



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL -CIIDIR-IPN
DURANGO

**Asociación de los Polimorfismos Genéticos de Folilpoliglutamil
sintetasa (FPGS), RFC1, ABCB1, ABCC5 y Xantina Oxidasa (XO) con la
Farmacocinética de Metotrexate (MTX) y la Respuesta al Tratamiento en
Pacientes Pediátricos con LLA**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

M. en C. FAUSTO LEONARDO ZARUMA TORRES

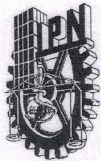
Director: Dr. C. Ismael Antonio Lares Asef

Codirector: Dr. C. Miguel Ángel Reyes López.

Victoria de Durango, DGO

JUNIO 2016

SIP 14



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 13:30 horas del día 19 del mes de Abril del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del: CIIDIR-IPN Unidad Durango para examinar la tesis titulada:

Asociación de los polimorfismos genéticos de la Foliopoliglutamato Sintetasa (FPGS), Transportador Reducido de Folatos (RFC), ABCB1, ABCC5 y Xantina Oxidasa (XO) con la farmacocinética de Metotrexate (MTX) y la respuesta al tratamiento en pacientes pediátricos con LLA.

Presentada por la alumna:

ZARUMA

TORRES

FAUSTO LEONARDO

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

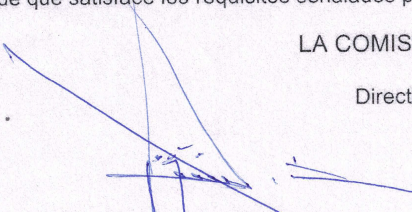
B	1	2	0	6	9	8
---	---	---	---	---	---	---

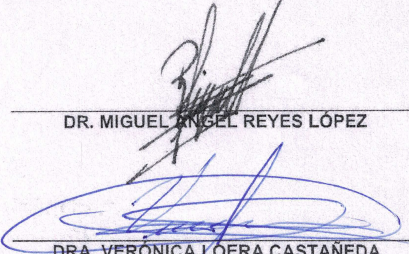
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

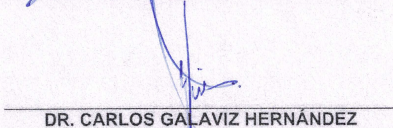
Directores de tesis


 DR. JOSÉ ISMAEL ANTONIO LARES ASEF

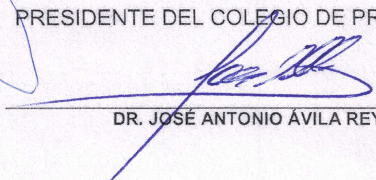

 DR. MIGUEL ÁNGEL REYES LÓPEZ

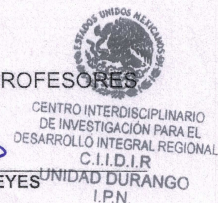

 DRA. MARTHA GUADALUPE SOSA MACÍAS


 DRA. VERÓNICA LOERA CASTAÑEDA


 DR. CARLOS GALAVIZ HERNÁNDEZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


 DR. JOSÉ ANTONIO ÁVILA REYES



SIP 13



SIP-13-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

*ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS*

México, D.F. a 03 de Septiembre del 2013

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Durango en su sesión ordinaria No. 9 celebrada el día 03 del mes de Septiembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

ZARUMA

TORRES

FAUSTO LEONARDO

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre (s)

Con registro:

B	1	2	0	6	9	8
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Asociación de los polimorfismos genéticos de la Folilpoliglutamato Sintetasa (FPGS), Transportador Reducido de Folatos (RFC), ABCB1, ABCC5 y Xantina Oxidasa (XO) con la farmacocinética de Metotrexate (MTX) y la respuesta al tratamiento en pacientes pediátricos con LLA.

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

Dr. José Ismael Antonio Lares Asef y Dr. Miguel Ángel Reyes López

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en: CIIDIR-IPN Unidad Durango

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dr. José Ismael Antonio Lares Asef

Aspirante

M. en C. Fausto Leonardo Torres Zaruma

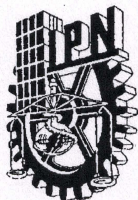
Dr. Miguel Ángel Reyes Flores

Presidente del Colegio

Dr. José Antonio Avila Reyes

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
COMISIÓN INTERDISCIPLINARIA
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
I.P.N.

CESIÓN DERECHOS



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día **19** del mes de **abril** del año **2016** el que suscribe **Fausto Leonardo Zaruma Torres** alumno del Programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**, con número de registro **B120698**, adscrito al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. CIIDIR-IPN Unidad Durango**, manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. José Ismael Antonio Lares Asef** y del **Dr. Miguel Ángel Reyes López** y cede los derechos del trabajo titulado “**Asociación de los polimorfismos genéticos de la Folilpoliglutamato Sintetasa (FPGS), Transportador Reducido de Folatos (RFC), ABCB1, ABCC5 y Xantina Oxidasa (XO) con la farmacocinética de Metotrexate (MTX) y la respuesta al tratamiento en pacientes pediátricos con LLA.**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones fausto.zaruma@ucuenca.edu.ec, ismaelares@yahoo.com y mareyesl@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

FAUSTO LEONARDO ZARUMA TORRES

LUGAR DE REALIZACIÓN

Esta investigación fue realizada con el apoyo del CONACYT en el Laboratorio de Genómica Aplicada del CIIDIR-DGO con la dirección del Dr. Ismael Lares Asef y en el Centro Estatal de Cancerología- CECAN de la SSA, Durango con la co-dirección del Dr. Aarón Reyes Espinoza, y en el Centro Oncológico Pediátrico de Baja California de la Fundación Castro Limón con el apoyo del Dr. Horacio Almanza Reyes y el Lic. Pedro Cruz Camarena.

