

Universidad de la República Oriental del Uruguay

Facultad de Química



Laboratorio de Biología Molecular



TESIS DE MAESTRIA

Lic. Andrea Giletti Cateura

**FARMACOGENÉTICA DEL METOTREXATE EN ADULTOS
URUGUAYOS CON PATOLOGÍA HEMATOONCOLOGICA**

Dra. Patricia Esperón

Directora de tesis

Setiembre2016



ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN.....	5
VÍA Y FARMACOGENÉTICA DEL MTX	9
OBJETIVOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Grupo de estudio.....	14
Genotipificación.....	15
Extracción de ADN.....	15
Electroforesis en gel de poliacrilamida	15
Diseño de oligonucleótidos y selección de enzimas de restricción	16
Selección de variantes genéticas y sus métodos de análisis	16
Secuenciación de ADN.....	18
Relevamiento y registro de datos clínicos	18
Análisis Estadístico.....	21
Determinación del equilibrio de Hardy Weinberg (HW)	21
Estudios estadísticos de asociación.....	21
RESULTADOS	23
Características demográficas y datos clínicos.....	23
Distribución genotípica y frecuencias alélicas	25
Estudios de asociación entre polimorfismos genéticos y datos clínicos.....	28
Construcción de árboles de decisión	32
Artículos científicos escritos durante el estudio.....	34
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	34
PERSPECTIVAS.....	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
APÉNDICE 1	47
APÉNDICE 2	49
APÉNDICE 3	64

RESUMEN

La variabilidad interindividual en la respuesta y toxicidad a tratamientos es un problema muy común y serio, que causa preocupación y puede ser responsable de la reducción de la dosis o discontinuación del tratamiento. La Farmacogenética busca predecir dicha variabilidad, mediante el análisis y uso de la información genética individual o poblacional.

El metotrexate(MTX), análogo estructural del ácido fólico, ha sido un fármaco altamente efectivo en tratamientos oncológicos y autoinmunes. Sin embargo presenta una gran variabilidad interindividual en su respuesta farmacológica y toxicidad. Una de las causas de dicha variabilidad es la existencia de polimorfismos en los genes que codifican proteínas transportadoras y dianas del MTX.

El objetivo general de este trabajo fue contribuir al conocimiento para un diseño de una terapia personalizada con MTX.

Como forma de realizar una aproximación a una vía tan compleja, desde el ingreso del MTX hasta su blanco de acción en la célula, nos propusimos evaluar la distribución y analizar la asociación entre la toxicidad y eficacia del tratamiento y los polimorfismos en los genes que codifican para los transportadores: de folato reducido (SLC19A1) G₈₀A y de solutos de aniones orgánicos de la familia 1B1 (SLCO1B1) T₅₂₁C; así como también en los genes que codifican para las enzimas involucradas en la actividad del MTX: 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) C₆₇₇T y A₁₂₉₈C, variación en el número de copias de 28 pb en el gen timidilato sintasa (TYMS) y dihidrofolato reductasa (DHFR) C-₁₆₁₀G/T, C-₆₈₀A, A-₃₁₇G y el polimorfismo que consiste en una inserción/delección de 19 pb.

El grupo de estudio consistió en 41 pacientes adultos uruguayos con leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma no-Hodgkin (LNH) agresivo tratados con un protocolo de poliquimioterapia que incluyera mediana y/o altas dosis de MTX y en un grupo control de 55 adultos uruguayos voluntarios sanos. De dichos pacientes se relevaron los parámetros clínicos y de laboratorio obtenidos del seguimiento de la terapia.

El análisis univariante mostró asociaciones entre: toxicidad hematológica y DHFR C-₁₆₁₀G/T y MTHFR C₆₇₇T; toxicidad hepática y DHFR C-₆₈₀A; toxicidad GI y MTHFR C₆₇₇T, DHFR A-₃₁₇G y DHFR 19 pb indel; así como también modificación de dosis de MTX durante la terapia con SLC19A1 G₈₀A.

El análisis multivariante mostró que los alelos DHFR-₁₆₁₀ G/T (OR = 9,3, $p = 0,018$) y MTHFR₆₇₇ T (OR = 8,1, $p = 0,026$) tenían un fuerte efecto protector frente a la toxicidad hematológica, mientras que el genotipo DHFR-₁₆₁₀ CC (OR = 0,12, $p = 0,045$) aumenta esta toxicidad.

Los resultados en este pequeño cohorte uruguayo sobre los modificadores genéticos de la terapia con MTX, promueven futuras investigaciones más extensas, para así obtener una mejor individualización de dosis en pacientes adultos con LLA y LNH.

INTRODUCCIÓN

El efecto de la información genética de un individuo sobre su capacidad de metabolizar fármacos es uno de los diversos factores que ocasionan considerable variación interindividual en la respuesta de pacientes a los fármacos.

La Farmacogenética es una disciplina que se ocupa de identificar uno o unos pocos genes candidatos a presentar variaciones genéticas heredables responsables de una respuesta única a un fármaco, mientras que la Farmacogenómica toma un abordaje más amplio partiendo de variaciones en todos los genes responsables de una respuesta compleja. Los fármacos de mayor interés son aquellos con un rango terapéutico estrecho en los cuales la concentración efectiva se encuentra cercana a la concentración tóxica o a la concentración que ocasionando el fracaso terapéutico.

El objetivo general de los estudios farmacogenéticos es lograr una terapia individualizada la cual nos permita considerar las características particulares del paciente para la toma de decisiones de salud, para así obtener el mayor beneficio terapéutico, mejorar la eficacia del uso de fármacos y reducir o prevenir los efectos adversos a los mismos. Este tipo de abordaje representa un cambio sustancial respecto al actual paradigma basado en poblaciones, el cual extrapola algoritmos basados en el promedio de las observaciones de la experiencia global de una población y los aplica a sus integrantes.

Incluso si las variaciones genéticas de interés para la Farmacogenética son comunes a las diferentes poblaciones, la frecuencia de las mismas puede variar entre las diferentes poblaciones ancestrales. Esto limita la capacidad de extrapolar los hallazgos obtenidos en una única población. Razón por la cual los datos reportados a partir de estudios realizados sobre poblaciones europeas y norteamericanas, no pueden ser extrapolados directamente a la población uruguaya debido a la ancestría particular de la misma. Los datos genéticos muestran aportes genéticos de 6% africano, 10% indígena y 84% europeo, mientras que la ancestría materna sube estos valores a 10%, 31% y 59% respectivamente ¹.

Los marcadores de dicha información ancestral son marcadores genéticos, comúnmente polimorfismos simple de nucleótido (SNP), que ayudan a identificar

poblaciones diferentes porque tienen diferentes frecuencias alélicas. Los alelos de SNPs próximos, normalmente están asociados y se heredan conjuntamente en forma de bloque, diciéndose que están en desequilibrio de ligamiento (LD). Los patrones de LD describen la historia de una población, las migraciones humanas, la selección natural, así como también la localización de sitios de recombinación.

La Farmacogenética es de particular importancia en oncología. Rama en la cual los fármacos utilizados presentan rangos terapéuticos estrechos y toxicidades significativas que pueden llegar a poner en riesgo la vida del paciente. Lograr identificar a aquellos pacientes que probablemente respondan al tratamiento o experimenten toxicidad a un fármaco quimioterápico, tendría un impacto significativo en la respuesta al tratamiento.

La Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) incluye desde hace unos años información farmacogenética sobre algunos fármacos quimioterápicos².

Hoy en día, se conocen varios ejemplos de polimorfismos en la línea germinal y mutaciones somáticas con la capacidad de predecir la potencial respuesta y/o toxicidad de fármacos quimioterápicos. Se ha observado un patrón de variabilidad interétnica en la respuesta y toxicidad a algunos fármacos quimioterápicos.

En particular, nos planteamos en este trabajo ver la aplicabilidad de estos conceptos en el campo de la hematooncología, concentrándonos en el estudio de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) y Linfoma No Hodgkin (LNH). La LLA es un tipo de cáncer de las células sanguíneas y de la médula ósea con rápida progresión, y el LNH es un tipo de cáncer originario del sistema linfático. Se encuentran dentro de los 15.100 nuevos casos de cáncer por año de Uruguay. La Sociedad Uruguaya de Hematología (<http://www.shu.com.uy>, último acceso 12 de setiembre del 2016) registró, una incidencia de 1,68 para LLA (período 2013-2014) y 9,84 para LNH (período 2010) por cada 100.000 habitantes por año. Los pacientes diagnosticados con LNH con residencia en la ciudad de Montevideo en el período 2007-2011 fueron 511 hombres y 508 mujeres y mientras que los pacientes con LLA para el período 2012 al 2014 fueron 100.

A pesar de que la sobrevida de los pacientes con LLA y LNH ha mejorado en los últimos años, todavía muchos factores se encuentran influenciando la eficacia del tratamiento y la sobrevida. La variabilidad interindividual en la respuesta y toxicidad a tratamientos es un problema muy común y serio, que causa preocupación y puede ser responsable de deber reducir la dosis o discontinuar el tratamiento, sin importar la enfermedad que está siendo tratada y la dosis utilizada^{3, 4, 5, 6, 7}.

La quimioterapia antifolato tuvo su origen en 1948 cuando el Dr. Sidney Farber del Hospital Infantil de Boston al estudiar el efecto del ácido fólico en la leucemia aguda infantil, logró una remisión temporaria de la enfermedad luego de administrar Metotrexate (MTX, ácido 2,4-diamino-N10-metil propil-glutamico) un análogo estructural del ácido fólico^{8, 9}.

El interés en antagonistas del folato aumentó con el desarrollo de una terapia combinada para LLA infantil. En esta terapia el MTX tuvo un papel crucial tanto en el tratamiento a nivel sistémico como a nivel del sistema nervioso central. La introducción de regímenes de altas dosis seguidos del rescate del paciente con ácido fólico, extendió la efectividad del MTX a linfomas agresivos tanto sistémicos (Burkitt) como del sistema nervioso central (SNC), osteosarcomas, leucemias y a otros como lo son el cáncer de mama, colorectal, cabeza y cuello⁵.

Además de su actividad antineoplásica, el MTX inhibe reacciones inmunes mediadas por células, por lo que es comúnmente utilizada para el tratamiento de la psoriasis artrítica y artritis reumatoidea. También es utilizada para el tratamiento de otras enfermedades inmunológicas como la psoriasis severa, esclerosis múltiple, dermatomiositis, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Crohn y suprime la enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD) en el trasplante alogénico de medula ósea y órganos^{5, 10, 11, 12}.

El MTX actúa como un inhibidor competitivo de algunas enzimas dependientes de folato, afecta la síntesis de bases nucleotídicas y de proteínas, pudiendo llegar a desencadenar la muerte celular. Los tejidos cancerosos e inflamatorios blanco de la terapia con MTX, se encuentran bajo una rápida proliferación conteniendo una alta fracción de células en fase S y G1, razón por la cual son los más susceptibles a los efectos citotóxicos de la droga^{13, 14}.

En el tratamiento de LLA y LNH varios protocolos poliquimioterápicos incluyen la administración de dosis altas de MTX en forma intravenosa (IV) ($\geq 1-7,5\text{g/m}^2$ cada 2 a 4 semanas durante inducción y consolidación de la remisión de LLA), bajas durante periodos prolongados de tiempo administradas en forma oral (20mg/m^2 semanales en el mantenimiento de la remisión de LLA) y/o intratecal (IT) (12 mg cada 4 días hasta alcanzar remisión)^{15, 16, 88, 89, 90}. El objetivo del uso de la vía IT para administrar el MTX es eliminar células cancerosas de sitios que no pueden ser fácilmente accedidos por la quimioterapia sistémica, debido a la barrera hemato-encefálica, para así prevenir la afección del SNC o recaída y en un alto número de pacientes evitar el uso de irradiación craneana.

Las principales toxicidades del MTX refieren a la medula ósea (toxicidad hematológica) y el epitelio gastrointestinal (GI). Se corrigen en un plazo de 10 a 14 días, durante el cual el paciente presenta un riesgo mayor de sufrir hemorragias espontáneas o infecciones que ponen en riesgo su vida. En aquellos pacientes con la función renal alterada, responsable de la excreción lenta del MTX, puede ocurrir toxicidad hematológica sostenida. Toxicidades adicionales pueden ser: hepática, renal, del SNC y piel¹⁷.

Un factor crítico sobre los efectos citotóxicos del MTX es la duración de la exposición al mismo, por lo que una exposición prolongada, incluso a dosis bajas, puede producir toxicidades comparables a las producidas por una exposición corta a altas dosis.

En 1970, la mortalidad asociada con tratamientos de altas dosis de MTX se encontraba entre 4,6 - 6 %. Numerosos estudios de la época demostraron que concentraciones plasmáticas elevadas de MTX entre las 24 y 72 horas post administración predecían el desarrollo de toxicidad. Mientras que la ausencia de dichas concentraciones elevadas, predecía un menor riesgo de desarrollar toxicidad. También se demostró en muchos casos que las toxicidades renales y hematológicas podían ser disminuidas o prevenidas si al detectarse concentraciones plasmáticas elevadas de MTX, se hidrataba, alcalinizaba y administraba ácido fólico (como rescate) al paciente¹⁸. Complementariamente se toman medidas preventivas para prevenir

episodios de mucositis oral, como lo son enjuagues bucales con borato, gel de hidróxido de aluminio, anestésicos y antimicóticos.

Debido a estas complicaciones asociadas al uso de MTX se está buscando superar las mediante un mejor conocimiento del acervo genético de los pacientes (Farmacogenómica) o incluso mediante la búsqueda de nuevos fármacos antifolatos con mejor efectividad ^{7, 14, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25}. Sin embargo, el MTX se seguirá utilizando dado que hasta ahora sigue siendo el más económico, fácil de manufacturar y permite su administración por vía oral a largo plazo ¹².

VÍA Y FARMACOGENÉTICA DEL MTX

Si bien las relaciones más estudiadas en el efecto del MTX se refieren principalmente a las enzimas involucradas en su metabolismo y acción, se ha visto también que las proteínas involucradas en el transporte a través de membrana plasmática pueden estar influyendo en dicho efecto ^{26, 27, 28, 29}.

El transportador de folato reducido 1 (SLC19A1 o RFC1) participa en el transporte activo de MTX del lumen intestinal al interior de los enterocitos (luego de administración oral), de el torrente sanguíneo al hígado, riñón y al interior de las células sanguíneas (ver Figura 1). El SNP más frecuentemente reportado, G80A (rs1051266), ha sido vinculado con el cambio en la afinidad del transportador por el MTX²⁷. Si la afinidad está disminuida se espera que disminuya el ingreso de MTX a la célula blanco y por ende el tratamiento no sea efectivo, así como también el ingreso al hígado y riñón dificultando su eliminación. Todavía no ha habido resultados concluyentes respecto a su efecto sobre la eficacia y toxicidad del tratamiento^{30, 31}. Entre las asociaciones reportadas está la toxicidad hepática, hematológica, GI, permanecer en remisión y menor frecuencia de metástasis ^{32, 33, 34, 35, 36, 37,38, 39}.

Otra proteína involucrada en el transporte es el transportador de solutos de aniones orgánicos de la familia 1B1 (SLCO1B1 o LST-1), el cual participa en el pasaje de MTX desde el torrente sanguíneo hacia el hígado. El polimorfismo más común del gen que codifica la proteína SLCO1B1, es T₅₂₁C (rs 4149056), el cual afecta su función de

transporte, por lo que ha sido asociado con una disminución de la eliminación del MTX del organismo^{40, 41, 42, 43, 44}.

Una vez que el MTX se encuentra en el citoplasma de la célula es convertido a sus formas activas MTX poliglutamados (MTX-PGs), gracias a la adición de residuos glutamil. Tanto MTX como los MTX-PGs inhiben competitivamente a la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), encargada de reducir dihidrofolato (DHF o FH₂) en tetrahydrofolato (FH₄ o THF). DHF y los MTX-PGs van a inhibir a la enzima timidilatosintasa (TYMS, TS o TMS) responsable de convertir dUMP en dTMP⁴⁵. La inhibición de DHFR y TYMS ocasiona la biosíntesis defectuosa de THF y dTMP, lo que provoca la acumulación del tóxico inhibitorio DHF, lo cual resulta en el bloqueo de la síntesis de novo de las purinas y del nucleótido dTMP, interrumpiendo la síntesis de ADN y ARN (ver Figura 1).

Los polimorfismos del gen DHFR localizados en los elementos reguladores han sido asociados a la respuesta al tratamiento con MTX, dado que alteran los niveles de expresión del gen. Los más comunes son C-1610GT (rs 1650694), C-680A (rs 442767), A-317G (rs 408626) y la inserción deleción de 19 pb (indel) en el intrón 1 (rs 70991108)^{46, 47, 48, 49, 50, 51}. Además de estar asociados individualmente con la respuesta, Dulucq et 2008 observó un haplotipo definido por los alelos C-1610, A-317 y C-680 del gen DHFR, vinculado con una menor sobrevida libre de eventos y con niveles elevados de ARNm de DHFR. Se ha reportado, a su vez una asociación entre algunos de los polimorfismos y toxicidades⁵².

Se encontró evidencia de un aumento de la concentración de DHFR intracelular en células leucémicas, en las 24 horas posteriores al tratamiento de pacientes con MTX. A medida que aumenta el tiempo de exposición al fármaco, surgen poblaciones de células tumorales con niveles aumentados de DHFR, debido a que presentan un mayor número de copias del gen. DHFR inhibe su propia traducción y parecería que el complejo DHFR-MTX es incapaz de hacerlo, dándonos un indicio de que efectivamente MTX se une a DHFR y no permite que el mismo inhiba su traducción. Estas observaciones a su vez nos llevan a pensar que aquellas células en las cuales están presentes los polimorfismos que provoquen niveles elevados de ARNm de DHFR, se

comportaran del mismo modo que las células leucémicas con una larga exposición al fármaco, presentando resistencia al tratamiento.

En la región promotora 5' UTR del gen TYMS se ha descrito un polimorfismo que consiste en un número variable de repetidos (CNV) de 28 pb (rs34743033). Las variaciones más comunes son dos y tres repetidos (2R y 3R). Estos afectan los niveles de expresión del gen TYMS⁵³. Tiene función de potenciador, por lo cual al incrementarse el número de repetidos (3R), se incrementa la expresión del ARNm del gen y la actividad enzimática⁵³. Se ha encontrado evidencia de que los niveles intracelulares de TYMS modulan la respuesta y toxicidad al MTX¹⁴. Tanto el alelo 3R como el genotipo 3R3R han sido asociados con una mala eficacia del tratamiento, toxicidad hematológica y necesidad de disminuirlas dosis de MTX^{52, 81, 54, 55, 56, 57, 58, 59}. Sin embargo, no todos los estudios coinciden con respecto a la asociación con la toxicidad, algunos no encuentran asociación mientras que otros encontraron que el alelo 3R tiene un rol protector frente a la toxicidad^{74, 40, 60, 61, 62, 63, 64}.

La enzima MTHFR, la cual es inhibida indirectamente por MTX, participa en la conversión de 5,10-CH₂-THF en 5-CH₃-THF (ver Figura 1). Este último está involucrado en la remetilación de la homocisteína en metionina, la cual es un precursor de un importante donador de grupos metilo para la metilación del ADN y proteínas. Los SNPs más comunes del gen MTHFR son C677T (rs 1801133) y A1298C (rs 1801131). Varios estudios han encontrado asociación entre estos SNPs con toxicidad y eficacia del tratamiento con MTX^{27, 65, 66, 67, 68}.

El SNP C677T reduce la actividad enzimática de MTHFR cuando el alelo mutante está presente, reduciéndola a valores del 30% y 65% para el genotipo TT y CT respectivamente⁶⁹. El alelo T de C677T ha sido asociado con las siguientes toxicidades al MTX: hematológica, GI, hepática, de la piel o desarrollo de mucositis oral^{21Error! Bookmark not defined., 52, 66, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76}. Respecto a la eficacia del tratamiento, el genotipo CC de C677T ha sido asociado con una rápida respuesta favorable a la terapia y el genotipo TT con una disminución de la tasa de sobrevida global^{52, 77, 78, 73}.

El alelo C del SNP A1298C ha sido asociado con una disminución en el riesgo de sufrir toxicidad hepática y de la piel, así como también con una mayor frecuencia de remisión de la enfermedad^{70, 79, 80}.

El haplotipo formado por el alelo T de C677T y el alelo A de A1298C ha sido asociado con una reducción en la sobrevida libre de eventos del paciente⁸¹.

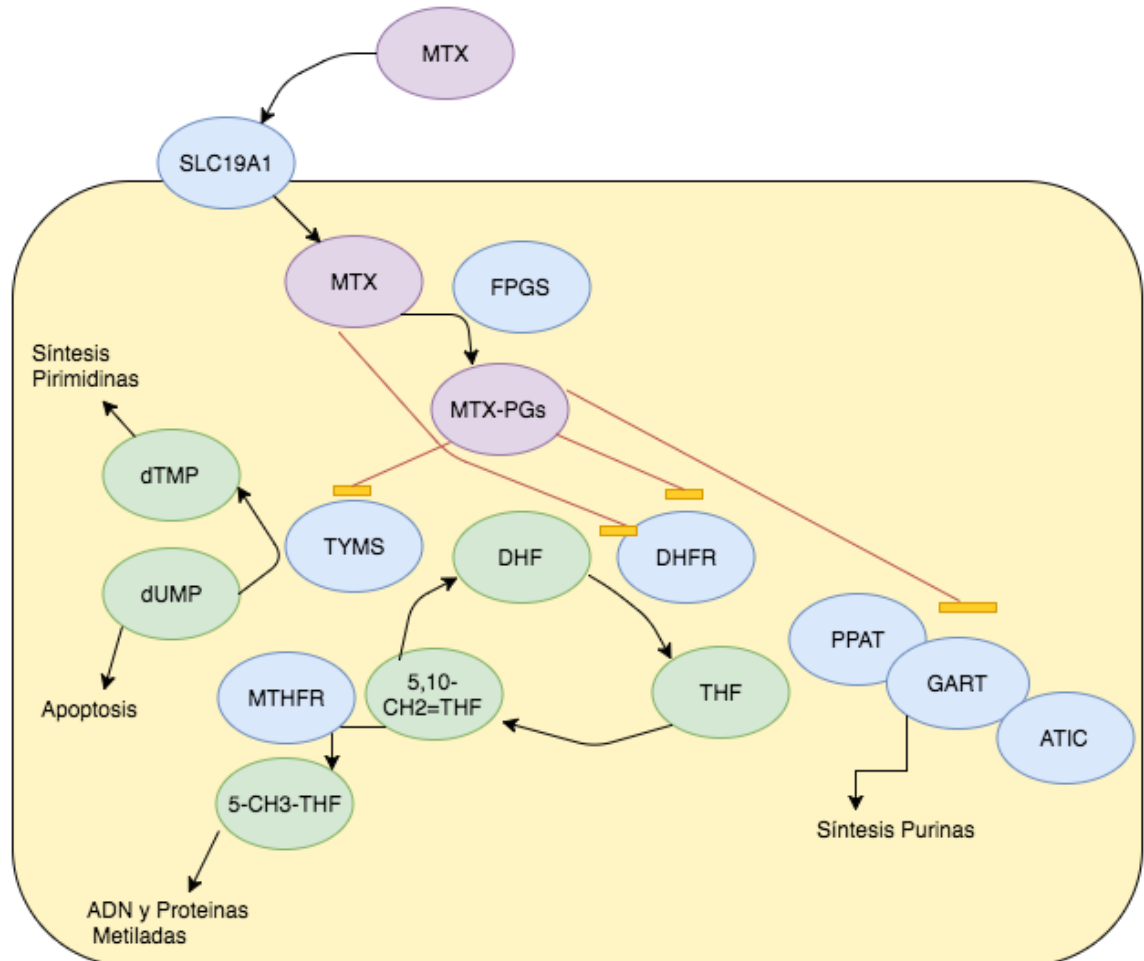


Figura 1. Esquema de los componentes principales de la vía del MTX, involucrados en el ingreso a la célula, metabolismo y blanco de acción.

La resistencia adquirida al MTX afecta su acción. Puede deberse al transporte defectuoso de MTX al interior celular, formas alteradas de la enzima DHFR que no permite que la misma sea inhibida por MTX, aumento de la concentración de DHFR intracelular por alteración de la expresión o amplificación génica, una síntesis defectuosa de MTX-PG o un aumento de la expresión de transportadores de eflujo de MTX, entre otras cosas.

La importancia de SLC19A1 en la resistencia se debe a un transporte defectuoso de MTX al interior celular. Se observó que en pacientes con el subtipo hiperdiploide de

LLA el gen que codifica para el transportador SLC19A1 se encuentra sobre expresado, debido a la presencia de múltiples copias del mismo en el cromosoma 21, aumentando la concentración intracelular de MTX y los MTX-PGs in vivo y haciendo las células más propensas a sufrir apoptosis in vitro lo que se traduce como un aumento de la sensibilidad al MTX ⁸².

En la Tabla 1 se resume la lista de genes estudiados, candidatos a presentar asociación con la toxicidad o eficiencia del tratamiento con MTX en nuestro grupo de estudio, efecto sobre el fármaco y polimorfismos más estudiados.

Tabla 1. Lista de genes candidatos estudiados. Forma de interacción con MTX, sus polimorfismos más estudiados y el efecto de los mismos.				
Genes	Efecto sobreMTX	Polimorfismos	Efecto de los Polimorfismos	Referencias
MTHFR	Indirectamente inhibida por MTX	C ₆₇₇ T A ₁₂₉₈ C	Actividad enzimática reducida	83, 84, 85
SLC19A1	Entrada de MTX a la célula	G ₈₀ A	Reduce la afinidad del transportador	36,86
DHFR	Inhibida tanto por MTX como por MTXPG, causando el bloqueo de la síntesis <i>de novo</i> de ADN	C ₋₁₆₁₀ GT C ₋₆₈₀ A A ₋₃₁₇ G 19 pb indel en intrón 1	Alelos C ₋₁₆₁₀ , A ₋₆₈₀ y G ₋₃₁₇ disminuyen niveles enzimáticos. Alelo Del _{19pb} Indel los aumenta.	39, 40, 41, 45,79
TYMS	Inhibida por MTXPG, causando el bloqueo de la síntesis <i>de novo</i> de ADN	28 pb CNV de 2R o 3R	Alelo 3R aumenta niveles enzimáticos.	78, 81,87
SLCO1B1	Entrada de MTX desde el torrente sanguíneo hacia los hepatocitos.	T ₅₂₁ C	Afecta la función del transportador y la excreción del MTX.	21, 25, 72,27

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue contribuir al conocimiento para un diseño de una terapia personalizada para pacientes bajo tratamiento con MTX.

Los objetivos específicos fueron: evaluar la distribución de los polimorfismos genéticos de transportadores y enzimas (SLC19A1 G₈₀A; SLC1B1 T₅₂₁C; MTHFR C₆₇₇T y A₁₂₉₈C; TYMS variación en el número de copias de 28 pb; DHFR C₋₁₆₁₀G/T, C₋₆₈₀A, A₋₃₁₇G y 19 pb indel); relevar los parámetros clínicos y de laboratorio obtenidos del seguimiento de la terapia; analizar asociaciones con significancia estadística entre los polimorfismos genéticos, la toxicidad y eficacia del tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Grupo de estudio

Se trató de un estudio descriptivo observacional en pacientes adultos uruguayos diagnosticados con una patología hematooncológica (LLA o LNH agresivo) que fuera tratada con un protocolo de poliquimioterapia que incluyera mediana y/o altas dosis de MTX.

Los criterios de exclusión fueron: signos de enfermedad hepática o renal previa al comienzo del tratamiento y no relacionada con la enfermedad hematooncológica diagnosticada.

