxicity and efficacy during the consolidation phase in paediatric acute lymphoblastic leukaemia and MTHFR polymorphisms as pharmacogenetic determinants. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 68(5), 1339-1346. doi: 10.1007/s00280-011-1665-1
- Danenberg, P. V. (2004). Pharmacogenomics of thymidylate synthase in cancer treatment. *Front Biosci*, 9, 2484-2494. doi: 10.2741/1410
- Eektimmerman, F., Swen, J. J., Madhar, M. B., Allaart, C. F., & Guchelaar, H. J. (2020). Predictive genetic biomarkers for the efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis: A systematic review. *The pharmacogenomics journal*, 20(2), 159-168. doi: 10.1038/s41397-019-0098-9
- Esmaili, M. A., Kazemi, A., Faranoush, M., Mellstedt, H., Zaker, F., Safa, M., ... & Rezvany, M. R. (2020). Polymorphisms within methotrexate pathway genes: Relationship between plasma methotrexate levels, toxicity experienced and outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(6), 800. doi: 10.22038/ijbms.2020.41754.9858
- Food and Drug Administration (FDA). (20 agosto de 2021). *Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs*. Recuperado de: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&varApplNo=09053>

- Frosst, P., Blom, H. J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C. A., Matthews, R. G., ... & Rozen, R. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature genetics*, 10(1), 111-113. doi: 10.1038/ng0595-111
- Gast, A., Bermejo, J.L., Flohr, T., Stanulla, M., Burwinkel, B., Schrappe, M., ... & Kumar, R. (2006). Folate metabolic gene polymorphisms and childhood acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Leukemia*, 21(2), 320-325. doi: 10.1038/sj.leu.2404474
- Ge, Y., Haska, C. L., LaFiura, K., Devidas, M., Linda, S. B., Liu, M., ... & Matherly, L. H. (2007). Prognostic role of the reduced folate carrier, the major membrane transporter for methotrexate, in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Clinical cancer research*, 13(2), 451-457. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2145
- Gilbody, S., Lewis, S., & Lightfoot, T. (2007). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genetic polymorphisms and psychiatric disorders: a HuGE review. *American journal of epidemiology*, 165(1), 1-13. doi: 10.1093/aje/kwj347
- Gorlick, R., Goker, E., Trippett, T., Steinherz, P., Elisseyeff, Y., Mazumdar, M., ... & Bertino, J. R. (1997). Defective transport is a common mechanism of acquired methotrexate resistance in acute lymphocytic leukemia and is associated with decreased reduced folate carrier expression. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 89(3), 1013-1018
- Haase, R., Elsner, K., Merkel, N., Stiefel, M., Mauz-Körholz, C., Kramm, C. M., & Körholz, D. (2012). High dose methotrexate treatment in childhood ALL: pilot study on the impact of the MTHFR 677C> T and 1298A> C polymorphisms on MTX-related toxicity. *Klinische Pädiatrie*, 224(03), 156-159. doi: 10.1055/s-0032-1304623
- Imanishi, H., Okamura, N., Yagi, M., Noro, Y., Moriya, Y., Nakamura, T., ... & Okumura, K. (2007). Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. *Journal of Human Genetics*, 52(2), 166-171. doi: 10.1007/s10038-006-0096-z
- Kałużna, E., Strauss, E., Zając-Spychała, O., Gowin, E., Świątek-Kościelna, B., Nowak, J., ... & Januszkiewicz-Lewandowska, D. (2015). Functional variants of gene encoding folate metabolizing enzyme and methotrexate-related toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *European journal of pharmacology*, 769, 93-99. doi : 10.1016/j.ejphar.2015.10.058
- Kawakami, K., & Watanabe, G. (2003). Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Research*, 63(18), 6004-6007.
- Kim, H., Kang, H.J., Kim, H.J., Jang, M.K., Kim, N.H., Oh, Y., ... & Ahn, H.S. (2012). Pharmacogenetic analysis of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: a possible association between survival rate and ITPA polymorphism. *PLoS ONE*, 7(9), e45558. doi: 10.1371/journal.pone.0045558
- Kodidela, S., Chandra, P.S., & Dubashi, B. (2014). Pharmacogenetics of methotrexate in acute lymphoblastic leukaemia: why still at the bench level?. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 70(3), 253-260. doi:10.1007/s00228-013-1623-4
- Krajinovic, M., Lamothe, S., Labuda, D., Lemieux-Blanchard, E., Théorêt, Y., Moghrabi, A., & Sinnett, D. (2004). Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 103(1), 252-257. doi: 10.1182/blood-2003-06-1794
- Lauten, M., Asgedom, G., Welte, K., Schrappe, M., & Stanulla, M. (2003). Thymidylate synthase gene polymorphism and its association with relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *haematologica*, 88(3), 353-354.
- Laverdiere, C., Chiasson, S., Costea, I., Moghrabi, A., & Krajinovic, M. (2002). Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 100(10), 3832-3834. doi: 10.1182/blood.V100.10.3832

- Levy, A. S., Sather, H. N., Steinherz, P. G., Sowers, R., La, M., Moscow, J. A., ... & Gorlick, R. (2003). Reduced folate carrier and dihydrofolate reductase expression in acute lymphocytic leukemia may predict outcome: a Children's Cancer Group Study. *Journal of pediatric hematology/oncology*, 25(9), 688-695. doi: 10.1097/00043426-200309000-00004
- Lima, A., Sousa, H., Monteiro, J., Azevedo, R., Medeiros, R., & Seabra, V. (2014). Genetic polymorphisms in low-dose methotrexate transporters: current relevance as methotrexate therapeutic outcome biomarkers. *Pharmacogenomics*, 15(12), 1611-1635. doi: 10.2217/PGS.14.116
- Lopez-Lopez, E., Ballesteros, J., & Garcia-Orad, A. (2011). MTHFR 677TT genotype and toxicity of methotrexate: controversial results. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 68(5), 1369-1370. doi: 10.1007/s00280-011-1719-4
- Lopez-Lopez, E., Gutierrez-Camino, A., Bilbao-Aldaiturriaga, N., Pombar-Gomez, M., Martin-Guerrero, I., & Garcia-Orad, A. (2014). Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics*, 15(10), 1383-1398. doi: 10.2217/PGS.14.106
- Mandola, M. V., Stoecklacher, J., Muller-Weeks, S., Cesarone, G., Mimi, C. Y., Lenz, H. J., & Ladner, R. D. (2003). A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer research*, 63(11), 2898-2904.
- Marsh, S., Collie-Duguid, E. S., Li, T., Liu, X., & McLeod, H. L. (1999). Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics*, 58(3), 310-312. doi: 10.1006/geno.1999.5833
- Marsh, S., Ameyaw, M.M., Githang'a, J., Indalo, A., Ofori-Adjei, D., & McLeod, H.L. (2000). Novel thymidylate synthase enhancer region alleles in African populations. *Human Mutation*, 16(6), 528-528. doi: 10.1002/1098-1004(200012)16:6<528::AID-HUMU11>3.0.CO;2-W
- Niedzielska, E., Weclawek-Tompol, J., Matkowska-Kocjan, A., & Chybicka, A. (2013). The Influence of Genetic RFC1, MS and MTRR Polymorphisms on the Risk of Acute Lymphoblastic Leukemia Relapse in Children and the Adverse Effects of Methotrexate. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 22(4), 579-584.
- Nief, N., Morvan, V.L., & Robert, J. (2007). Involvement of gene polymorphisms of thymidylate synthase in gene expression, protein activity and anticancer drug cytotoxicity using the NCI-60 panel. *European Journal of Cancer*, 43(5), 955-962. doi: 10.1016/j.ejca.2006.12.012
- Ongaro, A., De Mattei, M., Della Porta, M.G., Rigolin, G., Ambrosio, C., Di Raimondo, F., ... & Gemmati, D. (2009). Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: effects on methotrexate-related toxicity and survival. *Haematologica*, 94(10), 1391-1398. doi: 10.3324/haematol.2009.008326
- Pei, J. S., Hsu, C. M., Tsai, C. W., Chang, W. S., Ji, H. X., Hsiao, C. L., ... & Bau, D. T. (2015). The association of methylenetetrahydrofolate reductase genotypes with the risk of childhood leukemia in Taiwan. *PLoS One*, 10(3), e0119776. doi: 10.1371/journal.pone.0119776
- Pietrzyk, J. J., Bik-Multanowski, M., Skoczen, S., Kowalczyk, J., Balwierz, W., Matysiak, M., ... & Wachowiak, J. (2011). Polymorphism of the thymidylate synthase gene and risk of relapse in childhood ALL. *Leukemia research*, 35(11), 1464-1466. doi: 10.1016/j.leukres.2011.04.007
- Qiu, Q., Huang, J., Lin, Y., Shu, X., Fan, H., Tu, Z., ... & Xiao, C. (2017). Polymorphisms and pharmacogenomics for the toxicity of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 96(11). doi: 10.1097/MD.00000000000006337
- Radtko, S., Zolk, O., Renner, B., Paulides, M., Zimmermann, M., Möricke, A., ... & Langer, T. (2013). Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 121(26), 5145-5153. doi: 10.1182/blood-2013-01-480335