DEDICATORIA

A la memoria de mi hermano Jorge Antonio

A mi constante bendición, mi madre

A mis hermanos, y familia

Y especialmente a mis 4 motivaciones: Cris, Pablito, Javi y

Christian

ÍNDICE GENERAL

GLOSARIO.....	VI
RELACIÓN DE TABLAS	XI
RELACIÓN DE FIGURAS	XIII
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XV
I. CAPITULO.....	1
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
1.1. Leucemia linfoblástica aguda (LLA)	3
1.2. Etiología	3
1.3. Diagnóstico	5
1.4. Manejo terapéutico de LLA y uso de Metotrexate	5
1.5. Metotrexate	7
1.5.1. Características.....	7
1.5.2. Farmacocinética y Farmacodinamia del MTX.....	8
1.6. Farmacogenética y reacciones adversas.....	9
1.7. Gen de la Folilpoliglutamil Sintetasa (FPGS), actividad catalítica y su influencia en el metabolismo de MTX	9
1.7.1 Polimorfismos genéticos de <i>FPGS</i>	11
1.8. Actividad de la xantina oxidasa y su relación con el MTX.....	12
1.8.1. Polimorfismos genéticos del gen de <i>XO</i>	13
1.9.1. Transportadores de la familia de receptores de folato-RFC1 y COL18A1	15
1.9.2. Participación de las proteínas involucradas en la resistencia a fármacos (MDR1 y MRP5)	15
1.10. Farmacocinética poblacional, farmacogenética y medicina personalizada	19
1.11. Características de la modelación de farmacocinética poblacional.	20

1.12. JUSTIFICACIÓN	22
1.13. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	22
1.14. HIPÓTESIS	23
II. OBJETIVOS	24
General	24
Específicos	24
III. ARTÍCULO 1	25
Association of <i>ABCB1</i> , <i>ABCC5</i> and <i>Xanthine Oxidase</i> Genetic Polymorphisms with Methotrexate Adverse Reactions in Mexican Pediatric Patients with ALL	25
3.1. Abstract	25
3.2. Introduction	26
3.3. Methods	27
3.3.1. Genotyping	28
3.3.2. Pharmacovigilance	28
3.3.3. Statistical Analyses	29
3.4. Results	29
3.4.1. Genotyping results	29
3.4.2. Pharmacovigilance results	30
3.4.3. Classification of ADRs by NCI nomenclature:	30
3.5. Discussion	31
3.6. Conclusion	33
3.7. References	34
IV. ARTÍCULO 2	43
Impacto de polimorfismos genéticos de la vía metabólica del metotrexato sobre la sobrevida de niños mexicanos con leucemia linfoblástica aguda (LLA)	43
4.1. Resumen	43
4.2. Introducción	45
4.3. Métodos	46

4.3.1. Pacientes y controles.....	46
4.3.2. Genotipificación	47
4.3.3 Determinación de la sobrevida libre de enfermedad (SLE) y sobrevida total (ST).....	47
4.3.4. Análisis estadístico	47
4.4. Resultados	48
4.4.1. Características generales de los pacientes y controles.	48
4.4.2. Resultados de genotipos	48
4.4.3. Diferencias de la distribución genotípica y alélica de pacientes con LLA y del riesgo de padecer LLA.	49
4.4.4. Resultados de análisis de sobrevida.....	49
4.4.5. Asociación de los polimorfismos genéticos con la mortalidad	50
4.5. Discusión	51
4.6. Conclusión	54
4.7. Referencias.....	55
V. MANUSCRITO 1	70
Genetic polymorphisms encoding to folate transporters as predictors of increased risk of acute lymphoblastic leukemia occurrence.	70
5.1. Abstract.....	70
5.2. Introduction	71
5.3. Materials and Methods:.....	72
5.3.1. General study design	72
5.3.2. Genotyping	72
5.3.3. Statistical Analyses	73
5.4. Results	73
5.4.1. Genotyping results.....	74
5.4.2. Results of association between polymorphisms with ALL.....	74
5.4.3. Results of association between genetic binary combinations of polymorphisms with ALL	74

5.4.4. Results of analysis of artificial neural network and logistic regression. .	75
5.5. Discussion.....	75
5.6. Conclusion	77
5.7. References.....	78
VI. MANUSCRITO 2	87
Asociación de los polimorfismos genéticos de <i>FPGS rs1544105</i> y <i>rs4451422</i> sobre la farmacocinética poblacional de MTX en bajas dosis en niños con LLA	87
6.1. Resumen.....	87
6.2. Introducción.....	89
6.3. Materiales y métodos	89
6.3.1. Pacientes	89
6.3.2. Genotipificación	90
6.3.3. Farmacocinética poblacional del metotrexate	90
6.3.4. Análisis farmacocinético poblacional de MTX.....	91
6.3.5. Modelo estadístico	92
6.4. Resultados	94
6.4.1. Resultados de genotipo	95
6.4.2. Resultados de farmacocinética poblacional.....	95
6.5. Discusión	103
6.6. Conclusiones.....	105
6.7. Referencias.....	106
VII. CONCLUSIONES GENERALES	110
VIII. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS	111
IX. BIBLIOGRAFÍA DE PARTE INTRODUCTORIA	112
X. AGRADECIMIENTOS	120

GLOSARIO

Aclaramiento total: (CL) volumen de fármaco excretado en unidad de tiempo

ADN Genómico: Información genética total que posee un organismo

ADN: (Ácido desoxirribonucleico). Ácido nucleico de los cromosomas, que contiene la información genética codificada.

Alelo: Cada una de las posibles formas alternativas de un gen dado, que difiere en su secuencia de DNA y afecta a su función (a su producto, como RNA o proteína). Un organismo diploide tiene siempre dos alelos de cada gen, que pueden ser iguales (homocigosis) o diferentes (heterocigosis).

Aminoácido: Es la unidad básica constituyente de las proteínas.

Bicompartmental: proceso farmacocinético en el cual el fármaco se distribuye en 2 espacios biológicos (sangre y tejidos)

Concentración terapéutica: Niveles de un fármaco en sangre que se esperan que produzcan un efecto beneficioso sin toxicidad.

Cromosoma: Es una ordenación lineal de DNA y proteínas (*cromatina*), es decir, es una ordenación lineal de genes.

Enzimas: Biocatalizadores de naturaleza proteica que intervienen el metabolismo de los seres vivos.

Estado estacionario: Referente a los niveles de fármacos que permanecen estables mientras que la tasa de metabolismo se encuentra constante mediante la ingesta continua de suficiente medicación para sustituir la que ya se ha utilizado.

Fenotipo: Totalidad de la naturaleza física, bioquímica y fisiológica de un individuo, tal como viene determinada por su genotipo y el ambiente dentro del cual se desarrolla. En sentido más limitado, la expresión de algún gen o genes en particular.