Se estudiaron 41 adultos uruguayos con LLA y LNH agresivo tratados de acuerdo con los protocolos de poliquimioterapia: HYPERCVAD-MA (1g/m² IV + 12mg IT por curso y 20mg/m² oralmente por 24 meses durante la etapa de mantenimiento), Berlin-Frankfurt-Muensterwhich 2002 (5g/m² IV durante la etapa de si el paciente fue categorizado de alto riesgo y 8g/m² IV durante la etapa de consolidación + 160mg/m² oralmente durante la etapa de mantenimiento + 12-48mg IT durante todo el protocolo), CODOX-M-IVAC (3g/m² IV + 12mg IT por curso) o MTX-ARAC (3,5g/m² IV por curso)^{15, 88, 89, 90}.

Los Servicios de Hematología participantes fueron: Hospital de Clínicas, Hospital Maciel, Medica Uruguay y Asociación Española. Se contó con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Química y del Hospital Maciel. Los participantes brindaron su consentimiento informado por escrito.

Se incluyeron 55 adultos voluntarios sanos, uruguayos, los cuales fueron considerados como controles.

Genotipificación

Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico a partir de muestras de sangre periférica y/o mucosa yugal, se hizo utilizando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen).

El primer paso consiste en un lisado de la muestra utilizando proteinasa K, eliminando la necesidad de utilizar métodos físicos y reduciendo el tiempo de manipulación. Se agrega un buffer de lisis el cual podría contener un detergente para solubilizar las membranas y desnaturalizar las proteínas, luego se transfiere la solución a columna para su centrifugación. El ADN es absorbido a las membranas y se continúa con el agregado de buffers de lavados (que podrían contener etanol) alternados con centrifugación de las columnas, los cuales permiten remover eficientemente los contaminantes restantes y enzimas inhibidoras. Finalizando con la elución del ADN de las membranas mediante el agregado de un buffer de elución el cual ocasiona un cambio de pH.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

En este trabajo se emplearon geles de poliacrilamida al 6%. La tinción de los geles se realizó con nitrato de plata. La técnica consiste en primer lugar colocar el gel durante 5 min en una solución de fijación compuesta por 15 ml de Etanol, 750 μ l de HAc y 135 ml H₂O. Posteriormente colocarlo 8 min en una solución de nitrato de plata compuesta por 0,3g AgNO₃ y 150 ml H₂O. Continuar con lavados rápidos, y revelar con solución de revelado compuesta por 4,5g NaOH, 750 μ l de Formaldehído y cantidad suficiente de H₂O para 150 ml, donde se agitará hasta que se detecten las bandas. Al

finalizar la tinción el gel se coloca nuevamente en la solución de fijación, durante 24 h, para recién luego dejarse secar para archivarlo.

Diseño de oligonucleótidos y selección de enzimas de restricción

Para el diseño de los oligonucleótidos a emplearse en las reacciones de PCR, se obtuvieron las secuencias génicas de la base de datos Ensembl Genome Browser. Posteriormente se utilizó la herramienta informática Gene Runner versión 3.05 (Hastings Software, Inc.) para realizar los diseños, salvo en el caso de los diseños de las ASO-PCR para las cuales se utilizó la herramienta WASP⁹¹. Una vez finalizado el diseño y conociendo las secuencias de los productos de PCR, para aquellos casos en los cuales corresponde un posterior análisis por RFLP, se seleccionaron las enzimas de restricción a emplearse y se determinaron los tamaños de los fragmentos de restricción utilizando como herramienta informática el programa Gene Runner anteriormente mencionado y la página web <http://watcut.uwaterloo.ca/watcut/watcut/template.php> de la Universidad de Waterloo, Ontario, Canadá.

Selección de variantes genéticas y sus métodos de análisis

Como forma de realizar una aproximación a una vía tan compleja, desde el ingreso del MTX hasta su blanco de acción en la célula, nos propusimos estudiar la influencia de los polimorfismos en los genes que codifican para SLC19A1 y SLCO1B1 involucrados en el transporte de MTX; las enzimas MTHFR, TYMS y DHFR involucradas en la actividad del MTX.

El polimorfismo G80A del gen SLC19A1, al igual que los polimorfismos C677T y A1298C del gen MTHFR fueron detectados por PCR-RFLP. Los polimorfismos C-1610GT, C-680A y A-317G del gen DHFR, al igual que T₅₂₁C del gen SLCO1B1 fueron detectados por PCR-ASO. Mientras que el indel de 19 pb del gen DHFR y la variación en el número de copias de 28 pb del gen TYMS fueron detectados por diferencias de tamaño luego de amplificar por PCR. El indel de 19 pb del gen DHFR también fue detectado mediante Real Time - HRM.

Se realizó la puesta a punto de las técnicas a ser utilizadas para la detección de los polimorfismos, ajustando concentraciones a utilizarse de $MgCl_2$, dimetilsulfóxido (DMSO) y temperatura de hibridación del ciclado de acuerdo con las temperaturas de hibridación (T_m) de los oligonucleótidos diseñados. Se utilizó el termociclador CG Palm-Cycler (para la PCR-RFLP, PCR-ASO y PCR a tiempo final) y el equipo Rotor-Gene 6000 de CorbettResearch (para Real Time - HRM).

Secuencias de oligonucleótidos, condiciones de reacción y método de análisis se pueden ver en la Tabla 2.

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos utilizados en el estudio, condiciones de reacción y método de análisis para cada polimorfismo genotipado. DMSO: agregado (+) o no (-).					
Nombre Oligonucleótido	Secuencia Oligonucleótido (5'-3')	Temperatura de Hibridación (°C)	MgCl₂ (mM)	DMSO 5%	Método de Análisis
SLC19A1F SLC19A1R	CAGCGTCACCTTCGTCCTCC CAGGAGGTAGGGGGTGATGAAG	54	1	+	PCR-RFLP HhaI (Fermentas)
DHFR indelF DHFR indelR	ATGGGACCCAAACGGGCGCA AAAGGGGAATCCAGTCGGGC	55	1	-	Real Time PCR - HRM
DHFR ₁₆₁₀ CF DHFR ₁₆₁₀ CR DHFR ₁₆₁₀ GF DHFR ₁₆₁₀ GR DHFR ₁₆₁₀ TF DHFR ₁₆₁₀ TR	AGGAACAAAAGGGACCTTCT AATTCTCCAGAGGGCAGAAGAAG AAGGAGAAAGTTGGGAGAAC AATTCTCCAGAGGGCAGAAGATC GGTCTATCACTGCCTACCTT AATTCTCCAGAGGGCAGAAGACT	55	1.5	-	AS-PCR
DHFR ₋₆₈₀ CF DHFR ₋₆₈₀ CR DHFR ₋₆₈₀ AF DHFR ₋₆₈₀ AR	CTTCAATGCCCTTCCACATC CAGAGATACTGCCACAGGAA CTTCAATGCCCTTCCACATA GATGTGACTAATCATGGAGTCC	55	1.5	+	AS-PCR

DHFR ₋₃₁₇ AF DHFR ₋₃₁₇ AR	ATTGAGCCATGCTGTTGCAG CCTTGGTGGTCGAAGAGCT	WT: 58	1.5	+	AS-PCR
DHFR ₋₃₁₇ GF DHFR ₋₃₁₇ GR	CCACCCAACTGTATTTAGAC CCTTGGTGGTCGAAGAGCC	M: 52			
MTHFR ₆₇₇ F MTHFR ₆₇₇ R	TGAGCCCAGCCACTCACTG GTCGGTGCATGCCTTCAC	60	1.5	-	PCR-RFLP HinfI (Fermentas)
MTHFR ₁₂₉₈ F MTHFR ₁₂₉₈ R	AGAGCAAGTCCCCAAGGA CTTTGTGACCATTCGGTTTG	55	1.5	-	PCR-RFLP MboII (Fermentas)
TYMSIndelF TYMSIndelR	CGGGTTTCCTAAGACTCTCAGC AGCGGAGGATGTGTTGGATCTG	53	1.5	+	PCR
SLCO1B1TF SLCO1B1TR	TGGACTAATACACCATATTG AGCATATTACCATGAAGA	50	1,0	-	AS-PCR
SLCO1B1CF SLCO1B1CR	GGTCATACATGTGGATATATGC CAAAGGGAAAGTGATCATAC		1,5		

Secuenciación de ADN

El producto de amplificación se purifica desde un gel de agarosa utilizando el kit comercial ULTRAPrep® agarose gel extraction kit (AHN Biotechnologie GmbH) y se somete a secuenciación automática utilizando tanto los servicios del Instituto Pasteur de Montevideo o Macrogen (Korea).

Relevamiento y registro de datos clínicos

La historia clínica de los pacientes fue analizada para registrar sus parámetros clínicos y de laboratorio obtenidos del seguimiento realizado por los servicios de Hematología, con el fin de evaluar el desarrollo de toxicidad y la eficacia del tratamiento. Los parámetros clínicos y de laboratorio fueron recolectados diez días luego de cada infusión del fármaco, con el fin de aislarlos de los efectos de otros

fármacos recibidos durante el protocolo de tratamiento. Entre los parámetros se encuentran:

- Datos patronímicos: nombre, número de registro, C.I., edad, sexo.
- Antecedentes personales: HIV, celíaco, embarazo o diabetes.
- Diagnóstico: LAL y LNH.
- Tratamiento: nombre del tratamiento y fechas en que fue recibido; fármacos que recibe durante el tratamiento y sus dosis; si recibió dosis de folinato estándar o aumentadas; metotrexatemias realizadas post infusión de MTX; si se debió modificar la dosis de MTX.
- Paraclínica: hemoglobina, plaquetas, neutrófilos, glóbulos blancos, LDH, azoemia, creatinemia, bilirrubina total, fosfatasa alcalina, aminotransferasas de alanina (TGP) y aminotransferasas de aspartato (TGO).
- Evolución y complicaciones: si falleció y la causa; si entró en remisión; buena o mala tolerancia al MTX; los efectos secundarios con una incidencia mayor al 30% (toxicidad hematológica, toxicidad digestiva, mucositis) y los menos comunes con una incidencia de entre 10% y 29% (toxicidad renal, toxicidad cutánea, toxicidad hepática, toxicidad neurológica).

El Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE v4.0, NCI, NIH) es un sistema para determinar grados de toxicidad eliminando el componente subjetivo de los inter-observadores, desarrollado por el National Cancer Institute de Estados Unidos. Permite describir la severidad de los eventos adversos en investigaciones clínicas oncológicas. En este proyecto fue utilizado para determinar si estaban teniendo lugar las toxicidades estudiadas y en qué grado. A pesar de haber utilizado CTCAE, no se incluyó en el análisis la estratificación de las variantes clínicas referentes a toxicidades, dado el número de pacientes del estudio. Por lo cual se estableció utilizar variables cualitativas dicotómicas (presencia o ausencia).

El servicio de hematología del Hospital de Clínicas solicita la medición de la metotrexatemia post infusión en forma seriada (mediante aplicación de protocolo EMIT (SIEMENS)). Se consideran valores normales de metotrexatemias: post infusión hasta 5 μ Mol/L, a las 48 h hasta 0.5 μ Mol/L y a las 72 h hasta 0.05 μ Mol/L. Los valores fuera de estos rangos se consideraran como alterados y por protocolo se aumenta la

dosis de ácido fólico hasta que los valores de las metotrexatemia se normalicen. Sin embargo el servicio de hematología del Hospital Maciel sólo solicita esta medición si el paciente desarrolla toxicidad asociada al MTX durante el protocolo de tratamiento, razón por la cual no se incluyó este dato clínico en el análisis multivariante.

La modificación o suspensión de la dosis de MTX, puede deberse a la presencia de metotrexatemia elevadas y/o efectos adversos al MTX. Tiene una importante repercusión en la eficacia del tratamiento poliquimioterápico.

La remisión de la enfermedad y el fallecimiento del paciente son indicadores de eficacia e ineficacia del tratamiento poliquimioterápico, respectivamente. El fallecimiento del paciente puede ser por causa de la enfermedad o debido a efectos adversos al tratamiento, siendo éste último un indicador de toxicidad del fármaco.

La buena o mala tolerancia al MTX se determina mediante la presencia de por lo menos un efecto adverso al tratamiento con el mismo.

La toxicidad hematológica se determina a partir de valores anormales de hemoglobina (VR 13,4 - 16,6 g/dL), glóbulos blancos (VR 4000 - 10500 /mm³), neutrófilos (40 - 75 %) y plaquetas (VR 130 - 400 mil/mm³) (ver Apéndice1). La manifestación de alguno de estos efectos adversos es indicador de toxicidad hematológica.

Dado que el metabolismo del MTX es hepático, se han observado efectos adversos en este órgano detectados a partir de la alteración de su función. Las enzimas hepáticas relevadas son Gamma glutamil transferasa (GGT) (VR 3 - 48 U/L), aspartato amino transferasa (GOT) (VR 2 - 33 U/L), alanino amino transferasa (GPT) (VR 2 - 30 U/L) y fosfatasa alcalina (FA) (VR 40 - 130 U/L). Mientras que los pigmentos biliares son bilirrubina total (BT) (VR 0,3 - 1 U/L), bilirrubina indirecta (BI) (VR 0,3 - 0,7 U/L) y bilirrubina directa (BD) (VR 0,1 - 0,3 U/L) (ver Apéndice1). La fibrosis hepática y cirrosis también son indicadores de toxicidad hepática.

Toxicidad renal puede observarse en pacientes en terapia con altas dosis de MTX. Se utiliza el nitrógeno ureico de la sangre (blood urea nitrógeno - BUN) (VR 10 - 45 mg/dL) y la creatinina sérica (VR 0,4 - 1,2 mg/dL) como indicadores de la misma (ver Apéndice1).

Erupción cutánea, enrojecimiento de la piel, oscurecimiento de la piel y caída del pelo son indicadores de toxicidad cutánea.

Síntomas de alteraciones del tracto gastrointestinal como lo son náuseas, vómitos, falta de apetito y ulceraciones de la boca son indicadores de toxicidad digestiva (ver Apéndice1).

La mucositis es un efecto adverso frecuente al MTX. Un único episodio durante el tratamiento es suficiente para considerar presencia de mucositis (ver Apéndice1).

Pacientes que reciben MTX IT pueden presentar toxicidad neurológica debido a la acumulación tóxica del mismo en el SNC. Síntomas de esta son compromiso del sistema nervioso, náuseas, vómitos, cefalea, somnolencia, letargo, confusión, desorientación, convulsiones y aumento de la presión intracraneal.

Análisis Estadístico

Determinación del equilibrio de Hardy Weinberg (HW)

Mediante conteo directo, se estimaron las frecuencias genotípicas de los polimorfismos.

El principio de equilibrio de HW determina qué frecuencias deben esperarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias observadas. Estas frecuencias esperadas (E) calculadas se compararon con las observadas (O), utilizando el test exacto en el calculador online Michael Court⁹². Los p valores resultantes $> 0,05$ son consistentes con el estado de equilibrio.

Estudios estadísticos de asociación

Dado el problema biológico a investigar, la Farmacogenética del MTX, y las preguntas a responder, si existe una asociación estadísticamente significativa entre alguno de los polimorfismos estudiados y la toxicidad o eficacia del MTX, se decidió realizar análisis univariantes y multivariantes que se ajustan al tipo de variables de trabajo. Se empleó el software R Studio y Statistical Package for the Social Sciences (SPSS V22.0, Chicago, IL, USA).

Se definió un protocolo de análisis estadístico, en el cual los métodos de análisis a utilizar fueron: análisis de Chi cuadrado, análisis de regresión logística binaria, análisis de correspondencia múltiple y el método de construcción de árboles de clasificación y regresión (classification and regression tree - CART). Se aplicó, a los datos de parámetros clínicos y de laboratorio previamente recolectados, así como a los datos genéticos obtenidos de la genotipificación de las muestras.

Se analizaron los resultados obtenidos, así como también las respuestas estadísticas generadas y se generaron visualizaciones de los resultados.

El contraste de independencia Chi cuadrado, fue el análisis univariante utilizado para estudiar si existía una asociación entre la variable dependiente, respuesta al tratamiento, y las posibles variables explicativas cualitativas, los polimorfismos genéticos. Los modelos recesivos y dominantes toman como referencia al genotipo homocigota más frecuente y menos frecuente, respectivamente.

Para realizar el análisis multivariante, dado que nuestra variable a explicar es cualitativa dicotómica, no es posible emplear un modelo de regresión lineal puesto que no se cumplirían los supuestos del modelo. En su lugar, se emplea un modelo logístico binario, para variables dicotómicas. Se realiza en dos pasos, el modelo completo y el reducido.

El modelo completo se construye con las variables explicativas seleccionadas debido a su asociación estadísticamente significativa en el análisis univariante, considerada como un $p \text{ valor} \leq 0,25$ ⁹³.

Dado que no todas las variables introducidas tendrán una contribución significativa, se puede eliminar aquellas variables cuyos coeficientes no alcanzan la significación estadística ($p \text{ valor} \leq 0,05$) y construir así el modelo reducido. Finalmente se debe comparar ambos modelos e interpretar los coeficientes.

El análisis de correspondencia múltiple es una técnica multivariante de ordenación de tipo métrico, que utiliza los resultados del análisis univariante Chi cuadrado como medida de distancia. La representación gráfica de los resultados nos permite interpretar la correspondencia entre dos variables cualitativas de acuerdo a la proximidad en el gráfico. Cuanto menor sea la distancia entre las variables, mayor será

la correspondencia entre ellas. A partir de los resultados de dicho análisis, para cada variable a explicar, se seleccionaron las posibles variables explicativas que presentaban una correspondencia $\leq 0,25$ para ser incorporadas al método de CART.

El método de CART es una forma de partición binaria recursiva, dado que cada grupo de pacientes representado en un nodo del árbol solo puede ser dividido en dos grupos y este proceso puede ser aplicado sucesivas veces. El árbol comienza con un nodo raíz, conformado por todos los pacientes de la base de datos, que es dividido en dos nodos hijos utilizando la variable explicativa que mejor logre maximizar la homogeneidad de cada nodo hijo. Posteriormente se le asigna una clase predictiva a cada nodo hijo. Este proceso se repite hasta que sea imposible continuar debido al pequeño número de pacientes en los nodos hijos finales⁹⁴.

En este trabajo cada árbol de decisión construido nos permite predecir la variable clínica a explicar (por ejemplo si el paciente sufrirá o no toxicidad, si alcanzará o no la remisión). Las variantes explicativas son las variantes genéticas y clínicas estudiadas que presentaban una correspondencia $\leq 0,25$ en el análisis de correspondencia múltiple. Cada nodo del árbol va a representar una variante explicativa y en cada uno se analizarán todas aquellas variables que todavía no hayan sido atribuidas a un nodo anterior del árbol.

RESULTADOS

Características demográficas y datos clínicos

Del total de 41 pacientes, 20 presentaban LLA y 21 LNH. De esas muestras 25 eran de hombres y 16 de mujeres. La mediana de edad fue de $36,0 \pm 13,9$ y el rango de 18 a 74 años.

Nuestra meta inicial preveía la inclusión de 100 pacientes, estimado en función de la frecuencia anual de las patologías que cumplían con estos requisitos reportada por los centros participantes del estudio. Finalmente en un periodo que abarcó desde el mes de setiembre del año 2012 hasta marzo del año 2016, se logró sólo incluir 41 pacientes adultos. La frecuencia anual de las patologías parece haber disminuido en los

centros participantes respecto al último período relevado 2007-2011 antes del comienzo de este trabajo; por otro lado, el protocolo más comúnmente utilizado para el tratamiento de Linfoma No Hodgkin no agresivo no incluye MTX (se utiliza CHOP-Rituximab).

El grupo de 55 controles sanos incluido estaba conformado por, 31 hombres y 24 mujeres, con una mediana de edad de 37.21 ± 12.50 y un rango de 18 a 59 años.

Se relevaron los datos clínicos y paraclínicos (descritos en Materiales y Métodos) de los pacientes a partir de las historias clínicas, para luego ser empleados en el análisis estadístico.

Diferentes tipos de toxicidades fueron observadas, de las cuales cabe resaltar: un 63.4% de toxicidad hematológica a pesar de la administración de ácido fólico; un 19.5% de toxicidad renal a pesar de la hiper hidratación y haber mantenido un adecuado flujo de orina alcalinizada; y un 17,1% de mucositis oral a pesar de haberse indicado enjuagues bucales con borato, gel de hidróxido de aluminio, anestésicos locales y antimicóticos.

Los datos clínicos de los pacientes se encuentran listados en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos clínicos de pacientes.								
	Remisión	Dosis Ácido Fólico aumentada	Toxicidad Hematológica *¹	Toxicidad GI *²	Toxicidad Hepática *³	Toxicidad Renal*⁴	Mucositis	Modificación dosis MTX
Si	20 (48,8%)	31 (75,6%)	26 (63,4%)	13 (31,7%)	16 (39%)	8 (19,5%)	7 (17,1%)	7 (17,1%)
No	21 (51,2%)	10 (24,4%)	15 (36,6%)	28 (68,3%)	25 (61%)	33 (80,5%)	34 (82,9%)	34 (82,9%)

Indicadores utilizados: *¹ Hemoglobina, leucocitos, neutrófilos y plaquetas; *² Nausea, vómitos y falta de apetito; *³ Niveles de enzimas hepáticas; *⁴ BUN y creatinina sérica.

Dentro de los datos clínicos relevados, la toxicidad neurológica no presentó variación entre los pacientes y no fue incluida para los análisis estadísticos posteriores. Mientras que los valores de metotrexatemias fueron excluidos del análisis estadístico debido a que no se logró relevar los datos de las mismas para todos los pacientes, ya

sea porque el centro de salud no solicitó el estudio o porque los resultados del mismo fueron extraviados.

Distribución genotípica y frecuencias alélicas

La detección de polimorfismos se puede observar en las Figuras del 2 al 6. Las Figuras 2, 3 y 4 muestran ejemplos de electroforesis en geles de poliacrilamida de productos de PCR a tiempo final, PCR-RFLP y ASO-PCR, respectivamente. La Figura 5 muestra la visualización de Real Time - HRM y la Figura 6 muestra un de secuencia de ADN.

La distribución genotípica y frecuencia alélica calculadas, así como también los *p* valores resultantes del test de Chi cuadrado de Pearson se pueden observar en la Tabla 4.

De acuerdo a los resultados del test de desviación de HW todos los polimorfismos, a excepción de DHFR C-680A y DHFR A-317G, se encuentran en equilibrio.

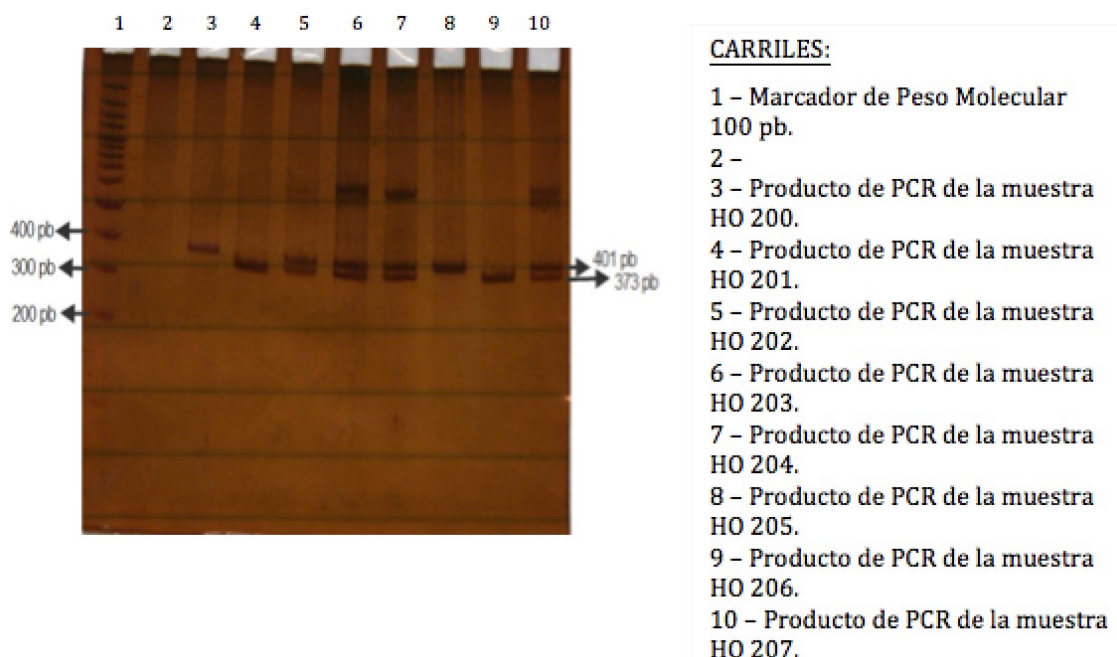


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% de productos de PCR a tiempo final. A partir del cual se analizó el polimorfismo de 28 pb CNV de TYMS para ocho muestras de ADN. En los carriles 3 y 8 se puede observar el patrón de bandas de un individuo Homocigota 3R, en los carriles 5, 6, 7 y 10 se puede observar el de un

individuo Heterocigota 2R/3R, mientras que en los carriles 4 y 9 se puede observar el de un individuo Homocigota 2R.

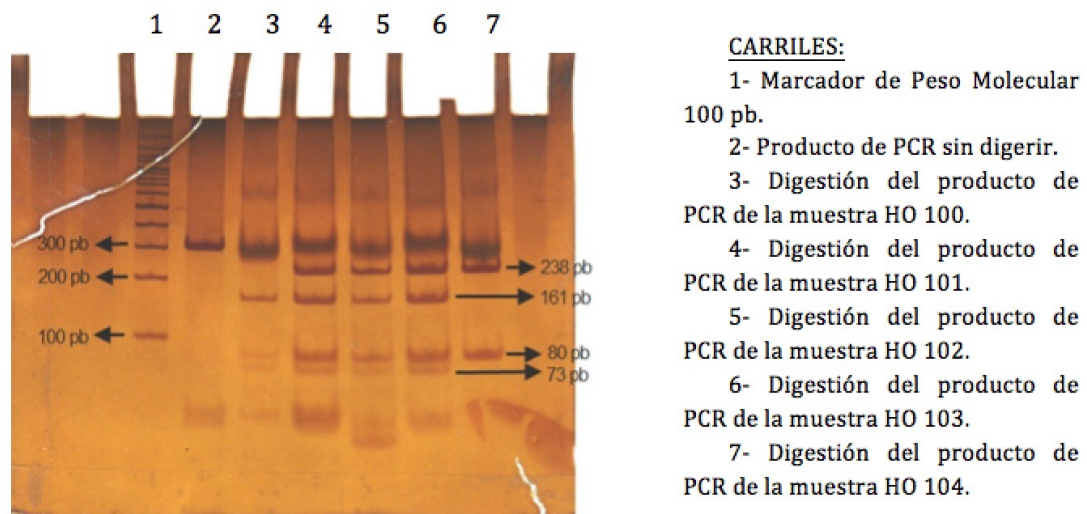


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% de productos de PCR-RFLP. A partir del cual se analizó el polimorfismo MTHFR C677T para cinco muestras de ADN. En los carriles 3 se puede observar el patrón de bandas de un individuo Homocigota TT, en los carriles 4, 5 y 6 se puede observar el de un individuo Heterocigota CT, mientras que en el carril 7 se puede observar el de un individuo Homocigota CC.