- Ramsey, L. B., Bruun, G. H., Yang, W., Treviño, L. R., Vattathil, S., Scheet, P., ... & Relling, M. V. (2012). Rare versus common variants in pharmacogenetics: SLC1B1 variation and methotrexate disposition. *Genome research*, 22(1), 1-8. doi: 10.1101/gr.129668.111
- Robien, K., & Ulrich, C. M. (2003). 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE minireview. *American journal of epidemiology*, 157(7), 571-582. doi: 10.1093/aje/kwg024
- Rudin, S., Marable, M., & Huang, R. S. (2017). The promise of pharmacogenomics in reducing toxicity during acute lymphoblastic leukemia maintenance treatment. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 15(2), 82-93. doi: 10.1016/j.gpb.2016.11.003
- Salazar, J., Altés, A., Del Rio, E., Estella, J., Rives, S., Tasso, M., ... & Badell, I. (2012). Methotrexate consolidation treatment according to pharmacogenetics of MTHFR ameliorates event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *The pharmacogenomics journal*, 12(5), 379-385. doi: 10.1038/tj.2011.25
- Salazar, J., Moya, P., Altés, A., Díaz-Torné, C., Casademont, J., Cerdà-Gabaro, D., ... & Baiget, M. (2014). Polymorphisms in genes involved in the mechanism of action of methotrexate: are they associated with outcome in rheumatoid arthritis patients?. *Pharmacogenomics*, 15(8), 1079-1090. doi: 10.2217/PGS.14.67
- Shimasaki, N., Mori, T., Samejima, H., Sato, R., Shimada, H., Yahagi, N., ... & Kosaki, K. (2006). Effects of methylenetetrahydrofolate reductase and reduced folate carrier 1 polymorphisms on high-dose methotrexate-induced toxicities in children with acute lymphoblastic leukemia or lymphoma. *Journal of pediatric hematology oncology*, 28(2), 64-68. doi: 10.1097/01.mph.0000198269.61948.90
- Tanaka, Y., Manabe, A., Nakadate, H., Kondoh, K., Nakamura, K., Koh, K., ... & Komiyama, T. (2014). Methylenetetrahydrofolate reductase gene haplotypes affect toxicity during maintenance therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia in Japanese patients. *Leukemia & lymphoma*, 55(5), 1126-1131. doi: 10.3109/10428194.2013.825902
- te Loo, D.M.W., Hagleitner, M.M., & Coenen, M.J. (2014). Is there a role for the MTHFR 677C> T and 1298A> C polymorphisms in methotrexate-induced liver toxicity?. *Pharmacogenomics*, 15(11), 1401-1403. doi: 10.2217/pgs.14.82
- Tripathi, R., Tewari, S., Singh, P.K., & Agarwal, S. (2010). Association of homocysteine and methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) gene polymorphism with coronary artery disease (CAD) in the population of North India. *Genetics and molecular biology*, 33(2), 224-228. doi: 10.1590/S1415-47572010005000026
- Ulrich, C.M., Bigler, J., Bostick, R., Fosdick, L., & Potter, J. D. (2002). Thymidylate synthase promoter polymorphism, interaction with folate intake, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Research*, 62(12), 3361-3364.
- Whetstone, J. R., Gifford, A. J., Witt, T., Liu, X. Y., Flatley, R. M., Norris, M., ... & Matherly, L. H. (2001). Single nucleotide polymorphisms in the human reduced folate carrier: characterization of a high-frequency G/A variant at position 80 and transport properties of the His27 and Arg27 carriers. *Clinical Cancer Research*, 7(11), 3416-3422.
- Yang, L., Hu, X., & Xu, L. (2012). Impact of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms on methotrexate-induced toxicities in acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Tumor Biology*, 33(5), 1445-1454. doi: 10.1007/s13277-012-0395-2
- Zhao, R., & Goldman, I. D. (2013). Folate and thiamine transporters mediated by facilitative carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and folate receptors. *Molecular aspects of medicine*, 34(2-3), 373-385. doi: 10.1016/j.mam.2012.07.006

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES FINALES y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES FINALES

Teniendo en cuenta que en Uruguay cerca de 23 niños son diagnosticados con LLA por año, y que la muestra comprende 192 niños reclutados entre 2010 y 2019 procedentes de todos los departamentos del país, se puede decir que la muestra utilizada es representativa del total de casos de leucemia linfoblástica aguda infantil reportados en nuestro país.

La muestra está compuesta mayoritariamente por niños de entre 1 y 5 años de edad, siendo la proporción de varones/niñas 1,26. El porcentaje de pacientes que sufrieron recaídas refleja el 80% de cura para esta enfermedad descrito para nuestro país.

Al igual que lo que ocurre a nivel mundial, la mayoría de los casos corresponde a una LLA de células precursoras de linfocitos B, siendo el subtipo LLA-prepreB el más frecuente.

La ancestralidad de los pacientes es mayoritariamente de origen europeo (69,4%), seguida de un componente nativo americano de 19,7% y de un componente africano de 10,9%, pero presenta una gran variabilidad interindividual.

La frecuencia de alelos variantes en los genes vinculados al metabolismo de la 6-MP alcanza el 20%.