Gen: Parte de una molécula de ADN que codifica la síntesis de un determinado polipéptido.

Genoma: Todos los genes existentes en una serie haploide de cromosomas.

Genotipo: La constitución genética (genoma) de un individuo, o de un determinado locus.

Haplotipo: Conjunto de alelos de loci estrechamente ligados sobre una región cromosómica que se heredan (generalmente) como una unidad.

Heterocigoto: Individuo que tiene dos alelos diferentes en un determinado locus de un par de cromosomas homólogos.

Homocigoto: Individuo que posee un par de alelos idénticos en un determinado locus de un par de cromosomas homólogos.

Idiopático: De origen o causa desconocidos.

Ligamiento o ligazón. Se dice que dos genes están ligados cuando están situados en loci cercanos, en el mismo cromosoma, por lo que, con frecuencia, la presencia del fenotipo correspondiente a uno de ellos, permite inferir la presencia del otro gen.

Locus: Localización exacta de un gen en un cromosoma. Las diferentes formas del gen (alelos) ocupan siempre la misma posición en el cromosoma. Plural: **loci**

Multifactorial. Determinada por múltiples factores genéticos y no genéticos, cada uno con efecto aditivo mínimo.

Polimorfismo: Un gen o marcador es polimórfico cuando encontramos múltiples formas (alelos) en más del 1% de los miembros de una población.

Sonda (probe) de ADN: Segmento de ADN de cadena simple, generalmente marcado con fluorescencia o radioactividad, destinado a unirse a su cadena complementaria.

Tiempo de vida media $t_{1/2}$: tiempo que transcurre desde que la concentración máxima de un fármaco disminuye a la mitad

Xenobióticos. Sustancia (fármaco u otro producto) extraña para el organismo.

Lista de acrónimos y abreviaturas.

6-MP: 6-mercaptopurina

A: adenina

ABC: ATP Binding Cassette

ADMTX: altas dosis de metotrexate

C: citosina

COL18A1: gen de colágeno tipo XVIII alfa1

Cp: Concentración plasmática / sérica

DHFR: dihidrofolato reductasa

FPGS: Folilpoliglutamil sintetasa

G: guanina

gpm: gravedades por minuto

IM: intramuscular

IMC: Índice de Masa Corporal

IV: intravenoso

kg: Kilogramos

LCR: líquido céfalo rquídeo

LLA: leucemia linfoblástica aguda

Ln: Logaritmo natural o neperiano

Log: Logaritmo de base 10.

m: metros

MDR: Multidrug resistance

mg: miligramos

min: minutos

mL: mililitros

MRP: Multidrug resistance related proteins

MTHFR: Metilén tetrahidrofolato reductasa

MTX: Metotrexate

mV: milivolts

n: número de individuos

ng: nanogramo

°C: Grados centígrados

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

p: Brazo corto de un cromosoma (del francés petit).

Pk: Pharmacokinetics, farmacocinética

PopPk: Population pharmacokinetics, farmacocinética poblacional

psi: medida de presión dada en libras por pulgada cuadrada (14.7psi=1 atmósfera)

q: Brazo largo de un cromosoma.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RAM: reacción adversa a los medicamentos

RFC1: Reduced Folate Carrier, transportador de folato reducido

rpm: revoluciones por minuto

SLC19A1: solute carrier type 19A1, transportador

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: (Single nucleotide polymorphism) Polimorfismo de un solo nucleótido

t: tiempo

T: timina

TGO: Transaminasa glutámico oxalacética

TGP: Transaminasa glutámico pirúvica

TS: timidilato sintasa

UI: unidades internacionales

XO: xantina oxidasa

µg: microgramo

µM: micromolar

RELACIÓN DE TABLAS

Tablas de INTRODUCCIÓN

Tabla 1 Anormalidades cromosómicas asociadas a la aparición de LLA.....	4
Tabla 2 Características de proteínas de resistencia a fármacos MDR y MRP5.....	17
Tabla 3 Variantes alélicas de las Multidrug Resistance proteins 1(MDR1) con su expresión genotípica.....	18
Tabla 4 Variantes alélicas de las proteínas relacionadas con la resistencia a fármacos (Multidrug Resistance-Related Proteins type 5 MPR5).....	19

Tablas del ARTÍCULO 1

Table 1 Characteristics of the studied single nucleotide polymorphisms (SNPs) with their National Center for Biotechnology Information (NCBI) and by Applied BioSystem references.....	38
Table 2. Demographic data, posology clinical biochemical tests for 35 pediatric oncology patients included in study.....	39
Table 3. Genotype and allelic frequencies polymorphisms regulating drug resistance proteins (<i>ABCB1</i> and <i>ABCC5</i>) and xanthine oxidase.....	40
Table 4. Frequencies of pediatric patients who had adverse reactions by genetic polymorphism.....	41
Table 5. Classification of adverse reactions according to National Cancer Institute (NCI) nomenclature and ATP-binding cassette transporter or xanthine oxidase genotype.....	42

Tablas del ARTÍCULO 2

Tabla 1 Características generales de los pacientes con LLA y controles.....	63
Tabla 2 Frecuencias genotípicas y alélicas y, valor de equilibrio de Hardy Weinberg de los pacientes con LLA y los controles.....	64
Tabla 3 Riesgo de asociación del alelo recesivo con LLA.....	65

Tabla 4 Asociación del genotipo del grupo de los pacientes vivos y fallecidos con el tiempo de sobrevida total(ST).....66

Tablas del MANUSCRITO 1

Table 1 Anthropometric characteristics and biological parameters of case-control groups.....83

Table 2 Allelic and genotypic frequencies and Hardy Weinberg equilibrium.....84

Table 3 Odds Ratios for ALL including for SNPs of carriers and best adjusted model.....,85

Table 4 Risk of association of ALL with combinations of SNPs of carriers.....,86

Tablas del MANUSCRITO 2

Tabla 1 Características antropométricas, parámetros hematológicos y bioquímicos de los pacientes.....94

Tabla 2 Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de FPGS en la población de estudio.....95

Tabla 3 Valores promedios de los parámetros farmacocinéticos poblacionales.....96

Tabla 4 Resultados de parámetros farmacocinéticos individuales sin covariables.....97