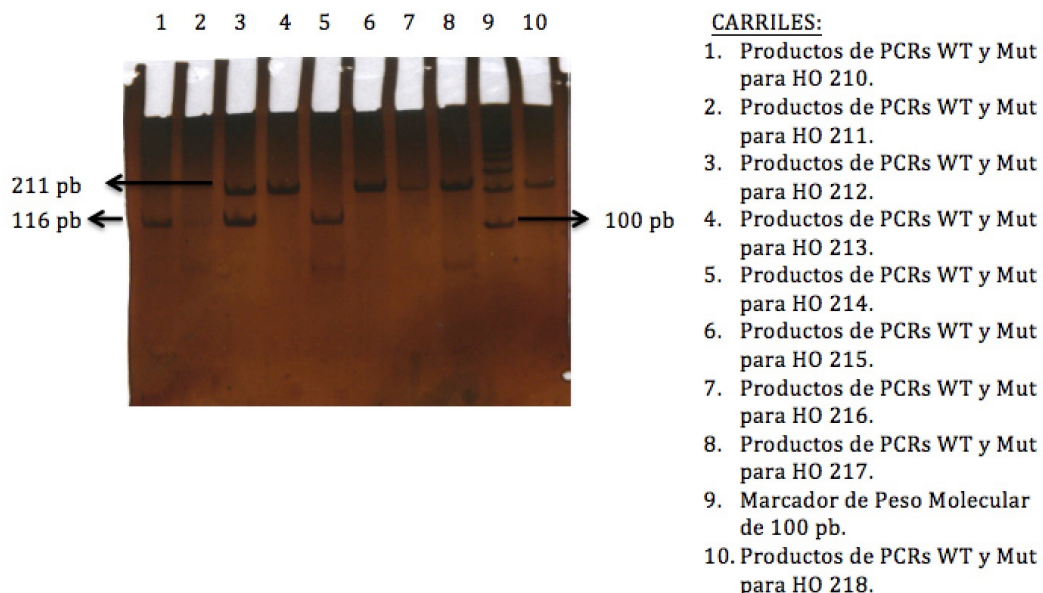


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% de productos de ASO-PCR. A partir del cual se analizó el polimorfismo DHFR A-317G para nueve muestras de ADN. En cada carril se sembró el producto de dos ASO-PCR (una utilizando primers para el alelo

A y otra utilizando primers para alelo G). En los carriles 1 y 5 se observa el patrón de bandas de los individuos homocigotas AA y en el carril 3 observamos el patrón para los heterocigotas AG. Mientras que en los carriles 4, 6, 7, 8 y 10 el patrón es de los individuos homocigotas GG.

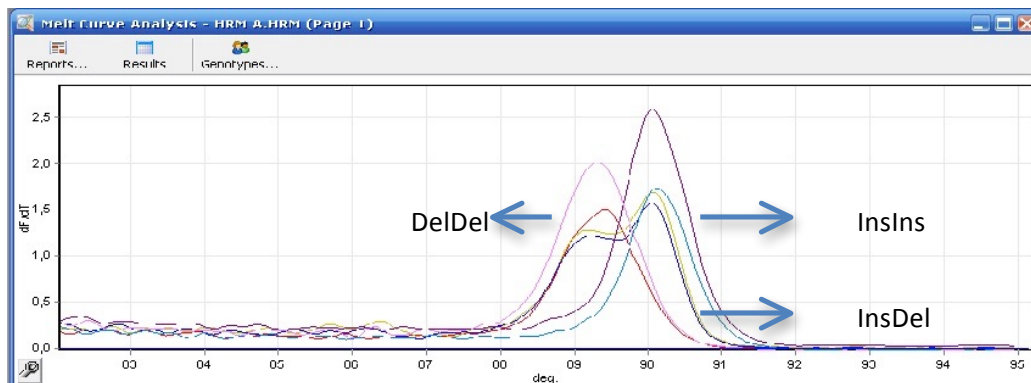


Figura 5. Captura de pantalla de Real Time - HRM para el análisis del polimorfismo 19 pb Indel de DHFR. En ella se muestra una gráfica de niveles de fluorescencia en función de la temperatura, en la cual se observan las curvas de melting para cada uno de los tres genotipos posibles. DelDel: homocigota sin inserción, InsDel: heterocigota, InsIns: homocigota con inserción.

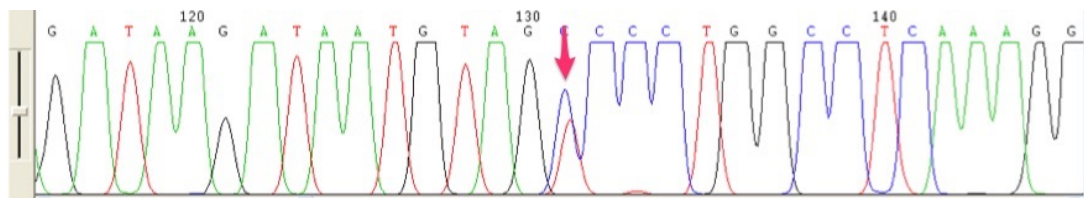


Figura 6. Electroferograma de una secuencia de ADN tomada de ejemplo en el cual se indica posición nucleotídica del polimorfismo y se observan dos picos de diferente color (cada uno corresponde a un alelo diferente) indicándonos el genotipo heterocigota.

Tabla 4. Distribución genotípica y frecuencia alélica de las variantes genéticas. Resultados del análisis del equilibrio de HW.						
	Distribución Genotípica			Frecuencia Alélica		Análisis de HW (<i>p</i> valor)
	Homocigota Salvaje	Homocigota Mutante	Heterocigota	Alelo Salvaje	Alelo Mutante	
SLC19A1 G₈₀A	26,80	26,80	46,40	0,50	0,50	0,64
DHFR 19 pb INDEL	29,30	24,40	46,3	0,52	0,48	0,65
DHFR C₋₁₆₁₀GT	58,50	12,20	29,30	0,73	0,27	0,10
DHFR C₋₆₈₀A	34,10	39,00	26,90	0,48	0,52	0,00
DHFR A₋₃₁₇G	41,50	29,25	29,25	0,56	0,44	0,01
MTHFR C₆₇₇T	53,70	7,30	39,00	0,73	0,27	0,97
MTHFR A₁₂₉₈C	41,50	7,30	51,20	0,67	0,33	0,31
TYMS 28 pb CNV	19,50	21,90	58,60	0,49	0,51	0,27
SLCO1B1 T₅₂₁C	29,30	31,70	39,00	0,49	0,51	0,16

Estudios de asociación entre polimorfismos genéticos y datos clínicos

En el análisis univariante los polimorfismos mostraron asociaciones estadísticamente significativas únicamente con las toxicidades y no con la eficacia del tratamiento.

Estos resultados al igual que sus *p* valores se encuentran listados en la Tabla 5.

Tabla 5. Análisis univariante. Asociaciones significativas atribuibles a la genética, su OR y IC.				
<i>Toxicidad Hematológica</i>	<i>No (n=15)</i>	<i>Si (n=26)</i>	<i>p valor</i>	<i>OR (95% IC)</i>
Distribución Genotípica				
MTHFR ₆₇₇ CC genotipo	5 (12,2%)	17 (43,9%)	0,026	4,500 (1,156-17,510)
MTHFR ₆₇₇ CT genotipo	10 (24,4%)	6 (14,6%)	0,006	0,150 (0,037-0,614)
Modelo Recesivo				
MTHFR ₆₇₇ CC genotipo	5 (12,2%)	17 (41,5%)		-
MTHFR ₆₇₇ T alelo	10 (24,4%)	9 (21,9%)	0,047	0,265 (0,69-1,015)
Modelo Recesivo				
DHFR ₋₁₆₁₀ CC genotipo	3 (7,3%)	17 (41,5%)		-
DHFR ₋₁₆₁₀ G/T alelo	12 (29,2%)	9 (21,9%)	0.005	0,132 (0,029-0,594)
<i>Toxicidad Hepática</i>	<i>No (n=25)</i>	<i>Si (n=16)</i>	<i>p valor</i>	<i>OR (95% CI)</i>
Distribución Genotípica				
DHFR ₋₆₈₀ CC genotipo	5 (12,2%)	9 (21,9%)	0,017	5,143 (1,279-20,677)
DHFR ₋₆₈₀ CA genotipo	10 (24,4%)	1 (2,4%)	0,017	0,100 (0,011-0,882)
Modelo Recesivo				
DHFR ₋₆₈₀ CC genotipo	5 (12,2%)	9 (21,9%)		-
DHFR ₋₆₈₀ A alelo	20 (48,8%)	7 (17,1%)	0,017	0,194 (0,048-0,782)
<i>Toxicidad GI</i>	<i>No (n=28)</i>	<i>Si (n=13)</i>	<i>p valor</i>	<i>OR (95% CI)</i>
Distribución Genotípica				
MTHFR ₆₇₇ TT genotipo	0 (0%)	2 (4,9%)	0,033	NA
MTHFR ₆₇₇ CT genotipo	14 (34,1%)	2 (4,9%)	0,034	5,5

DHFR Indel DelDel genotipo	5 (12,2%)	7 (17,1%)	0,018	5,367 (1,249-23,051)
DHFR ⁻³¹⁷ GG genotipo	5 (12,2%)	7 (17,1%)	0,018	5,367 (1,249-23,051)
Modelo Dominante				
MTHFR ₆₇₇ TT genotipo	0 (0%)	3 (7,3%)		-
MTHFR ₆₇₇ C alelo	28 (68,3%)	10 (24,4%)	0,008	4,5
DHFR Indel DelDel genotipo	5 (12,2%)	7 (17,1%)		-
DHFR Indel Ins alelo	23 (56,1%)	6 (14,6%)	0,018	0,186 (0,043-0,8)
DHFR ⁻³¹⁷ GG genotipo	5 (12,2%)	7 (17,1%)		-
DHFR ⁻³¹⁷ A alelo	23 (56,1%)	6 (14,6%)	0,018	0,186 (0,043-0,8)
Modificación dosis MTX	No (n=34)	Si (n=7)	p valor	OR (95% CI)
Distribución Genotípica				
SLCO19A1 ₈₀ GG genotipo	7 (17,1%)	4 (9,7%)	0,047	5,143 (0,928-28,50)
Modelo Recesivo				
SLCO19A1 ₈₀ GG genotipo	7 (17,1%)	4 (9,7%)		-
SLCO19A1 ₈₀ A alelo	27 (65,8%)	3 (7,3%)	0,047	0,194 (0,035-1,078)

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confianza; NA: No aplicacuando OR=Infinito.

El análisis univariante mostró asociaciones entre: toxicidad hematológica y DHFR C₋₁₆₁₀G/T y MTHFR C₆₇₇T; toxicidad hepática y DHFR C₋₆₈₀A; toxicidad GI y MTHFR C₆₇₇T, DHFR A₋₃₁₇G y DHFR 19 pb indel; así como también modificación de dosis de MTX durante la terapia con SLC19A1 G₈₀A.

Respecto a la toxicidad hematológica, el genotipo CC de MTHFR₆₇₇ (OR=4,5, $p=0,026$) incrementa el riesgo 4,5 veces; mientras que el alelo T (OR=0,265, $p=0,047$), genotipo CT (OR=0,150, $p=0,006$) y los alelos G/T de DHFR₋₁₆₁₀ (OR=0,132, $p=0,005$) tienen un efecto protector disminuyendo el riesgo 4, 7 y 8 veces respectivamente.

En cuanto a la toxicidad hepática, el genotipo CC de DHFR₋₆₈₀ (OR=5,143, $p=0,017$) incrementa el riesgo 5 veces, mientras que el alelo A tiene un efecto protector (OR=0,194, $p=0,017$).

La toxicidad GI tiene incrementado su riesgo de ocurrencia 5,4 veces para el genotipo TT de MTHFR₆₇₇ (OR=0, $p=0,033$), el alelo A de DHFR₋₃₁₇ (OR=0,186, $p=0,018$) o el alelo Ins de DHFR_{19pbIndel} (OR=0,186, $p=0,018$). Por el contrario, el alelo C de MTHFR₆₇₇ (OR=4,5, $p=0,032$), el genotipo GG de DHFR₋₃₁₇ (OR=5,4, $p=0,018$) y el genotipo Del/Del de DHFR Indel (OR=5,4, $p=0,018$) tiene un efecto protector, disminuyendo el riesgo 4,5 y 5,5 veces respectivamente.

Se requirió la modificación de la dosis de MTX durante el tratamiento en un 17% de los pacientes y fue 5 veces más frecuente en aquellos pacientes que presentaron el genotipo GG de SLC19A1₈₀ (OR=5,143, $p=0,047$), mientras que disminuyó en los portadores del alelo A (OR=0,194, $p=0,047$).

A pesar de las asociaciones encontradas en el análisis univariante, sólo unas pocas se mantuvieron en el análisis multivariante. Este último mostró asociaciones entre la toxicidad hematológica y el modelo recesivo de los polimorfismos DHFR C₋₁₆₁₀G/T y MTHFR C₆₇₇T (ver Tabla 6).

Tabla 6. Análisis multivariante. Asociaciones significativas atribuibles a la genética, su OR y IC.		
Toxicidad Hematológica	<i>p</i> valor	OR (95% IC)
DHFR ₋₁₆₁₀ CC genotipo	0,045	0,12 (0,015-0,950)
DHFR ₋₁₆₁₀ G/T alelos	0.018	9,3 (1,4-59)
MTHFR ₆₇₇ T alelo	0,026	8,1 (1,3-50,7)

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confianza.

Los alelos G/T de DHFR₋₁₆₁₀ (OR = 9,3, $p=0,018$) y el alelo T de MTHFR₆₇₇ (OR=8,1, $p=0,026$) tienen un efecto fuerte protector frente a la toxicidad hematológica, aumentando el riesgo 9 y 8 veces respectivamente en los pacientes que no presentan

dichos alelos. En concordancia con estos resultados, el genotipo CC de DHFR₋₁₆₁₀ (OR = 0,12, $p=0,045$) aumenta el riesgo de desarrollar dicha toxicidad 9 veces en relación con los no portadores.

Construcción de árboles de decisión

Ejemplos de los árboles de decisión contruidos utilizando el método de CART que ayudan a predecir si un paciente presentará toxicidad GI (Figura 7) y toxicidad hematológica (Figura 8).

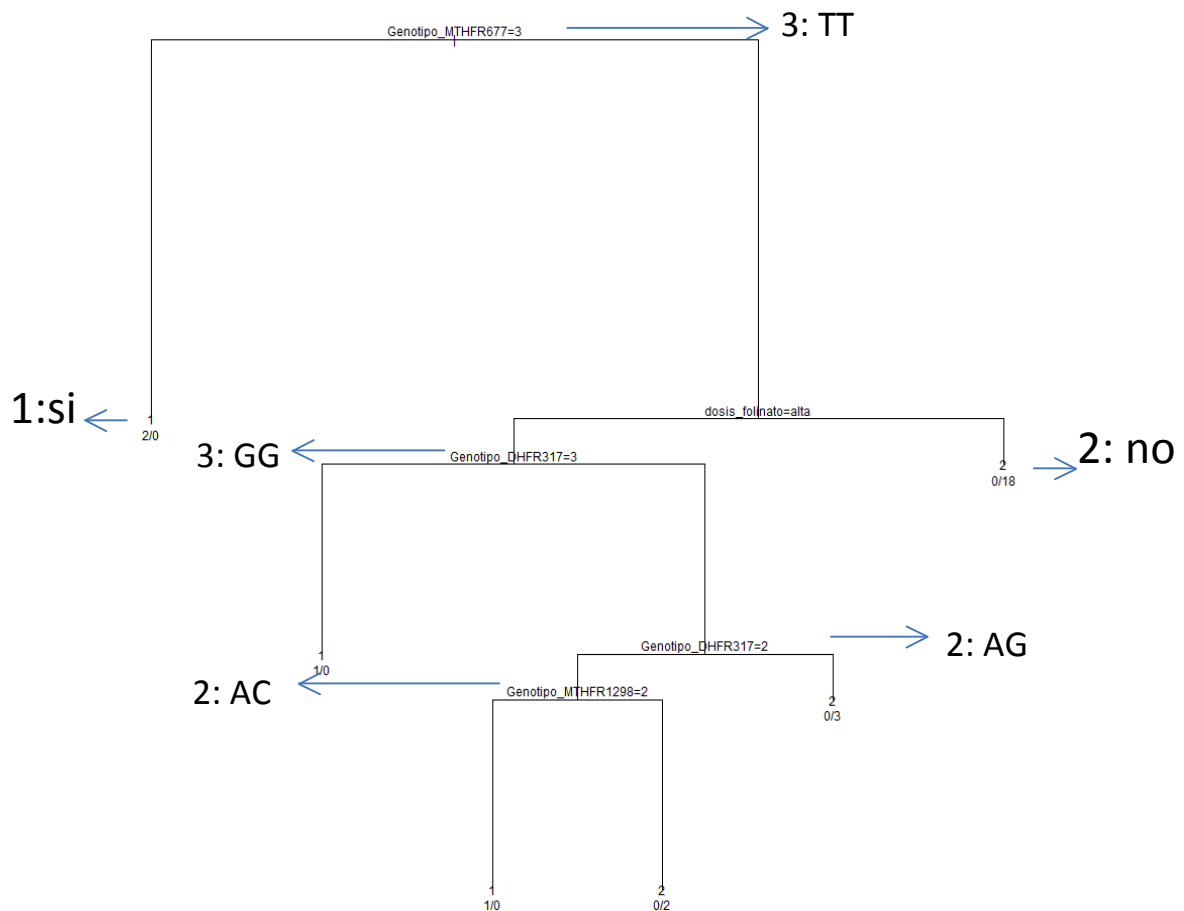


Figura 7. Árbol de decisión para la toxicidad GI. La raíz del árbol evalúa la presencia del genotipo TT de C₆₇₇T MTHFR, si está presente el paciente presentará toxicidad GI (1: si) mientras que si no esta presente debo evaluar como fueron las dosis de folinato administradas durante el tratamiento. Si las dosis de folinato no fueron altas no presentará toxicidad GI, mientras que si lo fueron debo evaluar el polimorfismo A₋₃₁₇G DHFR. Si el paciente presenta el genotipo GG presentará toxicidad GI, si no presenta el

genotipo GG ni AG (presenta AA) no desarrolla toxicidad GI, mientras que si presenta el genotipo AG no logro una predecir.

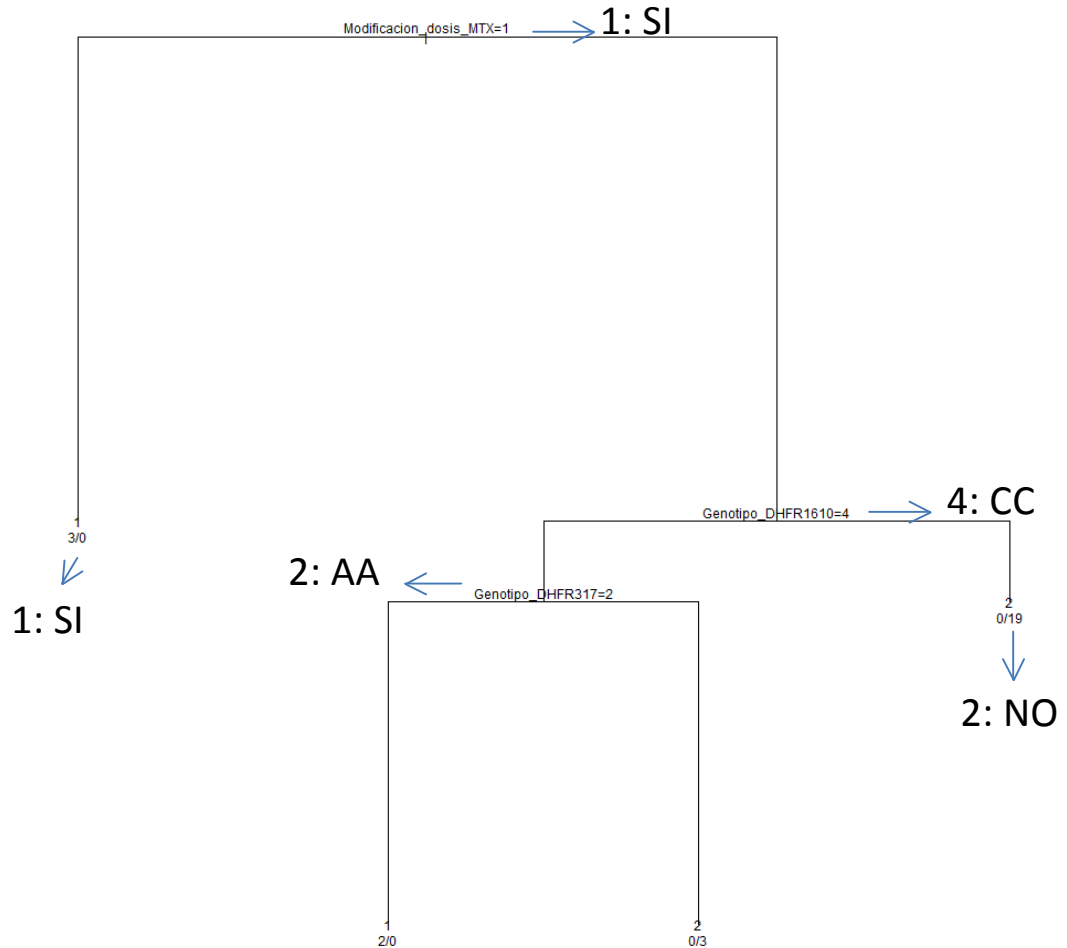


Figura 8. Árbol de decisión para la toxicidad hematológica. La raíz del árbol evalúa si se debió de modificar la dosis de MTX durante el tratamiento, si así lo fue el paciente presentara toxicidad hematológica (1: si) mientras que si no lo fue debo evaluar la presencia del genotipo CC de C₋₁₆₁₀G/T DHFR. Si el genotipo no es CC no presentará toxicidad hematológica, mientras que si lo es debo evaluar la presencia del genotipo AA de A₋₃₁₇G DHFR. Si el paciente presenta el genotipo AA desarrollara toxicidad hematológica, mientras que si no lo presenta no desarrollara toxicidad hematológica.

Artículos científicos escritos durante el estudio

Los resultados del trabajo se forman parte de un artículo sometido a la revista *European Journal of Haematology* el día 9 de noviembre del 2016 (ver Apéndice 2).

Revisión bibliográfica sobre la Farmacogenética del MTX, considerando las principales variantes genéticas involucradas desde la administración hasta la excreción, y su impacto clínico. La redacción de dicha revisión continúa en curso (ver Apéndice 3).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las variaciones genéticas de interés son comunes a las diferentes poblaciones, pero su frecuencia puede variar entre poblaciones con ancestría variable. Estudios de la distribución étnica del Uruguay constataron la particularidad de la misma al hallar que de acuerdo con los datos genéticos, el aporte indígena en genes autosómicos varía entre 1 y 20%, siendo 10% para la población en general, mientras que el aporte africano resulta más bajo y con menor variación regional (6 a 15%), siendo 6% el valor determinado para la población general ¹. Esto limita la capacidad de extrapolar hallazgos por lo que encontramos interesante replicar en la población uruguaya, estudios farmacogenéticos realizados previamente en poblaciones extranjeras, para así poder ganar conocimiento de nuestra población ²⁶⁻⁸¹.

La distribución genotípica y frecuencias alélicas calculadas en este trabajo para los individuos uruguayos, fueron diferentes a aquellas reportadas para otras poblaciones, apoyando los hallazgos previos de particularidad étnica ^{52, 95, 96, 97, 98, 99, 100}. Las diferencias encontradas evidenciaron la importancia de no extrapolar a nuestra población los datos genotípicos de otras poblaciones extensamente estudiadas y de la importancia de tener resultados obtenidos a partir del estudio de nuestra población.

Los resultados de los estudios de asociación multivariante mostraron evidencia de una asociación entre la toxicidad hematológica y los polimorfismos DHFR C₋₁₆₁₀G/T y MTHFR C₆₇₇T. Los alelos G/T de DHFR₋₁₆₁₀ (OR = 9,3, $p = 0,018$) y T de MTHFR₆₇₇ (OR = 8,1, $p = 0,026$) tuvieron un efecto protector frente a la toxicidad hematológica,

mientras que en los portadores del genotipo CC de DHFR-₁₆₁₀ (OR = 0,120, $p = 0,045$) se evidencio un incremento del riesgo de toxicidad.

Estos resultados de asociación encontrados son esperables en el contexto del tratamiento con MTX dada la participación de las enzimas DHFR y MTHFR en la síntesis de ADN, lo cual resulta en daño a las células sanguíneas. Tanto el MTX como sus formas activas poliglutamadas inhiben directamente a la enzima DHFR e indirectamente a la enzima MTHFR²⁰. Esta inhibición tiene como resultado el bloqueo de la síntesis *de novo* de purinas y pirimidinas, ocasionando defectos en la formación y metilación de ADN, así como también en la regulación génica.

El rol del polimorfismo DHFR C-₁₆₁₀G/T en la farmacogenética del MTX a sido poco estudiada. Los hallazgos de este trabajo son concordantes con el trabajo de Dulucq et al., el cual reportó que los portadores del genotipo CC de DHFR-₁₆₁₀ presentaban un incremento en sus niveles de ARNm de DHFR y riesgo de sufrir un efecto adverso⁴⁸.

Respecto a la asociación entre el polimorfismo MTHFR C₆₇₇T y la toxicidad hematológica, nuestro estudio está en desacuerdo con los resultados publicados en el año 2012 por Yang et al en su revisión y meta análisis llevado a cabo en poblaciones con ALL⁷⁰. Luego de incluir 14 estudios, los resultados de Yang et al sugieren que el alelo T y el genotipo TT del polimorfismo MTHFR C₆₇₇T se encuentran asociados a un incremento en el riesgo de sufrir toxicidad inducida por MTX (hepática, GI o de la piel), supresión de la médula ósea y mucositis oral. Sin embargo, varios estudios realizados para este polimorfismo reportan resultados contradictorios respecto a cuál es el alelo o genotipo responsable de la toxicidad inducida por MTX, o incluso no encuentran asociación entre estos^{101,102, 103, 104}. Campbell et al publicó en el año 2016 una revisión sistémica del tipo “umbrella”, donde concluyó que los resultados obtenidos en las revisiones sistémicas realizadas previamente variaban considerablemente dependiendo del grupo de estudio seleccionado¹⁰¹. Jabeen et al. encontró que el alelo T de MTHFR₆₇₇ se encontraba asociado con un alto grado de toxicidad hepática (88%, $p = 0.007$)¹⁰⁵. No debemos olvidar, como fue mencionado, que existen reportes como el de Chiusolo et al en el año 2012 y meta análisis como los de Hagleitner et al en el año 2014 y Lopez-Lopez et al en el año 2013, en los cuales no se encontró asociación alguna entre el polimorfismo MTHFR C₆₇₇T y toxicidades inducidas por MTX^{102, 103, 104}.

Luego de obtenidos los resultados de asociación se evaluó la existencia de una relación directa entre la toxicidad hematológica observada en este grupo de pacientes y la dosis de MTX fuera o dentro del rango terapéutico, la cual pudiera ser más importante que el efecto encontrado de las variantes genéticas. Dicha relación fue descartada dado que, el 57% no presentaba coincidencia (presentaban toxicidad y se encontraban dentro del rango terapéutico o no presentaban toxicidad y se encontraban fuera del rango terapéutico) y el 43% si lo hacía (presentaban toxicidad y se encontraban fuera del rango terapéutico o no presentaban toxicidad y se encontraban dentro del rango terapéutico).

No se logró encontrar a nivel del análisis multivariante algunas de las asociaciones encontradas en el análisis univariante, como lo fueron: toxicidad hepática y DHFR C₆₈₀A; toxicidad GI y MTHFR C₆₇₇T, DHFR A₋₃₁₇G y DHFR 19 pb indel; modificación de dosis de MTX durante la terapia con SLC19A1 G₈₀A. Así como tampoco se logró replicar asociaciones reportadas previamente para poblaciones: pediátricas con LLA entre el alelo C del polimorfismo SLC01B1 T₅₂₁C y una disminución en la excreción de MTX ^{27, 28,106, 107}; tanto pediátricas como adultas con LLA entre el alelo 3R del polimorfismo 28 pb CNV TYMS y anemia, neutropenia y la necesidad de disminuir la dosis de MTX ^{52, 72}.

