

Rol de los transportadores *ABCB1*, *ABCC4* y *ABCG2* en los niveles plasmáticos de Metotrexato en pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda

Laboratorio de Genética Molecular Humana, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional Litoral Norte, Universidad de la República
Mayo-Noviembre 2023

CICLO DE METODOLOGÍA CIENTÍFICA II 2023 - GRUPO N°113

Autores:

Br. Victoria Alonso¹

Br. Rosalba Gómez¹

Br. Mariana Muñoz¹

Br. Iván Richard¹

Br. Damaris Stéfani¹

Br. Wilson Tanoni¹

Orientadores: Gabriela Burgueño Rodríguez², Julio da Luz² y Ana María Soler²

¹Ciclo de Metodología Científica II 2023 - Facultad de Medicina - Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

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

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Tratamiento de la LLA: Protocolo BFM (2009)	3
1.2. Metotrexato en el tratamiento de la LLA	5
1.3. Transportadores de membrana dependientes de a ATP (ABC)	7
1.3.1. ABCB1 (miembro 1 de la subfamilia B de la proteína de unión a ATP)	7
1.3.2. ABCC4 (miembro 4 de la subfamilia C de la proteína de unión a ATP)	8
1.3.3. ABCG2 (miembro 2 de la subfamilia G de la proteína de unión a ATP)	8
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivo general	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. METODOLOGÍA	9
3.1. Tipo de estudio	9
3.2. Muestra de pacientes	10
3.3. Definición operacional de las variables	10
3.4. Determinación de las variantes genéticas	10
3.5. Tratamiento de datos	10
3.6. Consideraciones éticas	11
4. RESULTADOS	12
5. DISCUSIÓN	15
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	16
7. BIBLIOGRAFÍA	17
8. AGRADECIMIENTOS	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del Protocolo BFM 2009	4
Figura 2. Clasificación según grupos de riesgo de LLA	5
Figura 3. Protocolo de la fase de Consolidación	7
Figura 4. Gel de Electroforesis de Agarosa	12
Figura 5. Secuenciación de Sanger	12

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas de la muestra de pacientes	13
Tabla 2. Polimorfismos y toxicidad por MTX en cada pulso	14
Tabla 3. rs2231137 (<i>ABCG2</i>) y toxicidad por MTX, según la cantidad de MTX administrado	14

RESUMEN

Las leucemias constituyen las neoplasias más frecuentes en niños, siendo la leucemia linfoblástica aguda (LLA) la más frecuente a nivel mundial así como en Uruguay. El tratamiento de LLA en Uruguay sigue el protocolo BFM que incluye, entre otros fármacos, el metotrexato (MTX). Este puede causar reacciones adversas como hepatotoxicidad y mucositis, entre otras. Este estudio analizó la relación entre los polimorfismos rs2032582, rs9282564 del gen *ABCB1*, rs3765534 y rs11568658 del gen *ABCC4* y rs2231137 del gen *ABCG2* y los niveles plasmáticos de MTX 48 horas post-infusión durante la fase de consolidación en 204 pacientes pediátricos con LLA. La normalidad y la homogeneidad de varianzas de las variables fueron analizadas mediante el test Shapiro-Wilk y test Bartlett, respectivamente. La relación entre los distintos genotipos y la variable discreta toxicidad por MTX se analizó mediante el test de chi cuadrado. A su vez, la relación entre las variantes genéticas y la variable continua concentración de MTX a las 48hrs se analizó utilizando los test no paramétricos Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, según corresponda. Los resultados encontrados no evidenciaron una asociación significativa entre los distintos polimorfismos y la presencia o ausencia de toxicidad por MTX en ninguno de los cuatro pulsos. Sin embargo, se encontró una relación significativa entre la variante rs2231137 (*ABCG2*) y la toxicidad por MTX en el pulso total. Por otro lado, en el subgrupo de pacientes que recibieron 2 g/m^2 , se observó una relación significativa entre la variante en cuestión y el pulso total. Teniendo en cuenta la variabilidad entre pacientes en la eliminación de MTX sería conveniente ampliar este estudio a una muestra mayor, analizar otras variantes de estos genes así como otros genes involucrados en los procesos de absorción, distribución y eliminación, como los genes involucrados en el transporte al interior de la célula de MTX y en su metabolismo. Adicionalmente otra aproximación podría ser estudiar el *clearance* a nivel renal como indicador de toxicidad.

Palabras claves: Leucemia Linfoblástica Aguda, Farmacogenética, Metotrexato, *ABCB1*, *ABCC4*, *ABCG2*

ABSTRACT

Acute leukemia's are the most common neoplasms in children, being Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) the most common worldwide as well as in Uruguay. ALL treatment in Uruguay follows the BFM protocol that includes, among other drugs, methotrexate (MTX). This drug can cause adverse reactions as hepatotoxicity and mucositis, among others. This investigation analyzed the relationship between certain genetic polymorphisms (rs2032582, rs9282564 of the *ABCB1* gene, rs3765534 and rs11568658 of the *ABCC4* gene and rs2231137 of the *ABCG2* gene) and MTX plasma levels 48 hours post-infusion during the consolidation phase in 204 pediatric patients. Plasma MTX concentration levels among the different genotypes were analyzed using chi square for dichotomous discrete variables and nonparametric tests (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis) as appropriate. The normality and homogeneity of variances of the variables were analyzed using the Shapiro-Wilk test and the Bartlett test, respectively. The results did not show a significant association between the different polymorphisms and the presence or absence of MTX toxicity in each pulse. However, a significant relationship was found between the rs2231137 (*ABCG2*) variant and MTX toxicity in the total pulse. Hence, the sample was divided into two, according to the dose of MTX received (2 and 5 mg/m²). In those patients who received 2 mg/m², a significant relationship was observed between rs2231137 and the total pulse. Taking into account the patients' variability in the MTX elimination, it would be advisable to enlarge the study sample, analyze other variants of these genes, and other genes involved in the absorption, distribution and elimination processes of MTX and in its metabolism. Moreover, another approach could be to study renal clearance as an indicator of toxicity.

Keywords: Acute Lymphoblastic Leukemia, Pharmacogenomics, Methotrexate, *ABCB1*, *ABCC4*, *ABCG2*

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer es un problema prioritario de salud pública. Específicamente, Uruguay tiene las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer más altas de América Latina (1). En muchos países en desarrollo, tal como es el caso de Uruguay, el cáncer infantil es la tercera o cuarta causa de muerte entre niños (2). En particular, las leucemias agudas constituyen el grupo de neoplasias más frecuentes, tanto a nivel mundial como en Uruguay. En los últimos años, estos cánceres han sido objeto de estudio para la investigación y, a través de la medicina basada en evidencia, se han logrado importantes avances tanto en el diagnóstico precoz como en el tratamiento de los mismos (3).