Tabla 5 Parámetros farmacocinéticos poblacionales del modelo base con covariables y evaluación de la robustez del modelo.....98

RELACIÓN DE FIGURAS

Figuras de INTRODUCCIÓN

Figura 1 Flujo de MTX en el SNC, luego de la administración intratecal.....	7
Figura 2 Imagen esquemática del cromosoma 9 y la ubicación del gen <i>FPGS</i>	10
Figura 3 Estructura química del ácido fólico y de su poliglutamato, como producto de la actividad de la <i>FPGS</i>	11
Figura 4 Síntesis de purinas y participación de Xantina Oxidasa.....	12
Figura 5 Mecanismo inhibitorio del MTX sobre XO.....	13
Figura 6 Distribución de transportadores moleculares en metabolismo de MTX.....	14

Figuras del ARTÍCULO 2

Figura 1 Curva de Kaplan Meier de la sobrevida libre de la enfermedad (SLE) para los pacientes con y sin recaídas.....	60
Figura 2 Distribución genotípica de los polimorfismos evaluados en los niños fallecidos y sobrevivientes.....	61
Figura 3 Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia determinadas por el <i>FPGS</i> rs1544105.....	62

Figuras del MANUSCRITO 4

Figura 1 Distribución de los perfiles farmacocinéticos de MTX de acuerdo a la presencia del polimorfismo de <i>FPGS</i> rs4451422.....	99
Figura 2 Ajuste de efectos fijos individuales.....	100
Figura 3 Distribución de las concentraciones predichas y observadas de MTX.....	101
Figura 4 Comparación del aclaramiento (CL/F) de los individuos con genotipo heterocigoto y mutado frente al silvestre.....	103

RESUMEN

Antecedentes: La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es uno de los padecimientos oncológicos más frecuentes en pediatría. Para su tratamiento farmacológico se emplean varias fármacos como el metotrexate (MTX), cuya farmacocinética y farmacodinamia (efectividad y toxicidad) está asociado con el genotipo de enzimas y transportadores de la vía del folato. El objetivo de esta investigación fue determinar la asociación de los polimorfismos genéticos (SNPs) de *folilpoliglutamil sintetasa (FPGS)*, *COL18A1*, *RFC1 (SLC19A1)*, *ABCB1*, *ABCC5* y *xantina oxidasa (XO)* con la farmacocinética de MTX, la susceptibilidad a la enfermedad y la respuesta adversa al MTX en niños con LLA.

Métodos: se evaluaron 73 niños con LLA, en quienes se identificó el genotipo de 10 SNPs por qPCR. En un grupo de pacientes en fase de mantenimiento se determinó el MTX plasmático por HPLC, luego de una dosis i.m. de 40mg/m². La farmacocinética poblacional (PopPk) se realizó por modelado de efectos mixtos. Finalmente, se evaluó la respuesta al tratamiento con el estudio de farmacovigilancia y del análisis de supervivencia.

Resultados: se encontró una asociación entre *COL18A1*-rs2274808(OR=2.55, IC95%, 1.11-5.83, p=0.0001); *SLC19A1*-rs2838956(OR=44.69, IC95%, 10.42-191.63, p=0.0001); *ABCB1*-rs1045642(OR=13.76, IC95%,5.94-31.88, p=0.0001); *ABCC5*-rs9838667 (OR=2.61, IC95% 1.05-6.48, p=0.005) y *ABCC5*-rs3792585 (OR=9.99, IC 95%, 3.19-31.28 p=0.001) con la ocurrencia de LLA. En cuanto a la PopPk, ésta respondió a un modelo bicompartimental (CL/F=6.09L/h y Vc/F=6.78L), con una variabilidad interindividual de 40.7% y 31.5% respectivamente y residual de 31.2%. La covariable *FPGS*-rs4451422 explicó el modelo final, incrementando el CL/F. Los SNPs *ABCB1*-rs1128503 (OR 0.19, IC95% 0.03-0.9, p<0.05) y *ABCC5*-rs3792585(OR 0.12, IC95%, 0.027-0.58) se manifestaron protectores para mielosupresión. Finalmente los portadores del *FPGS*-rs1544105 aumentaron el tiempo de sobrevida libre de enfermedad a 16.67 meses vs a los no portadores.

Conclusión. Los portadores de los SNPs (*COL18A1*-rs2274808, *SLC19A1*-rs2838956, *ABCB1*-rs1045642 y *ABCC5*-rs3792585) mostraron una susceptibilidad mayor para la ocurrencia de LLA. El modelo farmacocinético poblacional obtenido de MTX a dosis bajas para los pacientes pediátricos con LLA fue bicompartimental y el efecto de los *FPGS*- rs1544105 y rs4451422 no influyó en el modelo final. Sin embargo, el peso fue la única covariable que estadísticamente si entró en el modelo final. El *ABCB1*-rs1128503 y *ABCC5*-rs3792585 se asociaron como factores de protección frente a mielosupresión. Finalmente el *FPGS*-rs1544105 se asoció con un incremento de la supervivencia.

ABSTRACT

Background: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is one of the most common diseases in pediatric oncology. Antimetabolite Methotrexate (MTX) are used for its treatment. The pharmacokinetic and pharmacodynamics (efficacy and toxicity) of MTX is associated with genotype of enzymes and transporters of folate pathway. The aim of this research was to determine the association of genetic polymorphisms (SNPs) *folilipoliglutamil synthetase (FPGS)*, *RFC1*, *ABCB1*, *ABCC5* and *xanthine oxidase (XO)* with the pharmacokinetics, susceptibility to ALL and, adverse response of MTX to treatment in children with ALL.

Methods: Seventy three children with ALL were assessed their genotype identifying 10 SNPs by qPCR. The plasmatic concentrations of MTX were determined by HPLC after a dose 40mg / m². i.m in a group of patients in the maintenance phase. The population pharmacokinetic (PopPk) was performed by mixed effects modeling. Finally, the response to treatment with the study of pharmacovigilance and survival analysis was evaluated.

