



Variantes genéticas y respuesta al metotrexato en pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda

Laboratorio de Genética Molecular Humana, Dpto. de Ciencias Biológicas, CENUR LN, Udelar, Salto 2022.

Ciclo de Metodología Científica II- 2022 - Grupo N° 115

Autores:

Br. Camila Asutin¹

Br. Bruno Beneditto¹

Br. Ximena Bitancourt¹

Br. Martin Boada¹

Br. Gabriela Machado¹

Br. Sergio Ordeix¹

Orientadores:

Dr. Julio Abayubá da Luz²

Dra. Ana María Soler²

Número de Registro CNEI: 7165794

¹ Ciclo de Metodología Científica II 2022 - Facultad de Medicina - Universidad de la República, Uruguay

² Laboratorio de Genética Molecular Humana, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República, Uruguay.

ÍNDICE

1. Resumen	3
2. Introducción	5
3. Objetivos	10
3.1 Objetivo general	10
3.2 Objetivos específicos	10
4. Metodología	11
4.1 Tipo de estudio y diseño general	11
4.2 Definición operacional de las variables	11
4.3 Plan de análisis de los resultados	12
4.4 Programas a utilizar en el análisis de los datos	12
4.5 Consideraciones éticas	13
4.6 Análisis estadísticos	14
5. Resultados	14
6. Discusión	19
7. Conclusiones y perspectivas	21
8. Referencias bibliográficas	22
9. Agradecimientos	26

1. Resumen

Objetivo: Analizar el impacto de variantes en los genes MTHFR, TYMS, SLC19A1 y SLCO1B1 en la respuesta hematológica al metotrexato en pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda.

Metodología: Estudio observacional de cohorte retrospectivo. Se utilizaron datos de 137 pacientes con diagnóstico de LLA, tratados con el protocolo BFM en el Servicio Hemato-Oncológico Pediátrico del Centro Hospitalario Pereira Rossell, obtenidos del proyecto ANII FMV_3_2018_148458 cuya responsable es la Dra. Ana María Soler. Se registraron las siguientes variables: valores de leucocitos y neutrófilos pre y post infusión de metotrexato. Se analizó si cada una de las variantes génicas por separado influye en el cambio del número de leucocitos y neutrófilos luego de cada pulso de metotrexato.

Resultados: Los polimorfismos analizados en los genes MTHFR, TYMS, SLCO1B1 no mostraron una asociación estadísticamente significativa, ni con el cambio en el número de glóbulos blancos ni con el porcentaje de neutrófilos pre y post administración de metotrexato, para ninguno de los cuatro pulsos de la fase de consolidación. Sin embargo, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo rs1051266 del gen SLC19A1 y el cambio de número de glóbulos blancos luego de la administración de metotrexato en el 2do pulso de la fase de consolidación.

Conclusiones: Los resultados obtenidos no son concluyentes para definir que las variantes estudiadas influyen en la respuesta al metotrexato en la reducción de glóbulos blancos pre y post pulso. Sin embargo, el polimorfismo rs1051266 del gen SLC19A1 fue estadísticamente significativo en el pulso 2 y 3 post metotrexato.

Palabras clave: leucemia linfoblástica aguda (LLA); farmacogenética; metotrexato (MTX); MTHFR; TYMS; SLC19A1; SLCO1B1.

Abstract:

Objective: To analyze the impact of MTHFR, TYMS, SLC19A1 and SLCO1B1 gene variants on the hematological response to Methotrexate in Acute Lymphoblastic Leukemia pediatric patients.

Methodology: Retrospective observational cohort study. Data from 137 patients diagnosed with ALL, treated with the BFM protocol at *Servicio Hemato Oncológico Pediátrico del Centro Hospitalario Pereira Rossell*, obtained from the ANII FMV_3_2018_148458 project whose manager is Dr. Ana María Soler, were used. The following variables were recorded: pre and post methotrexate infusion leukocyte and neutrophil values. It was analyzed whether each of the genetic variants influences the number of leukocytes and neutrophils after each methotrexate pulse.

Results: The polymorphisms analyzed in MTHFR, TYMS, and SLCO1B1 genes did not show a statistically significant association neither with the change in the number of white blood cells nor with neutrophils percentage before and after methotrexate administration in any of the four courses of consolidation phase. However, a statistically significant association was found between the rs1051266 of the SLC19A1 gene and the change in the number of white blood cells after methotrexate administration in the consolidation phase 2nd course.

Conclusions: The results obtained are not conclusive to define that the variants studied influence the response to methotrexate in the reduction of white blood cells pre and post pulse. However, the rs1051266 polymorphism of the SLC19A1 gene was statistically significant at pulse 2 and 3 post methotrexate.

Key words: Acute lymphoblastic leukemia (ALL); pharmacogenetics; methotrexate (MTX); MTHFR; TYMS; SLC19A1; SLCO1B1

2. Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muerte en niños y adolescentes entre 0 y 19 años en todo el mundo (1). Cada año cerca de 400.000 niños y adolescentes de entre 0 y 19 años son diagnosticados con cáncer(2).

En Uruguay, entre 2008 y 2012, la mayor tasa de incidencia de cáncer en niños fue observada en varones de 0 a 4 años, siendo la misma 1,2 veces mayor en comparación al sexo femenino. A nivel mundial, las neoplasias más comunes en niños son las leucemias, los tumores del sistema nervioso central, los linfomas y los neuroblastomas(3). De estas, las leucemias son las más frecuentes, representando el 31% en niños menores de 15 años. En nuestro país, este porcentaje es similar al reportado a nivel mundial (30,2%) y, dentro de este grupo, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) constituye más del 75% de las leucemias en la infancia, con un pico de incidencia entre los 2 y 5 años(4).

La LLA se caracteriza por la proliferación clonal y acumulación de células linfoides malignas inmaduras (blastos) en la médula ósea (MO) y en sangre periférica (5)Aproximadamente el 80% de los casos tiene su origen en células precursoras de linfocitos B (LLA-B). La sustitución de elementos hematopoyéticos normales en la MO por la proliferación blástica es responsable de las manifestaciones clínicas que se presentan en estos pacientes. Los síntomas más frecuentes son fiebre, astenia, pérdida de peso, sudoración nocturna, dolor óseo e infecciones. En algunos casos, la presentación puede ser de mayor entidad, provocando hemorragia, anemia, leucopenia, neutropenia y plaquetopenia severa(6).

El diagnóstico de LLA se confirma cuando las células blásticas de origen linfoide representan más del 20% del total de las células nucleadas de la MO o cuando el recuento no eritroide es mayor al 50%(7). En relación a su etiología, la misma se desconoce, pero se cree que es multifactorial, donde participan factores genéticos y medioambientales.

En nuestro país, el tratamiento se realiza principalmente en el Servicio Hemato Oncológico Pediátrico del Centro Hospitalario Pereira Rossell (SHOP-CHPR). Aproximadamente, el 80% de los pacientes logran la remisión completa (RC) de la enfermedad(4). A nivel mundial, se utilizan distintos protocolos para el tratamiento, siendo el protocolo del grupo alemán Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) el utilizado en Uruguay. Este consiste en una poliquimioterapia de 2 años de duración, dividida en cinco etapas: Inducción, Intensificación, Consolidación, Reintensificación y Mantenimiento. La etapa de inducción tiene una duración de 33 días y su objetivo es reducir el número de blastos para alcanzar la RC. Durante esta fase se administran los siguientes fármacos:

Prednisona (PRED), Vincristina (VCR), Daunorrubicina (DNR), L-Asparaginasa (L-ASP) y metotrexato (MTX). Las etapas de intensificación, consolidación y reintensificación comienzan una vez que la enfermedad entró en remisión y su objetivo es destruir los blastos restantes. Las primeras dos, son las más variables en cuanto a duración, dosis recibida y fármacos administrados, mientras que la etapa de reintensificación es homogénea para todos los pacientes. En estas etapas los fármacos utilizados son: Ciclofosfamida, Citarabina, Dexametasona, Doxorrubicina, L-ASP, Leucovorina cálcica, MTX, VCR, 6-Mercaptopurina (6-MP) y 6- Tioguanina. Específicamente, en la fase de consolidación el MTX se administra en 4 pulsos separados de dos semanas. Por último, la etapa de mantenimiento es la más extensa (63-74 semanas) y se administran únicamente dos fármacos 6-MP y MTX(8). En cualquier terapia con medicamentos existe una gran variabilidad interindividual respecto a las respuestas esperadas de los pacientes. Esta variabilidad está dada por múltiples factores tales como el “incumplimiento, los errores de medicación, las interacciones medicamentosas, los factores ambientales y los factores genéticos”. La farmacogenética estudia un gran número de variantes de un individuo o población, con el fin de explicar el componente genético que determina la respuesta variable a los fármacos (9). Los fármacos quimioterápicos mencionados anteriormente presentan un estrecho rango farmacológico y actúan de forma inespecífica generando distintos efectos adversos. En algunos pacientes, los efectos tóxicos son tan graves que se debe reducir la dosis empleada o detener el tratamiento(10). La farmacogenómica permite predecir, en base al genotipo, los posibles efectos nocivos y la respuesta a un determinado fármaco; permitiendo así un tratamiento más individualizado, seguro y eficaz para cada paciente.

Las enzimas de biotransformación y eliminación de los fármacos utilizados en el tratamiento de LLA, tienen una acción determinante en el efecto terapéutico de estos. La actividad y presencia de las mismas está codificada genéticamente y sujeta a variaciones alélicas (polimorfismos), cuyas frecuencias varían entre las distintas poblaciones. Estos polimorfismos influyen sobre la efectividad de los medicamentos y condicionan a su toxicidad o falla terapéutica. Esta variación en la respuesta podría estar relacionada con los genes codificantes para las enzimas involucradas en el transporte y metabolismo de fármacos, entre ellos el MTX (11).

El MTX es un antimetabolito de la familia de los folatos que actúa sobre el ciclo celular. Tiene actividad antiproliferativa e inmunosupresora y sus efectos inhibidores dependen de su concentración intracelular. Es un componente importante de la terapia utilizada para tratar la LLA pediátrica, ya que es utilizado en todas las fases del mismo, administrándose por diferentes

vías y en diferentes dosis(5). Presenta un estrecho rango terapéutico, por lo que existe una pequeña diferencia entre su dosis mínima eficaz y su dosis tóxica. En consecuencia, a pesar de que el tratamiento es exitoso, la toxicidad del MTX es frecuente(12)(13) Los principales efectos adversos son la mielosupresión, la insuficiencia renal, la mucositis, las alteraciones del tracto gastrointestinal y neurológicas(14).

El MTX ingresa a las células por el transportador de folato reducido SLC19A1 o por transportadores de aniones orgánicos como el SLCO1B1. El metabolismo del MTX es complejo e involucra muchas enzimas, como por ejemplo las enzimas MTHFR y TYMS. Estudios previos han demostrado que diversos polimorfismos en los genes que codifican para las enzimas involucradas en el transporte y metabolismo del MTX podrían influir en la respuesta al tratamiento, en el riesgo de recaída y/o producir eventos de toxicidad (5).

La metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es una enzima clave para la farmacocinética del MTX(15). Su función es regular la cantidad de folato intracelular disponible para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Cataliza la reducción de 5,10 metilentetrahidrofolato a 5 metil tetrahidrofolato, siendo esta última la forma en la que circula el folato endógeno. El MTX no puede inhibir directamente la enzima MTHFR, pero los cambios en la actividad de la misma afectan la distribución del folato intracelular y la metilación de los ácidos nucleicos, lo que puede influir en la eficacia y la toxicidad del MTX(16) (17)El gen que codifica para esta enzima está localizado en el cromosoma 1. Varios estudios han descrito ciertos polimorfismos en este gen, que producen una menor actividad enzimática y que podrían estar asociados a la eficacia y toxicidad del MTX (18,19). Entre ellos, el rs1801131 y el rs1801133 son los más estudiados.

El polimorfismo rs1801133, una transición de C a T en la posición 677 (c.677C>T), resulta en el cambio de una alanina por una valina en el codón 222 (p.Ala222Val)(5). Los individuos heterocigotos CT para este polimorfismo presentan 60% de actividad en comparación con aquellos de genotipo CC, mientras que los homocigotos TT presentan solamente 30% de actividad(5). Se han llevado a cabo numerosos estudios con el objetivo de determinar si existe una asociación entre la presencia de este polimorfismo y las toxicidades, las recaídas y la sobrevida de los pacientes con LLA. Aunque, la mayoría de estos estudios no lograron encontrar una asociación entre este polimorfismo y los eventos de toxicidad debida al MTX, el genotipo TT ha sido asociado con un mayor riesgo de recaída (20). La prevalencia del genotipo TT varía entre diferentes grupos étnicos. Mientras que en poblaciones africanas la prevalencia de este genotipo es muy baja, en poblaciones europeas o de América del Norte varía entre 5% y 15%.

El segundo polimorfismo más estudiado es el rs1801131, una transición de A a C en la posición 1298 (c.A1298C), que produce un cambio de un ácido glutámico por una alanina en el codón 429 (Glu429Ala). Los individuos de genotipo CC tienen 60% de actividad enzimática respecto a los individuos de genotipo AA(21). En cuanto a la toxicidad, algunos autores postulan que pacientes de genotipo CC tendrían un mayor riesgo de desarrollar toxicidad que los de genotipo AA cuando son tratados con MTX(22)(23). En contraste, otros autores reportan un efecto protector de esta variante frente a toxicidades hematológicas y hepáticas(24) (25). A modo de ejemplo, en un reporte de casos se estudió un niño con LLA-T, que presentó insuficiencia renal y neutropenia prolongada luego de la segunda administración de MTX en dosis altas (5 g/m²). El estudio molecular del gen MTHFR para este paciente, mostró que era heterocigoto para ambos polimorfismos C677T y A1298C. Luego, este paciente recibió 2 administraciones adicionales de MTX en una dosis de 3 g/m², sin presentar toxicidad(14). Al igual que el rs1801133, la frecuencia de este polimorfismo varía según las distintas etnias.

Otra enzima vinculada al metabolismo del MTX y que podría influenciar en su respuesta o en el desarrollo de efectos adversos es la enzima timidilato sintasa (TYMS). De hecho, se ha evidenciado que juega un rol importante en la variabilidad de respuesta farmacológica. Diferentes estudios señalan que niveles más altos de expresión intratumoral del gen predice una mala respuesta terapéutica y por lo tanto una menor supervivencia(5) (26) (27), (28). En efecto, en pacientes tratados con inhibidores de TYMS, se evidenció que cuanto menor sea el nivel intracelular de TYMS mayor es el beneficio terapéutico(29) (30). Esta enzima, una metiltransferasa de 312 aminoácidos y 35,5KDa, participa en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, catalizando la conversión de desoxiuridina monofosfato (dUMP) a desoxicitidina monofosfato (dTTP), compuesto esencial para la síntesis de pirimidinas(5) (26) (31). Al ser inhibida por el MTX, provoca la muerte celular. Este evento ocurre fundamentalmente en aquellas células que se dividen rápidamente, como por ejemplo las células cancerígenas(11). La enzima TYMS está codificada por un gen (TYMS) localizado en el cromosoma 18 y presenta un polimorfismo (rs45445694) que consiste en 2 o 3 copias de un repetido en tándem (VNTR) de 28pb denominado TSER 2R/3R. A su vez, dentro de VNTR, se encontró otro polimorfismo de nucleótido simple (SNP), un cambio de G por C (rs183205964). La sumatoria de estas variantes influyen en la expresión del gen y por ende en la respuesta al MTX(5). Pacientes portadores del alelo 2R tienen menor actividad de la enzima en comparación con pacientes homocigotos 3R (32). Estudios previos han demostrado que existe una asociación significativa entre la presencia del alelo 3R y la expresión del ARNm de TYMS(33). Los altos niveles de expresión de la enzima