Las leucemias constituyen un grupo de neoplasias que se caracterizan por una transformación maligna de una célula progenitora inmadura de la médula ósea (MO), denominada blasto, que se expande y forma un clon de células idénticas, que presentan una alta tasa de reordenamientos genéticos y proliferación (4). Según la estirpe celular en la cual ocurre la alteración, las leucemias pueden ser mieloblásticas o linfoblásticas. Estas últimas son aquellas cuya celularidad deriva de la estirpe linfoide, es decir, de linfocitos B y T. A su vez, las leucemias se diferencian en agudas, si la expansión clonal ocurre rápidamente, o crónicas, si lo hace lentamente (5).

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) se diagnostica cuando las células blásticas de origen linfoide son más del 20% del total de las células nucleadas de la MO o de las células no eritroides cuando el componente eritroide es mayor al 50%. La causa de la LLA continúa siendo desconocida (6). En Uruguay, la LLA comprende el 77,4% de todas las leucemias en la edad pediátrica. El pico de incidencia es entre 0 y 4 años, siendo más frecuente en niños que en niñas (7).

1.1. Tratamiento de la LLA: Protocolo BFM (2009)

En Uruguay, el tratamiento de la LLA pediátrica se lleva a cabo principalmente en el Servicio de Hemato-oncología Pediátrica del Centro Hospitalario Pereira Rossell (SHOP-CHPR), centro de referencia para esta enfermedad en el país. El protocolo utilizado es el del grupo Berlin Frankfurt Münster (BFM), al presente en su versión 2009 (8), el cual es una poliquimioterapia de dos años de duración (104 semanas) dividida en 5 etapas: inducción, intensificación, consolidación, reintensificación y mantenimiento (Figura 1).

Al momento del diagnóstico los pacientes son clasificados en tres grupos de riesgo (estándar, intermedio y alto) según determinadas características como la edad, cantidad de glóbulos blancos y presencia de ciertas alteraciones cromosómicas. Esta clasificación puede variar al día +8 del tratamiento según el número de blastos en sangre periférica del paciente. Asimismo, puede variar nuevamente al día +15 y +33 de acuerdo al porcentaje de blastos en MO. Al concluir la fase de inducción (día +33) el grupo de riesgo queda determinado (8) (Figura 2).

El objetivo de la fase de inducción (Figura 2, recuadro amarillo) es la remisión completa de la enfermedad mediante la destrucción de la mayor parte de células leucémicas. Dicha remisión se logra cuando las células blásticas representan menos del 5% de las células de la MO. Esta fase tiene una duración de 33 días. Una vez alcanzada la remisión, le siguen la fase de intensificación, consolidación y reintensificación (Figura 2, recuadros celeste, rojo y verde), destinadas a destruir las células malignas restantes y prevenir una recaída. La duración de la fase de intensificación y consolidación es entre 19 y 30 semanas dependiendo del grupo de riesgo del paciente, mientras que la fase de reintensificación dura 49 días para todos los pacientes.

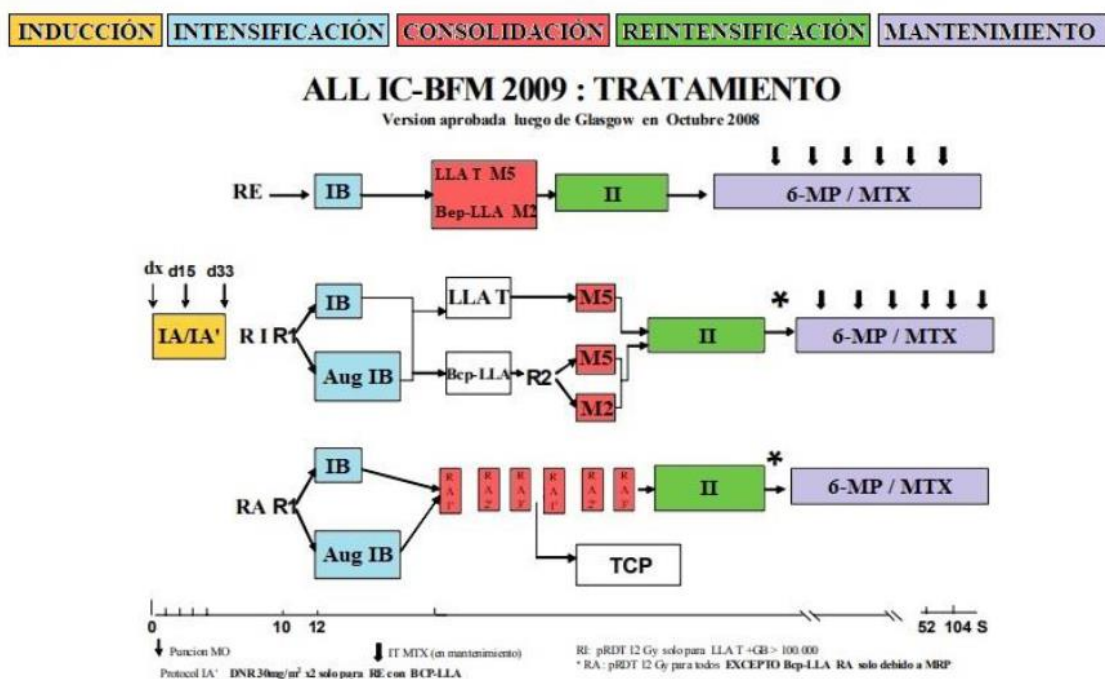


Figura 1. Esquema del Protocolo BFM 2009. Se muestran las fases del tratamiento y duración de cada una según el grupo de riesgo del paciente. En amarillo la fase de inducción, celeste la fase de intensificación, rojo la fase de consolidación, en verde la fase de reintensificación y en lila la fase de mantenimiento. RE: Riesgo estándar, RI: Riesgo intermedio y RA: Riesgo alto. R1/R2: Randomización. Gy: Radioterapia (Indicada solo para pacientes con LLAT o con infiltración del SNC). TCP: Trasplante de células madres (Imagen adaptada del International BFM Study Group, 2010).

Por último, la fase de mantenimiento (Figura 2, recuadro lila) comienza dos semanas después de finalizada la fase de reintensificación y dura entre 63 y 74 semanas, siendo la fase más larga del tratamiento. Una vez finalizada esta fase, el paciente alcanza el estado de “OFF”. Con el fin de detectar posibles recaídas, los pacientes acuden periódicamente al SHOP-CHPR para realizar reevaluaciones del estado de la MO durante 5 años.