Results: An association between *COL18A1*-rs2274808 (OR=2.55, 95%CI, 1.11-5.83, p=0.0001) was found; *SLC19A1*-rs2838956 (OR=44.69, 95%CI, 10.42-191.63, p=0.0001); *ABCB1*-rs1045642(OR=13.76, 95%CI, 5.94-31.88, p=0.0001); *ABCC5*-rs9838667(OR=2.61, 95%CI 1.05-6.48, p=0.005) and *ABCC5*-rs3792585(OR=9.99, 95%CI, 3.19-31.28 p=0.001) with the occurrence of ALL. PopPk of MTX responded to

a two-compartment model whose $CL/F=6.09L/h$ and $Vc/F=6.78L$, with inter-individual, intra-individual and residual variabilities of 40.7%, 31.5% and 31.2% respectively, residual. The *FPGS*-rs4451422 covariate explained the final model, increasing the CL/F . The pharmacovigilance study of *ABCB1*-rs1128503(OR 0.19, 95%CI 0.03-0.9, $p<0.05$) and *ABCC5*-rs3792585(OR 0.12, 95%CI 0.027-0.58) showed protectors against myelosuppression. Finally, carriers *FPGS*-rs1544105 increased time to disease free survival vs 16.67 months for non-carriers.

Conclusion. The carriers of the SNPs (*COL18A1*-rs2274808, *SLC19A1*-rs2838956, *ABCB1*-rs1045642 and *ABCC5*-rs3792585) showed increased susceptibility to the occurrence of ALL. The PopPk model of MTX to lower doses for pediatric patients with ALL was two compartment and the effect of SNPs of *FPGS* did not influence in the on the final model. However, the covariate weight could explain the final model and that considers for making a better fit dose. The *ABCB1*-rs3792585 and *ABCC5*-rs1128503 were associated as factors protecting against myelosuppression. Finally, there was an association between *FPGS*-rs1544105 with increased survival rates.

I. CAPITULO

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es uno de los trastornos oncológicos más frecuentes en los pacientes pediátricos. Consiste en la infiltración y producción exagerada de células anormales inmaduras, cuyo origen es el sistema hematopoyético. Se estima que esta patología se presenta en el 80 a 85 % de los pacientes pediátricos diagnosticado con leucemia (1); siendo en México uno de los padecimientos de mayor aparición, especialmente en el noreste del país (2, 3). Dentro del grupo de medicamentos análogos de purinas, fundamentales para la fase de consolidación y mantenimiento del tratamiento de la patología es la 6-mercaptopurina (6-MP) conjuntamente con una molécula citotóxica (4), Vincristina(VCR). Otro medicamento con función antimetabólica como antifolato es el Metotrexate (MTX); el cual interrumpe la generación de purinas y pirimidinas a partir de los poliglutamatos de folato, que se producen gracias a la presencia de la enzima Folilpoliglutamil sintetasa (FPGS) (5) . Dichos fármacos se encuentran dentro del protocolo de tratamiento de los ciclos de quimioterapia, desde la fase de inducción a la remisión hasta la de mantenimiento (6). Es evidente que de la acción farmacológica dependerán los buenos resultados terapéuticos; los mismos que se generan por la influencia metabólica de un grupo de enzimas hepáticas, entre las que figuran la Tiopurin metiltransferasa (TPMT), la Xantina Oxidasa (XO), la Inosin Trifosfatasa (ITPA), Metilen tetrahidrofolato reductasa y las isoenzimas del complejo de los citocromos P450 (4). La actividad metabólica de estas enzimas favorece la eliminación de las moléculas desconocidas para el organismo, mediante cambios bioquímicos que modifican la polaridad y facilitan su excreción.

Por otro lado, es muy conocida la influencia de un grupo de proteínas que son determinantes de resistencia a los fármacos, cuyo propósito es permitir la entrada y salida de los medicamentos de las células juveniles cancerosas (leucoblastos), son conocidas como proteínas transportadoras de folato (Reduced Folic Carrier type 1 -RFC1), involucradas en la entrada transmembranal y por el contrario, las proteínas

de resistencia a fármacos encargadas del eflujo, dentro de las cuales están las MDR1 y MRP5 (7). Los genes que codifican las enzimas hepáticas y las proteínas transportadoras, son altamente polimórficos, lo cual puede influir sobre la farmacocinética del MTX lo cual aumenta el riesgo de fallas terapéuticas y/o reacciones adversas al fármaco. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación es determinar la asociación de los polimorfismos genéticos de la *XO*, *FGPS* y de las proteínas de transporte de membrana con la farmacocinética del MTX, la respuesta no deseada al tratamiento oncológico y la susceptibilidad de ocurrencia a la LLA

ANTECEDENTES

1.1. Leucemia linfoblástica aguda (LLA)

La leucemia es la oncopatología más frecuente en pediatría y representa la principal causa de muerte por cáncer en los niños. El padecimiento se debe a la infiltración de células neoplásicas de origen hematopoyético en la médula ósea y otros tejidos. De acuerdo a la estirpe celular afectada puede clasificarse en mieloblástica y linfoblástica y con respecto a la velocidad de proliferación celular en aguda y crónica (1).

La LLA es la más frecuente y su incidencia se ha incrementado en diferentes partes del mundo incluyendo México, lo cual podría deberse a la disminución de la mortalidad en los niños por causas infecciosas. Se estima que esta patología se presenta en el 80 a 85 % de los pacientes pediátricos diagnosticado con leucemia. Según la investigación epidemiológica de Rodríguez y *col.* (3) en 2010, realizado en 5 centros hospitalarios en el noreste de la población mexicana, encontraron que la tasa de incidencia de leucemias agudas en general fue de 36.46:100000 en población infantil. Además, estos investigadores observaron que la LLA fue la más frecuente con 387 casos, seguida de la leucemia mieloblástica aguda con 50 casos. En los últimos años se ha podido determinar que la supervivencia de los niños con LLA de hasta cinco años de edad, ha tenido un incremento en los países desarrollados, llegando incluso hasta un 70% (8, 9), situación que no ha sucedido en nuestro país. Lo anterior posiblemente sea debido a la existencia de variaciones genéticas y a la falta de criterios farmacocinéticos y farmacodinámicos asociadas a la terapia oncológica (10).