están determinados por la presencia del alelo 3R; como consecuencia, son necesarias mayores dosis de antifolatos para inhibirla (5,34). Según Giletti (2012), la frecuencia genotípica de este polimorfismo en la población uruguaya es similar a la caucásica, pero diferente a la asiática(5). El gen SLC19A1 localizado en el cromosoma 21 (21q22.32), formado por 17 exones codifica para el transportador de membrana de 591 aminoácidos homónimo(35). Este es el responsable de la captación celular y el transporte de folato reducido, regulando las concentraciones intracelulares de folato(36) (37) .Se expresa en todos los órganos del cuerpo y, como se mencionó previamente, es utilizado por el MTX para ingresar a las células(5) (38,39). Por lo tanto, la concentración plasmática de MTX y la cantidad de MTX residual en el hígado está determinada, en parte, por este transportador. Este gen presenta un polimorfismo en el exón 2 (rs1051266), una transición de G a A en la posición 80 (c.80G>A), que resulta en el cambio de una arginina por una histidina en el codón 27 (p.Arg27His). Este polimorfismo reduce la eficiencia del transportador, lo que favorece un aumento en los niveles plasmáticos de MTX y, como consecuencia, problemas gastrointestinales, hematológicos y/o de toxicidad hepática(11). A su vez, este polimorfismo se encontró asociado con el aumento de la tasa de recaída de LLA en pacientes pediátricos (31,40) y una menor supervivencia libre de enfermedad (5). Debido a la reducción de la actividad de este transportador, los pacientes homocigotos AA tienen una mayor cantidad de MTX residual, lo que provoca un aumento significativo de hepatotoxicidad y toxicidad gastrointestinal inducida por MTX(5,41). La frecuencia genotípica de este polimorfismo en la población uruguaya es similar a la reportada tanto para poblaciones caucásicas como asiáticas (42).

Finalmente, el gen SLCO1B1 que se encuentra localizado en el cromosoma 12 y está formado por 15 exones, codifica para una proteína transportadora de aniones orgánicos independiente del sodio (OATP1B1). Este se expresa casi exclusivamente en el hígado, donde se ubica en la membrana basolateral de los hepatocitos. Su función es el pasaje de muchos fármacos como el MTX y otros solutos endógenos (bilirrubina y estrógenos) desde el torrente sanguíneo hacia el hígado(43) (44). En este gen, se han identificado aproximadamente 190 variantes comunes con una frecuencia de alelo menor (MAF) superior al 5%. De estos, se han caracterizado bien dos variantes no sinónimas: el rs2306283 (A388G) que produce un cambio de una arginina por un ácido aspártico en el codón 130 (c.Asn130Asp) y el rs4149056 (T521C) que produce un cambio de una valina por una arginina en el codón 174 (c.Val174Arg). Estas dos variantes están en desequilibrio de ligamiento parcial. En consecuencia, hay cuatro haplotipos importantes: SLCO1B1*1A (que no contiene ninguna variante), SLCO1B1*1B (rs2306238), SLCO1B1*5

(rs4149056) y SLCO1B1*15 (ambos polimorfismos). En estudios previos llevados a cabo en líneas celulares, el transportador OATP1B1-Ala174 y los haplotipos asociados, particularmente el SLCO1B1*15, han mostrado una actividad de transporte reducida en comparación con OATP1B1-Val174. En referencia a la toxicidad, varios polimorfismos de este gen, en especial rs4149081 y rs11045879, fueron asociados con la toxicidad gastrointestinal y el clearance del MTX(13) (38)(45).

En definitiva, por los datos expuestos anteriormente, es importante determinar cuáles son los distintos polimorfismos genéticos involucrados en el metabolismo del MTX, y cuál es su frecuencia en la población de estudio, con el fin de establecer su asociación con la respuesta hematológica al tratamiento durante la fase de consolidación.

En este trabajo se analizará la relación existente entre la presencia de polimorfismos en los genes MTHFR, TYMS, SLC19A1 y SLCO1B1 y la respuesta hematológica al tratamiento con MTX durante la etapa de consolidación del mismo.

Estos genes fueron elegidos porque tienen un rol en el transporte y metabolismo del fármaco, y para lograr una terapia individualizada es importante identificar aquellos pacientes con una mayor o menor susceptibilidad al MTX, teniendo en cuenta sus variantes genéticas. Esto genera un cambio en el régimen terapéutico adaptado a cada paciente, para reducir así la incidencia de reacciones adversas y/o mejorando la respuesta a la terapia.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

- Analizar el impacto de las variantes génicas de MTHFR, TYMS, SLC19A1 y SLCO1B1 en la respuesta hematológica al metotrexato en pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes previamente genotipadas en los genes MTHFR, TYMS, SLC19A1 y SLCO1B1.
- Determinar los valores de leucocitos y neutrófilos pre y post pulsos de metotrexato a partir de los datos de hemogramas.
- Analizar el efecto de las variantes genéticas en el número de leucocitos y neutrófilos pre y post pulso de metotrexato.

4. Metodología

4.1 Tipo de estudio y diseño general

Se propone un estudio observacional de cohortes retrospectivo, donde se usarán datos ya disponibles del proyecto ANII FMV_3_2018_148458 cuya responsable es la Lic. Ana María Soler. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del CENUR Litoral Norte (Exp. 311170-001284-20, www.expe.edu.uy). Los datos a usar fueron extraídos previamente de la historia clínica de los pacientes y se encuentran en una planilla electrónica que no tiene ningún dato filiatorio que permita la identificación de los mismos.

Se utilizará una muestra aproximada de 137 pacientes según los datos que conformen la base de datos. Se incluirán a pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA tratados con el protocolo BFM (Berlín-Frankfurt-Münster) en el Servicio de Hemato-oncología Pediátrica del Centro Hospitalario Pereira Rossell (CHPR). Se excluirán aquellos menores a un año debido a que son tratados con un protocolo diferente, los que tengan alteraciones cromosómicas congénitas y también los que no tengan registros del conteo de glóbulos blancos o neutrófilos post pulso de MTX, y los que no tenían datos genómicos.

La base de datos se conformará de la siguiente manera, cada fila representará un paciente, en las columnas irán los diferentes datos necesarios para el análisis. Las columnas serán 34 en total. La primera columna contendrá el código de paciente, las siguientes 4 tendrán información de los genotipos (MTHFR 6C77T, MTHFR A1298C, SL19A1 G80A, TYMS), las siguientes 3 las variantes del SLCO1B1 (rs2306283, rs11045819, rs4149056), luego una columna con la dosis en g/m² de MTX (2 g/m² o 5 g/m²). La siguiente columna corresponderá al nivel de riesgo de la enfermedad (Estándar, Intermedio, Alto). A partir de aquí habrá 2 grupos grandes de columnas, las del conteo de glóbulos blancos y la de neutrófilos, cada grupo estará conformado por 12 columnas distribuidas según los 4 pulsos de MTX, resultando en una columna de valores Pre-MTX, una Post MTX y el porcentaje de remisión de ese pulso, así con los demás pulsos, lo que da un total de 12 columnas por cada grupo (Glóbulos blancos y Neutrófilos).

4.2 Definición operacional de las variables

Las variables a analizar serán los valores de leucocitos y neutrófilos pre y post infusión de metotrexato.

- Porcentaje de remisión del número de glóbulos blancos en los 4 pulsos de MTX (variable cuantitativa continua, dependiente). La fórmula será: **$N^{\circ} GB \text{ Post MTX} / N^{\circ} GB \text{ Pre-MT}$**),

siendo N° GB Post MTX, el valor de glóbulos blancos posterior al pulso de MTX, N° GB Pre-MTX el valor de glóbulos blancos previo al pulso de MTX.