CLASIFICACIÓN ALL IC-BFM 2009

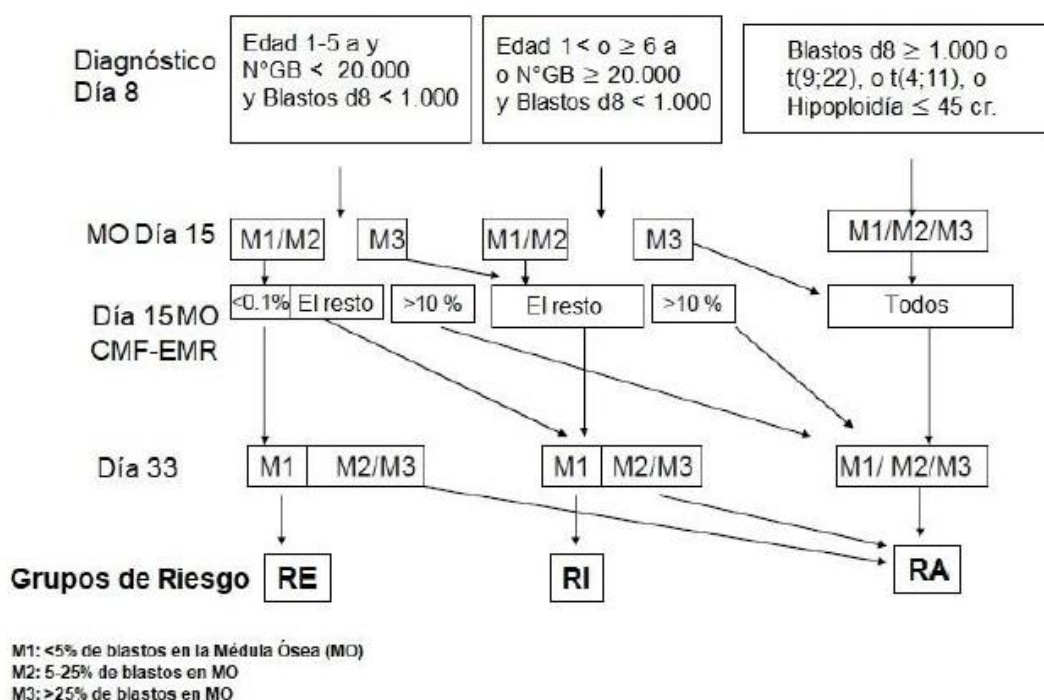


Figura 2. Clasificación según grupos de riesgo de LLA. Se muestran los criterios para la clasificación de los pacientes en los distintos grupos de riesgo. GB: Glóbulos blancos. MO: Médula ósea. CMF: Citometría de flujo. EMR: Enfermedad Mínima Residual. RE: Riesgo estándar. RI: Riesgo intermedio. RA: Riesgo alto. (Imagen adaptada del International BFM Study Group, 2010).

1.2. Metotrexato en el tratamiento de la LLA

El metotrexato (MTX) es uno de los pilares farmacológicos del tratamiento de la LLA pediátrica, utilizado en las cinco fases del mismo. Este fármaco es un antagonista del ácido fólico, que provoca la inhibición de la síntesis y reparación del ADN, mediante la disminución de la actividad de varias enzimas folato dependientes que intervienen en los mecanismos de proliferación celular (9).

La administración de MTX ha aumentado significativamente la tasa de supervivencia de los pacientes con LLA. Sin embargo, su administración causa, muchas veces, numerosos efectos

adversos y toxicidades, provocando la interrupción o abandono prematuro del tratamiento (6). De hecho, la administración de este fármaco ha sido asociada con la presencia de leucopenia, trombocitopenia, anemia, complicaciones pulmonares y gastrointestinales como, alveolitis, neumonitis, pérdida de apetito, náuseas, vómitos, dolor abdominal, inflamación y ulceración de la membrana mucosa bucal y de garganta, estomatitis, dispepsia y aumento de las enzimas hepáticas. Asimismo, se describen otras complicaciones menos frecuentes como dolor de cabeza, fatiga, somnolencia, parestesia, exantema, eritema y prurito (10).

El MTX puede ingresar a las células por el transportador de folato reducido SLC19A1 o por transportadores de aniones orgánicos, tal como el SLCO1B1. No obstante, cuando las concentraciones de MTX son muy elevadas, este puede entrar a la célula por difusión pasiva (6). Una vez dentro de la célula, el MTX se metaboliza dando lugar a su forma de mayor actividad, la poliglutamada (MTX-PGn). Las enzimas gamma glutamil hidrolasa (GGH) y folilpoliglutamato sintetasa (FPGS) son las encargadas de mantener un equilibrio entre ambas formas dentro de la célula. El MTX-PGn va a inhibir competitivamente a la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), como consecuencia de esta inhibición se impide formación de tetrahidrofolato (THF) que es el que aporta grupos de carbonos únicos para la síntesis de precursores del ADN (timidilato y purinas) y del ARN (11). De esta manera, provoca la muerte celular por apoptosis y la síntesis de purina quedará inhibida. Los tejidos con crecimiento más rápido y con mayor metabolismo celular, como por ejemplo las células de epitelio gastrointestinal y las células tumorales, son las más afectadas por la concentración intracelular y el efecto inhibitor del MTX (6).

La administración de MTX varía de acuerdo a las fases del tratamiento. En la fase de inducción, intensificación y reintensificación la aplicación del MTX es Intratecal. En cambio, en la fase de consolidación el MTX es administrado tanto de manera intratecal como por infusión en cuatro pulsos separados en dos semanas. La dosis del fármaco en esta fase varía según el riesgo del paciente y puede ser 2000 mg/m² o 5000 mg/m² (Figura 3). Por último, en la fase de mantenimiento la administración del MTX es vía oral (8).

Variantes en los genes que codifican para los transportadores y enzimas metabólicas del MTX pueden afectar el metabolismo y actividad del mismo (6). El estudio de estas variantes genéticas puede, potencialmente, determinar terapias farmacológicas personalizadas a cada paciente (9).