1.2. Etiología

La LLA tiene diferentes causas, entre las cuales destacan las siguientes:

- Exposición a radiaciones ionizantes
- Materiales químicos, por ejemplo benceno

- Medicamentos: tales como el uso de agentes alquilantes solos o combinados con radioterapia

Consideraciones genéticas:

- Gemelos idénticos, si uno de los gemelos desarrolla LLA antes de los 5 años, el segundo gemelo podrá desarrollar la patología con una probabilidad de hasta un 20%.
- Relaciones familiares: un individuo tendrá tendencia a desarrollar LLA hasta 4 veces más, si tiene un hermano con diagnóstico de la enfermedad.
- Anormalidades cromosómicas, como se muestra en la tabla 1:

Tabla 1 Anormalidades cromosómicas asociadas a la aparición de LLA.

Grupo	Riesgo	Intervalo de aparición
<i>Trisomía 21</i>	<i>1:95</i>	<i>Menores a 10 años de edad</i>
<i>Síndrome Bloom</i>	<i>1:8</i>	<i>Menores a 30 años</i>
<i>Anemia Fanconi</i>	<i>1:12</i>	<i>Menores a 16 años</i>

Tabla modificada de Arico,2000 (11)

- Incidencia incrementada con las condiciones genéticamente determinadas. (12)

1.3. Diagnóstico

El diagnóstico general de LLA inicia con el examen clínico valorando la presencia de hiperpirexia, sangrado, petequias, hematoma, osteoartralgias, linfadenopatía, esplenomegalia, hepatomegalia, leucocitosis superior a 17.000 cél/mm^3 , hemoglobinemia inferior a 7mg/dL , recuento plaquetario disminuido comprendido entre 20000 a 90000 cel./mm^3 (hiperleucocitosis) y la morfología linfoblástica clasificada en L1 (más de 85 % de casos) (13). Clásicamente el diagnóstico de LLA se realiza a partir del estudio del aspirado de médula ósea y se cataloga con base en su morfología celular en 3 tipos (L1, L2 y L3) según los criterios de la asociación Franco-Americano-Británica (FAB)(9). Gracias a las nuevas técnicas instrumentales de laboratorio (citogenética, citometría de flujo, etc.) se ha podido clasificar la LLA en función de su inmunofenotipo, estableciéndose 2 tipos: LLA de células B y de células T (13). A su vez, dentro del primer grupo se encuentran las LLA Pre-B tempranas, Pre B y B maduras; mientras que las de tipo T se clasifican de acuerdo al crecimiento del timo (9).

1.4. Manejo terapéutico de LLA y uso de Metotrexate

La quimioterapia es el principal recurso terapéutico para la LLA. El esquema de tratamiento de elección depende del inmunofenotipo y de la categoría del riesgo que se presente en cada paciente, de ahí que, se requiere un tratamiento individualizado sustentado en guías de manejo, tal como el protocolo St Jude Total XV (14, 15). Ventajosamente estos tratamientos oncológicos permiten remitir el 80% de los casos (16). El esquema terapéutico para los pacientes con LLA se divide en varias etapas: 1) inducción a la remisión, 2) consolidación, 3) mantenimiento, 4) terapia contra la infiltración de células leucémicas en el sistema nervioso central y 5) ciclos de reinducción. En fase de inducción a la remisión es posible eliminar el 99% de las células malignas, mientras que con las otras fases de tratamiento se puede erradicar las células leucémicas residuales. Los esquemas de tratamiento tienen especificaciones que dependen de las características clínicas del niño, y por tanto se aplicará un protocolo diferente a los pacientes de alto y bajo riesgo recidivante.

Así, la fase de inducción a la remisión se realiza durante 4 semanas mediante la aplicación simultánea de prednisona, vincristina, daunorrubicina y L-asparaginasa (17). En la fase de consolidación se administran altas dosis de MTX (ADMTX) y 6-MP durante 2 semanas, en asociación con quimioterapia intratecal, procedimiento útil para prevenir o tratar la infiltración de células leucémicas en el sistema nervioso central (Figura 1) (18). Estas primeras dos fases del tratamiento son iguales para los pacientes de alto o bajo riesgo. La última fase del esquema es la de mantenimiento, que dura 120 semanas y difiere en ambos grupos. En los pacientes de bajo riesgo, se utiliza MTX y 6-MP con ciclos de reinducción; en tanto que los pacientes de alto riesgo son tratados con dos antineoplásicos de manera alterna cada semana, (etopósido más ciclofosfamida, metotrexato más 6-MP, 6-MP más citarabina, vincristina más dexametasona, etopósido más ciclofosfamida, vincristina más dexametasona) (19). Con el establecimiento del protocolo quimioterapéutico, el tratamiento completo se cumplirá en un periodo de 2,5 años aproximadamente. Cabe señalar que estos medicamentos tienen un margen de seguridad estrecho, por lo que están asociados a reacciones adversas (20).