- Porcentaje de remisión del número de neutrófilos en los 4 pulsos de MTX (variable cuantitativa continua, dependiente). La fórmula será: **$N^{\circ} \text{ Neut Post MTX} / N^{\circ} \text{ Neut Pre-MTX}$** , siendo N° Neut Post MTX, el valor de glóbulos blancos posterior al pulso de MTX, N° Neut Pre-MTX el valor de glóbulos blancos previo al pulso de MTX.
- Variantes genéticas (variable cualitativa nominal, independiente).
- Variable dosis de metotrexato

4.3 Plan de análisis de los resultados

Se analizará si cada una de las variantes genéticas por separado influye en el cambio del número de leucocitos y neutrófilos luego de la administración de metotrexato. Para este análisis se usará ANOVA o test no paramétricos si los datos no son normales y/o homocedásticos.

En función de los resultados previos se analizará si se realizan análisis adicionales que puedan incorporar el efecto de todas o de un grupo de variantes a la vez.

4.4 Programas a utilizar en el análisis de los datos

Las variantes genéticas ya fueron determinadas en el Laboratorio de Genética Molecular Humana y se encuentran en una planilla para su análisis.

Se analizará si cada una de las variantes genéticas por separado influye en el cambio del número de leucocitos y neutrófilos luego de la infusión de metotrexato. Los programas a utilizar para el análisis de los datos consisten en la planilla de cálculo y análisis estadístico en R-Studio, disponible en la web de forma gratuita. Para este análisis se realizará ANOVA o test no paramétricos si los datos no son normales y/o homocedásticos.

En función de los resultados previos se analizará si se realizan análisis adicionales que puedan incorporar el efecto de todas o de un grupo de variantes a la vez.

Este estudio se enfoca en el análisis de la respuesta hematológica del metotrexato durante la etapa de consolidación del tratamiento para la LLA. Durante esta etapa se usan dos fármacos (6-mercaptopurina y metotrexato), pero el metotrexato se usa a altas dosis (2 g/m² o 5 g/m²). El objetivo del estudio es evaluar el impacto de variantes genéticas en la respuesta hematológica medida como el porcentaje de reducción o aumentos de leucocitos y neutrófilos luego de las cuatro infusiones de metotrexato que reciben los pacientes.

4.5 Consideraciones éticas

El proyecto a desarrollar se enmarca dentro del estudio de la farmacogenética de la Leucemia Linfoblástica pediátrica, línea de investigación del Laboratorio de Genética Molecular Humana del CENUR Litoral Norte.

En particular, este proyecto es parte del Proyecto: Caracterización farmacogenómica de la toxicidad debida al metotrexato en niños con leucemia linfoblástica, el cual fue aprobado en el llamado Fondo María Viñas del año 2018 (FMV_3_2018_1_148458), y actualmente se encuentra en ejecución.

El proyecto FMV_3_2018_1_148458 fue aprobado por el Comité de Ética para la Investigación en seres humanos del CENUR Litoral Norte (Exp. N° 311170-001762-18).

Todos los datos de los pacientes a analizar ya fueron obtenidos previa firma de un consentimiento y/o asentimiento informado.

Los estudiantes que participarán en la investigación trabajarán con una base de datos realizada previamente donde no hay datos que permitan la identificación de los pacientes. En esta base de datos se relevaron solamente los datos genéticos de los genes a analizar y los datos del hemograma, previamente obtenidos.

Uno de los riesgos de estos proyectos es la pérdida de confidencialidad de los pacientes participantes. Al trabajar con una base de datos ya disociada de los pacientes e identificada con un código alfanumérico, se minimiza fuertemente la posibilidad de la pérdida de confidencialidad.

Los estudiantes no trabajarán con la muestra propiamente dicha, sino con datos previamente obtenidos de esa muestra.

Por otra parte, este proyecto involucra el estudio de la toxicidad hematológica debido a metotrexato ya incluida en el proyecto FMV_3_2018_1_148458 pero la cual no ha sido analizada hasta el momento. Este análisis aún no se ha hecho debido a que nos concentramos en otras toxicidades observadas.

La información a los pacientes en caso de que estos la requieran o que pueda ser de utilidad para su tratamiento estará a cargo de los investigadores responsables (Ana María Soler y Julio da Luz) en conjunto con los médicos tratantes.

Por lo expuesto anteriormente, consideramos que los riesgos del desarrollo de este proyecto son mínimos y se han efectuado las acciones necesarias para minimizarlos.

4.6 Análisis estadísticos

Para determinar los valores de leucocitos y neutrófilos pre y post pulsos de MTX se utilizó el porcentaje de remisión del número de glóbulos blancos en los cuatro pulsos de MTX, utilizando la siguiente fórmula $\text{N}^\circ \text{GB Post MTX} / \text{N}^\circ \text{GB Pre-MTX}$; y se calculó el porcentaje de remisión del número de neutrófilos en los 4 pulsos de MTX mediante fórmula $\text{N}^\circ \text{Neutrófilos Post MTX} / \text{N}^\circ \text{Neutrófilos Pre-MTX}$.

Debido a la presencia de solo un individuo con el polimorfismo 4R/3R del gen TYMS, por practicidad se decidió realizar su cambio al grupo de individuos con el polimorfismo 3R/3R; y por haber solo un paciente portador del polimorfismo CC del gen SLCO1B1 rs4149054 se realizó su cambio al grupo de los portadores del polimorfismo TC.

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el programa R-Studio, utilizando un intervalo de confianza de 95%. Los gráficos fueron realizados mediante el método ggplot del software R-Studio versión 2022.02.3.

Para comprobar si los datos analizados presentaban una distribución normal se utilizó el test Shapiro-Wilk, para evaluar la homocedasticidad se utilizó el test Bartlett.

Se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas para cada uno de los polimorfismos. Luego, utilizando la prueba de Chi- cuadrado se determinó si cada uno de los polimorfismos se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Con el objetivo de evaluar la posible asociación entre la presencia de las variantes genéticas y su efecto en el número de glóbulos blancos junto con neutrófilos pre y post pulso de metotrexato se utilizaron los tests Mann Whitney para las variantes con dos genotipos (rs11045819, y rs4149056) del gen SLCO1B1 y Kruskal Wallis para el resto de variantes con tres genotipos: MTHFR (rs1801133 y rs1801131), SLC19A1 (rs1051266), TYMS (rs45445694), y SLCO1B1 (rs2306283).

5. Resultados

En la Tabla 1 se presentan las frecuencias genotípicas y alélicas de los siete polimorfismos analizados. Todos ellos se encuentran en el equilibrio de Hardy-Weinberg (p-valor > 0,05) mediante el test de Chi cuadrado.

El análisis de los datos demuestra que no presentan una distribución normal, ni tampoco son homocedásticos, utilizando el test Shapiro-Wilk y el test Bartlett respectivamente.

Los resultados obtenidos de los análisis entre la presencia de polimorfismos, y su asociación con la variación en el porcentaje de glóbulos blancos y neutrófilos en cada pulso de MTX, analizados mediante los test Mann Whitney y Kruskal Wallis para R-Studio, no evidenciaron una asociación estadísticamente significativa en la variación de glóbulos blancos luego de los pulsos de MTX en individuos portadores los genes analizados polimorfismos rs1801133 (MTHFR), rs1801131 (MTHFR), rs45445694 (TYMS), rs2306283 (SLCO1B1), rs101045819 (SLCO1B1), rs4149056 (SLCO1B1). Con excepción en el polimorfismo rs1051266 del gen SLC19A1, el mismo fue estadísticamente significativo en el pulso 2 post MTX con un p-valor menor a 0.05 (Tabla 2).

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos analizados para los genes MTHFR, TYMS, SLC19A1 y SLCO1B1. Se muestran los genes (polimorfismos) analizados, el número (N) y porcentaje de individuos por cada genotipo, junto con las frecuencias de cada alelo; para la muestra de pacientes.