Consolidation Therapy

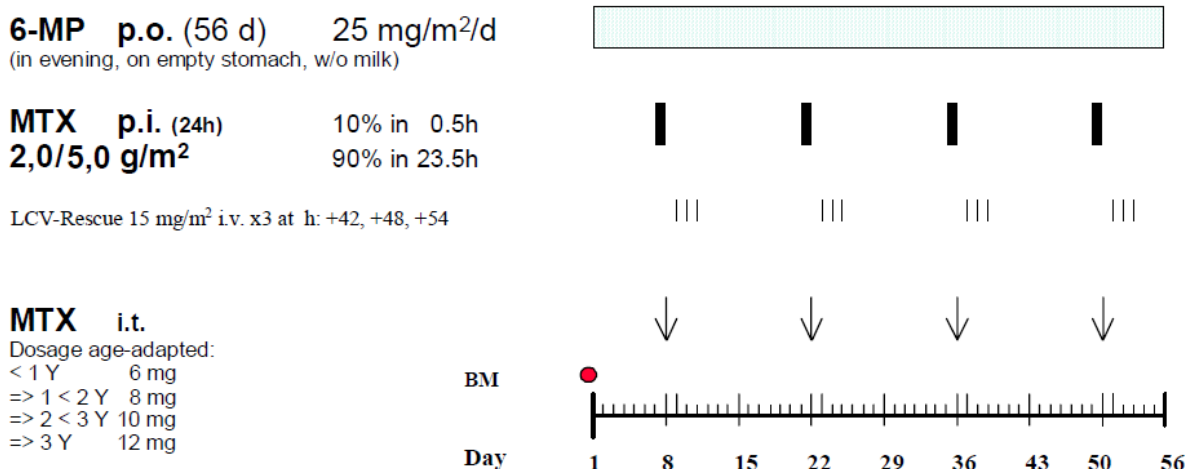


Figura 3. Protocolo de la fase de Consolidación. Se detalla la dosis, vía de administración y posología de los fármacos. 6-MP: 6 Mercaptopurina. MTX: Metotrexato. LCV: Leucovorina. p.o.: Administración oral. p.i.: infusión. i.t.: intratecal (Imagen adaptada del International BFM Study Group, 2010).

1.3. Transportadores de membrana dependientes de a ATP (ABC)

Los transportadores ABC son proteínas integrales de membrana que median la translocación de sustancias químicas, como por ejemplo fármacos, y otras moléculas hacia el exterior celular utilizando mecanismos activos (hidrólisis de ATP). Se expresan en el hígado, intestino delgado, placenta y barrera hematoencefálica, donde juegan un papel muy importante en la absorción, distribución y excreción. Estos se clasifican en siete familias basadas en el dominio de unión a nucleótidos y de dominios transmembrana (ABCA-ABCG) (12). Algunos ejemplos de ellos son ABCB1, ABCC4 y ABCG2, todos ellos capaces de transportar MTX.

1.3.1. ABCB1 (miembro 1 de la subfamilia B de la proteína de unión a ATP)

El gen *ABCB1* se ubica en el cromosoma 7 en la posición 7q21.12 y presenta 29 exones. Este codifica para la glicoproteína-P (gp-P) y se expresa en varios órganos como el riñón, intestino e hígado (13).

Diversos estudios han señalado que la presencia de variantes en el gen *ABCB1* puede influir en la respuesta o toxicidad por MTX. Un estudio con pacientes pediátricos con LLA en China reportó que los pacientes que presentaban el alelo C para la variante rs1128503 del gen *ABCB1* tuvieron un riesgo mayor de desarrollar mucositis oral y una estadía hospitalaria mayor

durante el tratamiento de LLA (14). Por otro lado, la variante rs1045642 (*ABCB1*) se encontró asociada significativamente con una reducción de los eventos adversos, debido al tratamiento con MTX de la artritis reumatoide (15). Otras variantes en este gen, tales como rs11568658 (G>T) y rs3765534 (C>T), podrían estar relacionadas con la administración de MTX y sus efectos adversos. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado ninguna asociación con estas variantes.

1.3.2. *ABCC4* (miembro 4 de la subfamilia C de la proteína de unión a ATP)

El gen *ABCC4* se ubica en el cromosoma 13 en la posición 13q32.1 y presenta 31 exones. Este codifica para una proteína implicada en la resistencia a fármacos (MRP4/*ABCC4*) y se expresa en variados órganos y tejidos como hígado, riñón, células de la sangre y del sistema inmune, entre otros (16).

Estudios previos, han reportado que el alelo C de la variante rs2274407 del gen *ABCC4* está asociado con menores dosis de MTX, mayor incidencia de eventos adversos a nivel hematológico y niveles elevados de LDH (indicando toxicidad hepática) (17). Por otra parte, una revisión sistemática del 2021, encontró que existen tres estudios que analizan la variante rs9516519 de este gen y su relación con el MTX, concluyendo una asociación entre esta y el *clearance* del fármaco (18). Además, el alelo T de esta variante se encontró asociado un mayor riesgo a desarrollar toxicidad por MTX (19). Al igual que en el gen *ABCB1*, existen otras variante que podrían ser relevantes para el ingreso de este fármaco a la célula. Entre ellas, el rs11568658 (G>T) y rs3765534 (C>T). Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado ninguna asociación con estas variantes.

1.3.3. *ABCG2* (miembro 2 de la subfamilia G de la proteína de unión a ATP)

El gen *ABCG2* se ubica en el cromosoma 4 en la posición 4q22.1, presenta 16 exones y codifica para la proteína de resistencia al cáncer de mama (*Breast cancer resistance protein*, BCRP). Se expresa principalmente en el intestino delgado. Su función es expulsar hacia el exterior celular diversos compuestos químicos como los fármacos MTX, Doxorubicina, aunrrubicina y esteroides sulfatados. Esto convierte al transportador en otro de los actores principales de la resistencia a múltiples fármacos (13).

Respecto a los efectos adversos, pacientes adultos portadores del alelo T (rs2231137) presentaron un aumento significativo del riesgo de sufrir distintas toxicidades de alto grado durante el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (13). Además, la variante rs2231142 del gen *ABCG2* se encontró significativa asociada con los niveles séricos de MTX (20).

Esta investigación pretende determinar si existe una relación entre distintas variantes de los genes *ABCB1*, *ABCC4* y *ABCG2* y la toxicidad por MTX en fase de consolidación, medida como la concentración plasmática de MTX 48 horas post infusión. De esta manera, si en este estudio se encuentra asociación entre alguna de las variantes, se podría sugerir un ajuste en la dosis del fármaco, con el fin de minimizar los efectos adversos sin afectar la respuesta terapéutica. Además, podría bajar la tasa de hospitalizaciones, generando un impacto positivo para la salud pública y la calidad de vida del paciente. Es decir, este estudio pretende fortalecer la idea de una terapia individualizada, basada en las características genéticas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Analizar el rol de variantes en los genes *ABCB1*, *ABCC4*, *ABCG2* sobre los niveles plasmáticos de Metotrexato en pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda en Uruguay.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar el genotipo de 50 pacientes pediátricos con LLA para las variantes rs3765534 y rs11568658 del gen *ABCC4*.
- Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes rs2032582 y rs9282564 del gen *ABCB1*, rs2231137 del gen *ABCG2*, y las variantes rs3765534 y rs11568658 gen *ABCC4*.
- Analizar la relación de cada una de las variantes genéticas y la concentración plasmática de MTX a las 48 horas de su administración en la fase de consolidación.

3. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de estudio

Esta investigación es un estudio observacional analítico retrospectivo, con un componente experimental. Los datos utilizados fueron extraídos previamente de las historias clínicas de los pacientes, los cuales se encontraban disponibles en una planilla electrónica que no tiene ningún dato que permita la identificación de los mismos.

3.2. Muestra de pacientes

Se utilizó una muestra de 204 pacientes pediátricos uruguayos de entre 6 meses y 19 años, diagnosticados con LLA, tratados con el protocolo BFM en el SHOP-CHPR.

3.3. Definición operacional de las variables

Se analizaron las concentraciones plasmáticas de MTX 48 horas post infusión en función de las variantes genéticas en los genes *ABCB1* (rs2032582 y rs9282564), *ABCC4* (rs3765534 y rs11568658) y *ABCG2* (rs2231137).

La variable “concentración plasmática de MTX 48 horas post infusión” es una variable cuantitativa continua, dependiente, mientras que las variantes genéticas son variables cualitativas nominales, independientes. A su vez, la variable “toxicidad por MTX” se definió de manera categórica (ausencia o presencia) según si la concentración de MTX 48 horas post infusión era mayor o $\leq 0,4$ $\mu\text{M/L}$. Por último, se definió la variable categórica “Pulso total” como la presencia de concentración plasmática de MTX a las 48hrs mayor a $0,4$ $\mu\text{M/L}$ en al menos uno de los cuatro pulsos.

3.4. Determinación de las variantes genéticas

Los genotipos para las variantes genéticas rs2032582 y rs9282564 del gen *ABCB1*, así como también para la variante rs2231137 del gen *ABCG2*, habían sido previamente determinados en el Laboratorio de Genética Molecular Humana. Además, se contaba con datos genotípicos de 150 pacientes para las variantes rs3765534 y rs11568658 del gen *ABCC4*. El genotipo de los restantes 50 pacientes fue determinado en esta investigación utilizando técnica de PCR y secuenciación de *Sanger*. Los *primers* utilizados para amplificar la variante rs3765534 fueron 5'-CAC CTC AGC CTC GCA TAC AAT AC-3' y 5'-GTC ACT GTA AAT GGA GGA GGA AA-3', mientras que para amplificar la variante rs11568658 se utilizaron los *primers* 5'-CTG CAT GAA TAC AAT TCT CTA CTT ACC-3' y 5'-CAC ATC ATT GGA CAG CAG ATT G-3'. En ambos casos, el ciclado utilizado fue: 95°C (2'), 35 ciclos de 95°C (20'') 60°C (25'') y 72°C (30''), 72°C (2').

3.5. Tratamiento de datos

Se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas para cada uno de las variantes por el método de conteo manual y se determinó si se encontraban en equilibrio de Hardy Weinberg (EHW), mediante el test de Chi-cuadrado.

Para los genes en los que se estudiaron más de dos variantes, se establecieron diplotipos utilizando los genotipos de los rs3765534 y rs11568658 para el gen *ABCC4* y los rs2032582 y rs9282564 para el gen *ABCB1*.

La normalidad y homogeneidad de varianzas de las variables fueron analizadas mediante los test el test Shapiro-Wilk y el test Bartlett, respectivamente.

La relación entre las variantes genéticas (genotipos y/o diplotipos) y la variable “toxicidad por MTX” en cada pulso (y para el pulso total) se analizó mediante el test de chi cuadrado. A su vez, para cada pulso, se analizó la relación entre cada una de las variantes genéticas y la variable “concentración de MTX a las 48hrs” mediante el test Mann Whitney o Kruskal Wallis.

En aquellos casos en donde se observaron diferencias significativas entre la variante genética y la toxicidad por MTX, se procedió a dividir la muestra en dos submuestras según la dosis de MTX administrada (2 o 5 g/m²), y se repitieron los análisis previamente descritos.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa Rstudio versión 2022.02.3 (21), con un intervalo de confianza del 95%.

3.6. Consideraciones éticas

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

En particular, esta investigación es parte de otro proyecto más amplio titulado “Caracterización fármaco-genómica de la toxicidad debida al MTX en niños con leucemia linfoblástica”, el cual fue aprobado por el Comité de Ética para la Investigación en seres humanos del CENUR Litoral Norte (Exp. N° 311170-001762-18) y financiado por el Fondo María Viñas en el año 2018 (FMV_3_2018_1_148458). Todos los datos de los pacientes fueron obtenidos previa firma de un consentimiento y/o asentimiento informado. Uno de los riesgos de estos proyectos es la pérdida de confidencialidad de los pacientes participantes. Al trabajar con una base de datos ya dissociada de los pacientes e identificada con un código alfanumérico, se minimizó fuertemente la posibilidad de la pérdida de confidencialidad. Los estudiantes que participaron en la investigación trabajaron con una base de datos realizada previamente donde no había datos que permitieran la identificación de los pacientes. A su vez, las muestras biológicas estaban identificadas bajo el código alfanumérico mencionado previamente. El manejo de 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, los riesgos éticos del desarrollo de este proyecto son mínimos y se han efectuado las acciones necesarias para minimizarlos.

4. RESULTADOS

Se logró amplificar correctamente los dos amplicones para la determinación de las variantes rs3765534 y rs11568658 (Figura 4 A y B), lo que posibilitó determinar satisfactoriamente el genotipo de los 50 pacientes para ambas variantes (Figura 5 A y B).

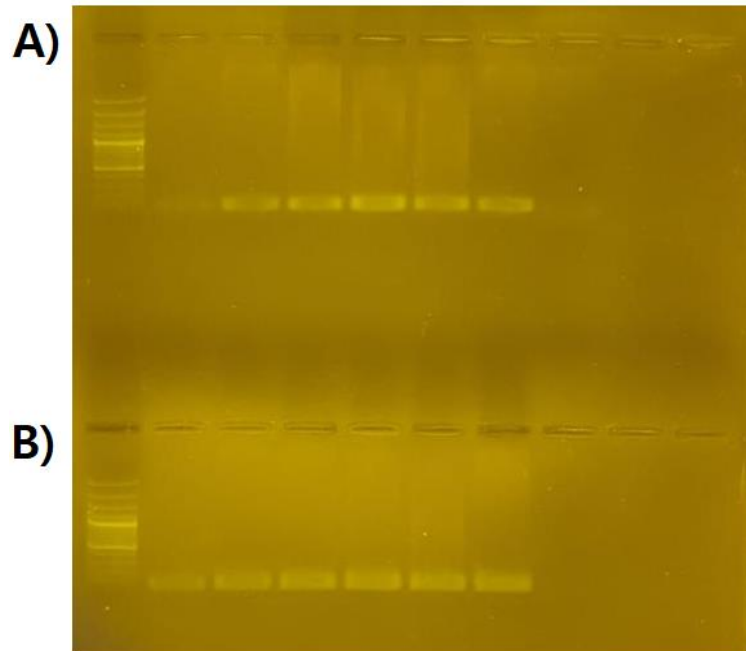


Figura 4. Gel de Electroforesis de Agarosa. Se observa la banda correspondiente al amplicón producto de la PCR realizada para la variante rs3765534 (A) y rs11568658 (B). Condiciones del Gel: 1X, 100V, 30 minutos. Marcador de peso molecular de 100pb (Carril 1).