Existe una asociación entre los eventos de toxicidad hematológica ocurridos durante la fase de mantenimiento y la presencia de variantes en los genes *TPMT* y *NUDT15*. Es decir, pacientes con mutaciones en dichos genes, tienen un mayor riesgo de presentar eventos de toxicidad hematológica durante el tratamiento.

La presencia de variantes en el gen *ITPA* tienen un efecto sobre la toxicidad, pero este efecto es menor que el de los alelos de *TPMT* y *NUDT15*.

Existe una correlación negativa entre la ancestralidad de origen nativo americano y el número de eventos de leucopenia en aquellos pacientes que no presentan variantes en los genes *NUDT15* y *TPMT*.

Existe una asociación entre la cantidad de repetidos "A" en el *TPMT*-VNTR y el número de eventos de leucopenias.

Todos los pacientes resultaron ser portadores de al menos un alelo variante en los genes vinculados al transporte y metabolismo del MTX, siendo la frecuencia de los alelos variantes en los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS* considerablemente alta (28% a 56%).

No se evidenció ninguna asociación entre las toxicidades hematológicas y hepáticas ocurridas durante la fase de mantenimiento y la presencia de variantes en los genes *MTHFR*, *SLC19A1* y *TYMS*.

Puesto que la vía metabólica del MTX es compleja e involucra muchas enzimas y, que la dosis administrada durante la fase de mantenimiento es baja, habría que investigar otros genes que pudieran explicar las toxicidades observadas en esta fase del tratamiento.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran la importancia de las variantes genéticas en el transporte y metabolismo de los fármacos utilizados en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda infantil. Pone de manifiesto la necesidad de determinar el genotipo de los pacientes previo al comienzo del tratamiento, con el fin de disminuir los efectos adversos ocurridos durante el mismo.

5.2 PERSPECTIVAS

Analizar la presencia de variantes en otros genes vinculados a la vía metabólica de la 6-MP, que como por ejemplo el transportador de salida *ABCC4*, con el fin intentar explicar aquellas toxicidades que no pudieron ser explicadas por las variantes en los genes *ITPA*, *NUDT15* y *TPMT*.

Analizar en profundidad los factores genéticos involucrados en la correlación negativa entre la ancestralidad de origen nativo americano y el número de eventos de leucopenia detectada en esta tesis.

Investigar la posible presencia de variantes en otros genes vinculados al transporte y metabolismo del MTX que pudiesen explicar las toxicidades debidas a este fármaco que no pudieron ser explicadas en esta tesis. Cabe mencionar que el equipo de trabajo del Laboratorio de Genética Molecular Humana (LGMH), en colaboración con la Fundación Pérez Scremini y el Polo de Genómica y Bioinformática, tiene un proyecto financiado por la ANII, en el que se plantea secuenciar mediante NGS los exones de 9 genes y 24 microRNAs vinculados al transporte y metabolismo del MTX en la fase de consolidación.

Investigar cuales son los factores genéticos que están influyendo en los eventos de toxicidad y en la respuesta al tratamiento en otras fases del tratamiento de la LLA, como por ejemplo la fase de inducción. Para ello, el equipo de trabajo del LGMH tiene un proyecto financiado por CSIC (iniciación 2019), en el que se plantea analizar polimorfismos relacionados con la prednisona, la L-asparaginasa y la vincristina. A su vez, este trabajo forma parte de la tesis de maestría de la Lic. Gabriela Burgueño-Rodríguez, miembro de dicho laboratorio.

Identificar las posibles variantes genéticas hereditarias involucradas con el riesgo de recaída en pacientes pediátricos con LLA. Para esto, el equipo de trabajo del LGMH tiene un proyecto financiado por CSIC (I+D 2020), que plantea secuenciar mediante NGS el exoma de pacientes con y sin recaídas con el fin de identificar variantes que puedan explicar el riesgo de recaída.

ANEXO I: Lista de AIMs

AIM	Cromosoma	Frecuencia alélica *		
		Africana	Europea	Nativo Am.
rs138022	22	0,833	0,262	0,330
rs249847	12	0,056	0,463	0,967
rs257748	5	0,806	0,381	0,967
rs708915	20	0,735	0,100	0,733
rs842634	2	0,972	0,738	0,233
rs888861	19	0,000	0,738	0,900
rs948360	11	0,250	0,974	1,000
rs1004704	16	0,028	0,214	0,867
rs1013459	18	0,233	0,900	0,967
rs1036543	2	0,750	0,024	0,767
rs1397618	10	0,294	0,952	1,000
rs1398829	4	0,222	0,976	1,000
rs1451928	14	0,861	0,857	0,200
rs1470524	2	0,222	0,786	0,533
rs1898280	8	0,889	0,238	0,833
rs1934393	1	0,222	0,842	0,300
rs2208139	20	0,833	0,667	0,033
rs2253624	17	0,176	1,000	1,000
rs2585901	13	0,765	0,854	0,067
rs2817611	1	0,278	0,952	0,967
rs2829454	21	0,056	0,274	0,933
rs4013967	9	0,059	0,655	1,000
rs4733652	8	0,917	0,762	0,100
rs4762106	12	0,806	0,095	0,667
rs6684063	1	0,222	0,833	0,167
rs6911727	6	0,139	0,476	1,000
rs9302185	15	0,875	0,190	0,033
rs9310888	3	0,667	0,075	0,000
rs9320808	6	0,861	0,095	0,967
rs10131076	14	0,694	0,071	0,000
rs10214949	7	0,281	0,845	0,967
rs10248051	7	0,083	0,833	0,200
rs10484578	6	0,944	0,375	0,067
rs10486576	7	0,944	0,900	0,200
rs10491097	17	0,056	0,647	0,133
rs10491654	9	0,500	0,286	0,900
rs10500505	16	0,056	0,214	0,800
rs10501474	11	0,056	0,643	0,800
rs10507688	13	0,000	0,167	0,733
rs10508349	10	0,056	0,012	0,767
rs10510791	3	0,972	0,488	0,133
rs10515535	5	1,000	0,286	0,133
rs10519979	4	0,167	0,451	0,967
rs10520678	15	0,154	0,732	1,000
rs12953952	18	0,139	0,927	0,967