Gen (Polimorfismo)	Frecuencias Genotípicas		Frecuencias Alélicas	
	Genotipo	Freq. (N)	Alelo	Freq.
MTHFR (rs1801133)	CC	0.321 (21)	C	0.588
	CT	0.533 (51)	T	0.412
	TT	0.146 (16)		
MTHFR (rs1801131)	AA	0.526 (51)	A	0.723
	AC	0.394 (33)	C	0.277
	CC	0.080 (4)		
SLC19A1 (rs1051266)	AA	0.204 (13)	A	0.471
	GA	0.533 (50)	G	0.529
	GG	0.263 (25)		
TYMS (rs45445694)	2R/2R	0.175 (18)	2R	0.434
	3R/2R	0.518 (39)	3R	0.566
	3R/3R	0.307 (31)		
SLCO1B1 (rs2306283)	AA	0.217 (13)	A	0.506
	AG	0.578 (34)	G	0.494
	GG	0.205 (13)		
SLCO1B1 (rs11045819)	CC	0.783 (45)	C	0.892
	CA	0.217 (15)	A	0.108
SLCO1B1 (rs4149056)	TT	0.675 (42)	C	0.157
	TC	0.325 (18)	T	0.831

Tabla 2. Variación de GB pre y post pulso de MTX (medido como: número de GB post-infusión/número de GB pre-infusión) en función del genotipo. Se muestran los genes (polimorfismos analizados) con sus respectivas medias de frecuencia, el número (N) y p-valor para cada pulso de MTX. El p-valor de los polimorfismos rs11045819 y rs4249056 fueron estimados mediante el test Mann-Whitney-Wilcoxon, mientras que para los demás polimorfismos se usó el test Kruskal-Wallis, ambos test realizados en R-Studio.

Gen (Polimorfismo)	Genotipo	Pulso 1		Pulso 2		Pulso 3		Pulso 4	
		Media (N)	p-valor	Media (N)	p-valor	Media (N)	p-valor	Media (N)	p-valor
MTHFR (rs1801133)	CC	0.707 (18)		0.660 (13)		1.196 (13)		0.612 (14)	
	CT	0.681 (39)	0.693	0.902 (26)	0.992	0.785 (27)	0.372	0.710 (23)	0.924
	TT	0.609 (12)		0.720 (8)		0.554 (9)		0.632 (9)	
MTHFR (rs1801131)	AA	0.654 (37)		0.965 (28)		0.822 (26)		0.756 (25)	
	AC	0.672 (28)	0.502	0.526 (16)	0.440	0.927 (20)	0.810	0.533 (19)	0.317
	CC	0.905 (4)		0.790 (3)		0.607 (3)		0.775 (2)	
SLC19A1 (rs1051266)	AA	0.618 (10)		2.476 (5)		1.284 (7)		0.874 (6)	
	GA	0.671 (38)	0.831	0.553 (26)	0.013	0.626 (25)	0.115	0.606 (25)	0.134
	GG	0.711 (21)		0.690 (16)		1.006 (17)		0.679 (15)	
TYMS (rs45445694)	2R/2R	0.710 (13)		0.819 (11)		0.518 (10)		0.681 (13)	
	3R/2R	0.686 (30)	0.919	0.877 (21)	0.573	1.127 (21)	0.468	0.696 (21)	0.827
	3R/3R	0.646 (26)		0.692 (15)		0.717 (18)		0.593 (12)	
SLCO1B1 (rs2306283)	AA	0.704 (9)		0.653 (6)		0.622 (7)		0.714 (8)	
	AG	0.649 (29)	0.693	0.566 (18)	0.502	0.624 (24)	0.056	0.641 (22)	0.513
	GG	0.744 (9)		1.121 (9)		1.575 (9)		0.788 (6)	
SLCO1B1 (rs11045819)	CC	0.665 (34)		0.647 (10)		0.659 (12)		0.669 (26)	
	CA	0.710 (13)	0.681	0.931 (23)	0.658	1.256 (28)	0.426	0.715 (10)	0.417
SLCO1B1 (rs4149056)	TT	0.655 (16)		0.701 (12)		0.779 (12)		0.601 (9)	
	TC	0.689 (31)	0.300	0.752 (21)	0.985	0.863 (28)	0.330	0.708 (27)	0.688

En la figura 1 se graficó el cambio en el número de GB de acuerdo al genotipo del polimorfismo rs1051266, el único que mostró una asociación significativa.

Para profundizar en la relación de este polimorfismo con el cambio de GB post-pulso, comparamos el cambio en el número de GB entre los individuos con el genotipo AA y aquellos con al menos un alelo G.

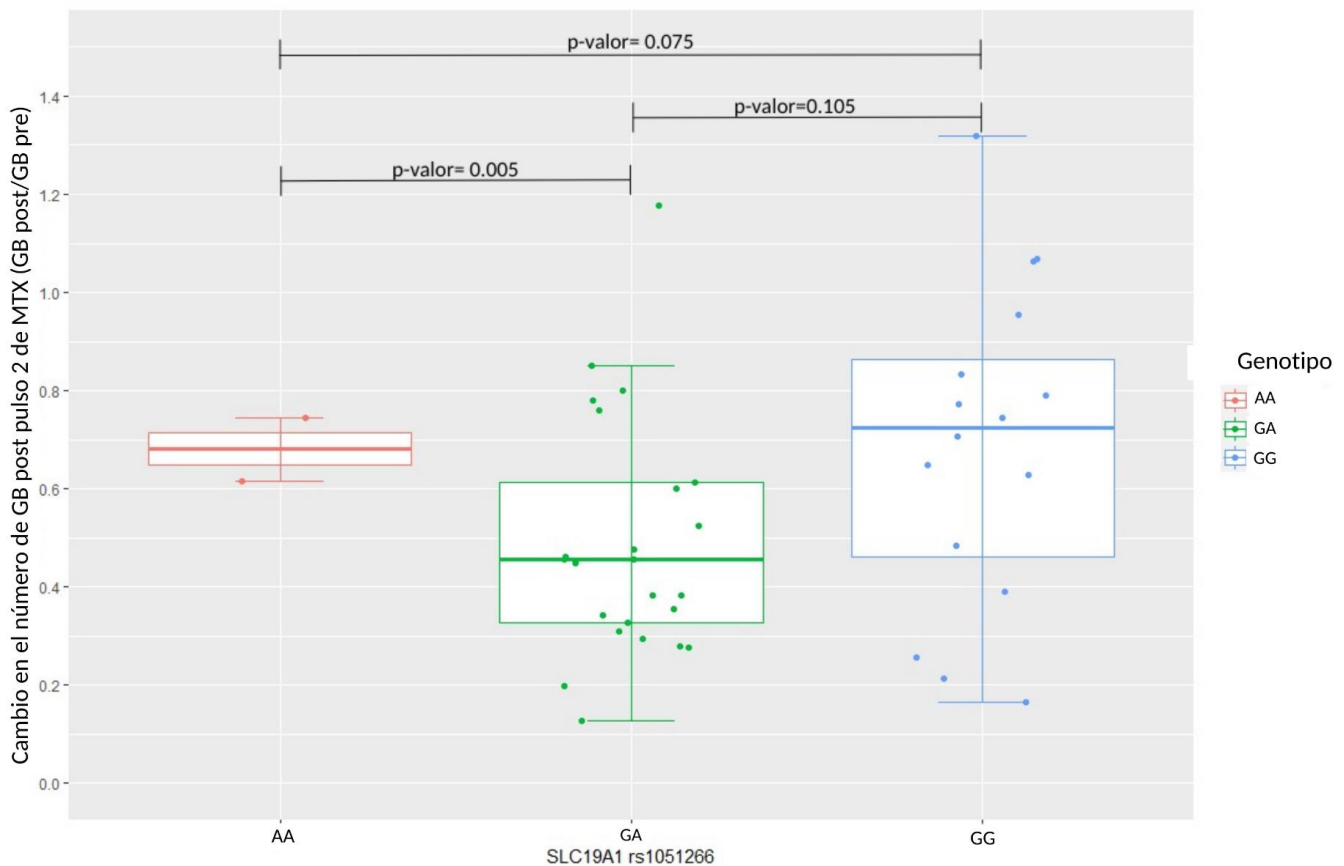


Figura 1. Genotipos de SLC19A1 rs 1051266 vs cambio en el número de GB post pulso 2 de MTX (GB post/GB pre). En las abscisas se muestran los genotipos SLC19A1 rs1051266 (AA, GA, GG) y en las ordenadas el porcentaje de remisión de glóbulos blancos luego del segundo pulso de metotrexato. Los valores p fueron estimados por la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon en R-Studio.