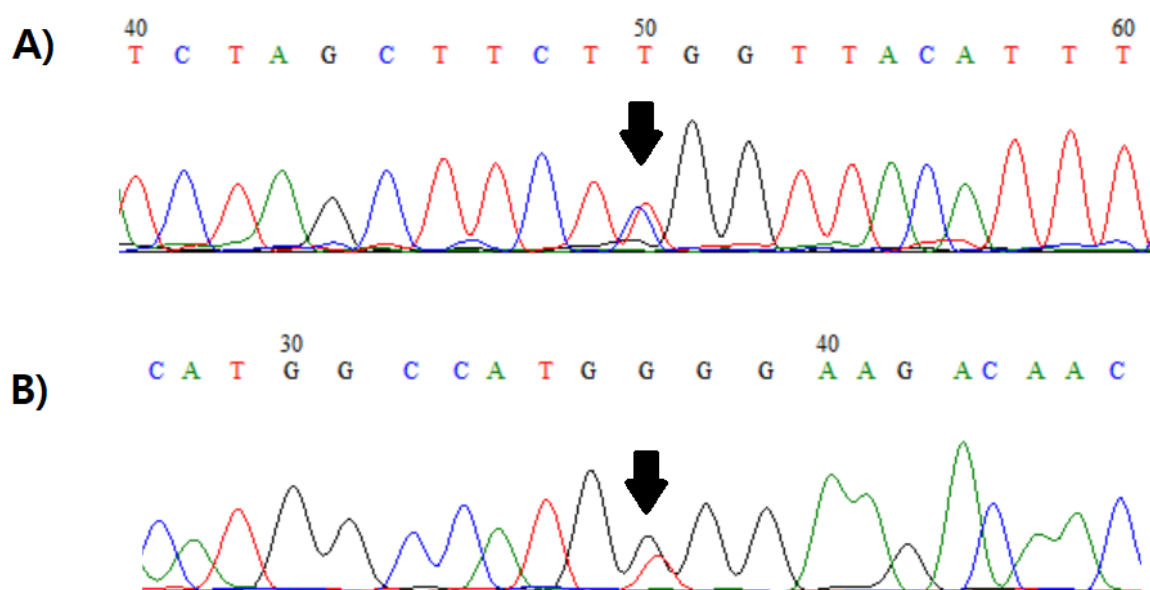


Figura 5. Secuenciación de Sanger. Cromatograma que muestra la variante rs3765534 (A) y rs11568658 en heterocigosis.

Las frecuencias genotípicas y alélicas de las cinco variantes analizadas se detallan en la Tabla 1. Todas ellas se encontraron en EHW. Los datos no presentaron una distribución normal, ni tampoco son homocedásticos.

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas de la muestra de pacientes

Gen y polimorfismo	Genotipo	N	Frecuencia	Alelo	Frecuencia	<i>p</i> -valor*
ABCC4 rs3765534	CC	179	0,922	C	0,961	0,696
	CT	15	0,078	T	0,039	
	TT	0	0			
ABCC4 rs11568658	GG	183	0,938	G	0,969	0,462
	GT	12	0,062	T	0,031	
	TT	0	0			
ABCG2 rs2231137	GG	109	0,694	G	0,838	0,673
	AG	45	0,286	A	0,162	
	AA	3	0,019			
ABCB1 rs9282564	TT	153	0,885	T	0,942	0,855
	TC	20	0,115	C	0,058	
	CC	0	0			
ABCB1 rs2032582	GG	56	0,359	G	0,612	0,775
	TG	75	0,481	T	0,369	
	TT	19	0,122	A	0,019	
	AG	4	0,026			
	TA	2	0,013			
	AA	0	0			

N: Número de individuos. * *p*-valor para el test de chi cuadrado para Equilibrio de Hardy-Weinberg

La relación entre los distintos polimorfismos y la presencia o ausencia de toxicidad por MTX en cada pulso no evidenciaron resultados significativos. Respecto al pulso total, los resultados evidenciaron una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de toxicidad por MTX y la variante rs2231137 del gen *ABCG2* (Tabla 2).

Para el caso del polimorfismo rs2231137 del gen *ABCG2*, no se determinaron relaciones significativas en ninguno de los 4 pulsos tanto para aquellos pacientes que recibieron 2g/m² como 5g/m².

Sin embargo, en aquellos pacientes que recibieron 2 g/m², se observó una relación significativa entre la variante en cuestión y el pulso total (Tabla 3). La distribución de los genotipos es significativamente diferente entre los individuos con y sin toxicidad por MTX. La frecuencia de toxicidad por MTX es significativamente mayor en los individuos del genotipo GG comparado con los AG y AA.

Tabla 2. Polimorfismos y toxicidad por MTX en cada pulso

Gen y polimorfismo	Genotipo	PULSO 1			PULSO 2			PULSO 3			PULSO 4			PULSO TOTAL
		A	P	p-valor*	A	P	p-valor*	A	P	p-valor*	A	P	p-valor*	p-valor*
ABCC4 rs3765534	CC	72	36		74	35		78	23		72	31		
	CT	5	5	0,477	6	3	1,000	7	0	0,344	5	4	0,606	1,000
	TT	0	0		0	0		0	0		0	0		
	NA	86			86			96			92			
ABCC4 rs11568658	GG	69	41		76	34		78	22		72	33		
	GT	7	0	0,111	4	4	0,465	4	3	0,415	6	2	1,000	1,000
	TT	0	0		0	0		0	0		0	0		
	NA	87			86			97			91			
ABCG2 rs2231137	GG	44	22		40	24		46	11		42	19		
	AG	15	4	0,306	17	4	0,140	17	3	0,654	14	7	0,495	0,038
	AA	3	0		3	0		3	0		3	0		
	NA	116			116			124			119			
ABCB1 rs9282564	CC	0	0		0	0		0	0		0	0		
	TC	9	4	1,000	7	5	0,552	10	1	0,575	7	5	0,641	2,000
	TT	63	28		65	26		66	18		60	26		
	NA	100			101			109			106			
ABCB1 rs2032582	GG	24	9		26	8		26	4		24	9		
	TG	31	14		28	15		31	8		27	13		
	TT	6	3	0,904	6	4	0,379	8	1	0,216	7	3	0,566	0,295
	AG	1	0		1	0		1	0		0	1		
	TA	1	0		0	1		0	1		1	0		
	AA	0	0		0	0		0	0		0	0		
	NA	115			115			124			119			