* Yaeger et al. 2008

ANEXO II. Frecuencia de los 45 AIMs en pacientes y controles

AIM	Alelo Ref.	Alelo Var.	Pacientes				Controles			
			Genotípicas		χ^2	Frecuencia alélica*	Genotípicas		χ^2	Frecuencia alélica*
			Homo	Hetero			Homo	Hetero		
rs138022	A	G	0,054	0,370	0,0447	0,239	0,095	0,355	2,1898	0,273
rs249847 [#]	C	T	0,399	0,350	14,862	0,574	0,335	0,445	1,9236	0,558
rs257748	A	T	0,211	0,478	0,1854	0,450	0,205	0,513	0,1572	0,462
rs708915	T	A	0,484	0,385	2,2969	0,677	0,453	0,472	1,5913	0,689
rs842634	T	C	0,050	0,385	0,3861	0,242	0,082	0,434	0,2030	0,299
rs888861	C	T	0,150	0,406	1,9632	0,353	0,127	0,443	0,0897	0,348
rs948360	C	T	0,813	0,181	0,2054	0,903	0,811	0,170	1,2057	0,896
rs1004704	A	G	0,092	0,386	0,5335	0,285	0,060	0,410	0,5512	0,265
rs1013459	G	A	0,044	0,263	1,3223	0,175	0,006	0,274	2,0910	0,143
rs1036543	C	T	0,044	0,346	0,0624	0,217	0,040	0,307	0,0628	0,193
rs1397618	A	T	0,000	0,112	0,5644	0,056	0,006	0,139	0,0101	0,076
rs1398829	T	A	0,006	0,068	2,2512	0,040	0,006	0,107	0,3726	0,060
rs1451928 [#]	C	A	0,044	0,503	6,8927	0,296	0,082	0,399	0,0337	0,282
rs1470524	G	A	0,565	0,379	0,0865	0,755	0,494	0,437	0,6657	0,712
rs1898280 [#]	A	G	0,500	0,337	10,578	0,668	0,495	0,409	0,1434	0,699
rs1934393 ^Δ	G	C	0,162	0,465	0,1352	0,395	0,095	0,575	9,4370	0,383
rs2208139	C	T	0,243	0,466	0,6345	0,476	0,255	0,428	2,9041	0,469
rs2253624	G	T	0,807	0,186	0,2700	0,901	0,842	0,152	0,0054	0,918
rs2585901	A	G	0,107	0,403	0,4992	0,308	0,101	0,437	0,0027	0,320
rs2817611	T	C	0,012	0,199	0,0001	0,112	0,000	0,170	1,3688	0,085
rs2829454	A	G	0,481	0,415	0,1844	0,689	0,495	0,405	0,3241	0,698
rs4013967 [#]	G	A	0,553	0,335	4,5031	0,720	0,557	0,367	0,3174	0,741
rs4733652	T	C	0,063	0,413	0,3919	0,269	0,057	0,363	0,0004	0,239
rs4762106 ^{#Δ}	A	G	0,556	0,319	7,5240	0,716	0,506	0,348	6,2967	0,680
rs6684063 ^Δ	G	T	0,118	0,435	0,0986	0,335	0,050	0,528	8,0724	0,314
rs6911727	T	C	0,384	0,450	0,4430	0,609	0,333	0,449	1,1872	0,558
rs9302185	C	T	0,025	0,248	0,0689	0,149	0,045	0,290	0,5215	0,190
rs9310888	A	G	0,888	0,112	0,5644	0,944	0,849	0,138	0,9799	0,918
rs9320808	G	A	0,522	0,391	0,1968	0,717	0,471	0,414	0,4127	0,678
rs10131076	A	G	0,014	0,226	0,0663	0,127	0,015	0,221	0,0082	0,126
rs10214949	G	A	0,019	0,199	0,3292	0,118	0,025	0,201	1,1459	0,126
rs10248051	C	T	0,399	0,464	0,0011	0,631	0,445	0,470	1,2788	0,680
rs10484578	A	G	0,196	0,522	0,4867	0,457	0,185	0,535	1,2718	0,453
rs10486576	T	C	0,590	0,327	2,2705	0,753	0,584	0,336	1,5233	0,752
rs10491097 ^Δ	A	G	0,179	0,500	0,0764	0,429	0,170	0,395	4,5199	0,368
rs10491654	T	C	0,178	0,534	1,1661	0,445	0,125	0,518	1,5069	0,384
rs10500505	A	T	0,057	0,312	0,7754	0,213	0,026	0,237	0,2857	0,145
rs10501474 ^Δ	C	T	0,331	0,517	0,8287	0,590	0,390	0,410	4,4575	0,595
rs10507688	A	G	0,560	0,375	0,0094	0,747	0,633	0,327	0,0112	0,796
rs10508349 [#]	A	G	0,033	0,174	5,5683	0,120	0,020	0,150	3,2591	0,095
rs10510791	C	G	0,293	0,475	0,3864	0,530	0,345	0,430	3,2479	0,560
rs10515535	A	G	0,207	0,473	0,3225	0,443	0,236	0,482	0,2193	0,477
rs10519979	A	G	0,266	0,511	0,1031	0,522	0,245	0,525	0,5047	0,508
rs10520678	C	T	0,625	0,348	1,2539	0,799	0,610	0,365	2,4113	0,793
rs12953952	G	A	0,878	0,122	0,5542	0,939	0,810	0,177	0,1102	0,899

Ref. = referencia. Var. = Variante. Homo = Homocigota alelo de referencia. Hetero = Heterocigota. χ^2 = chi-cuadrado de equilibrio de Hardy-Weinberg. * alelo de referencia. [#] AIM no en equilibrio H-W en pacientes. ^Δ AIM no en eq. H-W en

ANEXO IIIa: Ancestralidad individual de los pacientes

ID	Africana	Europea	Nativo Am.	ID	Africana	Europea	Nativo Am.
FL1	0,089	0,413	0,498	FL56	0,112	0,682	0,206
FL3	0,034	0,866	0,100	FL57	0,101	0,841	0,058
FL4	0,041	0,885	0,075	FL58	0,112	0,593	0,295
FL5	0,025	0,559	0,417	FL59	0,067	0,637	0,296
FL6	0,101	0,823	0,076	FL61	0,073	0,687	0,239
FL7	0,039	0,817	0,144	FL62	0,176	0,716	0,108
FL8	0,276	0,590	0,134	FL64	0,106	0,471	0,423
FL9	0,035	0,903	0,061	FL66	0,248	0,503	0,248
FL10	0,115	0,770	0,115	FL67	0,099	0,709	0,192
FL11	0,182	0,573	0,245	FL68	0,208	0,552	0,240
FL12	0,053	0,593	0,354	FL70	0,136	0,662	0,202
FL13	0,310	0,491	0,199	FL71	0,061	0,720	0,219
FL14	0,100	0,723	0,177	FL72	0,330	0,632	0,038
FL15	0,075	0,557	0,368	FL73	0,107	0,502	0,391
FL16	0,046	0,830	0,124	FL74	0,068	0,624	0,308
FL17	0,143	0,819	0,038	FL75	0,344	0,563	0,093
FL19	0,183	0,421	0,396	FL76	0,056	0,889	0,055
FL21	0,033	0,861	0,106	FL77	0,097	0,852	0,051
FL22	0,195	0,644	0,161	FL78	0,053	0,802	0,145
FL23	0,063	0,802	0,135	FL79	0,045	0,683	0,272
FL24	0,095	0,681	0,224	FL80	0,062	0,548	0,390
FL25	0,029	0,778	0,193	FL81	0,227	0,548	0,226
FL26	0,091	0,543	0,366	FL82	0,047	0,709	0,244
FL27	0,044	0,922	0,034	FL83	0,069	0,705	0,226
FL29	0,087	0,496	0,417	FL84	0,135	0,643	0,222
FL30	0,049	0,855	0,096	FL85	0,070	0,789	0,141
FL31	0,089	0,669	0,242	FL86	0,077	0,840	0,083
FL33	0,089	0,882	0,029	FL87	0,124	0,803	0,073
FL35	0,301	0,528	0,170	FL88	0,068	0,905	0,027
FL36	0,054	0,781	0,165	FL89	0,249	0,689	0,062
FL37	0,379	0,198	0,424	FL90	0,041	0,698	0,261
FL38	0,313	0,571	0,116	FL91	0,049	0,851	0,100
FL39	0,036	0,947	0,017	FL92	0,029	0,747	0,224
FL40	0,173	0,731	0,096	FL93	0,034	0,512	0,453
FL42	0,132	0,392	0,476	FL94	0,023	0,723	0,254
FL43	0,055	0,778	0,167	FL95	0,062	0,874	0,064
FL44	0,056	0,769	0,175	FL96	0,198	0,602	0,200
FL45	0,097	0,714	0,189	FL97	0,110	0,587	0,303
FL46	0,081	0,505	0,415	FL98	0,084	0,736	0,180
FL47	0,056	0,772	0,171	FL99	0,111	0,807	0,082
FL48	0,050	0,879	0,070	FL100	0,061	0,679	0,259
FL49	0,127	0,716	0,157	FL101	0,063	0,478	0,458
FL51	0,079	0,753	0,168	FL102	0,071	0,749	0,180
FL52	0,061	0,717	0,222	FL103	0,038	0,721	0,241
FL54	0,247	0,319	0,434	FL104	0,124	0,710	0,166
FL55	0,047	0,847	0,106	FL105	0,067	0,842	0,091