En la figura 2 se muestran los resultados del cambio de GB cuando comparamos el genotipo AA comparado con los genotipos AG y GG agrupados. En el pulso 2 y 3 observamos que los individuos del genotipo AA presentan una menor reducción en el número de GB comparada con los individuos AG o GG. Por otra parte, esta diferencia es significativa analizada por el test de Mann-Whitney-Wilcoxon ($p < 0,05$).

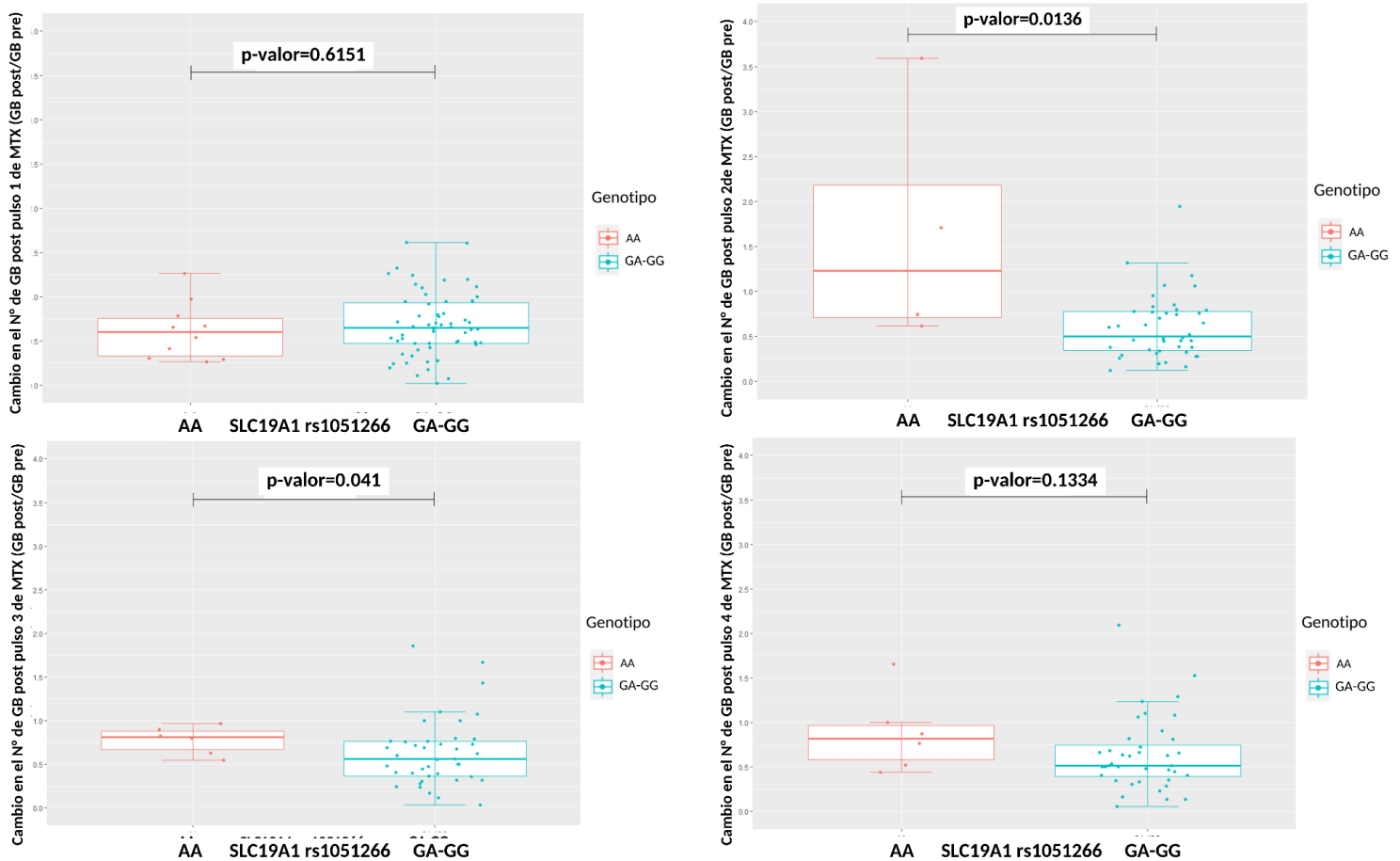


Figura 2: SLC19A1 rs 1051266 vs cambio en el N° de glóbulos blancos luego de cada pulso de MTX (GB Post/GB Pre). En abscisas se muestran los genotipos AA y agrupados GA-GG del gen SLC19A1 rs 1051266. En ordenadas el porcentaje de remisión de glóbulos blancos durante los diferentes pulsos de metotrexato. Los valores p fueron estimados por la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon en R-studio.

6. Discusión

En relación al polimorfismo C677T (rs1801133) del gen MTHFR, las frecuencias genotípicas y alélicas observadas fueron similares a las reportadas en el estudio de Giletti & Esperón(46).

Estos resultados son similares a los observados en las poblaciones europeas y americanas, y diferentes a los observados en poblaciones africanas y asiáticas(47) . En relación al polimorfismo A1298C (rs1801131) del mismo gen, la frecuencia del alelo variante fue de 27,7 % (Tabla 1), semejante a lo que se observa en la poblaciones europeas y caucásicas. Es ligeramente superior a la frecuencia informada para poblaciones de Latinoamérica, donde se describe una frecuencia de 15,1%. Esta diferencia podría deberse a la heterogeneidad de las poblaciones latinoamericanas que presentan diferentes proporciones de ancestralidad europea, nativo-americana y africana(5).

En relación al polimorfismo G80A (rs1051266) del gen SLC19A1, la frecuencia de homocigotos AA para la población estudiada fue de 20,4% (Tabla 1). A su vez, se observó una frecuencia del alelo A de 47,1 % (Tabla 1), similar a las reportadas para las poblaciones europeas, latinoamericanas y del sur de Asia. Sin embargo, la frecuencia es menor en las poblaciones africanas. Teniendo en cuenta la composición de nuestra población, estos resultados son los esperados.

Respecto al gen TYMS, el polimorfismo 2R/3R (rs45445694) las frecuencias genotípicas observadas fueron similares a las frecuencias reportadas por Giletti & Esperón(48). Estos valores son similares a lo reportado para poblaciones caucásicas, pero diferente a poblaciones asiáticas. Por ejemplo, en una población China la frecuencia del genotipo 3R/3R es más del doble de lo observado que en nuestra población (68% vs 30,7%)(28)

Para el polimorfismo A388G (rs2306283) del gen SLCO1B1 la frecuencia del alelo A es levemente inferior a lo observado en poblaciones europeas (59,7% vs 50,6%) pero superior a lo observado en poblaciones africanas (18,2%) y asiática 23,8%) (49)

Esta frecuencia intermedia es compatible con la composición genética de la población uruguaya que presenta un aporte mayormente europeo, con aportes menores pero significativos de poblaciones africanas y nativo-americanas (50). Para el polimorfismo C>A del mismo gen (rs11045819) se observó para el alelo C una frecuencia de 89,2%, frecuencia intermedia entre lo observado en poblaciones europeas (85,6%) y poblaciones africanas (94%) y asiáticas (99%).

Finalmente, para el polimorfismo rs4149056, la frecuencia del alelo C (15,7%) es similar a la observada en poblaciones europeas, asiáticas y nativo-americanas. Esta variante es prácticamente ausente en poblaciones africanas(49).

Respecto a la respuesta al MTX medida por la reducción del número de glóbulos blancos post-pulso de MTX, solamente la variante rs1051266 del gen SLC19A1 mostró una asociación estadísticamente significativa.