A: Número de individuos con ausencia de toxicidad por MTX. P: Número de individuos con presencia de toxicidad por MTX. *: p-valor para el test de Chi cuadrado

Tabla 3. rs2231137 (ABCG2) y toxicidad por MTX, según la cantidad de MTX administrado

	PULSO 1				PULSO 2				PULSO 3				PULSO 4				PULSO TOTAL			
			p-valor				p-valor				p-valor				p-valor				p-valor	
	P	A	*	**	P	A	*	**	P	A	*	**	P	A	*	**	P	A	*	**
2 g/m²																				
GG	6	27			7	23			2	28			7	23			14	16		
AG	1	7	0,68	0,91	0	10	0,16	0,81	0	10	0,63	0,45	0	11	0,14	0,45	1	10	0,03	NA
AA	0	3			0	3			0	3			0	3			0	3		
5 g/m²																				
GG	16	17			17	17			9	18			12	19			26	9		
AG	3	8	0,38	0,56	4	7	0,66	0,20	3	7	1,00	0,68	7	3	0,17	0,31	8	3	1,00	NA
AA	0	0			0	0			0	0			0	0			0	0		

A: Número de individuos con ausencia de toxicidad por MTX. P: Número de individuos con presencia de toxicidad por MTX. *: p-valor para el test de Chi cuadrado. **: p-valor para el test de Mann-Whitney o Kruskal Wallies entre los genotipos y la concentración de MTX como variable continua

Por otro lado, el análisis de diplotipos y la toxicidad por MTX no arrojó resultados significativos (datos no mostrados).

5. DISCUSIÓN

La variabilidad entre los pacientes en las concentraciones de MTX en plasma a las 48 horas post-infusión puede deberse a múltiples causas. Para que un fármaco alcance, en su lugar de acción, la concentración capaz de generar un efecto terapéutico o tóxico, diversos procesos como absorción, distribución y excreción deben ocurrir (11).

La concentración de MTX en plasma a las 48 horas puede ser tomada como un indicador de la velocidad de su eliminación. Valores mayores a 0.4 $\mu\text{M/L}$ son indicadores de una eliminación más lenta de este fármaco y por ende, un indicador de posible toxicidad. El MTX es eliminado fundamentalmente a nivel renal y, en menor medida, a nivel hepático (18). Por esta razón, la eliminación más lenta del MTX podría explicarse por genes que actúan a nivel renal.

Distintos transportadores, tanto de entrada como de salida, actúan en diferentes tejidos u órganos. A nivel hepático, el MTX ingresa principalmente por los transportadores SLC1B1 y SLC19A1 y es eliminado a nivel biliar por los transportadores ABCB1 y ABCC2. Por otra parte, una fracción es reintroducida al plasma por los transportadores ABCC3 y ABCC4. Finalmente, a nivel renal, los transportadores de entrada utilizados por este fármaco son SLC22A6 y SLC22A8, mientras que los de salida son ABCC4, ABCC2 y ABCG2 (18).

Respecto a la variante rs9282564 del gen *ABCB1*, a diferencia de lo reportado por Burgueño-Rodríguez, quien encuentra una asociación entre esta variante y la toxicidad neurológica (13), en el presente estudio no se encontró una relación con la toxicidad por MTX en ninguno de los cuatro pulsos. Aunque el transportador ABCB1 interviene en la eliminación de MTX tanto a nivel neuronal como a nivel biliar, la baja fracción eliminada a nivel biliar puede influir en la falta de asociación encontrada en este trabajo (11). Por otro lado, como fue mencionado previamente, la concentración de MTX puede estar influenciada por varios factores. Por tanto, mutaciones en otros genes de la vía metabólica pueden estar influyendo en la concentración plasmática de MTX. Además, otros autores reportan otros factores involucrados en la eliminación renal de MTX tales como la edad, el sexo y la raza (22). Finalmente, la falta de asociación también podría deberse a que el número de individuos analizados es relativamente bajo.

En relación al gen *ABCC4*, una revisión sistemática aportó evidencias de que cuatro polimorfismos de este gen (rs10219913, rs7317112, rs9516519 y rs868853) podrían alterar la eliminación de MTX (18). Sin embargo, en el presente estudio no se encontró asociación significativa entre las variantes rs3765534 y rs11568658 del gen *ABCC4* y la toxicidad por MTX.

Teniendo en cuenta que las variantes analizadas en este estudio no fueron las mismas que las reportadas por Taylor et al. (2021), es posible suponer que no todas las variantes del gen *ABCC4* alteran la eliminación de MTX.

Por último, en relación al gen *ABCG2*, la presencia de eventos de eliminación lenta de MTX (toxicidad por MTX) fue significativamente mayor entre los individuos de genotipo GG (rs2231137) comparada con los individuos de genotipo AG y AA. Esta misma relación fue detectada cuando se analizó la submuestra compuesta por pacientes a los que se les administró 2 g/m². Teniendo en cuenta que a mayor dosis de MTX administrada el transportador podría saturarse más fácilmente aumentando el riesgo de toxicidad por este fármaco, este hallazgo fue inesperado. Este resultado hace suponer que podrían existir otras variantes genéticas involucradas en lo que respecta a la saturación del transportador. Además, este resultado debe tomarse con cautela pues este análisis fue realizado con menos de 100 pacientes, ya que los restantes no contaban con datos de genotipos y/o datos de concentraciones plasmáticas de MTX post infusión (Tabla 3). Por otro lado, según la revisión sistemática antes mencionada, la variante rs2231142 del gen *ABCG2* está asociada con una excreción renal retardada de MTX (18). Por tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio podrían estar siendo influenciados por este fenómeno.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La presencia de eventos de eliminación lenta de MTX (toxicidad de MTX) fue significativamente mayor entre los individuos de genotipo GG (rs2231137) del gen *ABCG2* comparados con los individuos de genotipo AG y AA. Esta asociación fue también observada en la submuestra de pacientes que reciben 2 g/m² de MTX, pero no en la de 5 g/m².