ANEXO IIIa (Cont.)

ID	Africana	Europea	Nativo Am.	ID	Africana	Europea	Nativo Am.
FL106	0,274	0,416	0,309	FL153	0,045	0,594	0,361
FL107	0,032	0,746	0,222	FL154	0,040	0,740	0,219
FL108	0,072	0,892	0,037	FL155	0,078	0,640	0,282
FL109	0,416	0,542	0,042	FL156	0,134	0,612	0,254
FL110	0,101	0,764	0,135	FL157	0,115	0,779	0,106
FL111	0,036	0,616	0,348	FL158	0,038	0,771	0,191
FL112	0,094	0,817	0,089	FL159	0,152	0,817	0,031
FL113	0,171	0,694	0,135	FL160	0,133	0,735	0,132
FL114	0,168	0,671	0,161	FL161	0,060	0,774	0,166
FL115	0,115	0,727	0,158	FL162	0,120	0,534	0,346
FL116	0,091	0,612	0,298	FL163	0,148	0,747	0,106
FL117	0,117	0,799	0,084	FL164	0,184	0,517	0,299
FL118	0,028	0,624	0,348	FL165	0,115	0,581	0,304
FL119	0,167	0,637	0,196	FL166	0,023	0,929	0,048
FL120	0,060	0,626	0,314	FL167	0,166	0,747	0,087
FL121	0,038	0,880	0,082	FL168	0,223	0,339	0,439
FL122	0,023	0,814	0,163	FL169	0,038	0,845	0,117
FL123	0,210	0,396	0,394	FL170	0,056	0,644	0,301
FL124	0,048	0,804	0,148	FL171	0,201	0,733	0,066
FL125	0,140	0,544	0,317	FL172	0,075	0,739	0,186
FL126	0,055	0,865	0,080	FL173	0,053	0,650	0,297
FL127	0,093	0,769	0,138	FL174	0,045	0,737	0,219
FL128	0,188	0,266	0,546	FL175	0,079	0,626	0,295
FL129	0,054	0,876	0,071	FL176	0,082	0,851	0,067
FL130	0,233	0,643	0,124	FL178	0,219	0,560	0,222
FL131	0,033	0,433	0,535	FL179	0,189	0,719	0,091
FL132	0,045	0,780	0,175	FL180	0,048	0,840	0,112
FL133	0,139	0,736	0,126	FL181	0,052	0,725	0,223
FL134	0,112	0,790	0,098	FL182	0,037	0,886	0,077
FL135	0,150	0,596	0,254	FL184	0,156	0,680	0,165
FL136	0,072	0,896	0,032	FL185	0,218	0,646	0,136
FL137	0,147	0,681	0,172	FL186	0,050	0,764	0,185
FL138	0,167	0,753	0,080	FL189	0,199	0,675	0,126
FL139	0,046	0,716	0,238	FL190	0,090	0,728	0,182
FL140	0,024	0,856	0,120	FL192	0,102	0,836	0,061
FL141	0,180	0,781	0,039	FL194	0,054	0,810	0,137
FL142	0,154	0,712	0,134	FL195	0,064	0,483	0,453
FL143	0,120	0,546	0,335	FL198	0,153	0,702	0,145
FL144	0,083	0,828	0,088	FL199	0,036	0,851	0,113
FL145	0,080	0,640	0,279	FL200	0,076	0,852	0,072
FL146	0,065	0,844	0,092	FL201	0,210	0,657	0,133
FL147	0,073	0,352	0,575	FL202	0,072	0,684	0,244
FL148	0,202	0,717	0,081	FL203	0,112	0,515	0,373
FL149	0,095	0,730	0,175	FL206	0,036	0,722	0,243
FL150	0,079	0,708	0,213	FL207	0,175	0,743	0,082
FL151	0,050	0,666	0,284	FL209	0,093	0,719	0,188
FL152	0,227	0,592	0,181				

ANEXO IIIb: Ancestralidad individual de los Controles

ID	Africana	Europea	Nativo Am.	ID	Africana	Europea	Nativo Am.
601	0,077	0,730	0,193	651	0,051	0,856	0,093
602	0,087	0,578	0,335	652	0,016	0,932	0,052
603	0,147	0,770	0,083	653	0,178	0,772	0,050
604	0,205	0,751	0,045	654	0,034	0,924	0,041
605	0,043	0,825	0,132	655	0,051	0,754	0,195
606	0,074	0,741	0,185	656	0,100	0,423	0,478
607	0,188	0,619	0,193	657	0,136	0,737	0,127
608	0,092	0,802	0,106	658	0,082	0,839	0,079
609	0,047	0,779	0,174	659	0,071	0,733	0,196
610	0,075	0,571	0,354	660	0,260	0,588	0,152
611	0,154	0,615	0,231	661	0,172	0,579	0,249
612	0,110	0,826	0,064	662	0,067	0,888	0,045
613	0,227	0,693	0,080	663	0,068	0,900	0,033
614	0,094	0,827	0,079	664	0,221	0,717	0,062
615	0,022	0,691	0,288	665	0,067	0,680	0,253
616	0,350	0,522	0,128	666	0,219	0,489	0,291
617	0,120	0,743	0,137	667	0,073	0,710	0,217
618	0,066	0,774	0,161	668	0,065	0,754	0,181
619	0,259	0,649	0,092	669	0,200	0,522	0,278
620	0,180	0,665	0,155	670	0,098	0,662	0,241
621	0,068	0,811	0,121	671	0,037	0,788	0,175
622	0,334	0,619	0,046	672	0,288	0,614	0,099
623	0,280	0,604	0,117	673	0,151	0,703	0,146
624	0,041	0,778	0,181	674	0,190	0,589	0,222
625	0,027	0,688	0,285	675	0,022	0,850	0,128
626	0,071	0,902	0,028	676	0,075	0,821	0,104
627	0,103	0,683	0,214	677	0,210	0,600	0,189
628	0,092	0,844	0,063	678	0,247	0,657	0,095
629	0,268	0,399	0,334	679	0,098	0,759	0,143
630	0,109	0,759	0,132	680	0,208	0,742	0,050
631	0,038	0,778	0,184	681	0,109	0,758	0,133
632	0,051	0,790	0,159	682	0,028	0,693	0,278
633	0,188	0,692	0,120	683	0,072	0,711	0,217
634	0,134	0,613	0,253	684	0,155	0,771	0,074
635	0,018	0,908	0,074	685	0,017	0,534	0,449
636	0,091	0,673	0,236	686	0,027	0,598	0,375
637	0,164	0,559	0,277	687	0,056	0,660	0,284
638	0,047	0,688	0,265	688	0,416	0,524	0,059
639	0,038	0,851	0,112	689	0,067	0,757	0,176
640	0,089	0,775	0,135	690	0,158	0,802	0,040
641	0,064	0,763	0,173	691	0,057	0,800	0,143
642	0,159	0,555	0,286	692	0,044	0,791	0,165
643	0,121	0,845	0,034	693	0,206	0,720	0,074
644	0,249	0,670	0,080	694	0,042	0,855	0,104
645	0,115	0,753	0,133	695	0,280	0,382	0,338
646	0,239	0,525	0,236	696	0,064	0,880	0,056
647	0,016	0,771	0,213	697	0,077	0,778	0,144
648	0,083	0,645	0,272	698	0,158	0,674	0,169
649	0,089	0,878	0,033	699	0,121	0,551	0,327
650	0,095	0,857	0,048	700	0,214	0,675	0,111