El genotipo AA de este polimorfismo presentó una menor respuesta al MTX en los pulsos 2 y 3 comparada a los individuos que presentaban a los individuos de genotipo AG o GG. El cambio de G por A implica un cambio de Histidina (CAC) por Arginina (CGC), cambio que podría afectar la función de la proteína ya sea a nivel de la eficiencia del transporte o de la afinidad por el MTX (51). Un estudio con células K62 transfectadas con las variantes His27 o Arg27 mostró que, aunque no significativo las células transfectadas con las variantes His27 presentan una menor tasa de entrada de MTX a la célula que las células transfectadas con la variante Arg27 (52). Adicionalmente otros trabajos han indicado que los individuos con el genotipo AA presentan una eliminación más lenta de MTX (51). En este estudio también se observó que los mayores niveles de MTX en plasma fueron asociados a una mayor toxicidad hepática, toxicidades no analizadas en este trabajo(11) (51). Adicionalmente, en otro estudio se observó un mayor grado de toxicidad en la médula ósea en individuos con el genotipo AA comparado con aquellos que presentaban las variantes AG o GG y un 50% más de probabilidad de permanecer en remisión comparado con las variantes GG o GA.(53).

Los resultados obtenidos en este trabajo deben de ser tomados con cautela teniendo en cuenta el bajo número de individuos con el genotipo AA y que la asociación fue observada solamente en los pulsos 2 y 3.

Considerando que los genes analizados participan en el metabolismo y transporte del MTX y previas asociaciones observadas con algunas de estas variantes, esperábamos encontrar alguna asociación entre la presencia de polimorfismos y la reducción de GB pre y post pulso de MTX. Esta situación podría ser debido al bajo número de individuos analizados como mencionamos previamente, a un efecto pequeño de estas variantes en la disponibilidad de MTX a nivel intracelular y a las altas dosis de MTX recibidas por los pacientes que pueden enmascarar el efecto de las variantes genéticas analizadas (28)(36,40).

7. Conclusiones y perspectivas

Todos los pacientes analizados resultaron ser portadores de al menos un alelo variante en los genes estudiados. En todos los casos las frecuencias obtenidas en el estudio fueron intermedias entre los valores observados en las poblaciones europeas y las poblaciones africanas o asiáticas. Sin embargo, siempre fueron más cercanas a las frecuencias observadas en las poblaciones europeas, en línea con la historia del Uruguay.

El análisis de los datos no evidenció una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de polimorfismos de los genes MTHFR, TYMS y SLCO1B1 y la respuesta al MTX medidas como cambio en el número de GB pre y post pulso. Sin embargo, el polimorfismo rs1051266 del gen SLC19A1 fue estadísticamente significativo en el pulso 2 y 3 post MTX con un valor-p menor a 0.05 (tabla 2).

Aunque observamos una asociación significativa con la variante rs1051266 del gen SLC19A1, los resultados obtenidos deben ser tomados con cautela.

Teniendo en cuenta que los valores de neutrófilos son expresados como un porcentaje de los glóbulos blancos totales consideramos que analizar solo los glóbulos blancos es una aproximación más acertada. Adicionalmente, consideramos que sería interesante analizar estos polimorfismos y en particular el polimorfismo rs1051266 en una muestra de mayor tamaño para validar los resultados observados. Finalmente, sería adecuado realizar un seguimiento de los pacientes que presentaron una menor respuesta al tratamiento con MTX y con el genotipo AA del polimorfismo rs1051266, para analizar los posibles efectos en la sobrevida de los individuos y el papel que pueden jugar los polimorfismos analizados.

8. Referencias bibliográficas

1. National Institutes of Health (NIH) - National Cancer Institute (NCI). Cánceres infantiles [Internet]. 2022 [citado 2022 nov 9]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/infantil#tipos-de-cancer-en-nios>.
2. Sociedad Americana Contra el Cáncer. ¿Qué es la leucemia linfocítica aguda? [Internet]. American Cancer Society. 2022. Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-linfocitica-aguda/acerca/que-es-leucemia-linfocitica-aguda.html>
3. Castillo L, Dabezies A, Dufort G, Pages C, Carracedo M, Castiglioni M, et al. Evolucion del cáncer pediátrico en Uruguay (1992-2011). Arch Pediatr Urug. :5.
4. Rodriguez B, Malimpensa D, da Luz JA, Soler AM. FG. FARMACOGENÉTICA. Journal of Basic and Applied Genetics. 2019 sep;30(1 (Suppl.)):123-30.
5. Soler Cantera AM. Farmacogenética de la leucemia linfoblástica aguda pediátrica en Uruguay. 2021; Available from: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/31470>
6. Atienza AL. Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. :11.
7. Sanchez LMM, Jaramillo LIJ, Hernández LFÁ, Restrepo FH, Mejía CR, Álzate JDV. Enfermedad Mínima Residual en leucemia: rompiendo el paradigma de remisión completa. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia [Internet]. 2018 nov;34(1). Available from: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/881>
8. Ortiz MAW. EVALUACIÓN DEL PROTOCOLO BFM-ALLIC 2009 EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA: 5 AÑOS DE EXPERIENCIA EN CARTAGENA. 2009;50.
9. Brunton L L. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 13ª. McGraw-Hill; 2018.
10. Quintanilla JI, Candel GR. Metotrexato: toxicidad pulmonar, hepática y hematológica. :8.
11. Lopez-Lopez E, Gutierrez-Camino A, Bilbao-Aldaiturriaga N, Pombar-Gomez M, Martin-Guerrero I, Garcia-Orad A. Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. Pharmacogenomics [Internet]. 2014 jul;15(10):1383-98. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/pgs.14.106>
12. Mena-Ramírez JP. Farmacogenómica del metotrexate: estrategia para una terapéutica más individualizada en pacientes con artritis reumatoide. 2008;144(5):3.
13. Gutierrez-Camino A, Lopez-Lopez E, Garcia-Orad A. SLC19A1 hot spot for MTX plasma concentration. :1.
14. Jaime-Fagundo DJC, Forrellat-Barrios M, Arencibia DA. Urgencias hematológicas. III. Toxicidad por metotrexato. :7.
15. Chiusolo P, Reddiconto G, Farina G, Mannocci A, Fiorini A, Palladino M, et al. MTHFR polymorphisms' influence on outcome and toxicity in acute lymphoblastic leukemia patients. Leuk Res. 2007;6.

16. Zahra FT, Nahid NA, Islam MdR, Al-Mamun MMdA, Apu MNH, Nahar Z, et al. Pharmacogenetic Variants in MTHFR Gene are Significant Predictors of Methotrexate Toxicities in Bangladeshi Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* [Internet]. 2020 feb;20(2):e58–e65. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2152265019322104>
17. de Jonge R, Hooijberg JH, van Zelst BD, Jansen G, van Zantwijk CH, Kaspers GJL, et al. Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* [Internet]. 2005 jul;106(2):717-20. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/106/2/717/21311/Effect-of-polymorphisms-in-folaterelated-genes-on>
18. Zahra FT, Nahid NA, Islam MR, Al-Mamun MMA, Apu MNH, Nahar Z, et al. Pharmacogenetic Variants in MTHFR Gene are Significant Predictors of Methotrexate Toxicities in Bangladeshi Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2020 nov;20(2):e58-65.
19. Jonge R de, Hooijberg JH, Zelst BD van, Jansen G, Zantwijk CH van, Kaspers GJL, et al. Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2005 nov;106(2):717-20.
20. Badell I. Aplicación de la farmacogenética a la individualización terapéutica en la leucemia linfoblástica aguda: presentación de caso clínico. :2.
21. Martínez-Echevarría MT, Casanueva-Calero K, Hernández-Acea B, Torres W, García-Menéndez G. Polimorfismo MTHFR A1298C en pacientes cubanos con trombofilia. 2019;6.
22. Moulik NR, Kumar A, Agrawal S, Mahdi AA, Kumar A. Effect of folate status and methylenetetrahydrofolate reductase genotypes on the complications and outcome of high dose methotrexate chemotherapy in north Indian children with acute lymphoblastic leukemia. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*. 2016;37(2):5.
23. Haase R, Elsner K, Merkel N, Stiefel M, Mauz-Körholz C, Kramm C, et al. High Dose Methotrexate Treatment in Childhood ALL: Pilot Study on the Impact of the MTHFR 677CT and 1298AC Polymorphisms on MTX-related Toxicity. *Klin Padiatr* [Internet]. 2012 abr;224(03):156-9. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0032-1304623>
24. Fukushima H, Fukushima T, Sakai A, Suzuki R, Nakajima-Yamaguchi R, Kobayashi C, et al. Polymorphisms of MTHFR Associated with Higher Relapse/Death Ratio and Delayed Weekly MTX Administration in Pediatric Lymphoid Malignancies. *Leuk Res Treatment*. :10.
25. Esmaili MA, Kazemi A, Faranoush M, Mellstedt H, Zaker F, safa M, et al. Polymorphisms within methotrexate pathway genes: Relationship between plasma methotrexate levels, toxicity experienced and outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Iran J Basic Med Sci* [Internet]. 2020 jun;23(6). Available from: <https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.41754.9858>
26. Mandola M v, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ, et al. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of