En consecuencia, los resultados de estudios de asociación entre polimorfismos genéticos y respuesta al tratamiento difieren ampliamente dependiendo del grupo de pacientes, los protocolos de tratamiento o el modelo estadístico utilizado. Todavía no se ha logrado tener un vasto conocimiento respecto a las variantes génicas de la vía del folato y su asociación con la respuesta al tratamiento con MTX. Son requeridos estudios adicionales, con un grupo más grande de pacientes, para validar nuestros resultados. Sin embargo se debe tener en cuenta que estudios extensos con un mayor número de pacientes al nuestro también han dado resultados contradictorios.

En este primer estudio realizado en la población adulta uruguaya acerca de polimorfismos genéticos involucrados en la Farmacogenética del MTX, los resultados de distribución genotípica refuerzan la idea de que no se deben extrapolar a nuestra población los datos genotípicos de otras poblaciones.

Aunque existe la necesidad de realizar estudios genéticos más extensos, los resultados encontrados en este pequeño cohorte de pacientes uruguayos son

alentadores dada la particularidad étnica de este pequeño cohorte de la población del Uruguay.

PERSPECTIVAS

Este trabajo podría ser continuado aumentando el número de pacientes que conforman el grupo de estudio así como también ampliando el panel de polimorfismos genéticos a analizar, y así sumar aquellos polimorfismos en los genes que codifican para el resto de las proteínas involucradas en la vía del fármaco.

Si estudiáramos el exoma de los integrantes del grupo de estudio, podríamos detectar, además de los polimorfismos genéticos recién mencionados, la existencia de aquellos involucrados en la respuesta al fármaco que se encuentran fuera de la vía metabólica.

Lograr estudiar y analizar si existe una asociación entre los valores de metotrexatemias y los polimorfismos genéticos analizados y a analizar, como se ha reportado en la literatura. Así como también aplicar, a los futuros pacientes a incorporar al grupo de estudio, los arboles de decisión contruidos en este trabajo, con el fin de determinar si su predicción coincide o no con lo observado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹Sans, M. (2009). “Raza”, adscripción étnica y genética en Uruguay. *RUNA*, 30 (2): 163-174.

² Página web:
<http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm>, último acceso 20 de Setiembre del 2016.

³Abolmaali, S. S., Tamaddon, A. M. &Dinarvand, R. (2013).A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis.*Cancer ChemotherPharmacol*, 71: 1115–1130.

⁴Buitenkamp, T. D., Mathôt, R. A., de Haas, V., Pieters, R., &Zwaan, C. M. (2010). Methotrexate-induced side effects are not due to differences in pharmacokinetics in children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 95 (7): 1106-1113.

⁵Tetef, M. L., Margolin, K. A., Doroshow, J. H., Akman, S., Leong, L. A., Morgan, R. J.Jr, Raschko, J. W., Slatkin, N., Somlo, G., Longmate, J. A., Carroll, M. I., Newman, E. M. (2000).Pharmacokinetics and toxicity of high-dose intravenous methotrexate in the treatment of leptomeningealcarcinomatosis.*Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 46(1):19-26.

⁶Pui, C-H.,Relling, M. V., Evans, W. E. (2003). Role of pharmacogenomics and pharmacodynamics in the treatment of acute lymphoblastic leukaemia.*Best Practice & Research Clinical Haematology*, 15 (4):741-756.

⁷ Evans, W. E., Relling, M. V., Rodman, J. H., Crom, W. R., Boyett, J. M., &Pui, C. H. (1998). Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*,338(8): 499-505.

⁸Farber, S., Diamond, L. K., Mercer, R. D., Sylvester Jr, R. F., & Wolff, J. A. (1948). Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). *New England Journal of Medicine*, 238 (23): 787-793.

⁹Brunton, L. L., Chabner, B., &Knollmann, B. C. (Eds.). (2011). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics (12th edition). New York: McGraw-Hill Medical.

¹⁰DeVita, V. T., Lawrence, T. S., & Rosenberg, S. A. (Eds.). (2010). Cancer: principles and practice of oncology-advances in oncology (Vol. 1). Lippincott Williams & Wilkins.

¹¹Gervasini, G. (2009). Polymorphisms in Methotrexate Pathways: What is Clinically Relevant, What is Not, and What is Promising. *Current Drug Metabolism*, 10 (7): 547-566.

¹²Abolmaali, S. S., Tamaddon, A. M. &Dinarvand, R. (2013).A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis.*Cancer ChemotherPharmacol*, 71: 1115–1130.

¹³Bleyer, W. A. (1978). The clinical pharmacology of methotrexate. *Cancer*, 41(1): 36-51.

¹⁴Chan, E. S. L. &Cronstein, B. N. (2013). Mechanisms of Action of Methotrexate. *Bulletin of the Hospital for Joint Diseases*, 71 (Suppl 1): S5-8.

¹⁵Thomas, D.A., O'Brien, S., Cortes, J., Giles, F., Faderl, S., Verstovsek, S., Ferrajoli, A., Koller, C., Beran, M., Pierce, S., Ha, C. S., Cabanillas, F., Keating, M.J., &Kantarjian,

H. (2004). Outcome with the hyper-CVAD regimens in lymphoblastic lymphoma. *Blood*, 104 (6): 1624-1630.

¹⁶Riehm, H., Gadner, H., Henze, G., Kornhuber, B., Langermann, H. J., Müller-Weihrich, S., & Schellong, G. (1983). Acute lymphoblastic leukemia: treatment results in three BFM studies (1970-1981). *Leukemia research: Advances in cell biology and treatment*, New York: Elsevier Science Publishing, 251-263.

¹⁷ Chan, E. S. L., & Cronstein, B. N. (2013). Mechanisms of Action of Methotrexate. *Bulletin of the Hospital for Joint Diseases*, 71 (Suppl 1): S5-8.

¹⁸ Widemann, B. C., & Adamson, P. C. (2006). Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *The oncologist*, 11(6), 694-703.

¹⁹ Mikkelsen, T. S., Thorn, C. F., Yang, J. J., Ulrich, C. M., French, D., Zaza, G., Dunnenberger, H. M., March, S., McLeod, H. L., Giacomini, K., & Becker, M. L. (2011). PharmGKB summary: methotrexate pathway. *Pharmacogenetics and genomics*, 21(10): 679.

²⁰ Chen, Y., & Shen, Z. (2015). Gene polymorphisms in the folate metabolism and their association with MTX-related adverse events in the treatment of ALL. *Tumor Biology*, 36 (7): 4913-4921.

²¹ Restrepo, L. F., Giraldo, R., Londoño, J., Pinzón, C., Cortes, A., Ballesteros, G., & Santos, A. M. (2016). Farmacogenética del metotrexato en artritis reumatoide. Revisión sistemática. *Revista Colombiana de Reumatología*, 23 (2): 102-114.

²² Plumptre, C. O., Roberts, D., Pirmohamed, M., & Hughes, D. A. (2016). A Systematic Review of Economic Evaluations of Pharmacogenetic Testing for Prevention of Adverse Drug Reactions. *Pharmacoeconomics*, 34 (8): 771-793.

²³ Hazarika, M., White, R. M., Johnson, J. R., & Pazdur, R. (2004). FDA drug approval summaries: pemetrexed (Alimta). *Oncologist*, 9 (5): 482-488.

²⁴ Cohen, M. H., Justice, R., & Pazdur, R. (2009). Approval summary: pemetrexed in the initial treatment of advanced/ metastatic non-small cell lung cancer. *Oncologist*, 14 (9): 930-935.

²⁵ Thompson, C. A. (2009). FDA approves pralatrexate for treatment of rare lymphoma. *American journal of health-system pharmacy: AJHP: official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 66(21): 1890-1890.

²⁶ Chiabai, M. A., Lins, T. C., Pogue, R., & Pereira, R. W. (2012). Population analysis of pharmacogenetic polymorphisms related to acute lymphoblastic leukemia drug treatment. *Disease markers*, 32(4): 247-253.

²⁷ Lopez-Lopez, E., Ballesteros, J., Piñan, M. A., de Toledo, J. S., de Andoin, N. G., Garcia-Miguel, P., Navajas, A., & Garcia-Orad, A. (2013). Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenetics and genomics*, 23(2): 53-61.

²⁸ Ramsey, L. B., Bruun, G. H., Yang, W., Treviño, L. R., Vattathil, S., Scheet, P., Cheng, C., Rosner, G. L., Giacomini, K. M., Fan, Y., Sparreboom, A., Mikkelsen, T. S., Corydon, T. J., Pui, C., Evans, W. E., & Relling, M. V. (2012). Rare versus common variants in pharmacogenetics: SLCO1B1 variation and methotrexate disposition. *Genome Research*, 22 (1): 1-8.

²⁹ Zhang, H. N., He, X. L., Wang, C., Wang, Y., Chen, Y. J., Li, J. X., Niu, C. H., & Gao, P. (2014). Impact of SLCO1B1 521T> C variant on leucovorin rescue and risk of relapse in

childhood acute lymphoblastic leukemia treated with high-dose methotrexate. *Pediatric blood & cancer*, 61(12): 2203-2207.

³⁰Muralidharan, N., Mariaselvam, C. M., Mithun, C. B., & Negi, V. S. (2016). Reduced folate carrier-1 80G> A gene polymorphism is not associated with methotrexate treatment response in South Indian Tamils with rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology*, 35 (4): 879-885.

³¹He, H. R., Liu, P., He, G. H., Dong, W. H., Wang, M. Y., Dong, Y. L., & Lu, J. (2014). Association between reduced folate carrier G80A polymorphism and methotrexate toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Leukemia & lymphoma*, 55 (12): 2793-2800.

³²Świerkot, J., Ślęzak, R., Karpiński, P., Pawłowska, J., Noga, L., Szechiński, J., & Wiland, P. (2015). Associations between single-nucleotide polymorphisms of RFC1, GGH, MTHFR, TYMS, and TCII genes and the efficacy and toxicity of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis. *PolskieArchiwumMedycynyWewnętrznej*, 125 (3): 152-61.

³³Jabeen, S., Holmboe, L., Alnæs, G. I. G., Andersen, A. M., Hall, K. S., & Kristensen, V. N. (2015). Impact of genetic variants of RFC1, DHFR and MTHFR in osteosarcoma patients treated with high-dose methotrexate. *The pharmacogenomics journal*, 15 (5): 385-390.

³⁴Kung T. N., Dennis J., Ma Y, Xie G., Bykerk V., Pope J., Thorne C., Keystone E., Siminovitch K. A., & Gagnon F. (2014). RFC1 80G80A Is a Genetic Determinant of Methotrexate Efficacy in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 66 (5): 1111–1120.

³⁵Samara, S. A., Irshaid, Y. M., & Mustafa, K. N. (2014). Association of MDR1 C3435T and RFC1 G80A polymorphisms with methotrexate toxicity and response in Jordanian rheumatoid arthritis patients. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 52 (9): 746-755.

³⁶Lima, A., Bernardes, M., Sousa, H., Azevedo, R., Costa, L., Ventura, F., Seabra, V., & Medeiros, R. (2014). SLC19A1 80G allele as a biomarker of methotrexate-related gastrointestinal toxicity in Portuguese rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*, 15 (6): 807-820.

³⁷FaganelKotnik, B., Grabnar, I., BohanecGrabar, P., Dolžan, V., & Jazbec, J. (2011). Association of genetic polymorphism in the folate metabolic pathway with methotrexate pharmacokinetics and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia and malignant lymphoma. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 67 (10): 993–1006.

³⁸Gregers, J., Christensen, I. J., Dalhoff, K., Lausen, B., Schroeder, H., Rosthoej, S., Carlsen, N., Schmiegelow, K., & Peterson, C. (2010). The association of reduced folate carrier 80G>A polymorphism to outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia interacts with chromosome 21 copy number. *Blood*, 115 (23): 4671-4677.

³⁹Kishi, S., Cheng, C., French, D., Pei, D., Das, S., Cook, E. H., Hijiya, N., Rizzari, M., Rosner, G. L., Frudakis, T., Pui, C. H., Evans, W. E., & Relling, M. V. (2007). Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood*, 109 (10): 4151-4157.

⁴⁰Ramsey, L. B., Panetta, J. C., Smith, C., Yang, W., Fan, Y., Winick, N. J., Martin, P. L., Cheng, C., Devidas, M., Pui, C., Evans, W. E., Hunger, S. P., Loh, M., & Relling, M. V.

(2013).Genome-wide study of methotrexate clearance replicates SLCO1B1. *Blood*,121(6): 898-904.

⁴¹Trevino, L. R., Shimasaki, N., Yang, W., Panetta, J. C., Cheng, C., Pei, D., Chan, D., Sparreboom, A., Giacomini, K. M., Pui, C., Evans, W. E., & Relling, M. V. (2009). Germ line genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *Journal of Clinical Oncology*, 27 (35):5972-5978.

⁴²Radtke, S., Zolk, O., Renner, B., Paulides, M., Zimmermann, M., Möricke, A., Stanulla, M., Schrappe, M., & 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): 5154-5153.

⁴³Lopez-Lopez, E., Martin-Guerrero, I., Ballesteros, J., Piñan, M., Garcia-Miguel, P., Navajas, A., & Garcia-Orad, A. (2011). Polymorphisms of the SLCO1B1 gene predict methotrexate-related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric blood & cancer*, 57(4): 612-619.

⁴⁴Zhang, H.N., He, X.L., Wang, C., Wang, Y., Chen, Y.J., Li, J.X., Niu, C.H., & Gao, P. (2014). Impact of SLCO1B1 521T>C variant on leucovorin rescue and risk of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia treated with high-dose methotrexate. *Pediatric Blood Cancer*. 61 (12): 2203–2207.

⁴⁵Blakley, R. L., & Sorrentino, B. P. (1998). In vitro mutations in dihydrofolate reductase that confer resistance to methotrexate: potential for clinical application. *Human mutation*, 11(4), 259.

⁴⁶Ascari, B. S., & Krajcinovic, M. (2010). Dihydrofolate Reductase Gene Variations in Susceptibility to Disease and Treatment Outcomes. *Current Genomics*, 11 (8): 578-583.

⁴⁷Al-Shakfa, F., Dulucq, S., Brukner, I., Milacic, I., Ansari, M., Beaulieu, P., Morghrabi, A., Laverdiere, C., Sallan, S. E., Silverman, L. B., Neuberg, D., Kutok, J. L., Sinnett, D. & Krajcinovic, M. (2009). DNA variants in region for noncoding interfering transcript of dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Cancer Research*, 15 (22): 6931-6938.

⁴⁸Dulucq, S., St-Onge, G., Gagné, V., Ansari, M., Sinnett, D., Labuda, D., Moghrabi, A. & Krajcinovic, M. (2008). DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood*, 111 (7): 3692-3700.

⁴⁹Moorman A. V. (2008). One man's dose, another man's poison. *Blood*, 111 (7): 3303-3304.

⁵⁰Gellekink, H., Blom, H. J., Van der Linden, I. J. M., & Den Heijer, M. (2007). Molecular genetic analysis of the human dihydrofolate reductase gene: relation with plasma total homocysteine, serum and red blood cell folate levels. *European Journal of Human Genetics*, 15 (1): 103-109.

⁵¹Matherly, L. H., Taub, J. W., Ravindranath, Y., Proefke, S. A., Wong, S. C., Gimotty, P., Buck, S., Wright, J. E., & Rosowsky, A. (1995). Elevated dihydrofolate reductase and impaired methotrexate transport as elements in methotrexate resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 85 (2): 500-509.

⁵²Ongaro, A., De Mattei, M., Della Porta, M. G., Rigolin, G., Ambrosio, C., Di Raimondo, F., Pellati, A., Masieri, F. F., Caruso, A., Catozzi, L., & 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.

⁵³Horie, N., Aiba, H., Oguro, K., Hojo, H., &Takeishi, K. (1995). Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase.*Cell structure and function*, 20 (3): 191-197.

⁵⁴Lima, 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.

⁵⁵Senapati, S., Singh, S., Das, M., Kumar, A., Gupta, R., Kumar, U., Gupta, R., Kumar, U., Jain, S., Juyal, R. C., & Thelma, B. K. (2014). Genome-wide analysis of methotrexate pharmacogenomics in rheumatoid arthritis shows multiple novel risk variants and leads for TYMS regulation. *Pharmacogenetics and genomics*, 24 (4): 211-219.

⁵⁶Zgheib, N. K., Akra-Ismail, M., Aridi, C., Mahfouz, R., Saab, R., Abboud, M. R., &Solh, H. (2013). Genetic Polymorphisms In Candidate Genes Predict Increased Toxicity With Methotrexate Therapy In Children With Acute Lymphoblastic Leukemia In Lebanon. *Blood*, 122 (21): 4926-4926.

⁵⁷Jekic, B., Lukovic, L., Bunjevacki, V., Milic, V., Novakovic, I., Damnjanovic, T., Milasin, J., Popovic, B., Maksimovic, N., Damjanov, N., Radunovic, G., Kovacevic, L., &Radunovic, G. (2013). Association of the TYMS 3G/3G genotype with poor response and GGH 354GG genotype with the bone marrow toxicity of the methotrexate in RA patients. *European journal of clinical pharmacology*, 69 (3): 377-383.

⁵⁸Campalani, E., Arenas, M., Marinaki, A. M., Lewis, C. M., Barker, J. N., & Smith, C. H. (2007). Polymorphisms in folate, pyrimidine, and purine metabolism are associated with efficacy and toxicity of methotrexate in psoriasis.*Journal of Investigative Dermatology*, 127 (8): 1860-1867.

⁵⁹Dervieux, T., Kremer, J., Lein, D. O., Capps, R., Barham, R., Meyer, G., Smith, K., Caldwell, J., &Furst, D. E. (2004). Contribution of common polymorphisms in reduced folate carrier and γ -glutamylhydrolase to methotrexate polyglutamate levels in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics and Genomics*, 14 (11): 733-739.

⁶⁰Erčulj, N., Kotnik, B. F., Debeljak, M., Jazbec, J., &Dolžan, V. (2012).Influence of folate pathway polymorphisms on high-dose methotrexate-related toxicity and survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 53 (6): 1096-1104.

⁶¹Ghodke, Y., Chopra, A., Joshi, K., &Patwardhan, B. (2008). Are Thymidylate synthase and Methylene tetrahydrofolatereductase genes linked with methotrexate response (efficacy, toxicity) in Indian (Asian) rheumatoid arthritis patients?. *Clinicalrheumatology*, 27 (6): 787-789.

⁶²Pare, L., Altes, A., y Cajal, T. R., Del Rio, E., Alonso, C., Sedano, L., Barnadas, A., &Baiget, M. (2007). Influence of thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolatereductase gene polymorphisms on the disease-free survival of breast cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil/methotrexate-based therapy. *Anti-cancer drugs*, 18(7): 821-825.

⁶³Takatori, R., Takahashi, K. A., Tokunaga, D., Hojo, T., Fujioka, M., Asano, T., Hirata, T., Kawahito, Y., Satomi, Y., Nishino, H., Tanaka, T., Hirota Y., & Kubo, T. (2006). ABCB1 C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 24 (5): 546-54.

- ⁶⁴Pakakasama, S., Kanchanakamhaeng, K., Kajanachumpol, S., Udomsubpayakul, U., Sirachainan, N., Thithapandha, A., & Hongeng, S. (2007). Genetic polymorphisms of folate metabolic enzymes and toxicities of high dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Annals of Hematology*, 86 (8): 609–611.
- ⁶⁵Hagleitner, M. M., Coenen, M. J. H., Aplenc, R., Patino-Garcia, A., Chiusolo, P., Gemmati, D., De Mattei, M., Ongaro, A., Krajcinovic, M., Hoogerbrugge, P. M., Vermeulen, S. H. H. M., & te Loo, D. M. W. M. (2013). The role of the MTHFR 677C>T polymorphism in methotrexate-induced liver toxicity: a meta-analysis in patients with cancer. *The pharmacogenomics journal*, 14(2): 115-119.
- ⁶⁶Chiusolo, P., Reddicono, G., Casorelli, I., Laurenti, L., Sora, F., Mele, L., Annino, L., Leone, G., & Sica, S. (2002). Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate. *Annals of Oncology*, 13(12): 1915-1918.
- ⁶⁷Morgan, M. D., Al-Shaarawy, N., Martin, S., Robinson, J. I., Twigg, S., YEAR Consortium, Magdy, A. A., Omar, A. S., Ghattas, M. H., Emery, P., Barrett, J. H., & Morgan, A. W. (2014). MTHFR functional genetic variation and methotrexate treatment response in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Pharmacogenomics*, 15 (4): 467-475.
- ⁶⁸Ruiz-Arguelles G J, Coconi-Linares L N, Garcés-Eisele J, & Reyes-Núñez V. (2007). Methotrexate-induced mucositis in acute leukemia patients is not associated with the MTHFR 677T allele in Mexico. *Hematology*, 12 (5): 387–391.
- ⁶⁹Frosst, P., Blom, H. J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C. A., Matthews, R. G., Boers, G. J. H., den Heijer, M., Kluijtmans, L. A. J., van den Heuvel, L. P., & Rozen, R. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics*, 10 (1): 111-113.
- ⁷⁰Yang, 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.
- ⁷¹Ayad, M. W., El Naggar, A. A., & El Naggar, M. (2014). MTHFR C677T polymorphism: association with lymphoid neoplasm and effect on methotrexate therapy. *European Journal of Haematology*, 93 (1): 63-69.
- ⁷²Zgheib, N. K., Akra-Ismail, M., Aridi, C., Mahfouz, R., Abboud, M. R., Solh, H., & Muwakkit, S. A. (2014). Genetic polymorphisms in candidate genes predict increased toxicity with methotrexate therapy in Lebanese children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenetics and genomics*, 24 (8): 387-396.
- ⁷³Eissa, D. S., & Ahmed, T. M. (2013). C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: effect on methotrexate-related toxicity in adult acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 24 (2): 181-188.
- ⁷⁴Chaabane, S., Marzouk, S., Akrou, R., Hamad, M. B., Achour, Y., Rebai, A., Keskes, L., Fourati, H., Bahloul, Z., & Maalej, A. (2015). Genetic determinants of methotrexate toxicity in Tunisian patients with rheumatoid arthritis: a study of polymorphisms involved in the MTX metabolic pathway. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 41 (4): 385-393.
- ⁷⁵Ulrich, C. M., Yasui, Y., Storb, R., Schubert, M. M., Wagner, J. L., Bigler, J., Ariail, K. S., Keener, C. L., Li, S., Liu, H., Farin, F. M., & Potter, J. D. (2001). Pharmacogenetics

of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolatereductase C677T polymorphism. *Blood*, 98 (1): 231-234.

⁷⁶Robien, K., Schubert, M. M., Bruemmer, B., Lloid, M. E., Potter, J. D., Ulrich, C. M. (2004). Predictors of oral mucositis in patients receiving hematopoietic stem cell transplants for chronic myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 22 (7): 1268–1275.

⁷⁷Stamp, L. K., Chapman, P. T., O'Donnell, J. L., Zhang, M., James, J., Frampton, C., Barclaya, M. L., Kennedy, M. A., & Roberts, R. L. (2010). Polymorphisms within the folate pathway predict folate concentrations but are not associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Pharmacogenetics and genomics*, 20 (6): 367-376.

⁷⁸Kurawski, M., Pawlik, A., Safranow, K., Herczynska, M., & Drozdziak, M. (2007). 677C>T and 1298A>C MTHFR polymorphisms affect methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*, 8 (11): 1551-1559.

⁷⁹Kato, T., Hamada, A., Mori, S., & Saito, H. (2012). Genetic polymorphisms in metabolic and cellular transport pathway of methotrexate impact clinical outcome of methotrexate monotherapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 27 (2): 192-199.

⁸⁰Mena, J. P., Salazar-Paramo, M., Gonzalez-Lopez, L., Gamez-Nava, J. I., Sandoval-Ramirez, L., Sanchez, J. D., Figuera, L. E., Muñoz-Valle, F. J., Vazquez del Mercado, M., & Dávalos, I. P. (2011). Polymorphisms C677T and A1298C in the MTHFR gene in Mexican patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate: implication with elevation of transaminases. *The pharmacogenomics journal*, 11 (4): 287-291.

⁸¹Krajinovic, M., Lemieux-Blanchard, E., Chiasson, S., Primeau, M., Costea, I., & Moghrabi, A. (2004). Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *The pharmacogenomics journal*, 4(1): 66-72.

⁸²Pui, C. H., Relling, M. V., & Downing, J. R. (2004). Acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 350(15), 1535-1548.

⁸³Spyridopoulou, K. P., Dimoub, N. L., Hamodrakasa, S. L., & Bagosb, P. G. (2012). Methylene tetrahydrofolatereductase gene polymorphisms and their association with methotrexate toxicity: a meta-analysis. *Pharmacogenetics and Genomics*, 22 (2): 117–133.

⁸⁴Suthandiram, S., Gana, G.G., MohdZaina, S., Beea, P.C., Liana, L.H, Changb, K.M., Ongb, T.C., Mohameda, Z. P0177 Impact of genetic polymorphisms of MTHFR, SLC, and ABC on high-dose methotrexate toxicity and plasma levels in adults with haematological malignancies. *European Journal of Cancer* 2014; 50(4): e60.

⁸⁵Ranganathan, P., Culverhouse, R., Marsh, S., Mody, A., Scott-Horton, T. J., Brasington, R., Joseph, A., Reddy, V., Eisen, S., & McLeod, H. (2008). Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 35 (4): 572-579.

⁸⁶Campalani, E., Arenas, M., Marinaki, A. M., Lewis, C. M., Barker, J. N., & Smith, C. H. (2007). Polymorphisms in folate, pyrimidine, and purine metabolism are associated with efficacy and toxicity of methotrexate in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(8), 1860-1867.

⁸⁷Lecomte, T., Ferraz, J. M., Zinzindohoué, F., Lorient, M. A., Tregouet, D. A., Landi, B., Berger, A., Cugnenc, P. H., Jian, R., Beaune, P., & Laurent-Puig, P. (2004). Thymidylate Synthase Gene Polymorphism Predicts Toxicity in Colorectal Cancer Patients Receiving 5-Fluorouracil-based Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 10 (17): 5880-5888.

⁸⁸Stary, J., Zimmermann, M., Campbell, M., Castillo, L., Dibar, E., Donska, S., Gonzalez, A., Izraeli, S., Janic, D., Jazbec, J., Konja, J., Kaiserova, E., Kowalczyk, J., Kovacs, G., Li, C-K., Magyarosy, E., Popa, A., Stark, B., Jabali, Y., Trka, J., Hrusak, O., Riehm, H., Masera, G., Schrappe, M. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. *Journal of clinical oncology* 2013; 32: 174-185.

⁸⁹Mead, G., Barrans, S., Qian, W., Walewski J, Radford JA, Wolf M, Clawson SM, Stenning SP., Yule, CL., Jack, AS on behalf of the UK National Cancer Research Institute Lymphoma Clinical Studies Group and the Australasian Leukaemia and Lymphoma Group. A prospective clinicopathologic study of dose-modified CODOX-M/IVAC in patients with sporadic Burkitt lymphoma defined using cytogenetic and immunophenotypic criteria (MRC/NCRI LY10 trial). *Blood* 2008; 112: 2248-2260.

⁹⁰Ferreri AJM, Reni M, Foppoli M, Martelli M, Pangalis GA, Frezzato M, Cabras MG, Fabbri A, Corazzelli G, Ilariucci F, Rossi G, Soffietti R, Stelitano C, Vallisa D, Zaja F, Zoppegno L, Aondio GM, Avvisati G, Balzarotti M, Brandes AA, Fajardo J, Gomez H, Guarini A, Pinotti G, Rigacci L, Uhlmann C, Picozzi P, Vezzulli P, Ponzoni M, Zucca E, Caligaris-Cappio F, Cavalli F on behalf of the International Extranodal Lymphoma Study Group (IELSG). High-dose cytarabine plus high-dose methotrexate versus high-dose methotrexate alone in patients with primary CNS lymphoma: a randomised phase 2 trial. *Lancet* 2009; 374: 1512-20.