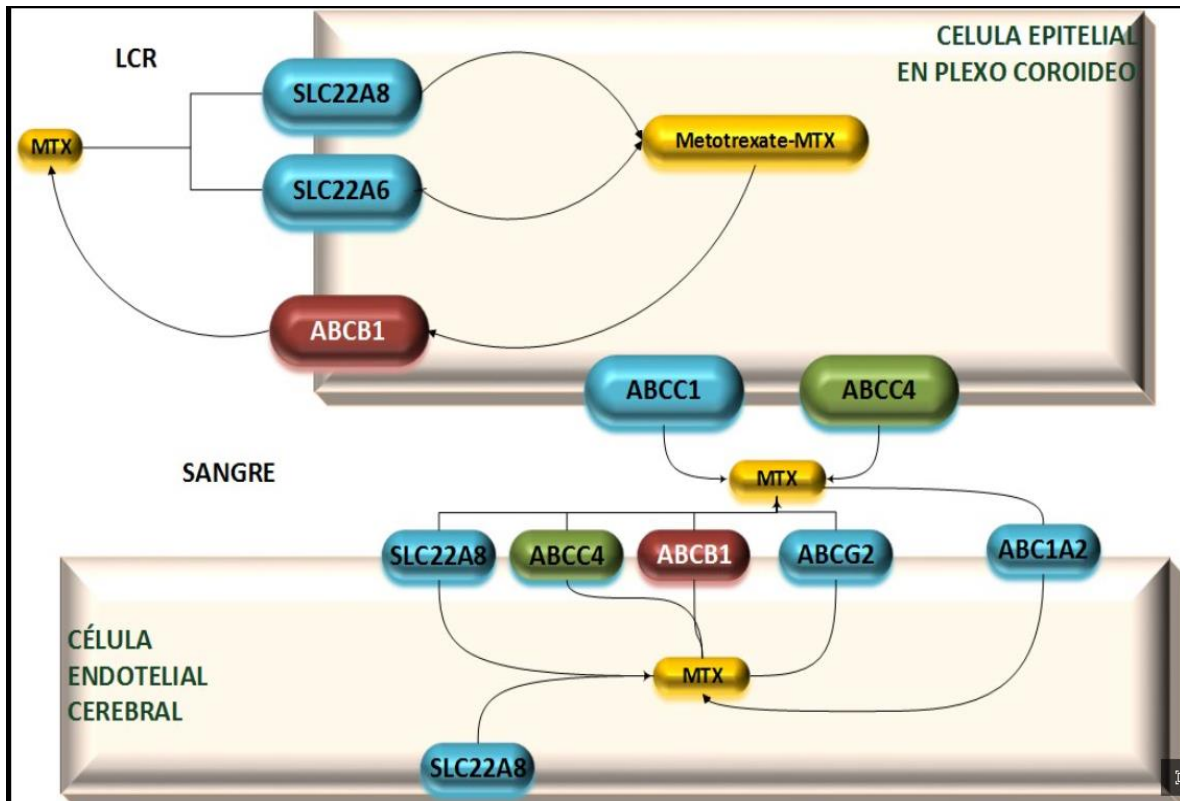


Figura 1 Flujo de MTX en el SNC, luego de la administración intratecal.

MTX: metotrexato, SLC: Solute carriers family-familia de transportadores solubles; ABC, ATP_binning cassette family, familia de transportadores de ATP-asa. LCR: líquido céfalo raquídeo. Modificado de PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org>)

1.5. Metotrexate

1.5.1. Características.

El MTX (ácido 4-amino-N10-metilpteroilglutámico) es un típico fármaco inmunosupresor antifolato que se encuentra en casi la totalidad de los protocolos oncológicos pediátricos de células blancas (21). Normalmente las células tienen dirigidos el metabolismo del MTX a la producción de poliglutamatos, los cuales promueven la propia citotoxicidad, siendo este proceso más efectivo y notable en las células patológicamente multiproliferativas, tales como las leucémicas (22).

1.5.2. Farmacocinética y Farmacodinamia del MTX.

El MTX presenta una alta variabilidad farmacocinética interindividual semejante a los aminoglucósidos, lo que explicaría la forma relativa de respuesta al tratamiento (23). Este fármaco tiene 3 valores de pKa 3.4, 4.8 en medio ácido y 5.6 en medio alcalino, lo que influye significativamente en el proceso farmacocinético. Su tiempo de vida media ($t_{1/2}$) es de 7 horas, un aclaramiento (CL) de 2mL/min/kg, la fracción eliminada sin cambios, esencialmente por filtración glomerular es mayor a 0.7mL/min/kg, la unión a proteínas plasmáticas es aproximadamente del 60% y una biodisponibilidad oral superior a 75% (24). Para realizar un estudio farmacocinético básico se requiere controlar muchas variables, lo cual resulta muy complicado y es casi imposible de ejecutar en población pediátrica. Debido a lo anterior, se recurre a la farmacocinética poblacional basada en la aplicación de algoritmos con modelos bayesianos que a su vez se basan en el modelado de efectos mixtos. Los programas computacionales que facilitan este análisis son principalmente NONMEM (25) y Monolix® (26).

Con relación a la farmacodinamia del MTX, se conoce que esta molécula dentro de la célula blanco se transforma en poliglutamato, gracias a la folilpoliglutamil sintetasa (FPGS). Varias enzimas como dihidrofolato reductasa (DHFR), timidilato sintasa (TS), 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido transformilasa (ATIC), Glicinamida ribonucleótido transformilasa (GART) y Fosforibosil pirofosfato amido-transferasa (PPAT) participan también en el proceso final de inhibición de purinas (27).

El MTX es un antimetabolito, análogo del ácido fólico. Inhibe de manera reversible a la dihidrofolato reductasa, enzima útil para la conversión del ácido fólico a tetrahidrofolato (metabolito activo). Este último compuesto sirve como donador de un fragmento de carbono para la síntesis de la timidina in vivo, por tal razón el MTX funciona como un inhibidor de la síntesis del DNA (28). Su alta especificidad sobre el ciclo de folato, explica la inminente presentación de efectos tóxicos difícilmente revertidos, aún con dosis altas de ácido fólico. Sin embargo, una alternativa terapéutica para evitar este evento no deseado se consigue con la administración

de ácido folínico (factor Leucovorin®), un análogo del tetrahidrofolato, que puede inhibir el bloqueo enzimático si se administra en las primeras 48 horas después de dar MTX (29).

1.6. Farmacogenética y reacciones adversas.

Los agentes oncológicos forman parte del grupo fármaco-terapéutico relacionado con el desarrollo de reacciones adversas a los medicamentos (RAM) (30, 31). El desarrollo de RAM depende en parte de la actividad de las enzimas metabolizadoras de medicamentos (32). Se ha descrito una alta variabilidad se debe en gran medida a mutaciones y/o polimorfismos (SNPs- single nucleotide polymorphisms) en los genes encargados de codificarlas. Se conoce que la frecuencia de las RAM podría ser reducida, ajustando la dosis de los medicamentos con base al tipo de polimorfismo detectado en los genes de los pacientes (33). El estudio de estos polimorfismos y su correlación con la respuesta a fármacos ha dado origen a la farmacogenética, la cual tiene como objetivo predecir la respuesta a fármacos y establecer la dosis más adecuada para un paciente específico, de acuerdo a su perfil genético (34).

El mecanismo de acción del MTX, por su semejanza con el ácido fólico fisiológico produce estados de toxicidad en varios sitios como el tracto gastrointestinal, médula ósea, mucosas, etc. (35-37). El MTX produce RAMs especialmente de tipo dosis-dependiente, que se hacen más evidentes luego de la administración de dosis iguales o superiores a 1.5 g/m^2 (38), manifestándose como anemia, leucopenia, neutropenia febril, trombocitopenia, mucositis, entre otras (39).