ANEXO IIIb (Cont.)

ID	Africana	Europea	Nativo Am.	ID	Africana	Europea	Nativo Am.
701	0,304	0,635	0,061	751	0,294	0,649	0,057
702	0,301	0,552	0,148	752	0,209	0,755	0,035
703	0,317	0,218	0,465	753	0,215	0,464	0,322
704	0,044	0,794	0,162	754	0,090	0,620	0,291
705	0,098	0,636	0,266	755	0,084	0,652	0,264
706	0,165	0,765	0,070	756	0,197	0,709	0,094
707	0,055	0,769	0,176	757	0,036	0,807	0,157
708	0,079	0,601	0,319	758	0,107	0,800	0,093
709	0,036	0,596	0,368	759	0,099	0,771	0,130
710	0,054	0,676	0,270	760	0,083	0,552	0,366
711	0,023	0,690	0,287	761	0,099	0,774	0,127
712	0,039	0,732	0,228	762	0,062	0,689	0,249
713	0,020	0,751	0,229	763	0,339	0,516	0,145
714	0,051	0,842	0,108	764	0,188	0,665	0,147
715	0,300	0,626	0,075	765	0,091	0,701	0,208
716	0,173	0,645	0,182	766	0,047	0,831	0,122
717	0,117	0,773	0,110	767	0,111	0,767	0,121
718	0,055	0,617	0,328	768	0,131	0,631	0,238
719	0,190	0,514	0,296	769	0,054	0,841	0,105
720	0,340	0,509	0,150	770	0,134	0,748	0,119
721	0,050	0,889	0,061	771	0,254	0,697	0,049
722	0,057	0,783	0,160	772	0,203	0,632	0,164
723	0,120	0,424	0,457	773	0,117	0,855	0,028
724	0,039	0,784	0,178	774	0,053	0,800	0,147
725	0,210	0,513	0,277	775	0,087	0,800	0,113
726	0,165	0,756	0,079	776	0,022	0,742	0,236
727	0,079	0,829	0,092	777	0,065	0,686	0,250
728	0,130	0,791	0,079	778	0,08	0,577	0,343
729	0,048	0,734	0,218	779	0,051	0,646	0,303
730	0,073	0,878	0,049	780	0,060	0,714	0,226
731	0,035	0,921	0,044	781	0,133	0,786	0,081
732	0,128	0,793	0,079	782	0,120	0,787	0,093
733	0,183	0,685	0,132	783	0,200	0,690	0,111
734	0,262	0,547	0,192	784	0,278	0,550	0,172
735	0,161	0,697	0,142	785	0,065	0,680	0,256
736	0,073	0,817	0,111	786	0,150	0,715	0,135
737	0,093	0,541	0,366	787	0,037	0,877	0,086
738	0,186	0,628	0,186	788	0,208	0,563	0,229
739	0,087	0,879	0,034	789	0,140	0,611	0,249
740	0,129	0,729	0,142	790	0,050	0,854	0,096
741	0,167	0,675	0,158	791	0,056	0,696	0,248
742	0,266	0,689	0,045	792	0,103	0,839	0,059
743	0,108	0,841	0,051	793	0,181	0,664	0,155
744	0,053	0,635	0,311	794	0,199	0,708	0,093
745	0,103	0,722	0,175	795	0,203	0,690	0,107
746	0,137	0,764	0,100	796	0,223	0,560	0,217
747	0,184	0,690	0,125	797	0,035	0,574	0,391
748	0,074	0,893	0,033	798	0,329	0,494	0,177
749	0,083	0,741	0,176	799	0,087	0,727	0,187
750	0,047	0,626	0,327	800	0,060	0,608	0,332

***TPMT* and *NUDT15* genes are both related to mercaptopurine intolerance in acute lymphoblastic leukaemia patients from Uruguay**

Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) is the most common childhood cancer in Uruguay and worldwide, comprising approximately 25% of all cancers in children under 15 years (Hunger & Mullighan, 2015). In recent decades, the event-free survival rate of ALL patients in Uruguay has significantly increased, reaching about 80%. This is similar to that observed in developed countries (Castillo *et al*, 2012). However, adverse events related to drugs such as 6-mercaptopurine (6-MP) remain an important complication of therapy. Accumulation of 6-MP metabolites can cause haematological and hepatic toxicities contributing to the morbi-mortality of ALL. *TPMT* gene variants have been associated with haematological toxicity in many populations, mainly with European ancestry. However, in Asian-or Asian-derived populations, such as Native Americans, the frequency of *TPMT* variants is lower and only explains a small element of toxicity. Recent studies have shown that variants in other genes, such as *ITPA* and *NUDT15*, can better explain the toxicity observed in these populations (Yang *et al*, 2015; Moriyama *et al*, 2016). The Uruguayan population is mainly comprised by individuals with European ancestry (Spaniards, Italians, Portuguese, Basques, etc.) with a minor proportion of Native Americans and African populations (Sans *et al*, 1997). The tri-hybrid structure of the Uruguayan population, similar to other Latin-American populations, may allow the co-existence of *TPMT*, *ITPA* and *NUDT15* variants at high frequency.

Here, we present data of *TPMT*, *ITPA* and *NUDT15* genetic variant frequencies and their relationship with haematological toxicity relative to 6-MP maintenance therapy. We analysed a sample of 124 ALL Uruguayan paediatric patients aged 1–15 years, followed up at the Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica from Pereira-Rosell Hospital, Montevideo, Uruguay. The protocol and procedure employed for this research were undertaken in compliance with the Helsinki Declaration and patient parents gave written informed consent to participate in this research. All patients were treated according to the Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) protocol and receive uniform oral maintenance therapy of 6-MP (50 mg/m²/day) and methotrexate (20 mg/m²/week). Complete blood count (CBC) was performed weekly during the first 2 months of maintenance and then every two or three weeks.