⁹¹Wangkumhang, P., Chaichoompu, K., Ngamphiw, C., Ruangrit, U., Chanprasert, J., Assawamakin, A., & Tongsim, S. (2007). WASP: a Web-based Allele Specific PCR assay designing tool for detecting SNPs and mutations. *BMC Genomics*, 8: 275.

⁹²Court, M. H., & Michael, H. (2012) Court's (2005–2008) online calculator. Tuft University Web site (<http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls>).

⁹³Mickey, J., & Greenland, S. (1989). A study of the impact of confounder-selection criteria on effect estimation. *American Journal of Epidemiology*, 129: 125-137.

⁹⁴Breiman, L., Friedman, J. H., Olshen, R. A., & Stone, C. J. (1984). *Classification and Regression Trees*. Wadsworth and Brooks, Pacific Grove, CA.

⁹⁵Morales Machín, A., Borjas Fajardo, L., Quintero, J. M., Zabala, W., Alvarez, F., Delgado, W., Hernández, M. L., Solís Añez, E., Sánchez, Y., & Butrón, Z. (2009). Polimorfismo C677T del gen de la Metiltetrahidrofolato Reductasa como factor de riesgo en mujeres con aborto recurrente. *Investigación clínica*, 50 (3): 327-333.

⁹⁶Morán González, D., Jiménez Cabrera, S., & Domínguez-Gil Hurlé, A. (2008). Farmacogenética en oncología. *Medicina Clínica*, 131 (5): 184-195.

⁹⁷García Campelo, R., Rosell Costa, R., Alonso Curbera, G., Antón Aparicio, L. M., & Benítez, J. (2008). Farmacogenómica como instrumento de individualización del tratamiento del cáncer. *Revista de Formación Médica Continuada en Oncología*, (3): 71-89.

⁹⁸Wessels, J. A. M., De Vries-Bouwstra, J. K., Heijmans, B. T., Slagboom, P. E., Goekoop-Ruiterman, Y. P. M., Allaart, C. F., Kerstens, P. J. S. M., Van Zeben, D,

Breedveld, F. C., Dijkmans, B. A. C., Huizinga, T. W. J. & Guchelaar, H. (2006). Efficacy and Toxicity of Methotrexate in Early Rheumatoid Arthritis Are Associated With Single-Nucleotide Polymorphisms in Genes Coding for Folate Pathway Enzymes. *Arthritis & Rheumatism*, 54 (4): 1087-1095.

⁹⁹ Castañón, M. M., Lauricella, A. M., Genoud, V., & Quintana, I. L. (2006). Importancia de la determinación de homocisteinemia y metilentetrahidrofolato reductasa C677T. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 40 (003): 335-339.

¹⁰⁰ Martínez, I., Valdez, R., Azambuja, C., & Estrada, N. (2005). Trombofilia hereditaria. Prevalencia de mutaciones en el factor II, V y en la Metiltetrahidrofolato Reductasa, en una población de donantes de sangre en Paraguay. *Anales de la Facultad de Ciencias Médicas*, 38 (4): 17-29.

¹⁰¹ Campbell, J. M., Bateman, E., Stephenson, M. D., Bowen, J. M., Keefe, D. M., Peters, M. D. (2016). Methotrexate-induced toxicity pharmacogenetics: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 78 (1): 26-39.

¹⁰² Chiusolo P, Giammarco S, Bellesi S, Metafuni E, Piccirillo N, De Ritis D, Marietti S, Federica S, Laurenti L, Fianchi L, Hohaus S, Giuseppe L & Sica S. 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 Chemother Pharmacol* 2012; 69(3): 691-696.

¹⁰³ Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, Ballesteros J & Garcia-Orad A. A systematic review and meta-analysis of MTHFR polymorphisms in methotrexate toxicity prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J* 2013; 13(6): 498-506.

¹⁰⁴ Hagleitner M, Coenen M, Aplenc R, Patiño-García A, Chiusolo P, Gemmati D, De Mattei M, Ongaro A, Krajcinovic M, Hoogerbrugge P, Vermeulen S & te Loo DM. The role of the MTHFR 677C>T polymorphism in methotrexate-induced liver toxicity: a meta-analysis in patients with cancer. *Pharmacogenomics J* 2014; (2): 115-119.

¹⁰⁵ Jabeen S, Holmboe L, Alnæs G, Andersen A, Hall K, & Kristensen V. Impact of genetic variants of RFC1, DHFR and MTHFR in osteosarcoma patients treated with high-dose methotrexate. *Pharmacogenomics J* 2015; 15(5): 385-390.

¹⁰⁶ Relling, M. V., & Ramsey, L. B. (2013). Pharmacogenomics of acute lymphoid leukemia: new insights into treatment toxicity and efficacy. *Hematology American Society of Hematology, The Education Program*, 2013 (1): 126-130.

¹⁰⁷ Treviño, L. R., Shimasaki, N., Yang, W., Panetta, J. C., Cheng, C., Pei, D., ... & Evans, W. E. (2009). Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *Journal of Clinical Oncology*, 27(35), 5972-5978.

APÉNDICE 1

BLOOD/BONE MARROW						Page 1 of 1
Adverse Event	Short Name	Grade				
		1	2	3	4	5
Bone marrow cellularity	Bone marrow cellularity	Mildly hypocellular or ≤25% reduction from normal cellularity for age	Moderately hypocellular or >25 – ≤50% reduction from normal cellularity for age	Severely hypocellular or >50 – ≤75% reduction cellularity from normal for age	—	Death
CD4 count	CD4 count	<LLN – 500/mm ³ <LLN – 0.5 x 10 ⁹ /L	<500 – 200/mm ³ <0.5 – 0.2 x 10 ⁹ /L	<200 – 50/mm ³ <0.2 x 0.05 – 10 ⁹ /L	<50/mm ³ <0.05 x 10 ⁹ /L	Death
Haptoglobin	Haptoglobin	<LLN	—	Absent	—	Death
Hemoglobin	Hemoglobin	<LLN – 10.0 g/dL <LLN – 6.2 mmol/L <LLN – 100 g/L	<10.0 – 8.0 g/dL <6.2 – 4.9 mmol/L <100 – 80g/L	<8.0 – 6.5 g/dL <4.9 – 4.0 mmol/L <80 – 65 g/L	<6.5 g/dL <4.0 mmol/L <65 g/L	Death
Hemolysis (e.g., immune hemolytic anemia, drug-related hemolysis)	Hemolysis	Laboratory evidence of hemolysis only (e.g., direct antiglobulin test [DAT, Coombs'] schistocytes)	Evidence of red cell destruction and ≥2 gm decrease in hemoglobin, no transfusion	Transfusion or medical intervention (e.g., steroids) indicated	Catastrophic consequences of hemolysis (e.g., renal failure, hypotension, bronchospasm, emergency splenectomy)	Death
ALSO CONSIDER: Haptoglobin; Hemoglobin.						
Iron overload	Iron overload	—	Asymptomatic iron overload, intervention not indicated	Iron overload, intervention indicated	Organ impairment (e.g., endocrinopathy, cardiopathy)	Death
Leukocytes (total WBC)	Leukocytes	<LLN – 3000/mm ³ <LLN – 3.0 x 10 ⁹ /L	<3000 – 2000/mm ³ <3.0 – 2.0 x 10 ⁹ /L	<2000 – 1000/mm ³ <2.0 – 1.0 x 10 ⁹ /L	<1000/mm ³ <1.0 x 10 ⁹ /L	Death
Lymphopenia	Lymphopenia	<LLN – 800/mm ³ <LLN x 0.8 – 10 ⁹ /L	<800 – 500/mm ³ <0.8 – 0.5 x 10 ⁹ /L	<500 – 200/mm ³ <0.5 – 0.2 x 10 ⁹ /L	<200/mm ³ <0.2 x 10 ⁹ /L	Death
Myelodysplasia	Myelodysplasia	—	—	Abnormal marrow cytogenetics (marrow blasts ≤5%)	RAEB or RAEB-T (marrow blasts >5%)	Death
Neutrophils/granulocytes (ANC/AGC)	Neutrophils	<LLN – 1500/mm ³ <LLN – 1.5 x 10 ⁹ /L	<1500 – 1000/mm ³ <1.5 – 1.0 x 10 ⁹ /L	<1000 – 500/mm ³ <1.0 – 0.5 x 10 ⁹ /L	<500/mm ³ <0.5 x 10 ⁹ /L	Death
Platelets	Platelets	<LLN – 75,000/mm ³ <LLN – 75.0 x 10 ⁹ /L	<75,000 – 50,000/mm ³ <75.0 – 50.0 x 10 ⁹ /L	<50,000 – 25,000/mm ³ <50.0 – 25.0 x 10 ⁹ /L	<25,000/mm ³ <25.0 x 10 ⁹ /L	Death
Splenic function	Splenic function	Incidental findings (e.g., Howell-Jolly bodies)	Prophylactic antibiotics indicated	—	Life-threatening consequences	Death
Blood/Bone Marrow – Other (Specify, ___)	Blood – Other (Specify, ___)	Mild	Moderate	Severe	Life-threatening; disabling	Death

CTCAE v3.0

- 4 -

March 31, 2003, Publish Date: August 9, 2006

Figura 1. Imagen extraída de CTCAE v3 en que se listan algunos de los eventos adversos considerados para determinar toxicidad hematológica y grado.

METABOLIC/LABORATORY						Page 1 of 3
Adverse Event	Short Name	Grade				
		1	2	3	4	5
Acidosis (metabolic or respiratory)	Acidosis	pH <normal, but ≥7.3	—	pH <7.3	pH <7.3 with life-threatening consequences	Death
Albumin, serum-low (hypoalbuminemia)	Hypoalbuminemia	<LLN – 3 g/dL <LLN – 30 g/L	<3 – 2 g/dL <30 – 20 g/L	<2 g/dL <20 g/L	—	Death
Alkaline phosphatase	Alkaline phosphatase	>ULN – 2.5 x ULN	>2.5 – 5.0 x ULN	>5.0 – 20.0 x ULN	>20.0 x ULN	—
Alkalosis (metabolic or respiratory)	Alkalosis	pH >normal, but ≤7.5	—	pH >7.5	pH >7.5 with life-threatening consequences	Death
ALT, SGPT (serum glutamic pyruvic transaminase)	ALT	>ULN – 2.5 x ULN	>2.5 – 5.0 x ULN	>5.0 – 20.0 x ULN	>20.0 x ULN	—
Amylase	Amylase	>ULN – 1.5 x ULN	>1.5 – 2.0 x ULN	>2.0 – 5.0 x ULN	>5.0 x ULN	—
AST, SGOT (serum glutamic oxaloacetic transaminase)	AST	>ULN – 2.5 x ULN	>2.5 – 5.0 x ULN	>5.0 – 20.0 x ULN	>20.0 x ULN	—
Bicarbonate, serum-low	Bicarbonate, serum-low	<LLN – 16 mmol/L	<16 – 11 mmol/L	<11 – 8 mmol/L	<8 mmol/L	Death
Bilirubin (hyperbilirubinemia)	Bilirubin	>ULN – 1.5 x ULN	>1.5 – 3.0 x ULN	>3.0 – 10.0 x ULN	>10.0 x ULN	—
REMARK: Jaundice is not an AE, but may be a manifestation of liver dysfunction/failure or elevated bilirubin. If jaundice is associated with elevated bilirubin, grade bilirubin.						
Calcium, serum-low (hypocalcemia)	Hypocalcemia	<LLN – 8.0 mg/dL <LLN – 2.0 mmol/L Ionized calcium: <LLN – 1.0 mmol/L	<8.0 – 7.0 mg/dL <2.0 – 1.75 mmol/L Ionized calcium: <1.0 – 0.9 mmol/L	<7.0 – 6.0 mg/dL <1.75 – 1.5 mmol/L Ionized calcium: <0.9 – 0.8 mmol/L	<6.0 mg/dL <1.5 mmol/L Ionized calcium: <0.8 mmol/L	Death
REMARK: Calcium can be falsely low if hypoalbuminemia is present. Serum albumin is <4.0 g/dL, hypocalcemia is reported after the following corrective calculation has been performed: Corrected Calcium (mg/dL) = Total Calcium (mg/dL) – 0.8 [Albumin (g/dL) – 4] [†] . Alternatively, direct measurement of ionized calcium is the definitive method to diagnose metabolically relevant alterations in serum calcium.						

[†]Crit Rev Clin Lab Sci 1984;21(1):51-97

CTCAE v3.0

- 40 -

March 31, 2003, Publish Date: August 9, 2006

Figura 2. Imagen extraída de CTCAE v3 en que se listan algunos de los eventos adversos considerados para determinar toxicidad hepática y grado.

METABOLIC/LABORATORY						Page 2 of 3
Adverse Event	Short Name	Grade				
		1	2	3	4	5
Calcium, serum-high (hypercalcemia)	Hypercalcemia	>ULN – 11.5 mg/dL >ULN – 2.9 mmol/L Ionized calcium: >ULN – 1.5 mmol/L	>11.5 – 12.5 mg/dL >2.9 – 3.1 mmol/L Ionized calcium: >1.5 – 1.6 mmol/L	>12.5 – 13.5 mg/dL >3.1 – 3.4 mmol/L Ionized calcium: >1.6 – 1.8 mmol/L	>13.5 mg/dL >3.4 mmol/L Ionized calcium: >1.8 mmol/L	Death
Cholesterol, serum-high (hypercholesteremia)	Cholesterol	>ULN – 300 mg/dL >ULN – 7.75 mmol/L	>300 – 400 mg/dL >7.75 – 10.34 mmol/L	>400 – 500 mg/dL >10.34 – 12.92 mmol/L	>500 mg/dL >12.92 mmol/L	Death
CPK (creatine phosphokinase)	CPK	>ULN – 2.5 x ULN	>2.5 x ULN – 5 x ULN	>5 x ULN – 10 x ULN	>10 x ULN	Death
Creatinine	Creatinine	>ULN – 1.5 x ULN	>1.5 – 3.0 x ULN	>3.0 – 6.0 x ULN	>6.0 x ULN	Death
REMARK: Adjust to age-appropriate levels for pediatric patients. ALSO CONSIDER: Glomerular filtration rate.						
GGT (γ-Glutamyl transpeptidase)	GGT	>ULN – 2.5 x ULN	>2.5 – 5.0 x ULN	>5.0 – 20.0 x ULN	>20.0 x ULN	—
Glomerular filtration rate	GFR	<75 – 50% LLN	<50 – 25% LLN	<25% LLN, chronic dialysis not indicated	Chronic dialysis or renal transplant indicated	Death
ALSO CONSIDER: Creatinine.						
Glucose, serum-high (hyperglycemia)	Hyperglycemia	>ULN – 160 mg/dL >ULN – 8.9 mmol/L	>160 – 250 mg/dL >8.9 – 13.9 mmol/L	>250 – 500 mg/dL >13.9 – 27.8 mmol/L	>500 mg/dL >27.8 mmol/L or acidosis	Death
REMARK: Hyperglycemia, in general, is defined as fasting unless otherwise specified in protocol.						
Glucose, serum-low (hypoglycemia)	Hypoglycemia	<LLN – 55 mg/dL <LLN – 3.0 mmol/L	<55 – 40 mg/dL <3.0 – 2.2 mmol/L	<40 – 30 mg/dL <2.2 – 1.7 mmol/L	<30 mg/dL <1.7 mmol/L	Death
Hemoglobinuria	Hemoglobinuria	Present	—	—	—	Death
Lipase	Lipase	>ULN – 1.5 x ULN	>1.5 – 2.0 x ULN	>2.0 – 5.0 x ULN	>5.0 x ULN	—
Magnesium, serum-high (hypermagnesemia)	Hypermagnesemia	>ULN – 3.0 mg/dL >ULN – 1.23 mmol/L	—	>3.0 – 8.0 mg/dL >1.23 – 3.30 mmol/L	>8.0 mg/dL >3.30 mmol/L	Death
Magnesium, serum-low (hypomagnesemia)	Hypomagnesemia	<LLN – 1.2 mg/dL <LLN – 0.5 mmol/L	<1.2 – 0.9 mg/dL <0.5 – 0.4 mmol/L	<0.9 – 0.7 mg/dL <0.4 – 0.3 mmol/L	<0.7 mg/dL <0.3 mmol/L	Death
Phosphate, serum-low (hypophosphatemia)	Hypophosphatemia	<LLN – 2.5 mg/dL <LLN – 0.8 mmol/L	<2.5 – 2.0 mg/dL <0.8 – 0.6 mmol/L	<2.0 – 1.0 mg/dL <0.6 – 0.3 mmol/L	<1.0 mg/dL <0.3 mmol/L	Death
Potassium, serum-high (hyperkalemia)	Hyperkalemia	>ULN – 5.5 mmol/L	>5.5 – 6.0 mmol/L	>6.0 – 7.0 mmol/L	>7.0 mmol/L	Death

CTCAE v3.0

- 41 -

March 31, 2003, Publish Date: August 9, 2008

Figura 3. Imagen extraída de CTCAE v3 en que se listan algunos de los eventos adversos considerados para determinar toxicidad hepática y renal, al igual que su grado.

GASTROINTESTINAL						Page 6 of 10
Adverse Event	Short Name	Grade				
		1	2	3	4	5
Mucositis/stomatitis (clinical exam) – Select: – Anus – Esophagus – Large bowel – Larynx – Oral cavity – Pharynx – Rectum – Small bowel – Stomach – Trachea	Mucositis (clinical exam) – Select	Erythema of the mucosa	Patchy ulcerations or pseudomembranes	Confluent ulcerations or pseudomembranes; bleeding with minor trauma	Tissue necrosis; significant spontaneous bleeding; life-threatening consequences	Death
REMARK: Mucositis/stomatitis (functional/symptomatic) may be used for mucositis of the upper aero-digestive tract caused by radiation, agents, or GVHD.						
Mucositis/stomatitis (functional/symptomatic) – Select: – Anus – Esophagus – Large bowel – Larynx – Oral cavity – Pharynx – Rectum – Small bowel – Stomach – Trachea	Mucositis (functional/symptomatic) – Select	Upper aerodigestive tract sites: Minimal symptoms, normal diet; minimal respiratory symptoms but not interfering with function Lower GI sites: Minimal discomfort, intervention not indicated	Upper aerodigestive tract sites: Symptomatic but can eat and swallow modified diet; respiratory symptoms interfering with function but not interfering with ADL Lower GI sites: Symptomatic, medical intervention indicated but not interfering with ADL	Upper aerodigestive tract sites: Symptomatic and unable to adequately aliment or hydrate orally; respiratory symptoms interfering with ADL Lower GI sites: Stool incontinence or other symptoms interfering with ADL	Symptoms associated with life-threatening consequences	Death
Nausea	Nausea	Loss of appetite without alteration in eating habits	Oral intake decreased without significant weight loss, dehydration or malnutrition; IV fluids indicated <24 hrs	Inadequate oral caloric or fluid intake; IV fluids, tube feedings, or TPN indicated ≥24 hrs	Life-threatening consequences	Death
ALSO CONSIDER: Anorexia; Vomiting.						

CTCAE v3.0

- 24 -

March 31, 2003, Publish Date: August 9, 2008

Figura 4. Imagen extraída de CTCAE v3 en que se listan algunos de los eventos adversos considerados para determinar mucositis y toxicidad GI, al igual que su grado.

APÉNDICE 2

METHOTREXATE PHARMACOGENETICS IN ADULTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA AND NON-HODGKIN LYMPHOMA

Andrea Giletti^a, Marcelo Vital^a, Mariana Lorenzo^b, Patricia Cardozo^a, Gabriel Borelli^c, Raúl Gabus^c, Lem Martínez^d, Lilian Díaz^b, Rodrigo Assar^e, María Noel Rodríguez^f, Patricia Esperón^{a,*}.

^aLaboratorio de Biología Molecular, Depto. de Bioquímica Clínica, Facultad de Química, Universidad de la Republica, Uruguay; ^bCátedra de Hematología, Hospital de Clínicas, Universidad de la Republica, Uruguay; ^cServicio de Hematología, Hospital Maciel, ASSE, Uruguay; ^dServicio de Hematología Sociedad Medica Uruguaya, Uruguay; ^eFacultad de Medicina, Universidad de Chile, Chile; ^fUNADEQ, Facultad de Química, Universidad de la Republica, Uruguay

*Corresponding author at: Laboratorio de Biología Molecular, Depto. de Bioquímica Clínica, Facultad de Química, UDELAR, General Flores 2124, Uruguay. Tel.: +598 29242426.

e-mail address: pesperon@fq.edu.uy.

FinancialSupport: Theworkwassupportedbyfundsfrom Comisión Sectorialde Investigación Científica (CSIC I+D 808), ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación POS_NAC_2014_1_102979) and Fundación Manuel Pérez, Uruguay.

Abstract

Objective: Individual variability is among the causes of treatment and interruption in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and severe non-Hodgkin lymphoma (NHL) patients under protocols including Methotrexate (MTX).

Methods: 41 Uruguayan patients and 55 controls were recruited. Gene polymorphisms involved in MTX pathway were analyzed and their associations with treatment toxicities and outcome were evaluated.

Results: Genotype distribution and allele frequency were determined for SLC19A1 G80A, MTHFR C677T and A1298C, TYMS 28bp copy number variation, SLCO1B1 T521C, DHFR C-1610G/T, DHFR C-680A, DHFR A-317G, and DHFR 19 bpindel. Multivariate analysis showed that DHFR-1610 G/T (OR = 9.3, p = 0.018) and MTHFR677 T alleles (OR = 8.1, p = 0.026) had a strong protective effect against hematologic toxicity, while DHFR-1610 CC genotype increased this toxicity (OR = 0.12, p = 0.045). No more associations were found.

Conclusion: Genotype distribution and allele frequency showed to be different from other populations, reinforcing the idea that genotype data from other populations should not be extrapolated to ours. The associations found between gene polymorphisms and toxicities in this small cohort are encouraging for a more extensive research to gain a better dose individualization in adult ALL and NHL patients.

Keywords: Methotrexate, Genetic Polymorphisms, Pharmacogenetics, Acute Lymphoblastic Leukemia, Non-Hodgkin Lymphoma.

1. Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) and non-Hodgkin lymphoma (NHL) are within the annual 15.100 new cancer cases in Uruguay, according to the Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. In the Uruguayan population, constituted by an estimate of 3 million people, the annual incidence reported for ALL is 1.76 and for NHL is 9.99 per 100.000 (1).

For decades, MTX, a structural analog of folic acid, has been commonly used in different types of cancer treatments (e.g. ALL, aggressive NHL, osteosarcoma, breast cancer, colorectal

cancer, head and neck cancer), autoimmune diseases (e.g. rheumatoid arthritis, Crohn's disease, psoriasis) and rejection in hematopoietic cell transplantation. Due to its ability to inhibit enzymes involved in the cellular folate metabolism pathway, MTX leads to the inhibition of purine and pyrimidine precursors' synthesis, preventing DNA and RNA synthesis in rapidly dividing cells and causes defects in the methylation process (2).

MTX-induced toxicity is a matter of concern and can be the cause of treatment interruption or discontinuation, which may increase relapse risk. The primary toxicities of MTX affect the bone marrow and the gastrointestinal (GI) system. A bone marrow depression can occur abruptly leading to leucopenia, thrombocytopenia, anemia and megaloblastic anemia. Symptoms such as stomatitis, vomits, nausea, loss of appetite, diarrhea, oral and intestinal mucositis are indicators of GI toxicity. Stomatitis and diarrhea lead to treatment discontinuation, because it may lead to hemorrhagic enteritis, intestinal perforation or even death. Oral and intestinal mucositis are characterized by painful inflammation and ulceration of the mucous membranes lining the digestive system. During MTX chemotherapy, mucositis causes a significantly increase in infection and bleeding frequency, thereby reducing the therapy efficacy (3, 4). Acute or chronic liver damage, renal failure, central nervous system toxicity and skin reactions are less frequent adverse reactions (3, 5).

Genetic polymorphisms in elements that control the pharmacokinetics or pharmacodynamics of MTX, may lead to variability in drug efficacy and safety. This explains why a small population proportion may be at higher risk of drug inefficacy or toxicity.

Several studies regarding MTX pharmacogenetics, have reported genetic variations in candidate genes of the therapeutic drug pathway associated with toxicity and response. After a selection among several studies, the set of polymorphisms in candidate genes included in this work are listed in Table 1.

The study aimed to determine the influence of a group of gene polymorphisms involved in MTX pathway, on toxicity and treatment outcome, on Uruguayan adults with a hemato-oncological disease under treatment with intermediate or high-dose MTX.

2. Patients and Methods

2.1. Patients and study design

A prospective longitudinal multicenter study was conducted on 41 Uruguayan adult patients diagnosed with ALL or aggressive NHL, whose treatment included intermediate or high-dose MTX. Doses were given according to the protocols HYPERCVAD-MA (1g/m² intravenous (IV) plus 12mg intrathecal (IT) per even course and 20mg/m² orally for 24 months during maintenance), Berlin-Frankfurt-Muensterwhich 2002 (5g/m² IV during high risk induction and 8g/m² IV during consolidation, followed by 160mg/m² orally during maintenance and 12 to 48mg IT throughout protocol), CODOX-M-IVAC (3g/m² IV plus 12mg IT per course) or MTX-ARAC (3,5g/m² IV per course) (21, 22, 23, 24).

Exclusion criteria were hepatic or renal disease before starting treatment and not related to the hemato-oncological disease diagnosed.

In addition, 55 healthy adult Uruguayan volunteers were included as controls.

A signed informed consent was obtained from all participants. The Ethical Committee of the School of Chemistry approved the study and is in accordance with the current version of the Helsinki Declaration.

2.2 Genotype determination

Genomic DNA was obtained from peripheral blood samples, using a commercial kit. Details of genotyping methods for each genetic polymorphism studied can be found in Table 2.

In all cases, Sanger sequencing was used to confirm the results obtained by the different analysis methods employed.

2.3 Clinical data

Patients were followed-up for clinical and laboratory parameters until they stopped receiving MTX treatment, in order to assess the development of therapy-related toxicity and clinical outcome (through remission and alive or deceased status). Data were collected 10 or 30 days after IV or oral administration, respectively.

GI and neurological symptoms, MTX dose modification, calcium folinate dose, as well as remission and death were qualitatively evaluated. Liver and renal function were assessed by measuring bilirubin, hepatic enzymes, serum creatinine and blood urea nitrogen (BUN). A complete blood count and MTX plasma levels were also performed.

For toxicity measurement, the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE v4.0, NCI, NIH) scale was used. Nevertheless, toxicity grading was not performed, due to the low number of patients; instead, qualitative variables were established in a dichotomous (presence or absence) form.

2.4 Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS V22.0, Chicago, IL, USA).

For all polymorphisms, the alleles and genotypes frequencies were estimated by direct counting.

Hardy-Weinberg (HW) equilibrium was tested using the exact test. A p value > 0.05 is consistent with HW equilibrium.

Univariate analysis was performed using Chi square test to estimate association between gene polymorphisms and clinical data of patients. The recessive and dominant models established the most frequent homozygous genotype as reference. A probability level (p value) was assumed significant if ≤ 0.05 .

Multivariate analysis was performed using the logistic regression model for binary data, in which those variables with a p value ≤ 0.25 in the univariate analysis were included (25). Statistical significance was defined as p value ≤ 0.05 .

3. Results

3.1. Demographic characteristics and clinical data

A total of 96 adults, 60 males and 36 females, were included. The median age was 36.0 ± 13.9 in a range between 18 and 74 years. Among them, 41 were patients (20 ALL and 21 NHL) and 55 were healthy controls. Despite preventive measures, different kinds of toxicity in the patients group were observed: 63.4% hematologic toxicity (regardless of the administration of calcium folinate), 19.5% kidney toxicity (in spite of the adequate flow of alkaline urine maintained) and 17.1% oral mucositis (despite mouthwash with borate, aluminum hydroxide gel, local anesthetics and antimycotic). Patient clinical data are listed in Table 3. Neurological toxicity was excluded from the statistical analysis because it did not present any variation among patients.