Las variantes de los demás genes analizados no mostraron relación con la toxicidad por MTX. Esta falta de relación podría deberse a varios factores:

- a) Estas variantes no presentan un efecto relevante en la eliminación de MTX.
- b) Estas variantes presentan un efecto pequeño que no puede ser detectado en este estudio.
- c) El tamaño de la muestra no es el adecuado para detectar los efectos de estas variantes.

Teniendo en cuenta la variabilidad entre pacientes en la eliminación de MTX sería conveniente ampliar este estudio a una muestra mayor, analizar otras variantes de estos genes así como

otros genes involucrados en los procesos de absorción, distribución y eliminación, como los genes involucrados en el transporte de MTX al interior de la célula y en su metabolismo.

Adicionalmente, otra aproximación podría ser estudiar el *clearance* a nivel renal como indicador de toxicidad.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Garau MN, Alonso R, Musetti C, Barrios E. Incidencia y mortalidad de cáncer en Uruguay: 2013-2017. Colomb Méd (Cali), 2022; 53(1):e2014966 disponible en: <https://doi.org/10.25100/cm.v53i1.4966>
2. Castillo Luis, Dabezies Agustín, Dufort Gustavo, Pages Carolina, Carracedo Maria, Castiglioni Mariela et al . Evolucion del cáncer pediátrico en Uruguay (1992-2011). Arch. Pediatr. Urug. [Internet]. 2012 Mar [citado 2023 Mayo 10] ; 83(1): 26-30. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-12492012000100006&lng=es.
3. Masetti R. Avances en la terapia de la leucemia infantil. Ambienteciencias [Internet]. 2018 [citado el 26 de mayo de 2023];5–20. e1988-3021 Disponible en: <http://193.146.99.90/handle/10612/7680>
4. Atienza, A. L. Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. Pediatr. Integr [internet].2012 [citado el 26 de mayo de 2023]; 17(6), 453-462. Disponible en: <https://www.pediatriaintegral.es/numeros-anteriores/publicacion-2012-07/leucemias-leucemia-linfoblastica-aguda/>
5. E. Agil, I. Corría-Milán, L. Cruz. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA EN EDAD PEDIÁTRICA. Segundo Congreso Virtual de Ciencias Básicas Biomedicas en Granma.[Internet]; 20 de abril de 2021 [consultado el 10 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://cibamanz2021.sld.cu/index.php/cibamanz/cibamanz2021/paper/viewFile/750/490>
6. Soler Cantera AM. Farmacogenética de la leucemia linfoblástica aguda pediátrica en Uruguay. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA.; 2021.
7. Dufort y Álvarez Gustavo. Epidemiología del cáncer en niños y adolescentes en Uruguay: 2008-2012. Un estudio de registro poblacional. Arch. Pediatr. Urug. [Internet]. 2021 Jun [citado 2023 Nov 15] ; 92(1): e202. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-12492021000101202&lng=es. Epub 01-Jun-2021. <https://doi.org/10.31134/ap.92.1.3>.
8. International BFM Study Group [Internet]. International BFM Study Group; [consultado el 27 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://bfminternational.wordpress.com/>
9. Xu M, Wu S, Wang Y, Zhao Y, Wang X, Wei C, et al. Association between high-dose methotrexate-induced toxicity and polymorphisms within methotrexate pathway genes in acute lymphoblastic leukemia. Front Pharmacol [Internet]. 2022;13. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2022.1003812>

10. Principios Activos - Metotrexato, antineoplásico (L01BA01) [Internet]. Vademecum; [Fecha de actualización desconocida; consultada en 27 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.vademecum.es/principios-activos-metotrexato,+antineoplasico-l01ba01>
11. PharmGKB [Internet]. PharmGKB. [citado el 15 de noviembre de 2023]. Disponible en: <https://www.pharmgkb.org/>
12. Bautista B. Estudio de las variantes alélicas (rs1042642 y rs2032582) en el gen abcb1 y de la variante (rs2231142) en el gen abcg2 en pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda [tesis de grado]: universidad nacional autonoma de mexico
13. Burgueño-Rodríguez G. Farmacogenética de la Leucemia Linfoblástica Aguda pediátrica en Uruguay: eventos adversos vinculados a fármacos de la fase de inducción. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA.; 2022.
14. Liu S-G, Gao C, Zhang R-D, Zhao X-X, Cui L, Li W-J, et al. Polymorphisms in methotrexate transporters and their relationship to plasma methotrexate levels, toxicity of high-dose methotrexate, and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* [Internet]. 2017;8(23):37761–72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.17781>
15. Torres RP, Santos FP, Branco JC. Methotrexate: Implications of pharmacogenetics in the treatment of patients with Rheumatoid Arthritis. *ARP Rheumatol* [Internet]. 2022 [citado el 29 de mayo de 2023];1(3):225–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35724450/>
16. ABCC4 ATP binding cassette subfamily C member 4 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 29 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10257>
17. Gervasini G, de Murillo SG, Jiménez M, de la Maya MD, Vagace JM. Effect of polymorphisms in transporter genes on dosing, efficacy and toxicity of maintenance therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Gene* [Internet]. 2017;628:72–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.025>
18. 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. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021;13(11):2837. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13112837>
19. Lopez-Lopez E, Ballesteros J, Piñan MA, Sanchez de Toledo J, Garcia de Andoin N, Garcia-Miguel P, et al. Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: A new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics* [Internet]. 2013;23(2):53–61. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1097/fpc.0b013e32835c3b24>
20. Li M, Kong X-Y, Wang S-M. Effects of splicing-regulatory polymorphisms in ABCC2, ABCG2, and ABCB1 on methotrexate exposure in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2023;91(1):77–87. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-022-04498-0>
21. Equipo RStudio (2020). RStudio: Desarrollo integrado para R. RStudio, PBC, Boston, MA, URL <http://www.rstudio.com/>
22. Treviño LR, Shimasaki N, Yang W, Panetta JC, Cheng C, Pei D, et al. Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J Clin Oncol* [Internet]. 2009;27(35):5972–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2008.20.4156>

8. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos agradecer al ciclo Metodología Científica II por adentrarnos en el mundo de la investigación y darnos las herramientas necesarias para dar nuestros primeros pasos.

En segundo lugar, queremos agradecer al Laboratorio de Genética Molecular Humana (Departamento de Ciencias Biológicas Cenur – Litoral Norte) por ser los únicos en recibirnos en su lugar de trabajo.

Agradecemos sinceramente al Dr. Julio da Luz, Dra. Ana María Soler y MSc . Gabriela Burgueño Rodríguez por su invaluable dedicación y orientación durante la realización de esta monografía. Su apoyo y conocimientos han sido fundamentales para lograr el objetivo de este proyecto.