The *ITPA* c.94C>A (rs1127354) variant and *NUDT15* variants were determined by automated sequencing using

previously reported primers (Cao & Hegele, 2002; Moriyama *et al*, 2016). *TPMT**2, *3A, *3B and *3C variants were determined as previously described (Ameyaw *et al*, 1999). The cumulative 6-MP dose at weeks 8, 16 and 24, and the mean weekly 6-MP dose were compared between individuals with and without these variants by the Kruskal–Wallis test. We also analysed the association between gene variants and the number of cases with leucopenia grade 3–4 (White blood cell count <2.0 × 10⁹/l) by the Mann–Whitney test. Moreover, odd ratios were determined to evaluate the leucopenia risk among patients with and without gene variants. Twenty-two patients were excluded from these analyses due to the presence of germline chromosomal abnormalities or because they were not yet in maintenance phase. Statistical analyses were performed in SPSS 22.0 (IBM Corp. Armonk, NY, USA) with 95% confidence interval.

TPMT variants were observed in 13 individuals; 12 were heterozygous for *TPMT**3A and one for *TPMT**2. The spectrum and frequency of heterozygotes (10.5%) is similar to that observed for other Latin-American and European populations. However, the *ITPA* 94A variant frequency (5.3%) was higher than that reported for a Chilean population (Silva *et al*, 2008; Farfan *et al*, 2014; Aráoz *et al*, 2015). Interestingly, 11 of the 115 individuals analysed were heterozygous for *NUDT15* variants: five for *NUDT15**2, two for *3, one for *4 and three for *6. This frequency (8.8%) is similar to that reported for Guatemalan and other American populations that have a higher Native American influence than in Uruguay (Sans *et al*, 1997; Moriyama *et al*, 2016).

ITPA c.94C>A variant was not associated with 6-MP dose, number of leucopenia events or risk of leucopenia (data not shown). For *TPMT* and *NUDT15*, we assigned a genetic risk score for each individual based on the number of risk alleles in both genes as previously reported (Yang *et al*, 2015): zero (no *TPMT* or *NUDT15* variants), one (presence of *TPMT* or *NUDT15* variant) or two risk alleles (presence of *TPMT* and *NUDT15* variants). The 6-MP dose was significantly lower in individuals with one or two risk alleles compared to those without risk alleles in all analysed intervals. Similar results were observed with the mean weekly 6-MP dose. In contrast to previous reports (Yang *et al*, 2015), the cumulative 6-MP dose for individuals with two risk alleles was higher than those with one risk allele at weeks 8 and 16. However, this was not observed at week 24 or when we analysed the mean

weekly 6-MP dose (Fig 1). Although we cannot exclude interactions between *TPMT* and *NUDT15* genes, it is more probable that the observed difference is due to the low number of individuals with two risk alleles and/or to more accurate 6-MP dosage during the maintenance phase.

In the first eight weeks and in the interval from week 17 to 24, the risk of leucopenia was significantly higher in individuals with one or two risk alleles for *TPMT* and/or *NUDT15* compared to those without risk alleles (Table I). Although the same bias was observed during weeks 6 to 16, the odd ratios were not significant. This may be explained by an increased number of individuals with leucopenia without

risk alleles due to 6-MP accumulation. Similar results were obtained when the number of leucopenia events were analysed.

In summary, our study shows that the cumulative frequency of *TPMT* and *NUDT15* variants was approximately 20%, and explains a significant fraction of toxicities related to 6-MP therapy in Uruguayan ALL patients. This frequency is higher than that observed in European populations and similar to some Asian populations (Ameyaw *et al*, 1999; Yang *et al*, 2015; Moriyama *et al*, 2016). These results could be relevant to other Latin-American countries with different European and Native-American contributions. Hence,

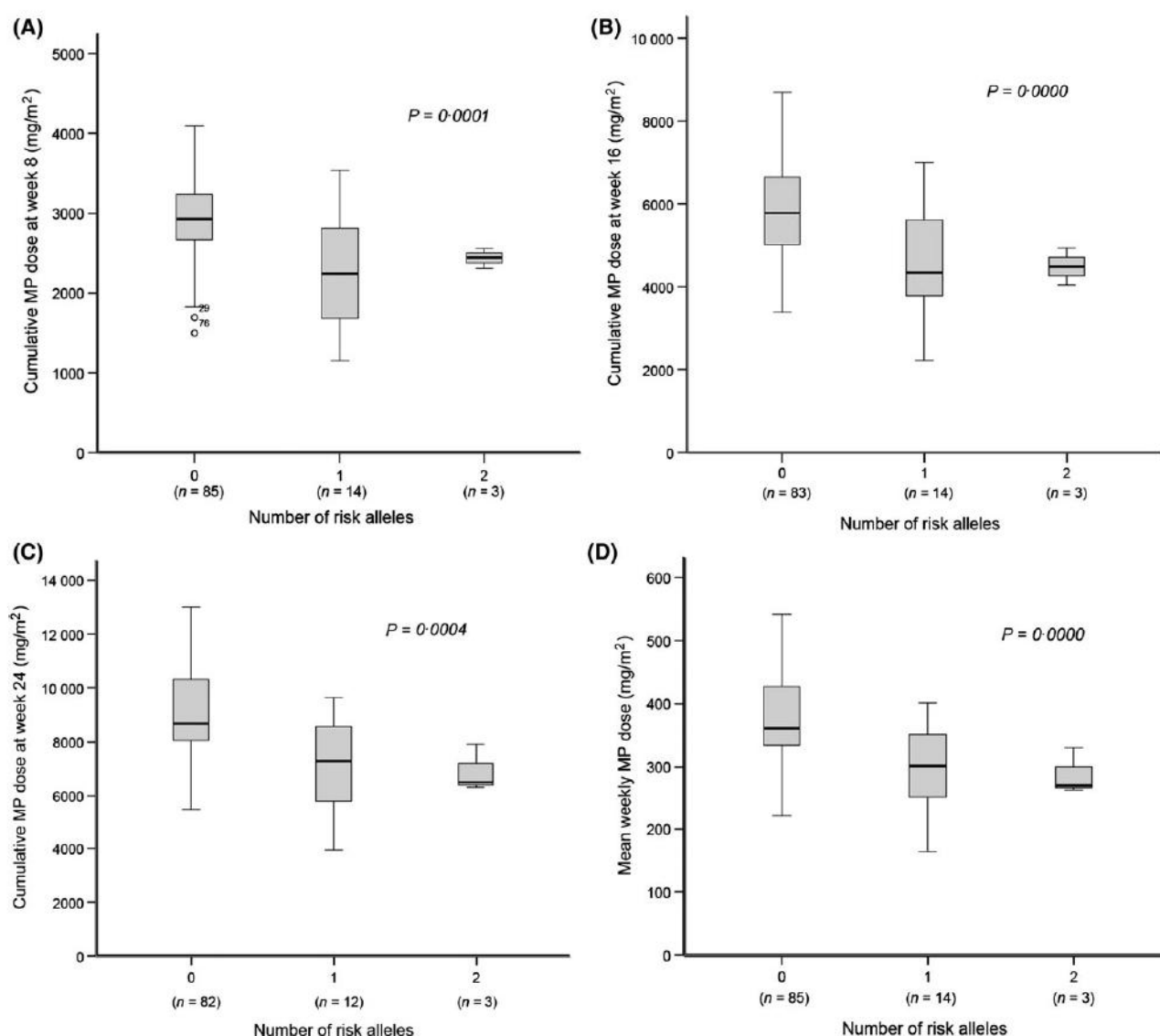


Fig 1. *NUDT15* and/or *TPMT* genotypes and 6-mercaptopurine (6-MP) dose (mg/m²). Patients were classified as 0, 1 and 2 according to the number of *TPMT* and/or *NUDT15* variants (rs1800462, rs1800460 and rs1142345 in *TPMT* contributing to alleles *2, *3A, *3B and *3C; rs116855232, rs55440599 and rs147390019 in *NUDT15* contributing to alleles *2, *3, *4 and *6). P-values were estimated by Kruskal–Wallis test. Each box includes data between 25th and 75th percentiles, with horizontal line indicating the median. Whiskers indicate maximal and minimal observations within 1.5 × length of box. (A) Cumulative 6-MP dose (mg/m²) at week 8. (B) Cumulative 6-MP dose (mg/m²) at week 16. (C) Cumulative 6-MP dose at week 24. (D) Mean weekly 6-MP dose (mg/m²). MP, 6-mercaptopurine.