3.2. Genotype distribution and allele frequency

Genotype distribution and allele frequency calculated for the 96 individuals, considering both patients and controls, and p value results of Pearson's Chi-squared test are shown in Table 4.

According to the results of the deviation test, all of the polymorphisms tested, except DHFR C-680A and DHFR A-317G polymorphism, were in HW equilibrium.

3.3. Association studies between gene polymorphisms and clinical data

In the univariate analysis a statistically significant association was found only with hematologic, liver and GI toxicity and MTX dose modification. No association with remission or death was found. Genotypes and alleles significantly associated with a p value ≤ 0.05 are listed in Table 5.

The univariate analysis showed associations between: hematologic toxicity and DHFR C-1610G/T and MTHFR C677T polymorphisms; liver toxicity and DHFR C-680A polymorphism;

GI toxicity and MTHFR C677T, DHFR A-317G and DHFR 19 bpindel polymorphisms; as well as MTX dose modification during therapy and SLC19A1 G80A polymorphism.

Regarding hematologic toxicity, MTHFR677 CC genotype (OR=4.5, p=0.026) increased the risk 4.5 times, while MTHFR677 T allele (OR=0.265, p=0.047), MTHFR677 CT genotype (OR=0.150, p=0.006) and DHFR-1610 G/T alleles (OR=0.132, p=0.005) had a protective effect decreasing the risk 4, 7 and 8 times, respectively.

DHFR-680 CC genotype (OR=5.143, p=0.017) increased the risk 5 times for liver toxicity, whereas DHFR-680 A allele was seen to have a protective effect (OR=0.194, p=0.017).

GI toxicity had a 5.4 increased risk of occurring if MTHFR677 TT genotype (OR=0, p=0.033), DHFR-317 A allele (OR=0.186, p=0.018) or DHFR19bpIndel Ins allele (OR=0.186, p=0.018) were present. Contrary, MTHFR677 C allele (OR=4.5, p=0.032), DHFR-317 GG genotype (OR=5.4, p=0.018) and DHFR19bpIndel Del/Del genotype (OR=5.4, p=0.018) were found protective, decreasing the risk 4.5, 5.4 and 5.4 times, respectively.

A MTX dose modification was required along treatment in 17% of the patients and was 5 times more frequent in SLC19A180 GG genotype patients (OR=5.143, p=0.047), while less frequent in SLC19A180 A allele carriers (OR=0.194, p=0.047).

On the basis of the results of univariate (variables with a p value ≤ 0.25), in the multivariate analysis, only hematologic toxicity and the recessive model of DHFR C-1610G/T and MTHFR C677T polymorphisms presented a p value ≤ 0.05 .

DHFR-1610 G/T alleles (OR = 9.3, p=0.018) and MTHFR677 T allele (OR = 8.1, p=0.026) had a strong protective effect against hematologic toxicity, augmenting the risk 9 and 8 times, respectively, in patients without these alleles. In accordance with these results, DHFR-1610 CC genotype (OR = 0.120, p=0.045) increased the risk of suffering this kind of toxicity 9 times in comparison with non-carriers.

We could not replicate previously reported associations between 28bp CNV TYMS or SLC01B1 T521C and treatment response (9, 15, 16, 17, 18, 19, 20).

4. Discussion

We were interested in replicate in Uruguay previous pharmacogenetic studies performed abroad, in order to gain knowledge of a population with a particular ethnicity (84.1% European; 10.4% Amerindian; 5.6% African) (26).

Findings concerning the genotype distribution and allele frequency of the studied gene polymorphisms differed from previous reports.

The results of the multivariate analysis showed that DHFR-1610 G/T alleles and MTHFR677 T allele had a protective effect against hematologic toxicity, while DHFR-1610 CC genotype carriers had an increase risk.

These results are expectable in the context of MTX treatment, due to the involvement of DHFR and MTHFR enzymes in DNA synthesis, resulting in damage to the blood cells. MTX and its active polyglutamated forms are inhibitors of the DHFR and MTHFR enzymes (27). This inhibition results in blockage in the de novo purine and pyrimidine synthesis, causing impaired DNA formation, DNA methylation and gene regulation.

The role of DHFR C-1610G/T polymorphism in MTX pharmacogenetics has been poorly studied. Dulucq et al. reported that DHFR-1610 CC genotype carriers presented increased DHFR mRNA levels leading to a higher risk of suffering an adverse event, which agrees with our findings (12).

Regarding the association between MTHFR677T polymorphism and hematologic toxicity, our study is in disagreement with recent meta-analysis in ALL population (28). Nevertheless, several studies on this polymorphism reported contradictory results regarding the genotype or

allele responsible for MTX-induced toxicity (29), while others did not find any association between them (30, 31, 32, 33). Jabeen et al. (34) even found that MTHFR677C allele was associated with higher degree of liver toxicity (88%, $p = 0.007$).

In consequence, the results of association studies between gene polymorphisms and treatment response differ widely, depending on the patient groups, treatment protocols, or the statistical models employed. Full knowledge concerning folate pathway gene variants and their association with toxicity and outcome in MTX treatment is still part of an unfinished topic. Further studies with larger patient number are required to validate our findings, although extensive studies with large number of patients also yield contradictory results.

In this first MTX pharmacogenetic study performed in Uruguay, our genotype distribution results reinforced the idea that available genotyping data from other populations should not be extrapolated to ours.

Although more extensive genetic molecular studies must be performed, the results in this small cohort of Uruguayan patients with a particular ethnicity are encouraging.

Acknowledgements

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA Química), Uruguay.

References

1. Sociedad Uruguaya de Hematología. <http://www.shu.com.uy/>, 2016 (accessed 20.06.2016).
2. Chan ESL & Cronstein BN. Mechanisms of Action of Methotrexate. *Bull Hosp Jt Dis* 2013; 71: S5-8.
3. Ross CJD, Visscher H, Rassekh SR, Castro-Pastrana LI, Shereck E, Carleton B, Hayden MR. Pharmacogenomics of serious adverse drug reactions in pediatric oncology. *J Popul Ther Clin Pharmacol* 2011; 18: 134-151.
4. Gibson RJ, Bowen JM, Keefe DMK. Technological advances in mucositis research: New insights and new issues. *Cancer Treat Rev* 2008; 34: 476–482.
5. Sweetman SC. Martindale The complete drug reference, 36th ed. London: Pharmaceutical Press 2009.
6. Ongaro A, De Mattei M, Della Porta MG, Rigolin G, Ambrosio C, Di Raimondo F, Pellati A, Masieri FF, Caruso A, Catozzi L, Gemmati D. Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: effects on methotrexate-related toxicity and survival. *Haematol* 2009; 94: 1391-1398.
7. Spyridopoulou KP, Dimoub NL, Hamodrakasa SL, Bagosb PG. Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with methotrexate toxicity: a meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics* 2012; 22: 117–133.

8. Suthandiram S, Gan GG, MohdZain S, Bee PC, Lian LH, Chang KM, Ong TC, Mohamed Z. P0177 Impact of genetic polymorphisms of MTHFR, SLC, and ABC on high-dose methotrexate toxicity and plasma levels in adults with haematological malignancies. *Eur J Cancer* 2014; 50: e60.
9. Ranganathan P, Culverhouse R, Marsh S, Mody A, Scott-Horton TJ, Brasington R, Joseph A, Reddy V, Eisen S, McLeod H. Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2008; 35: 572-579.
10. FaganelKotnik B, Grabnar I, BohanecGrabar P, Dolžan V, Jazbec J. Association of genetic polymorphism in the folate metabolic pathway with methotrexate pharmacokinetics and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia and malignant lymphoma. *Eur J ClinPharmacol* 2011; 67: 993–1006.
11. Dorababu P, Naushad SM, Linga VG, Gundeti S, Nagesh N, Kutala VK, Reddanna P, Digumarti R. Genetic variants of thiopurine and folate metabolic pathways determine 6-MP mediated hematological toxicity in childhood ALL. *Pharmacogenomics* 2012; 13: 1001-1008.
12. Dulucq S, St-Onge G, Gagné V, Ansari M, Sinnett D, Labuda D, Moghrabi A, Krajcinovic M. DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood* 2008; 111: 3692-3700.
13. Al-Shakfa F, Dulucq S, Brukner I, Milacic I, Ansari M, Beaulieu P, Moghrabi A, Laverdière C, Sallan SE, Silverman LB, Neuberg D, Kutok JL, Sinnett D, Krajcinovic M. DNA variants in region for noncoding interfering transcript of dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *ClinCancer Res* 2009; 15: 6931-6938.
14. Ascari BS & Krajcinovic M. DihydrofolateReductase Gene Variations in Susceptibility to Disease and Treatment Outcomes. *Curr Genomics* 2010; 11: 578-583.
15. Pakakasama S, Kanchanakamhaeng K, Kajanachumpol S, Udomsubpayakul U, Sirachainan N, Thithapandha A, Hongeng S. Genetic polymorphisms of folate metabolic enzymes and toxicities of high dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 2007; 86: 609–611.
16. Lecomte T, Ferraz JM, Zinzindohoué F, Lorient MA, Tregouet DA, Landi B, Berger A, Cugnenc PH, Jian R, Beaune P, Laurent-Puig P. Thymidylate Synthase Gene Polymorphism Predicts Toxicity in Colorectal Cancer Patients Receiving 5-Fluorouracil-based Chemotherapy. *ClinCancer Res* 2004; 10: 5880-5888.
17. Ramsey LB, Panetta JC, Smith C, Yang W, Fan Y, Winick NJ, Martin PL, Cheng C, Devidas M, Pui C, Evans WE, Hunger SP, Loh M, Relling MV. Genome-wide study of methotrexate clearance replicates SLCO1B1. *Blood* 2013; 121: 898-904.
18. Relling MV & Ramsey LB. Pharmacogenomics of acute lymphoid leukemia: new insights into treatment toxicity and efficacy. *Hematology Am SocHematolEduc Program* 2013; 2013: 126-130.
19. Zhang HN, He XL, Wang C, Wang Y, Chen YJ, Li JX, Niu CH, Gao P. Impact of SLCO1B1 521T>C variant on leucovorin rescue and risk of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia treated with high-dose methotrexate. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61: 2203–2207.
20. Radtke S, Zolk O, Renner B, Paulides M, Zimmermann M, Moricke A, Stanulla M, Schrappe M, Langer T. Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2013; 121: 5154-5153.
21. Thomas DA, O'Brien S, Cortes J, Giles F, Faderl S, Verstovsek S, Ferrajoli A, Koller C, Beran M, Pierce S, Ha CS, Cabanillas F, Keating MJ, Kantarjian H. Outcome with the hyper-CVAD regimens in lymphoblastic lymphoma. *Blood* 2004; 104: 1624-1630.
22. Riehm H, Gadner H, Henze G, Kornhuber B, Langermann HJ, Müller-Wehrich S, Schellong G. Acute lymphoblastic leukemia: treatment results in three BFM studies (1970–81) In: Murphy SB, Gilbert JR, editors. *Leukemia Research: Advances in Cell Biology and Treatment*. New York: Elsevier Science Publishing, 1983: 251–263.
23. Mickey J & Greenland S. A study of the impact of confounder-selection criteria on effect estimation. *Am J Epidemiol* 1989; 129:125-137.
24. Sans M. “Raza”, adscripción étnica y genética en Uruguay. *RUNA* 2009; 30: 163-174.
25. Chen Y & Shen Z. Gene polymorphisms in the folate metabolism and their association with MTX-related adverse events in the treatment of ALL. *Tumor Biol* 2015; 36: 4913-4921.

26. Campbell JM, Bateman E, Stephenson MD, Bowen JM, Keefe DM, Peters MD. Methotrexate-induced toxicity pharmacogenetics: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016; 78: 26-39.
27. Yang L, Hu X, Xu L. Impact of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms on methotrexate-induced toxicities in acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Tumor Biol* 2012; 33: 1445-1454.
28. Kung TN, Dennis J, Ma Y, Xie G, Bykerk V, Pope J, Thorne C, Keystone E, Siminovitch KA, Gagnon F. RFC1 80G80A is a genetic determinant of methotrexate efficacy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66: 1111–1120.

Gene	Interaction with MTX	Polymorphisms	Polymorphism effects	Ref.
5,10-methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR)	Indirectly inhibited by MTX	C ₆₇₇ T (rs1801133) A ₁₂₉₈ C (rs1801131)	Reduced enzyme activity	(6, 7, 8, 9)
Solute carrier family 19 member 1 (SLC19A1)	MTX uptake	G ₈₀ A (rs1051266)	Decreases the transporter affinity	(10, 11)
Dihydrofolate reductase (DHFR)	Is inhibited either by MTX or MTX-PGs*, causing the blockage of <i>de novo</i> DNA synthesis	C ₋₁₆₁₀ G/T (rs1650694) C ₋₆₈₀ A (rs442767) A ₋₃₁₇ G (rs408626) 19 bpindel ** on intron 1 (rs70991108)	C ₋₁₆₁₀ , A ₋₆₈₀ and G ₋₃₁₇ alleles cause a decrease in enzyme levels. DHFR _{19bpindel} Del allele augments enzyme levels.	(7, 12, 13, 14)
Thymidylate synthetase (TYMS)	Is inhibited by MTX-PGs, causing the blockage of <i>de novo</i> DNA synthesis	28 nucleotide CNV*** (rs34743033) of 2 (2R) or 3 (3R) repeats	3R allele increases enzyme level	(9, 15, 16)
Solute carrier organic anion transporter family member 1B1 (SLCO1B1)	Mediates uptake of MTX from blood into hepatocytes	T ₅₂₁ C (rs 4149056)	Affects transport function and drug clearance	(17, 18, 19, 20)

Table 1. Gene polymorphisms included in this work. Their interaction with MTX, most studied polymorphisms, their effect and previous studies references.

*MTX-PGS: active methotrexate polyglutamate metabolite

** Indel: insertion/deletion

*** CNV: copy number variation

Primer Name	Primer Sequence (5'-3')	Annealing Temp (°C)	Mg Cl ₂ (mM)	DMSO 5%	Analysis Method
SLC19A1F SLC19A1R	CAGCGTCACCTTCGTCCCCTCC CAGGAGGTAGGGGGTGATGAAG	54	1	+	PCR-RFLP RE: HhaI
DHFR _{19bpIndel} F DHFR _{19bpIndel} R	ATGGGACCCAAACGGGCGCA AAAGGGGAATCCAGTCGGGC	55	1	-	Real Time - HRM
DHFR ₁₆₁₀ CF DHFR ₁₆₁₀ CR DHFR ₁₆₁₀ GF DHFR ₁₆₁₀ GR DHFR ₁₆₁₀ TF DHFR ₁₆₁₀ TR	AGGAACAAAAGGGACCTTTCT AATTCTCCAGAGGGCAGAAGAAG AAGGAGAAAGTTGGGAGAAC AATTCTCCAGAGGGCAGAAGATC GGTCTATCACTGCCTACCTT AATTCTCCAGAGGGCAGAAGACT	55	1,5	-	AS-PCR
DHFR ₆₈₀ CF DHFR ₆₈₀ CR DHFR ₆₈₀ AF DHFR ₆₈₀ AR	CTTCAATGCCCTTCCACATC CAGAGATACTGCCACAGGAA CTTCAATGCCCTTCCACATA GATGTGACTAATCATGGAGTCC	55	1,5	+	AS-PCR
DHFR ₃₁₇ AF DHFR ₃₁₇ AR DHFR ₃₁₇ GF DHFR ₃₁₇ GR	ATTGAGCCATGCTGTTGCAG CCTTGGTGGTCGAAGAGCT CCACCCAACTGTATTTCAGAC CCTTGGTGGTCGAAGAGCC	WT: 58 M: 52	1,5	+	AS-PCR
MTHFR ₆₇₇ F MTHFR ₆₇₇ R	TGAGCCCAGCCACTCACTG GTCGGTGCATGCCTTCAC	60	1,5	-	PCR-RFLP RE: HinfI
MTHFR ₁₂₉₈ F MTHFR ₁₂₉₈ R	AGAGCAAGTCCCCCAAGGA CTTTGTGACCATTCCGGTTTG	55	1,5	-	PCR-RFLP RE: MboII
TYMS _{indel} F TYMS _{indel} R	CGGGTTTCCTAAGACTCTCAGC AGCGGAGGATGTGTTGGATCTG	53	1,5	+	PCR
SLCO1B1TF SLCO1B1TR SLCO1B1CF SLCO1B1CR	TGGACTAATACACCATATTG AGCATATTACCCATGAAGA GGTCATACATGTGGATATATGC CAAAGGGAAAGTGATCATA	50	1,0 1,5	-	AS-PCR

Table 2. Details of genotyping methods for each genetic polymorphism studied.

DMSO: Dimethyl sulfoxide added (+) or not (-). PCR: polymerase chain reaction. AS-PCR: allele specific PCR. PCR conditions were an initial denaturation of 3 min at 95°C, 30 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at annealing temperature, 30 sec at 72°C, with a final extension of 5 min at 72°C. RFLP: restriction fragment length polymorphism. Enzyme digestion was performed at 37°C for 3 h with 0,001 U of restriction enzyme (RE). PCR and digestion products were analyzed on 6% polyacrylamide gels. HRM: high resolution melting.

	Remission	Ca ⁺⁺² folinate dose augment	Hematologic Toxicity * ¹	GI Toxicity * ²	Liver Toxicity * ³	Kidney Toxicity * ⁴	Mucositis	MTX dose modification
Yes	20 (48,8%)	31 (75,6%)	26 (63,4%)	13 (31,7%)	16 (39%)	8 (19,5%)	7 (17,1%)	7 (17,1%)
No	21 (51,2%)	10 (24,4%)	15 (36,6%)	28 (68,3%)	25 (61%)	33 (80,5%)	34 (82,9%)	34 (82,9%)

Table 3. Patient Clinical Data

*¹ Hemoglobin, leucocytes, neutrophils and thrombocytes; *² Nausea, vomiting, lack of appetite and oral ulcerations; *³ Hepatic enzyme levels; *⁴ BUN and serum creatinine.

Genetic Variants	Genotype Distribution			Allele Frequency		HW analysis (p value)
	Homozygous Wild Type	Homozygous Mutant	Heterozygous	Wild Type Allele	Mutant Allele	
SLC19A1 G ₈₀ A	26,8	26,8	46,4	0,50	0,50	0,64
DHFR 19 bpIndel*	29,3	24,4	46,3	0,52	0,48	0,65
DHFR C ⁻¹⁶¹⁰ G/T**	58,5	12,2	29,3	0,73	0,27	0,10
DHFR C ⁻⁶⁸⁰ A	34,1	39,0	26,9	0,48	0,52	0,00
DHFR A ⁻³¹⁷ G	41,5	29,25	29,25	0,56	0,44	0,01
MTHFR C ₆₇₇ T	53,7	7,3	39,0	0,73	0,27	0,97
MTHFR A ₁₂₉₈ C	41,5	7,3	51,2	0,67	0,33	0,31
TYMS 28 bp CNV*	19,5	21,9	58,6	0,49	0,51	0,27
SLO1B1 T ₅₂₁ C	29,3	31,7	39,0	0,49	0,51	0,16

Table 4. Genotype distribution, allele frequency and HW analysis results.

DHFR_{19bpIndel}Del and TYMS_{28bpCNV} 3R were taken as mutant alleles. Both DHFR⁻¹⁶¹⁰GG and DHFR⁻¹⁶¹⁰TT genotypes were counted as homozygous mutants, while DHFR⁻¹⁶¹⁰CG and DHFR⁻¹⁶¹⁰CT genotypes as heterozygous.

Hematologic toxicity	p value	OR (95% CI)
MTHFR ₆₇₇ CC genotype	0,026	4,500 (1,156-17,510)
MTHFR ₆₇₇ CT genotype	0,006	0,150 (0,037-0,614)
Recessive Model		
MTHFR ₆₇₇ T allele	0,047	0,265 (0,69-1,015)
DHFR ₋₁₆₁₀ G/T alleles	0.005	0,132 (0,029-0,594)
Liver toxicity	p value	OR (95% CI)
DHFR ₋₆₈₀ CC genotype	0,017	5,143 (1,279-20,677)
DHFR ₋₆₈₀ CA genotype	0,017	0,100 (0,011-0,882)
Recessive Model		
DHFR ₋₆₈₀ A allele	0,017	0,194 (0,048-0,782)
GI toxicity	p value	OR (95% CI)
MTHFR ₆₇₇ TT genotype	0,033	NA
MTHFR ₆₇₇ CT genotype	0,034	5,5
DHFR _{19bpIndel} DelDel genotype	0,018	5,367 (1,249-23,051)
DHFR ₋₃₁₇ GG genotype	0,018	5,367 (1,249-23,051)
Dominant Model		
MTHFR ₆₇₇ C allele	0,008	4,5
DHFR _{19bpIndel} Ins allele	0,018	0,186 (0,043-0,8)
DHFR ₋₃₁₇ A allele	0,018	0,186 (0,043-0,8)
MTX dose modification	p value	OR (95% CI)
SLCO19A1 ₈₀ GG genotype	0,047	5,143 (0,928-28,50)
Recessive Model		
SLCO19A1 ₈₀ A allele	0,047	0,194 (0,035-1,078)

Table 5. Univariate analysis. Significant associations, their OR and CI.

OR: Odds Ratio; CI: Confidence interval; NA: Not applicable when OR=Infinity.

APENDICE 3

METHOTREXATE PHARMACOGENOMICS

Giletti A. & Esperón P.

Abstract

Methotrexate (MTX) is a structural analog of folic acid used effectively in the treatment of different cancers and autoimmune diseases. However, pharmacokinetics and pharmacodynamics parameters show an interpatient variability regardless of the disease or protocols, leading to a variable treatment efficacy and toxicity. In particular, MTX induced toxicity is a matter of concern and can be the cause of dose reduction or treatment discontinuation.

To date, many studies have been carried out to overcome these limitations. This review aims to focus on gene polymorphisms involved in MTX pathway following each step since administration until excretion, providing an update on MTX pharmacogenomics biomarkers.

To reach our purpose, a systemic search was conducted in PubMed, until June 2016, using terms: methotrexate, pharmacogenomics, pharmacogenetics, polymorphisms, toxicity, efficacy and response.

Keywords: methotrexate, pharmacogenomics, polymorphisms, toxicity, efficacy.

Introduction

Methotrexate (MTX, 2,4-diamino-N10-methyl propyl-glutamic acid), used for the first time in 1948 in antifolate therapy for pediatric acute leukemia, is a structural analog of folic acid¹⁰⁸.

MTX has played a crucial role in the treatment of severe systemic and central nervous system lymphomas, osteosarcoma and leukemia, as well as in breast, colorectal and head and neck cancer. Besides, it is currently the most widely used disease modifying antirheumatic drug for rheumatoid arthritis (RA) and psoriatic arthritis, as well as for other immune-mediated conditions such as severe psoriasis, multiple sclerosis, Crohn's disease, Wegener's granulomatosis, dermatomyositis and suppresses graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow and organ transplantation^{109, 110, 111}.

MTX acts as a competitive inhibitor of some folate-dependent enzymes affecting biochemical reactions of great importance in cell proliferation such as thymidine nucleotide, purines and protein synthesis ultimately leading to cell death. Cancer or inflammatory tissues, undergoing rapid cellular turnover with a high fraction of the cells in S and G1 phase are the most susceptible to the drug's cytotoxic effects^{112, 113}.

Variable response and toxicity to treatment is a matter of concern and can be the cause of dose reduction or treatment discontinuation, regardless of the disease and dose^{114, 115, 116, 117ref 4 Abolmaali}. The primary toxicities affect the bone marrow (hematological toxicity) and gastrointestinal epithelium (GI toxicity) and correct within 10-14 days, putting patients at risk for spontaneous hemorrhage or life threatening infection during that period. Sustained hematological toxicity may occur in patients with impaired renal function who have delayed

excretion of MTX. These toxicities as well as additional ones are indicated in Table 1 (Ref 7 Chan118).

Table 1. List of MTX toxicities and symptoms.	
Toxicity	Adverse Event
Hematological	Thrombocytopenia and leukoneutropenia
Gastrointestinal	Oral mucositis, abdominal pain, vomiting and diarrhea
Hepatic	Fibrosis and cirrhosis
Central nervous system	Leukoencephalopathy, headache, nausea, vomiting, aseptic meningitis, paraplegia, cerebellar dysfunction and seizure after intrathecal administration
Skin	Alopecia, dermatitis, burning sensation of the skin, photosensitivity, acral erythema, multiform erythema, urticaria and vasculitis
Renal	Acute renal failure due to acute tubular necrosis, <2% frequency after high doses regardless of preventive measures

In recent years, different approaches had been carried out to overcome these therapeutic limitations focusing on MTX mechanism of action, pharmacogenomics, designing novel drug delivery systems in the body or even searching for more effective antifolate drugs^{119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126} (ref 4 Abolmaali).

This review aims to provide an update of MTX pharmacogenomics considering main genetic variants of proteins involved since its administration until excretion and their clinical impact, irrespectively of the disease model.

Pathway after oral administration and important genetic variants

MTX can be administered orally, in low doses during prolonged periods of time, in the treatment of RA (up to 25 mg per week), severe psoriasis and psoriatic arthritis (2,5 mg for 5 days with 2 days rest) as well as in maintenance chemotherapy (eg. 20 mg/m² weekly in acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment) (ref 4 Abolmaali¹²⁷).

After oral administration, MTX is actively transported from the intestinal lumen into the enterocytes almost exclusively through the reduced folate carrier1 (SLC19A1 or RFC1). It's rapidly absorbed when given in low doses but less after higher doses, given the saturable capacity of the intestinal active transporter. When SLC19A1 is saturated, MTX could also be transported through folate receptor alpha (FOLR1), solute carrier organic anion transporter 1A2 (SLCO1A2) and proton-coupled folate transporter (SLC46A1, HCP1, PCFT)^{128, 129, 130, 131, 132} (Figure 1).

The importance of transport in drug sensitivity is illustrated by the findings that hyperdiploid subtype of acute lymphoblastic leukemia cells has extreme sensitivity to MTX given that SLC19A1 gene is highly expressed in them^{133, 134}.

The most common SLC19A1 single nucleotide polymorphism (SNP), G80A (rs1051266), has been reported to alter the affinity of the transporter. Its effects on treatment efficacy and toxicity are summarized in Table 2.

Otherwise, ATP-binding cassette (ABC) efflux transporters: ABCC2, ABCB1, and ABCG2, flow MTX out of the enterocytes and back to the intestinal tract. While ABCC1 and ABCC3 transporters can efflux it to the blood stream¹³⁵, Ref 13 Lima (Figure 1).

Genetic variants on ABCC2 and ABCB1 transporters are involved in toxicity and efficacy and are summarized in Tables 3 and 4, respectively. The rest of the influx and efflux transporters previously mentioned do not have genetic variants related with MTX toxicity or efficacy.

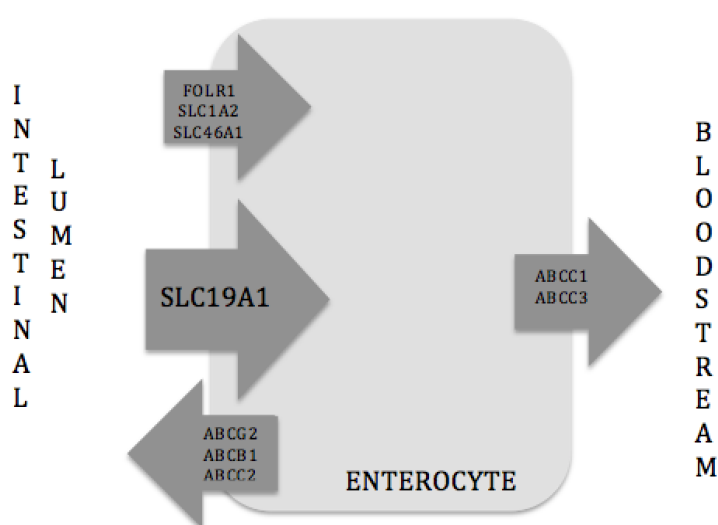


Figure 1. MTX influx and efflux transporters in the enterocytes.
SLC19A1 arrow width indicates MTX is transported almost exclusively through it.