- the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res.* 2003 jun;63(11):2898-904.
27. Kawakami K, Watanabe G. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res.* 2003 sep;63(18):6004-7.
 28. Danenberg V. P. Pharmacogenomics of thymidylate synthase in cancer treatment. *Frontiers in Bioscience* [Internet]. 2004;9(1-3):2484. Available from: <https://imrpress.com/journal/FBL/9/4/10.2741/1410>
 29. Lenz HJ. Pharmacogenomics and colorectal cancer. *Annals of Oncology* [Internet]. 2004 oct;15:iv173–iv177. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419531684>
 30. Thomas F, Hoskins JM, Dvorak A, Tan BR, McLeod HL. Detection of the GC SNP and rare mutations in the 28-bp repeat of TYMS using gel-based capillary electrophoresis. *Pharmacogenomics* [Internet]. 2010 dic;11(12):1751-6. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/pgs.10.170>
 31. Cheok MH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia: A model for the pharmacogenomics of cancer therapy. Vol. 6, *Nature Reviews Cancer*. 2006. p. 117-29.
 32. Jekic B, Lukovic L, Bunjevacki V, Milic V, Novakovic I, Damnjanovic T, et al. 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. *Eur J Clin Pharmacol* [Internet]. 2013 mar;69(3):377-83. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00228-012-1341-3>
 33. Nief N, Morvan V le, Robert J. Involvement of gene polymorphisms of thymidylate synthase in gene expression, protein activity and anticancer drug cytotoxicity using the NCI-60 panel. *Eur J Cancer* [Internet]. 2007 mar;43(5):955-62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804907000135>
 34. Marsh S, Ameyaw MM, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, McLeod HL. Novel thymidylate synthase enhancer region alleles in African populations. *Hum Mutat.* 2000;16(6):528.
 35. Niedzielska E, Węclawek-Tompol J, Matkowska-Kocjan A, Chybicka A. The Influence of Genetic RFC1, MS and MTRR Polymorphisms on the Risk of Acute Lymphoblastic Leukemia Relapse in Children and the Adverse Effects of Methotrexate.
 36. Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, et al. A Polymorphism (80G-A) in the Reduced Folate Carrier Gene and Its Associations with Folate Status and Homocysteinemia. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2000 ago;70(4):310-5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096719200930348>
 37. Owen SA, Hider SL, Martin P, Bruce IN, Barton A, Thomson W. Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2013 jun;13(3):227-34. Available from: <https://www.nature.com/articles/tpj20127>
 38. Radtke S, Zolk O, Renner B, Paulides M, Zimmermann M, Möricke A, et al. Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia.

- Blood [Internet]. 2013 jun;121(26):5145-53. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/121/26/5145/31522/Germline-genetic-variations-in-methotrexate>
39. Owen SA, Hider SL, Martin P, Bruce IN, Barton A, Thomson W. Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2013 nov;13(3):227-34. Available from: <https://www.nature.com/articles/tpj20127>
 40. Laverdière C, Chiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajcinovic M. Brief report Polymorphism G 80 A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. 2002.
 41. Imanishi H, Okamura N, Yagi M, Noro Y, Moriya Y, Nakamura T, et al. Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. *J Hum Genet*. 2007 feb;52(2):166-71.
 42. Giletti Cateura A. Evaluación de la distribución en una población uruguaya de los polimorfismos MTHFR C677T, RFC G80A y el número de repetidos en tándem en el 5' UTR de TYMS. 2012; Available from: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/1420>
 43. Giletti A, Vital M, Lorenzo M, Cardozo P, Borelli G, Gabus R, et al. Methotrexate pharmacogenetics in Uruguayan adults with hematological malignant diseases. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 2017 nov;109:480-5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098717304943>
 44. Taylor ZL, Vang J, Lopez-Lopez E, Oosterom N, Mikkelsen T, Ramsey LB. Systematic review of pharmacogenetic factors that influence high-dose methotrexate pharmacokinetics in pediatric malignancies. Vol. 13, *Cancers*. MDPI; 2021.
 45. Ramsey LB, Moncrieffe H, Smith CN, Sudman M, Marion MC, Langefeld CD, et al. Association of SLCO1B1 *14 Allele with Poor Response to Methotrexate in Juvenile Idiopathic Arthritis Patients. *ACR Open Rheumatol*. 2019 mar 1;1(1):58-62.
 46. Giletti A, Esperon P. Genetic markers in methotrexate treatments. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2018 nov;18(6):689-703. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41397-018-0047-z>
 47. Otero DAM, Ferrari RP, Pons E, Lens D, Lisa E de, Dellepiane M, et al. Trombofilia y pérdida recurrente de embarazo. 2004;20:8.
 48. Giletti A, Esperon P. Genetic markers in methotrexate treatments. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2018 dic;18(6):689-703. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41397-018-0047-z>
 49. Ensembl genome browser 108 [Internet]. [citado 2022 nov 13]. Available from: <https://www.ensembl.org/index.html>
 50. Sans M, Figueiro G, Bonilla C, Bertoni B, Cappetta M, Artagaveytia N, et al. Genetic ancestry and social stratification in montevideo, Uruguay. *Rev Argent Antropol Biol*. 2020 dic 1;23(1):1-19.

51. Kotur N, Lazic J, Ristivojevic B, Stankovic B, Gasic V, Dokmanovic L, et al. Pharmacogenomic markers of methotrexate response in the consolidation phase of pediatric acute lymphoblastic leukemia treatment. *Genes (Basel)*. 2020 abr 1;11(4).
52. Whetstone JR, Gifford AJ, Witt T, Liu XY, Flatley RM, Norris M, et al. Single Nucleotide Polymorphisms in the Human Reduced Folate Carrier: Characterization of a High-Frequency G/A Variant at Position 80 and Transport Properties of the His 27 and Arg 27 Carriers 1 [Internet]. Available from: <http://aacrjournals.org/clincancerres/article-pdf/7/11/3416/2078459/df1101003416.pdf>
53. Gregers J, Christensen IJ, Dalhoff K, Lausen B, Schroeder H, Rosthøj S, et al. The association of reduced folate carrier 80G>A polymorphism to outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia interacts with chromosome 21 copy number. *Blood*. 2010 jun 10;115(23):4671-7.

9. Agradecimientos

Nos sentimos muy afortunados por la oportunidad de poder formar parte de esta investigación que consideramos de gran relevancia para nuestra formación académica en algo tan importante como es la investigación científica, la cual es un pilar para generar nuevos avances en el conocimiento.

Agradecemos a todo el equipo del Laboratorio de Genética Molecular Humana por recibirnos en su espacio de trabajo y su colaboración en la elaboración de este manuscrito, en especial a nuestros orientadores Dr. Julio Abayubá da Luz y Dra. Ana María Soler que nos acompañaron durante todo este proceso.