Table I. Association between risk alleles of *TPMT* and *NUDT15* and the presence or number of grade 3 or 4 leucopenia events (WBC $<2.0 \times 10^9/l$).

		Presence of leucopenia grade 3 and 4			
		Risk alleles*			
Weeks		0 N (%)	≥1 N (%)	OR (95% CI)	P
1–8	WBC>2.0 × 10 ⁹ /l	54 (63.5)	6 (35.3)	3.194 (1.075–9.483)	0.037
	WBC<2.0 × 10 ⁹ /l	31 (36.5)	11 (64.7)		
9–16	WBC>2.0 × 10 ⁹ /l	40 (48.2)	5 (29.4)	2.233 (0.722–6.902)	0.163
	WBC<2.0 × 10 ⁹ /l	43 (51.8)	12 (70.6)		
17–24	WBC>2.0 × 10 ⁹ /l	58 (70.7)	6 (40.0)	3.625 (1.163–11.304)	0.026
	WBC<2.0 × 10 ⁹ /l	24 (29.3)	9 (60.0)		

		Number of grade 3/4 leucopenia events			
		Risk alleles*			
Weeks		0	≥1		P
1–8	Average rank	48.48	66.62		0.007
9–16		48.90	58.29		0.191
17–24		46.45	62.97		0.008

*Individuals with one or more risk alleles in *NUDT15* and/or *TPMT* genes were assigned to category ≥ 1 . WBC: White blood cell count. OR: odds ratio; 95% CI: 95% confidence interval. Association between the numbers of leucopenia events was estimated by Mann–Whitney test. *P* values ≤ 0.05 (in italic) were considered statistically significant.

specific studies for each Latin-American country are necessary to elucidate which genes are important to explain related 6-MP toxicity.

Acknowledgements

NO, YM AL and AS provided patient samples and clinical data. AMS and JdL designed and performed the research and the data analysis. JdL, AD and LC supervised the study. AMS and JdL wrote the manuscript. All authors read and reviewed the manuscript. This project was funded by Comisión Coordinadora del Interior, Universidad de la República (CCI-UdelaR) and the Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer (CHLCC).

Conflict of interest

The authors report no conflicts of interest.

Ana M. Soler¹
Natalia Olano²
Yessika Méndez²

References

Ameyaw, M.M., Collie-Duguid, E.S.R., Powrie, R.H., Ofori-Adjei, D. & McLeod, H.L. (1999) Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanaian populations. *Human Molecular Genetics*, **8**, 367–370.

Aráoz, H.V., D'Aloí, K., Foncuberta, M.E., Sanchez La Rosa, C.G., Alonso, C.N., Chertkoff, L. & Felice, M. (2015) Pharmacogenetic studies in children with acute lymphoblastic leukemia in Argentina. *Leukemia & Lymphoma*, **56**, 1370–1378.

Cao, H. & Hegele, R.A. (2002) DNA polymorphisms in *ITPA* including basis of inosine

triphosphatase deficiency. *Journal Human Genetics*, **47**, 620–622.

Castillo, L., Dabiezies, A., Dufort, G., Pages, C., Carracedo, M., Castiglioni, M., Simón, E., Zuccolo, S., Barcelona, R., Incoronato, A., Schelotto, M., Morosini, F., Ferrando, M., Siri, A. & Silveira, A. (2012) Evolución del cáncer pediátrico

Ana Lopes²
Anaulina Silveira²
Agustin Dabiezies²
Luis Castillo²
Julio A. da Luz¹

¹Laboratorio de Genética Molecular Humana, CENUR Litoral Norte-Sede Salto, Universidad de la República, Salto, and ²Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica, Centro Hospitalario Pereira Rosell, Montevideo, Uruguay.
E-mails: jdal@fmed.edu.uy, jdal@adinet.com.uy

Keywords: Paediatric Acute Lymphoblastic Leukaemia, Pharmacogenetic, *NUDT15*, *TPMT*, 6-Mercaptopurine

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table SI. *TPMT*, *NUDT15* and *ITPA* variants frequency.

Correspondence

- en Uruguay (1992–2011). *Archivos de Pediatría del Uruguay*, **83**, 26–30.
- Farfan, M.J., Salas, C., Canales, C., Silva, F., Villarroel, M., Kopp, K., Torres, J.P., Santolaya, M.E. & Morales, J. (2014) Prevalence of TPMT and ITPA gene polymorphisms and effect on mercaptopurine dosage in Chilean children with acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer*, **14**, 299.
- Hunger, S.P. & Mullighan, C.G. (2015) Acute lymphoblastic leukemia in children. *New England Journal of Medicine*, **373**, 1541–1552.
- Moriyama, T., Nishii, R., Perez-Andreu, V., Yang, W., Klusmann, F.A., Zhao, X., Lin, T.N., Hoshitsuki, K., Nersting, J., Kihira, K., Hofmann, U., Komada, Y., Kato, M., McCorkle, R., Li, L., Koh, K., Najera, C.R., Kham, S.K., Isobe, T., Chen, Z., Chiew, E.K., Bhojwani, D., Jeffries, C., Lu, Y., Schwab, M., Inaba, H., Pui, C.H., Relling, M.V., Manabe, A., Hori, H., Schmiegelow, K., Yeoh, A.E., Evans, W.E. & Yang, J.J. (2016) NUDT15 polymorphisms alter thiopurine metabolism and hematopoietic toxicity. *Nature Genetics*, **48**, 367–373.
- Sans, M., Salzano, F.M. & Chakraborty, R. (1997) Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. *Human Biology*, **69**, 161–170.
- Silva, M.R., de Oliveira, B.M., Viana, M.B., Murao, M. & Romanha, A.J. (2008) Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene polymorphism in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: association with clinical and laboratory data. *Therapeutic Drug Monitoring*, **30**, 700–704.
- Yang, J.J., Landier, W., Yang, W., Liu, C., Hageman, L., Cheng, C., Pei, D., Chen, Y., Crews, K.R., Kornegay, N., Wong, F.L., Evans, W.E., Pui, C.H., Bhatia, S. & Relling, M.V. (2015) Inherited NUDT15 variant is a genetic determinant of mercaptopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal Clinical Oncology*, **33**, 1235–1242.