Table 2. Relationship of SLC19A1 G80A with treatment toxicity and efficacy.			
Toxicity	Efficacy	Number of patients or meta-analysis / Disease model	Ref.
NS	NS	327 RA patients	13
AA genotype: ↑ hepatic toxicity and alopecia	NS	273 RA patients	13
NS	GG genotype: ↑ survival ↓ metastasis	62 adult osteosarcoma patients	13
NS	AA genotype:	Meta-analysis RA	13

	↑ efficacy		
G allele: ↑ GI toxicity	Not analyzed	233 RA patients	14, 141
GG genotype: ↑ GI toxicity	NS	159 RA patients	14
NS	NS	Meta-analysis pediatric ALL	14
NS	-	151 pediatric ALL patients	14
NS	NS	55 RA patients	14
NS	NS	124 RA patients	14
GG genotype: ↓ leucopenia	NS	64 pediatric ALL and ML patients	14
GG genotype: ↑ liver toxicity AA genotype: ↑ bone marrow toxicity	AA genotype: ↑ remission	500 pediatric ALL patients	14
Not analyzed	NS	281 RA patients	14
A allele: ↑ overall toxicity	A allele: ↑ treatment discontinuation	203 Psoriasis patients	15
A allele: ↑ GI toxicity	Not analyzed	240 pediatric ALL patients	15
NS	AA genotype: ↑ efficacy	174 RA patients	15
NS	Not analyzed	76 pediatric ALL patients	15

↑: increases; ↓: decrease; NS: Not statistically significant; GI: gastrointestinal; RA: Rheumatoid arthritis; ALL: acute lymphoblastic leukemia; ML: malignant lymphoma.

Table 3. Relationship of ABCC2 genetic variants with treatment toxicity and efficacy.				
Genetic Variants	Toxicity	Efficacy	Number of patients / Disease model	Ref.
rs717620	Not analyzed	T allele: ↓ clearance	127 pediatric ALL patients	154
rs717620	NS	NS	65 pediatric ALL patients	155
rs2273697	A allele: ↑ GI toxicity			
rs3740066	T allele: ↓ hepatic toxicity			
rs717620	Not analyzed	T allele: ↓ clearance	50 adult ML patients	156
rs3740066				
rs2273697				

rs81877 10				
rs81876 94				
rs37400 65	C allele: ↑ overall toxicity	Not analyzed	151 pediatric patients	40 lopezlozop ez
rs37400 66	NS			
rs71762 0				
rs12826				
rs22736 97	A allele: ↑ GI	Not analyzed	222 RA patients	157
rs70806 81	A allele: ↑ hepatic toxicity			
rs71762 0	Not analyzed	T allele: ↓ clearance	44 pediatric ALL patients	158

↑: increases; ↓: decrease; NS: Not statistically significant; GI: gastrointestinal; RA: Rheumatoid arthritis; ALL: acute lymphoblastic leukemia; ML: malignant lymphoma.

Table 4. Relationship of ABCB1 genetic variants with treatment toxicity and efficacy.				
Variant	Toxicity	Efficacy	Number of patients / Disease model	Ref.
rs102649 9	NS	T allele: ↓ survival	194 RA patients	159
rs868755	TT genotype: ↑ Overall toxicity	T allele: ↓ survival		
rs102806 23		NS		
rs185892 3	G allele: ↑ Overall toxicity			
rs104564 2	T allele: neutropenia	NS	127 pediatric ALL patients	160, 46 Zgheib
rs112850 3				
rs104564 2	NS	TT genotype: ↓ responders	124 RA patients	39 Takatori
rs104564 2	Not analyzed	TT genotype: ↓ disease activity score	55 RA patients	41 Kato
rs203258 2		G allele: ↑ disease activity score		
rs112850 3	T allele: ↑ Overall toxicity	Not analyzed	222 RA patients	49 Rangathan

↑: increases; ↓: decrease; NS: Not statistically significant; RA: Rheumatoid arthritis; ALL: acute lymphoblastic leukemia.

Once the drug reaches the blood, SLC19A1, SLCO1B1 and SLCO1B3 transporters are involved in hepatic uptake¹⁶¹. MTX does not suffer any kind of modification inside the hepatocyte. A large portion will pass through, to enter the general blood stream via ABCC3 and ABCC4 transporters in the basolateral membrane of the hepatocyte. The influence of genetic variants in these transporters, on MTX toxicity and/or efficacy are shown in Tables 5 and 6.

The rest will be excreted into the bile duct by ABCG2, ABCB1 and ABCC2 transporters^{162, 163, 13 Lima} (Figure 2).

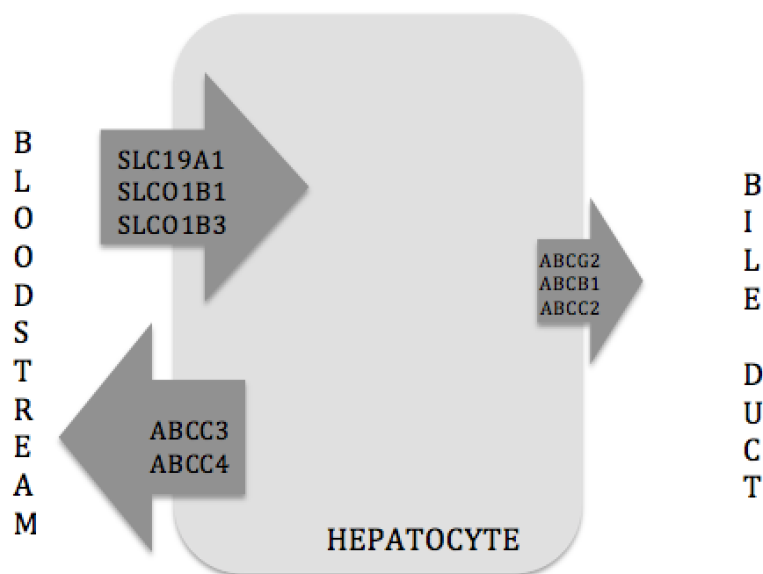


Figure 2. MTX influx and efflux transporters in the liver cells. Arrow width is proportional to amount of MTX transported.

Table 5. Relationship of SLCO1B1 genetic variants with treatment toxicity and efficacy.				
Genetic Variants	Toxicity	Efficacy	Number of patients / Disease model	R ef.
rs414908 1	Not analyzed	AA genotype: ↑ MTX plasma concentration	280 pediatric ALL patients	¹⁶⁴
rs110458 79		CC genotype: ↑ MTX plasma concentration		
rs110458 79	CC genotype: ↑ overall toxicity	CC genotype: ↑ clearance	80 RA patients	¹⁶⁵
rs414905 6	Not analyzed	C allele: ↓ clearance	115 Pediatric ALL patients	¹⁶⁶
rs414905 6	Not analyzed	C allele: ↓ clearance	434 Pediatric ALL patients	¹⁶⁷
rs230628 3	Not analyzed	A allele: ↓ clearance	1279 pediatric ALL patients	¹⁶⁸
rs110458		G allele: ↑		

72		clearance		
rs414905		C allele: ↓		
6		clearance		
rs414905	C allele: ↑	C allele: ↓	499 pediatric ALL	169
6	overall toxicity	clearance	patients	
Rs23062	Not analyzed	G allele: ↑	699 pediatric ALL	170
83		clearance	patients	

↑: increases; ↓: decrease; RA: Rheumatoid arthritis; ALL: acute lymphoblastic leukemia.

Table 6. Relationship of ABCC4 genetic variants with treatment toxicity.			
Variant	Toxicity	Number of patients / Disease model	R ef.
rs951651	T allele: ↑ overall toxicity,	151 pediatric ALL patients	3 7 lopez lopez
9	↑ MTX plasma levels		
rs261931	C allele: ↑ renal toxicity		
2			
rs167839	A allele: ↑ renal toxicity		
2			
rs731711	NS	134 pediatric ALL patients	171
2			
rs930206			
1			
rs102199			
13			
rs731711	AA genotype: ↑		
2	mucositis		

↑: increases; ↓: decrease; NS: Not statistically significant; ALL: acute lymphoblastic leukemia.

Bloodstream to target cells pathway and important genetic variants:

MTX is administered as intravenous infusion in high doses during short time, throughout cancer treatment (up to 12 g/m²) (ref 6 y 21).

MTX will enter cells mainly by SLC19A1. Once in the cytoplasm, it is converted to its active polyglutamates form (MTX-PGs) by folylpolyglutamatesynthetase (FPGS), which adds glutamyl residues to MTX. MTX-PGs are strongly charged and crosses cellular membranes poorly, remaining in the cell for a long time (Ref Goodman).

See Table 7 for FPGS genetic variants relationship with treatment toxicity and efficacy.

Both MTX and MTX-PGs competitively inhibit the dihydrofolatereductase enzyme (DHFR), which reduces dihydrofolate (FH₂ o DHF) to tetrahydrofolate (FH₄ o THF), and both MTXPGs and FH₂ inhibit thymidylate synthase (TYMS) enzyme, responsible for converting deoxyuridine monophosphate (dUMP) into deoxythymidine monophosphate (dTMP) (ref 3 Neradil 172). The inhibition of DHFR and TYMS leads to impaired FH₄ and dTMP biosynthesis and allows an accumulation of toxic inhibitory substrate FH₂, which results in the blockage of *de novo* purine and dTMP nucleotidesynthesis, interrupting DNA and RNA synthesis.

The 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) enzyme, indirectly inhibited by MTX, is a catalyst in the folate metabolic pathway. Its byproducts are involved in the remethylation of homocysteine to methionine, which is a precursor for a major DNA methyl donor important for DNA and protein methylation.

The methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, cyclohydrolase and formyltetrahydrofolatesynthetase 1 (MTHFD1) enzyme is responsible for the inter-conversion of 10-CHO-THF into THF, 5,10-CH-THF into 5,10-CH₂-THF and 10-CHO-THF into 5,10-CH-THF. THF, 5,10-CH₂-THF and 5,10-CH-THF are essentials for dTMP and *de novo* purine synthesis. Studies suggest that genetic variant in MTHFD1 gene may only be relevant in combination with other folate-related genetic variants^(ref 5 Gervasini). See Table 8 for MTHFD1 A1958 (rs2236225) relationship with treatment toxicity and efficacy.

Table 7. Relationship of FPGS genetic variants with treatment toxicity and efficacy.				
Genetic Variants	Toxicity	Efficacy	Number of patients / Disease model	Ref
rs10987742	NS	AA genotype: ↓ response	194 RA patients	50 Moy a
rs10106	TT genotype: ↑ Overall toxicity	TT genotype: ↓ response		
rs1544105	Not analyzed	T allele: ↑ Disease free survival, ↑ Overall survival	39 pediatric ALL patients	173
rs4451422		NS		
rs10106	NS	NS	352 RA patients	174
rs10760502				
rs11545078	Not analyzed	NS	281 RA patients	42 shar ma
rs1544105		NS		

↑: increases; ↓: decrease; NS: Not statistically significant; RA: Rheumatoid arthritis; ALL: acute lymphoblastic leukemia.

Table 8. Relationship of MTHFD1 G1958A with treatment toxicity and efficacy.			
Toxicity	Efficacy	Number of patients / Disease model	Ref.
AA genotype: ↑ GI toxicity	AA genotype: ↑ disease activity	200 RA patients	175
NS	A allele: ↓ EFS	201 pediatric ALL patients	176
A allele: ↓ liver toxicity	NS	167 pediatric ALL patients	177
NS	NS	255 RA patients	178

↑: increases; ↓: decrease; NS: Not statistically significant; GI: gastrointestinal; EFS: Event-free Survival; RA: Rheumatoid arthritis; ALL: acute lymphoblastic leukemia.

Most common genetic variations found in **DHFR**, associated with response to treatment, are listed in Table 9. Dulucq et al 2008 observed a haplotype defined by C-1610, A-317 and C-

680 alleles was associated with lower event free survival and higher DHFR mRNA levels (^{ref 67 Dulucq,179}). Elevated DHFR mRNA levels had been associated with treatment resistance in a pediatric ALL population¹⁸⁰.

Table 9. Relationship of DHFR genetic variants with treatment toxicity and efficacy.				
Genetic Variants	Toxicity	Efficacy	Number of patients / Disease model	Re f.
rs1650694 C-1610GT	Not analyzed	C allele: ↓ EFS and ↑ DHFR mRNA levels	277 pediatric ALL patients	¹⁸¹
rs408626 A-317G		A allele: ↓ EFS and ↑ DHFR mRNA levels		
rs408626 A-317G	Not analyzed	GG: ↑ relapse	31 adult ALL patients	¹⁸²
rs442767 C-680A		NS		
rs5030762 and rs34764978 C829T	NS	Not analyzed	105 pediatric ALL patients	¹⁸³
rs1053129	NS	GG genotype: ↑ metastasis	62 adult osteosarcoma patients	ref 25 Jabeen
rs1650723	T allele: ↑ mucositis	NS		
rs1677666	NS	NS		
rs1643650	NS	C allele: ↑ response	124 RA patients	¹⁸⁴
rs70991108 19 bpindel on intron 1	Del allele: ↑ hepatic toxicity	NS	122 adult ALL patients	¹⁸⁵
rs70991108 19 bpindel on intron 1	NS	Not analyzed	141 RA patients	¹⁸⁶
rs1105525	Not analyzed	A allele: ↓ EFS	277 pediatric ALL patients	¹⁸⁷
rs10072026	C allele: ↓ AE	NS	309 RA patients	¹⁸⁸
rs12517451	C allele: ↑ AE			
rs1643657	G allele: ↓ AE			

↑: increases; ↓: decrease; NS: Not statistically significant; AE: Adverse Events; EFS: Event-free Survival; RA: Rheumatoid arthritis; ALL: acute lymphoblastic leukemia.

The most common coding sequence SNPs in the **MTHFR** gene are C677T (rs1801133) and A1298C (rs1801131). SNP C677T reduces enzyme activity when mutant allele is present, being of 30% and 65% for genotypes TT and CT respectively¹⁸⁹. Associations with toxicity and response for C677T are listed in Table 10 and for A1298C in Table 11. Additional SNP studied within the MTHFR gene, non-coding sequence rs17421511 and rs1476413, had been associated with treatment efficacy (^{ref 81 Salazar}).

Table 10. Relationship of MTHFR C677T with treatment toxicity and efficacy.			
Toxicity	Efficacy	Number of patients / Disease model	R ef.
C allele: ↑ degree liver toxicity	NS	62 adult osteosarcoma patients	² 5 Jabeen
TT genotype: ↑ liver and GI toxicity, risk of leukopenia	TT genotype: ↓ overall survival rate	122 adult ALL patients	⁷ 1 Ongaro
TT genotype: ↑ toxicity	Not analyzed	61 adult AL patients	¹⁹⁰
TT genotype: ↑ oral mucositis	Not analyzed	133 adult hematopoietic cells transplant patients	¹⁹¹
TT genotype: ↑ oral mucositis	Not analyzed	220 marrow allografts patients	¹⁹²
T allele: ↑ liver toxicity	Not analyzed	91 adult ALL and NHL patients	¹⁹³
TT genotype: neutropaenia, ↑hepatic and GI toxicities.	TT genotype: unfavorable response, ↑relapse, mortality and shorter survival.	50 adult ALL patients	¹⁹⁴
T allele: ↓ hemoglobin levels.	NS	127 adult ALL patients	¹⁹⁵
T allele: ↑ liver toxicity, adverse events were more frequent	CC genotype: more rapid positive response	273 RA patients	¹⁹⁶
T allele: ↑ toxicity, oral mucositis, liver, GI and skin toxicity. TT genotype: ↑myelosuppression	Not analyzed	Meta analysis adult ALL patients	¹⁹⁷
TT genotype: ↑mucositis and ↓ clearance	NS	64 pediatric ALL and ML patients	³ 9 faganel
TT genotype: ↑ toxicity	Not analyzed	141 RA patients	⁷ 7Chaabane
Not analyzed	NS	200 RA patients	⁷ 7 Stamp
NS	NS	54 adult ML patients	¹⁹⁸
NS	Not analyzed	Meta analysis for pediatric ALL patients	¹⁹⁹
Not analyzed	NS	Meta analysis for RA patients	²⁰⁰
NS	Not analyzed	Meta analysis for pediatric ALL and osteosarcoma patients	²⁰¹
NS	Not analyzed	28 ALL patients	²⁰²

NS	NS	Meta analysis for RA patients	²⁰³
NS	NS	Meta analysis for RA patients	²⁰⁴
NS	NS	167 pediatric ALL patients	⁶ 9 erculj
NS	NS	93 RA patients	²⁰⁵
NS	NS	34 RA patients	²⁰⁶
Not analyzed	T allele: ↑ remission	174 RA patients	²⁰⁷

↑: increases; ↓: decrease;GI: gastrointestinal; NS: Not statistically significant;ALL: acute lymphoblastic leukemia; AL: acuteleukemia; NHL: non-Hodgkin lymphoma;RA: Rheumatoid arthritis;ML: malignant lymphoma.

Table 11. Relationship of MTHFR A1298C with treatment toxicity and efficacy.			
Toxicity	Efficacy	Number of patients / Disease model	Ref.
Not analyzed	NS	Meta analysis for RA patients	²⁰⁸
NS	Not analyzed	Meta analysis for pediatric ALL patients	²⁰⁹
NS	NS	Meta analysis for RA patients	²¹⁰
NS	NS	Meta analysis for RA patients	²¹¹
NS	NS	93 RA patients	⁹⁵ kumagai
NS	Not analyzed	141 RA patients	⁷⁷ Chaabane
NS	NS	34 RA patients	⁹⁸ ghodke
NS	NS	167 pediatric ALL patients	⁶⁹ erculj
Not analyzed	C allele: ↑ remission	174 RA patients	²¹²
C allele:↓ skin toxicity	Not analyzed	Meta analysis adult ALL patients	²¹³
C allele:↑ liver toxicity	Not analyzed	70 RA patients	²¹⁴
CC genotype: ↓ leucopenia	NS	64 pediatric ALL and ML patients	³⁹ faganel
NS	C allele:↓ EFS	499 pediatric ALL patients	⁶¹ radtk
CC genotype: ↓ myelosuppression	Not analyzed	76 pediatric ALL patients	⁴⁵ pakakasama

↑: increases; ↓: decrease; NS: Not statistically significant;ALL: acute lymphoblastic leukemia;RA: Rheumatoid arthritis.

In the 5'untranslated region of the TYMS gene is located a 28bp tandem repeat (rs34743033), most common variations are double and triple repeats (2R and 3R), which affectTYMS gene expression levels²¹⁵. It acts as an enhancer, as the number of repeats

increases, mRNA expression and enzymatic activity increases (^{ref 84 Hourie}). Intracellular levels of TYMS modulate the response and toxicity of MTX (^{Ref Pui 2004}). Associations of this polymorphism with toxicity and response are listed in Table 12. The haplotype formed by MTHFR C677T T allele and A1298C A allele has been associated with reduction of event free survival alone and in conjunction with TYMS 28bp tandem repeat 3R allele (^{ref 68 Krajinovic}).

TYMS expression is regulated by enolase superfamily member 1 (ENOSF1) at both post-transcriptional and post-translational levels, findings show that TYMS and ENOSF1 are genes in opposite directions and with an overlap at their 3'untranslated regions ^{216,217}. In this region there is a 6 bp deletion (rs34489327/151264360/48297568) that alters TYMS mRNA stability. Carriers of the deletion had shown a poorer response to MTX treatment than those without it (^{218 105 Senepati, 42 campalani}).

Table 12. Relationship of TYMS5'UTR 28bp tandem repeats with treatment toxicity and efficacy.			
Toxicity	Efficacy	Number of patients / Disease model	Ref.
NS	3R: ↑ MTX dose	93 RA patients	95 kumagai
NS	3R3R genotype: ↓ response	233 RA patients	106 lima
3R allele: neutropenia	3R allele: ↓ MTX dose	127 pediatric ALL patients	85 zgheib
3R allele: anemia	NS	122 adult ALL patients	75 ongaro
NS	3R3R genotype: ↓ response	184 RA patients	219
NS	3R allele: ↓ clinical outcome	203 psoriasis patients	42 campalani
NS	NS	255 RA patients	69 dervieux
3R3R genotype: ↓ thrombocytopenia and mucositis	Not analyzed	64 pediatric ALL and ML patients	39 faganel
3R allele: ↓ stomatitis	NS	499 pediatric ALL patients	61 radtke
2R allele: ↓ overall toxicity	Not analyzed	141 RA patients	77 Chaabane
3R allele: ↓ thrombocytopenia and leukocytopenia	NS	167 pediatric ALL patients	69 erculj
NS	NS	34 RA patients	98 ghodke
NS	Not analyzed	76 pediatric ALL patients	45 pakakasama
NS	NS	124 RA patients	39 takatori

MTXPGs further inhibit key enzymes such as phosphoribosylglycinamideformyltransferase, phosphoribosylglycinamidesynthetase, phosphoribosylaminoimidazolesynthetase and

aminoimidazolecarboxamideribonucleotide (AICAR) transformylase in the de novo purine synthesis pathway²²⁰. MTXPG inhibition results in decreased protein and DNA methylation in addition to impaired DNA formation and repair. AICAR transformylase has been proposed as the potential target of MTX in RA, given that its inhibition accumulates AICAR and its metabolites, which are inhibitors of adenosine and AMP deaminase, therefore increasing adenosine levels. Adenosine release induces immunoregulation and anti-inflammatory effects (ref 7 Chan)²²¹.

Several SNPs in **AICAR**rs 12995526, rs 3821353, rs 7563206 and rs 16853834 gene were associated with MTX efficacy; while rs 16853826 and rs 10197559 were associated with toxicity (Ref 73 Owen, 81 Salazar).

MTXPG levels are sustained inside the cells for a longer time than those of MTX; degradation of MTXPGs to MTX, for its posterior efflux from the cell, depends on the activity of the lysosomal enzyme γ -glutamyl hydrolase (GGH), which catalyzes the removal of polyglutamates. MTXPGs have been investigated in relation to clinical outcomes in rheumatoid arthritis (RA) and juvenile idiopathic arthritis (JIA).

SNPs G-354T (rs 719235), C-401T (rs 3758149) and C452T (rs 11545078) in the **GGH** gene have been studied. C452T T allele was associated with mucositis, hepatic and hematological toxicity; while G-354T GG genotype was associated with hematological toxicity and T allele with better survival (ref 86 Jekic)^{222, 223}. For C-401T findings show that T allele was associated with higher MTX serum levels, hematological toxicity as well as fewer adverse events and TT genotype with MTXPGs levels below median (ref 65 Koomdee, ref 81 Swierkot, ref 88 Dervieux)^{224, 225}.

Excretion and important genetic variants: Kidneys

Approximately 80% to 90% of the administered dose is excreted unchanged in the urine within 48 hours, most within the first 8-12 hours, resulting in short plasma half-life (ref 6 Bleyer). Renal transporter proteins responsible for influx are SLC22A6, SLC22A8 and SLC19A1, where as ABCG2, ABCB1, ABCC2 and ABCC4 are in charge of efflux (Figure 3 and Tables 2, 3, 4 and 6)^{Ref 13 Lima}.

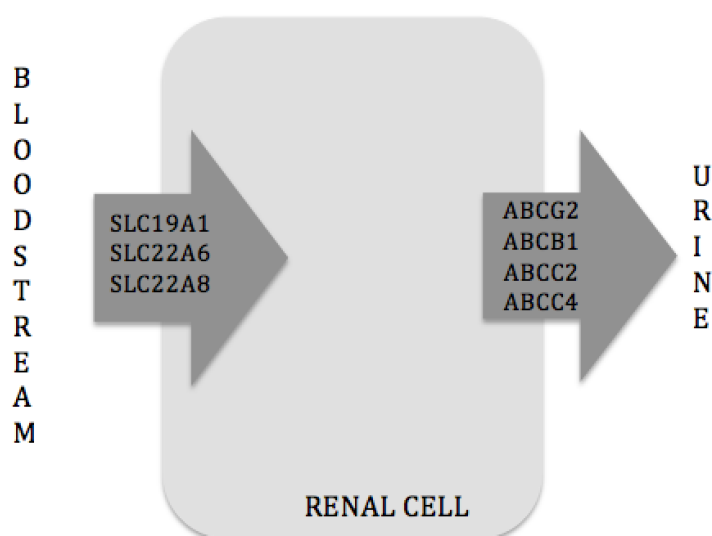


Figure 3. MTX influx and efflux transporters in the renal cells.

Concluding remarks and future prospects

In summary, after a thorough review considering different diseases models, the most relevant genetic variants affecting MTX treatment toxicity and efficacy common to all administration pathways were: SLC19A1 G₈₀A; ABCC2 C₋₂₄T; SLCO1B1 T₅₂₁C; DHFR C₋₁₆₁₀GT, C₋₆₈₀A, A₋₃₁₇G and 19 bp indel in intron 1; MTHFR C₆₇₇T and TYMS28 bp tandem repeat.

To date, there is no knowledge of genetic variants that affect exclusively the intrathecal administration pathway, causing inter-individual variations at a neurological level.

To characterize the response, the combined effect of variations in multiple genes should be further studied, as well as the effect of multiple variations in a single gene (as seen with DHFR haplotype) which enhance the effect of individual SNPs (ref 61 Dulucq). In order to create an algorithm which decrease treatment toxicity and increase efficacy.

Despite the information currently available, from MTX pharmacogenetics studies, no genetic variant has yet been evaluated as a predictor of treatment response in clinical trials.

References

- ¹⁰⁸Farber, S., Diamond, L. K., Mercer, R. D., Sylvester Jr, R. F., & Wolff, J. A. (1948). Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). *New England Journal of Medicine*, 238(23), 787-793.
- ¹⁰⁹DeVita, V. T., Lawrence, T. S., & Rosenberg, S. A. (Eds.). (2010). Cancer: principles and practice of oncology-advances in oncology (Vol. 1). Lippincott Williams & Wilkins.
- ¹¹⁰Gervasini G. Polymorphisms in Methotrexate Pathways: What is Clinically Relevant, What is Not, and What is Promising. *Current Drug Metabolism* 2009; 10 (7).
- ¹¹¹Abolmaali S. S., Tamaddon A. M. & Dinarvand R. 2013. A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. *Cancer Chemother Pharmacol* 71:1115–1130.
- ¹¹²Bleyer, W. A. (1978). The clinical pharmacology of methotrexate. *Cancer*, 41(1), 36-51.
- ¹¹³Chan E. S. L. & Cronstein B. N. Mechanisms of Action of Methotrexate. *Bulletin of the Hospital for Joint Diseases* 2013; 71 (Suppl 1): S5-8.
- ¹¹⁴Buitenkamp, T. D., Mathôt, R. A., de Haas, V., Pieters, R., & Zwaan, C. M. (2010). Methotrexate-induced side effects are not due to differences in pharmacokinetics in children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 95(7), 1106-1113.
- ¹¹⁵Tetef ML, Margolin KA, Doroshow JH, Akman S, Leong LA, Morgan RJ Jr, Raschko JW, Slatkin N, Somlo G, Longmate JA, Carroll MI, Newman EM. Pharmacokinetics and toxicity of high-dose intravenous methotrexate in the treatment of leptomeningeal carcinomatosis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2000;46(1):19-26.
- ¹¹⁶Pui C-H, Relling MV, Evans WE. Role of pharmacogenomics and pharmacodynamics in the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003;15:741-56.
- ¹¹⁷Evans, W. E., Relling, M. V., Rodman, J. H., Crom, W. R., Boyett, J. M., & Pui, C. H. (1998). Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 338(8), 499-505.
- ¹¹⁸Gaies, E., Jebabli, N., Trabelsi, S., Salouage, I., Charfi, R., Lakhal, M., & Klouz, A. (2013). Methotrexate side effects: review article. *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*, 2012.
- ¹¹⁹Mikkelsen, T. S., Thorn, C. F., Yang, J. J., Ulrich, C. M., French, D., Zaza, G., ... & Becker, M. L. (2011). PharmGKB summary: methotrexate pathway. *Pharmacogenetics and genomics*, 21(10), 679.

- ¹²⁰Chen, Y., &Shen, Z. (2015). Gene polymorphisms in the folate metabolism and their association with MTX-related adverse events in the treatment of ALL.*Tumor Biology*, 36(7), 4913-4921.
- ¹²¹Chan, E. S., &Cronstein, B. N. (2013). Mechanisms of action of methotrexate.*BullHospJt Dis*, 71(Suppl 1), S5-S8.
- ¹²²Restrepo, L. F., Giraldo, R., Londoño, J., Pinzón, C., Cortes, A., Ballesteros, G., & Santos, A. M. (2016). Farmacogenética del metotrexato en artritis reumatoide. Revisión sistemática. *Revista Colombiana de Reumatología*.
- ¹²³Plumpton, C. O., Roberts, D., Pirmohamed, M., & Hughes, D. A. (2016).A Systematic Review of Economic Evaluations of Pharmacogenetic Testing for Prevention of Adverse Drug Reactions. *Pharmacoeconomics*, 1-23.
- ¹²⁴Hazarika M, White RM, Johnson JR, Pazdur R. FDA drug approval summaries: pemetrexed (Alimta). *Oncologist* 2004; 9:482-8.
- ¹²⁵Cohen MH, Justice R, Pazdur R. Approval summary: pemetrexed in the initial treatment of advanced/ metastatic non-small cell lung cancer. *Oncologist* 2009; 14:930-5.
- ¹²⁶Thompson CA. FDA approves pralatrexate for treatment of rare lymphoma. *Am J Health Syst Pharm* 2009; 66:1890.
- ¹²⁷Kremer, J. M. (2001). Rational use of new and existing disease-modifying agents in rheumatoid arthritis. *Annals of internal medicine*, 134(8), 695-706.
- ¹²⁸Lima, 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.
- ¹²⁹Zhao R & Goldman I D. Folate and Thiamine Transporters mediated by Facilitative Carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and Folate Receptors. *Mol Aspects Med*. 2013; 34(2-3): 373-85.
- ¹³⁰Zhao, R., Qiu, A., Tsai, E., Jansen, M., Akabas, M. H., & Goldman, I. D. (2008). The proton-coupled folate transporter: impact on pemetrexed transport and on antifolates activities compared with the reduced folate carrier. *Molecular pharmacology*, 74(3), 854-862.
- ¹³¹Qiu A., Min S. H., Jansen M., Malhotra U., Tsai E., Cabelof D. C., ...& Goldman I. D. (2007). Rodent intestinal folate transporters (SLC46A1): secondary structure, functional properties, and response to dietary folate restriction. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 293(5), C1669-C1678.
- ¹³²Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*. 2006; 127:917–928.
- ¹³³Kager L., Cheok M., Yang W., Zaza G., Cheng Q., Panetta J. C., ...& Evans, W. E. (2005). Folate pathway gene expression differs in subtypes of acute lymphoblastic leukemia and influences methotrexate pharmacodynamics.*The Journal of clinical investigation*, 115(1), 110-117.
- ¹³⁴Belkov, V. M., Krynetski, E. Y., Schuetz, J. D., Yanishevski, Y., Masson, E., Mathew, S., ...& Evans, W. E. (1999). Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: a mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. *Blood*, 93(5), 1643-1650.
- ¹³⁵Simon N,Marsot A, Villard E, Choquet S, Khe H-X, Zahr N, Lechat P, Leblond V &HulotJ-S. Impact of ABCC2 polymorphisms on high-dose methotrexate pharmacokinetics in patients with lymphoid malignancy.*The Pharmacogenomics Journal* 2013; 13: 507–513.
- ¹³⁶Muralidharan, N., Mariaselvam, C. M., Mithun, C. B., &Negi, V. S. (2016). Reduced folate carrier-1 80G> A gene polymorphism is not associated with methotrexate treatment response in South Indian Tamils with rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology*, 35(4), 879-885.
- ¹³⁷Świerkot, J., Ślęzak, R., Karpiński, P., Pawłowska, J., Noga, L., Szechiński, J., &Wiland, P. (2015).Associations between single-nucleotide polymorphisms of RFC-1, GGH, MTHFR, TYMS,

and TCII genes and the efficacy and toxicity of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Pol Arch Med Wewn*, 125(3), 152-61.

¹³⁸Jabeen, S., Holmboe, L., Alnæs, G. I. G., Andersen, A. M., Hall, K. S., & Kristensen, V. N. (2015). Impact of genetic variants of RFC1, DHFR and MTHFR in osteosarcoma patients treated with high-dose methotrexate. *The pharmacogenomics journal*, 15(5), 385-390.

¹³⁹Kung, T. N., Dennis, J., Ma, Y., Xie, G., Bykerk, V., Pope, J., ... & Gagnon, F. (2014). RFC1 80G> A Is a Genetic Determinant of Methotrexate Efficacy in Rheumatoid Arthritis: A Human Genome Epidemiologic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Arthritis & Rheumatology*, 66(5), 1111-1120.

¹⁴⁰Lima, A., Bernardes, M., Sousa, H., Azevedo, R., Costa, L., Ventura, F., ... & Medeiros, R. (2014). SLC19A1 80G allele as a biomarker of methotrexate-related gastrointestinal toxicity in Portuguese rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*, 15(6), 807-820.

¹⁴¹Lima, A., Bernardes, M., Azevedo, R., Monteiro, J., Sousa, H., Medeiros, R., & Seabra, V. (2014). SLC19A1, SLC46A1 and SLC01B1 polymorphisms as predictors of methotrexate-related toxicity in Portuguese rheumatoid arthritis patients. *Toxicological Sciences*, kfu162.

¹⁴²Samara, S. A., Irshaid, Y. M., & Mustafa, K. N. (2014). Association of MDR1 C3435T and RFC1 G80A polymorphisms with methotrexate toxicity and response in Jordanian rheumatoid arthritis patients. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 52(9), 746-755.

¹⁴³He, H. R., Liu, P., He, G. H., Dong, W. H., Wang, M. Y., Dong, Y. L., & Lu, J. (2014). Association between reduced folate carrier G80A polymorphism and methotrexate toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Leukemia & lymphoma*, 55(12), 2793-2800.

¹⁴⁴Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, Ballesteros J & Garcia-Orad A. Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *The Pharmacogenomics Journal* 2013; 13: 498-506.

¹⁴⁵Kato, T., Hamada, A., Mori, S., & Saito, H. (2012). Genetic polymorphisms in metabolic and cellular transport pathway of methotrexate impact clinical outcome of methotrexate monotherapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 27(2), 192-199.

¹⁴⁶Takatori, R., Takahashi, K. A., Tokunaga, D., Hojo, T., Fujioka, M., Asano, T., ... & Tanaka, T. (2006). ABCB1 C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. *ClinExpRheumatol*, 24(5), 546-54.

¹⁴⁷FaganelKotnik B, Grabnar I, BohanecGrabar P, Dolžan V & Jazbec J. Association of genetic polymorphism in the folate metabolic pathway with methotrexate pharmacokinetics and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia and malignant lymphoma. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2011; 67: 993–1006.

¹⁴⁸Gregers J, Christensen I J, Dalhoff K, Lausen B, Schroeder H, Rosthøj S, Carlsen N, Schmiegelow K & Curt Peterson. The association of reduced folate carrier 80G>A polymorphism to outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia interacts with chromosome 21 copy number. *BLOOD* 2010; 115 (23): 4671-4677.

¹⁴⁹Sharma, S., Das, M., Kumar, A., Marwaha, V., Shankar, S., Aneja, R., ... & Kumar, U. (2008). Interaction of genes from influx-metabolism-efflux pathway and their influence on methotrexate efficacy in rheumatoid arthritis patients among Indians. *Pharmacogenetics and genomics*, 18(12), 1041-1049.

¹⁵⁰Campalani, E., Arenas, M., Marinaki, A. M., Lewis, C. M., Barker, J. N., & Smith, C. H. (2007). Polymorphisms in folate, pyrimidine, and purine metabolism are associated with efficacy and toxicity of methotrexate in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(8), 1860-1867.

¹⁵¹Kishi, S., Cheng, C., French, D., Pei, D., Das, S., Cook, E. H., ... & Pui, C. H. (2007). Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood*, 109(10), 4151-4157.

- ¹⁵²Drozdik, M., Rudas, T., Pawlik, A., Gornik, W., Kurzawski, M., & Herczynska, M. (2007). Reduced folate carrier-1 80G> A polymorphism affects methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *The pharmacogenomics journal*, 7(6), 404-407.
- ¹⁵³Pakakasama S, Kanchanakamhaeng K, Kajanachumpol S, Udomsubpayakul U, Sirachainan N, Thithapandha A & Hongeng S. Genetic polymorphisms of folate metabolic enzymes and toxicities of high dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Annals of Hematology* 2007; 86: 609–611.
- ¹⁵⁴Zgheib, N. K., Akra-Ismail, M., Aridi, C., Mahfouz, R., Abboud, M. R., Solh, H., & Muwakkit, S. A. (2014). Genetic polymorphisms in candidate genes predict increased toxicity with methotrexate therapy in Lebanese children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenetics and genomics*, 24(8), 387-396.
- ¹⁵⁵Sharifi, M. J., Bahoush, G., Zaker, F., Ansari, S., Rafsanjani, K. A., & Sharafi, H. (2014). Association of 24CT, 1249GA, and 3972CT ABCC2 gene polymorphisms with methotrexate serum levels and toxic side effects in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric hematology and oncology*, 31(2), 169-177.
- ¹⁵⁶Simon, N., Marsot, A., Villard, E., Choquet, S., Khe, H. X., Zahr, N., ... & Hulot, J. S. (2013). Impact of ABCC2 polymorphisms on high-dose methotrexate pharmacokinetics in patients with lymphoid malignancy. *The pharmacogenomics journal*, 13(6), 507-513.
- ¹⁵⁷Ranganathan P, Culverhouse R, Marsh S, Mody A, Scott-Horton T J, Brasington R, Joseph A, Reddy V, Eisen S & McLeod H. Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* 2008; 35 (4): 572-579.
- ¹⁵⁸Rau, T., Erney, B., Göres, R., Eschenhagen, T., Beck, J., & Langer, T. (2006). High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia: Impact of ABCC2 polymorphisms on plasma concentrations. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 80(5).
- ¹⁵⁹Moya, P., Salazar, J., Arranz, M. J., Díaz-Torné, C., del Río, E., Casademont, J., ... & Baiget, M. (2016). Methotrexate pharmacokinetic genetic variants are associated with outcome in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*, 17(1), 25-9.
- ¹⁶⁰Zgheib, N. K., Akra-Ismail, M., Aridi, C., Mahfouz, R., Saab, R., Abboud, M. R., & Solh, H. (2013). Genetic Polymorphisms In Candidate Genes Predict Increased Toxicity With Methotrexate Therapy In Children With Acute Lymphoblastic Leukemia In Lebanon. *Blood*, 122(21), 4926-4926.
- ¹⁶¹Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, Nomura H, Unno M, Suzuki M, Naitoh T, Matsuno S & Yawo H. Identification of a Novel Gene Family Encoding Human Liver-specific Organic Anion Transporter LST-1. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 17159-17163.
- ¹⁶²Vlaming, M. L. H., Mohrmann, K., Wagenaar, E., de Waart, D. R., Elferink, R. O., Lagas, J. S., ... & Schellens, J. H. (2006). Carcinogen and anticancer drug transport by Mrp2 in vivo: studies using Mrp2 (Abcc2) knockout mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(1), 319-327.
- ¹⁶³Kitamura Y, Hirouchi M, Kusuhara H, Schuetz J D & Sugiyama Y. Increasing systemic exposure of methotrexate by active efflux mediated by multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3/ Abcc3). *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2008; 327 (2): 465-473.
- ¹⁶⁴Li, J., Wang, X. R., Zhai, X. W., Wang, H. S., Qian, X. W., Miao, H., & Zhu, X. H. (2015). Association of SLCO1B1 gene polymorphisms with toxicity response of high dose methotrexate chemotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(4), 6109.
- ¹⁶⁵Payá, X. M., García, J. S., Cid, A. R., Catalá, J. C., Cervellera, M. I. G. C., & Fernández, C. C. (2015). Marcadores genéticos de eficacia y toxicidad a metotrexato en una población española con artritis reumatoide. *Revista de la SVR: Sociedad Valenciana de Reumatología*, 6(2), 2-13.

- ¹⁶⁶ Lopez-Lopez, E., Martin-Guerrero, I., Ballesteros, J., Piñan, M., Garcia-Miguel, P., Navajas, A., & Garcia-Orad, A. (2011). Polymorphisms of the SLCO1B1 gene predict methotrexate-related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric blood & cancer*, 57(4), 612-619.
- ¹⁶⁷ Trevino LR, Shimasaki N, Yang W, Panetta J. C., Cheng C, Pei D, Chan D, Sparreboom A, Giacomini K. M., Pui C, Evans W. E. and Relling M. V. Germ line genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27:5972-5978.
- ¹⁶⁸ Ramsey L. B., Panetta J. C., Smith C, Yang W, Fan Y, Winick N. J., Martin P. L., Cheng C, Devidas M, Pui C., Evans W. E., Hunger S. P., Loh M and Relling M. V. Genome-wide study of methotrexate clearance replicates SLCO1B1. *Blood* 2013; 120 (21): 2466.
- ¹⁶⁹ Radtke S, Zolk O, Renner B, Paulides M, Zimmermann M, Moricke A, Stanulla M, Schrappe M & Langer T. Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2013; 121 (26): 5154-5153.
- ¹⁷⁰ Ramsey L. B., Bruun G. H., Yang W., Treviño L. R., Vattathil S., Scheet P., Cheng C., Rosner G. L., Giacomini K. M., Fan Y., Sparreboom A., Mikkelsen T. S., Corydon T. J., Pui C., Evans W. E. & Relling M. V. Rare versus common variants in pharmacogenetics: SLCO1B1 variation and methotrexate disposition. *Genome Research* 2012; 22:1-8.
- ¹⁷¹ Den Hoed M. A. H., Lopez-Lopez E., TeWinkel M. L., Tissing W., de Rooij J. D. E., Gutierrez-Camino A., ... & De Jonge R. (2015). Genetic and metabolic determinants of methotrexate-induced mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *The pharmacogenomics journal*, 15(3), 248-254.
- ¹⁷² Blakley, R. L., & Sorrentino, B. P. (1998). In vitro mutations in dihydrofolate reductase that confer resistance to methotrexate: potential for clinical application. *Human mutation*, 11(4), 259.
- ¹⁷³ Zaruma-Torres, F., Lares-Asseff, I., Reyes-Espinoza, A., Loera-Castañeda, V., Almanza-Reyes, H., & Arias-Peláez, M. C. (2015). Impacto de polimorfismos genéticos de la vía metabólica del metotrexato sobre la sobrevida de niños mexicanos con leucemia linfoblástica aguda (LLA). *Vitae*, 22(3), 177-187.
- ¹⁷⁴ Van der Straaten, R. J. H. M., Wessels, J. A., de Vries-Bouwstra, J. K., Goekoop-Ruiterman, Y. P., Allaart, C. F., Bogaartz, J., ... & Guchelaar, H. J. (2007). Exploratory analysis of four polymorphisms in human GGH and FPGS genes and their effect in methotrexate-treated rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*, 8(2), 141-150.
- ¹⁷⁵ Stamp, L. K., Chapman, P. T., O'Donnell, J. L., Zhang, M., James, J., Frampton, C., ... & Roberts, R. L. (2010). Polymorphisms within the folate pathway predict folate concentrations but are not associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Pharmacogenetics and genomics*, 20(6), 367-376.
- ¹⁷⁶ Krajcinovic M, Lemieux-Blanchard E, Chiasson S, Primeau M, Costea I, Moghrab A. Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *The Pharmacogenomics Journal* 2004; 4: 66–72.
- ¹⁷⁷ Erčulj, N., Kotnik, B. F., Debeljak, M., Jazbec, J., & Dolžan, V. (2012). Influence of folate pathway polymorphisms on high-dose methotrexate-related toxicity and survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 53(6), 1096-1104.
- ¹⁷⁸ Dervieux, T., Wessels, J. A., van der Straaten, T., Penrod, N., Moore, J. H., Guchelaar, H. J., & Kremer, J. M. (2009). Gene–gene interactions in folate and adenosine biosynthesis pathways affect methotrexate efficacy and tolerability in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics and genomics*, 19(12), 935-944.
- ¹⁷⁹ Moorman A. V. One man's dose, another man's poison. *Blood* 2008; 111: 3303-3304.
- ¹⁸⁰ Matherly, L. H., Taub, J. W., Ravindranath, Y., Proefke, S. A., Wong, S. C., Gimotty, P., ... & Rosowsky, A. (1995). Elevated dihydrofolate reductase and impaired methotrexate

transport as elements in methotrexate resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 85(2), 500-509.

¹⁸¹ Dulucq S., St-Onge G., Gagné V., Ansari M., Sinnett D., Labuda D., Moghrabi A., Krajinovic M. DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood* 2008; 111 (7): 3692-3700.

¹⁸² Biswajit

¹⁸³ Koomdee, N., Hongeng, S., Apibal, S., & Pakakasama, S. (2012). Association between polymorphisms of dihydrofolate reductase and gamma glutamyl hydrolase genes and toxicity of high dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(7), 3461-3464.

¹⁸⁴ 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.

¹⁸⁵ 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.

¹⁸⁶ Chaabane, S., Marzouk, S., Akrou, R., Hamad, M. B., Achour, Y., Rebai, A., ... & Maalej, A. (2015). Genetic determinants of methotrexate toxicity in Tunisian patients with rheumatoid arthritis: a study of polymorphisms involved in the MTX metabolic pathway. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 1-9.

¹⁸⁷ Al-Shakfa F, Dulucq S, Brukner I, Milacic I, Ansari M, Beaulieu P, Moghrabi A, Laverdière C, Sallan SE, Silverman LB, Neuberg D, Kutok JL, Sinnett D, Krajinovic M. DNA variants in region for noncoding interfering transcript of dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Cancer Research* 2009; 15 (22): 6931-8.

¹⁸⁸ Owen, S. A., Hider, S. L., Martin, P., Bruce, I. N., Barton, A., & Thomson, W. (2013). Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients. *The pharmacogenomics journal*, 13(3), 227-234.

¹⁸⁹ 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.

¹⁹⁰ Chiusolo P, Reddicono G, Casorelli I, Laurenti L, Sora F, Mele L, Annino L, Leone G, Sica S. Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate. *Ann Oncol* 2002;13:1915–1918.

¹⁹¹ Robien K, Schubert MM, Bruemmer B, Lloid ME, Potter JD, Ulrich CM. Predictors of oral mucositis in patients receiving hematopoietic stem cell transplants for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 2004;22: 1268–1275.

¹⁹² Ulrich C M, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner J L, Bigler J, Ariail K S, Keener C L, Li S, Liu H, Farin F M & Potter J D. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood* 2001; 98 (1): 231-234.

¹⁹³ Ayad M W, El Naggar A A and El Naggar M. MTHFR C677T polymorphism: association with lymphoid neoplasm and effect on methotrexate therapy. *European Journal of Haematology* 2014; 93: 63-69.

¹⁹⁴ Eissa D S & Ahmed T M. C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: effect on methotrexate-related toxicity in adult acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 2013; 24 (2): 181-188.

¹⁹⁵ Zgheib, N. K., Akra-Ismael, M., Aridi, C., Mahfouz, R., Saab, R., Abboud, M. R., & Solh, H. (2013). Genetic Polymorphisms In Candidate Genes Predict Increased Toxicity With

Methotrexate Therapy In Children With Acute Lymphoblastic Leukemia In Lebanon. *Blood*, 122(21), 4926-4926.

¹⁹⁶Świerkot, J., Ślęzak, R., Karpiński, P., Pawłowska, J., Noga, L., Szechiński, J., & Wiland, P. (2015). Associations between single-nucleotide polymorphisms of RFC-1, GGH, MTHFR, TYMS, and TCII genes and the efficacy and toxicity of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Pol Arch Med Wewn*, 125(3), 152-61.

¹⁹⁷Yang, 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.

¹⁹⁸Chiusolo, P., Giammarco, S., Bellesi, S., Metafuni, E., Piccirillo, N., De Ritis, D., ... & Hohaus, 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.

¹⁹⁹Lopez-Lopez, E., Martin-Guerrero, I., Ballesteros, J., & Garcia-Orad, A. (2013). A systematic review and meta-analysis of MTHFR polymorphisms in methotrexate toxicity prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *The pharmacogenomics journal*, 13(6), 498-506.

²⁰⁰Morgan M D, Al-Shaarawy N, Martin S, Robinson J I, Twigg S, YEAR Consortium, MagdyAA, Omar A S, Ghattas M H, Emery P, Barrett J H & Morgan A W. MTHFR functional genetic variation and methotrexate treatment response in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Pharmacogenomics* 2014; 15 (4): 467-475.

²⁰¹HagleitnerMM, CoenenMJH, AplencR, Patiño-GarcíaA, ChiusoloP, GemmatiD, De MatteiM, OngaroA, KrajcinovicM, HoogerbruggePM, VermeulenSHM & te LooDMWM. The role of the MTHFR 677C4T polymorphism in methotrexate-induced liver toxicity: a meta-analysis in patients with cancer. *The Pharmacogenomics Journal* (2013), 1–5.

²⁰²Ruiz-Arguelles G J, Coconi-Linares L N, Garcés-Eisele J, & Reyes-Núñez V. Methotrexate-induced mucositis in acute leukemia patients is not associated with the MTHFR 677T allele in Mexico. *Hematology* 2007; 12 (5): 387–391.

²⁰³Owen, S. A., Lunt, M., Bowes, J., Hider, S. L., Bruce, I. N., Thomson, W., & Barton, A. (2013). MTHFR gene polymorphisms and outcome of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis: analysis of key polymorphisms and meta-analysis of C677T and A1298C polymorphisms. *The pharmacogenomics journal*, 13(2), 137-147.

²⁰⁴Lee, Y. H., & Song, G. G. (2010). Associations between the C677T and A1298C Polymorphisms of MTHFR and the Efficacy and Toxicity of Methotrexate in Rheumatoid Arthritis. *Clinical drug investigation*, 30(2), 101-108.

²⁰⁵Kumagai, K., Hiyama, K., Oyama, T., Maeda, H., & Kohno, N. (2003). Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *International journal of molecular medicine*, 11(5), 593-600.

²⁰⁶Ghodke, Y., Chopra, A., Joshi, K., & Patwardhan, B. (2008). Are Thymidylate synthase and Methylene tetrahydrofolate reductase genes linked with methotrexate response (efficacy, toxicity) in Indian (Asian) rheumatoid arthritis patients?. *Clinical rheumatology*, 27(6), 787-789.

²⁰⁷Kurzawski M, Pawlik A, Safranow K, Herczynska M & Drozdziak M. 677C>T and 1298A>C MTHFR polymorphisms affect methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics* 2007; 8 (11): 1551-1559.

²⁰⁸Morgan M D, Al-Shaarawy N, Martin S, Robinson J I, Twigg S, YEAR Consortium, MagdyAA, Omar A S, Ghattas M H, Emery P, Barrett J H & Morgan A W. MTHFR functional genetic variation and methotrexate treatment response in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Pharmacogenomics* 2014; 15 (4): 467-475.

²⁰⁹Lopez-Lopez, E., Martin-Guerrero, I., Ballesteros, J., & Garcia-Orad, A. (2013). A systematic review and meta-analysis of MTHFR polymorphisms in methotrexate toxicity

prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *The pharmacogenomics journal*, 13(6), 498-506.

²¹⁰Owen, S. A., Lunt, M., Bowes, J., Hider, S. L., Bruce, I. N., Thomson, W., & Barton, A. (2013). MTHFR gene polymorphisms and outcome of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis: analysis of key polymorphisms and meta-analysis of C677T and A1298C polymorphisms. *The pharmacogenomics journal*, 13(2), 137-147.

²¹¹Lee, Y. H., & Song, G. G. (2010). Associations between the C677T and A1298C Polymorphisms of MTHFR and the Efficacy and Toxicity of Methotrexate in Rheumatoid Arthritis. *Clinical drug investigation*, 30(2), 101-108.

²¹²Kurzawski M, Pawlik A, Safranow K, Herczynska M & Drozdziak M. 677C>T and 1298A>C MTHFR polymorphisms affect methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics* 2007; 8 (11): 1551-1559.

²¹³Yang, 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.

²¹⁴Mena, J. P., Salazar-Paramo, M., Gonzalez-Lopez, L., Gamez-Nava, J. I., Sandoval-Ramirez, L., Sanchez, J. D., ... & Dávalos, I. P. (2011). Polymorphisms C677T and A1298C in the MTHFR gene in Mexican patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate: implication with elevation of transaminases. *The pharmacogenomics journal*, 11(4), 287-291.

²¹⁵Horie, N., Aiba, H., Oguro, K., Hojo, H., & Takeishi, K. (1995). Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell structure and function*, 20(3), 191-197.

²¹⁶Senapati, S., Singh, S., Das, M., Kumar, A., Gupta, R., Kumar, U., ... & Thelma, B. K. (2014). Genome-wide analysis of methotrexate pharmacogenomics in rheumatoid arthritis shows multiple novel risk variants and leads for TYMS regulation. *Pharmacogenetics and genomics*, 24(4), 211-219.

²¹⁷Dolnick, B. J. (2005). The rTS signaling pathway as a target for drug development. *Clinical colorectal cancer*, 5(1), 57-60.

²¹⁸Lima, A., Seabra, V., Bernardes, M., Azevedo, R., Sousa, H., & Medeiros, R. (2014). Role of key TYMS polymorphisms on methotrexate therapeutic outcome in portuguese rheumatoid arthritis patients. *PloS one*, 9(10), e108165.

²¹⁹Jekic, B., Lukovic, L., Bunjevacki, V., Milic, V., Novakovic, I., Damjanovic, T., ... & Radunovic, G. (2013). Association of the TYMS 3G/3G genotype with poor response and GGH 354GG genotype with the bone marrow toxicity of the methotrexate in RA patients. *European journal of clinical pharmacology*, 69(3), 377-383.

²²⁰Panetta, J. C., Sparreboom, A., Pui, C. H., Relling, M. V., & Evans, W. E. (2010). Modeling mechanisms of in vivo variability in methotrexate accumulation and folate pathway inhibition in acute lymphoblastic leukemia cells. *PLoS Comput Biol*, 6(12), e1001019.

²²¹Hasko G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 2004;25:33-9

²²²Chen, X., Wen, F., Yue, L., & Li, C. (2012). Genetic polymorphism of γ-glutamyl hydrolase in Chinese acute leukemia children and identification of a novel double nonsynonymous mutation. *Pediatric hematology and oncology*, 29(4), 303-312.

²²³Garcia-Bournissen, F., Moghrabi, A., & Krajcinovic, M. (2007). Therapeutic responses in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) and haplotypes of gamma glutamyl hydrolase (GGH) gene. *Leukemia research*, 31(7), 1023-1025.

²²⁴Wang, S. M., Sun, L. L., Zeng, W. X., Wu, W. S., & Zhang, G. L. (2014). Influence of genetic polymorphisms of FPGS, GGH, and MTHFR on serum methotrexate levels in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 74(2), 283-289.

²²⁵Kalantari, A., Zaker, F., Ansari, S., Sharafi, H., & Mohammadian, M. (2015). The effect of polymorphisms of gamma-glutamyl hydrolase (GGH) gene on methotrexate-induced toxicity in acute lymphoblastic leukemia. *Toxin Reviews*, 34(3), 136-141.