1.7. Gen de la Folilpoliglutamil Sintetasa (FPGS), actividad catalítica y su influencia en el metabolismo de MTX

El gen de *FPGS* que se muestra en la figura 2, tiene una longitud de 11.4Kb. con 15 exones y 14 intrones y en la región cromosómica *9q34.11* (40).

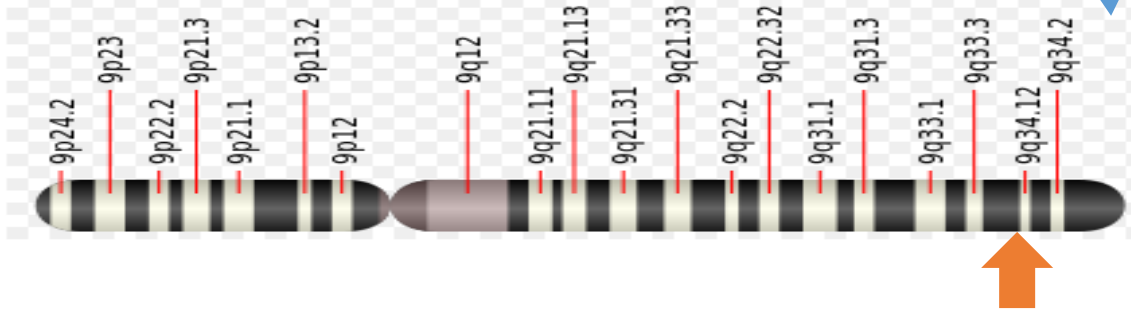


Figura 2 Imagen esquemática del cromosoma 9 y la ubicación del gen *FPGS*

La enzima FPGS cataliza la poliglutamatación del ácido fólico, del MTX y otros medicamentos similares, produciendo metabolitos activos. Fisiológicamente, los el ácido fólico al ingresar al centro activo de la FPGS, ésta le adiciona un importante número de moléculas de glutamato, sobre la estructura primaria de pteroilglutamato y así produce una polimerización (tetrahidrofolatos), como se muestra en la Figura 3 (42).

Se han descrito 34 SNPs en el gen *FPGS*, de los cuales 5 son mutaciones no sinónimas, es decir, que alteran la secuencia de aminoácidos de dicha enzima. Para la caracterización del variabilidad genética del gen *FPGS* en 4 diferentes etnias mediante resecuenciación se encontraron 34 SNPs donde 5 aparecieron como no sinónimos (41).

De otra parte el exón 1 de iniciación puede codificar 2 proteínas, una citosólica de 537 residuos aminoácidos y otra de tan solo 42 aminoácidos; de ahí que su disminución promovida por una baja de expresión se relaciona fundamentalmente con la resistencia al tratamiento de antifolatos en cultivos celulares (43, 44)

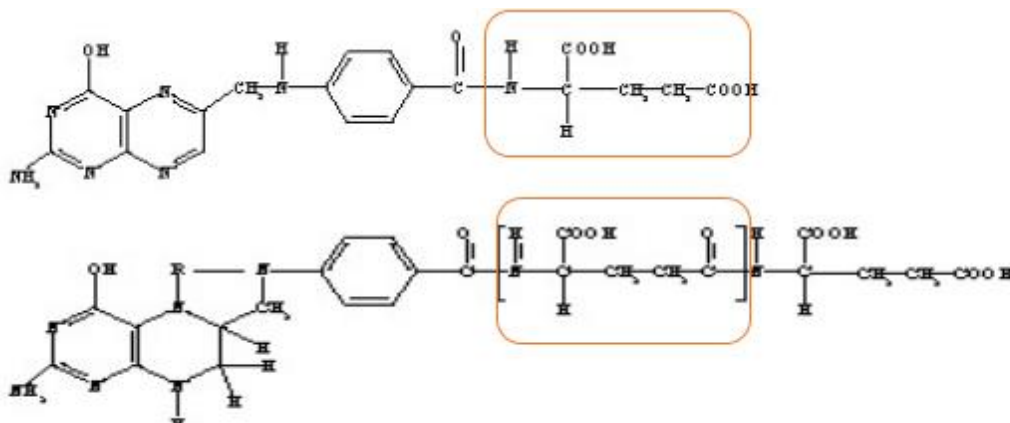


Figura 3 Estructura química del ácido fólico (arriba) y de su poliglutamato (abajo), como producto de la actividad de la FPGS

El MTX, de su parte, presenta una vía metabólica general dentro del ciclo de folatos como antagonistas de la producción celular de purinas y pirimidinas. Inicialmente también es transformado en poliglutamatos por la FPGS, cuyos metabolitos tienen actividad farmacológica. Sin embargo, este proceso puede ser revertido debido a la actividad de la gamma-glutamyl hidrolase (GGH) (45).

La importancia clínica de la FPGS se ha determinado como un posible predictor del efecto farmacológico de los antifolatos de uso oncológico. Así, en los niños con LLA, la acumulación de los poliglutamatos de MTX dentro de los linfoblastos se asocia con un incremento de 5 años de supervivencia y con un aumento a corto plazo de la erradicación de los leucocitos jóvenes (46).

1.7.1 Polimorfismos genéticos de *FPGS*

Se han identificado varios SNPs de *FPGS* asociados con el metabolismo de MTX como el rs1054774, rs1544105, rs4451422 entre otros (47). Cabe destacar que no se conocen las frecuencias alélicas de estos polimorfismos en población mexicana; sin embargo, de la mayoría de estos se encuentra información en población caucásica donde su frecuencia es de 38% para el caso del polimorfismo que se ha reportado con trascendencia clínica rs1544105 (47).

1.8. Actividad de la xantina oxidasa y su relación con el MTX

La xantina oxidasa (XO) es codificada por el gen *XDH* con locus 2p23.1. Está constituido de 36 exones que codifican una proteína de 1333 aminoácidos, cuya función es catalizar el paso final de la degradación de las purinas (48). El metabolismo fisiológico de la XO se basa en metabolizar a la hipoxantina que proviene de la adenina. Además, puede ejercer un efecto metabólico indirecto sobre la guanina, cuando este sustrato pase previamente por la vía de la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT). Cualquier vía bioquímica culmina en la producción de hipoxantina, que finalmente es eliminada del cuerpo como ácido úrico. Esta enzima es determinante en la presentación de un cuadro clínico llamado gota, donde el ácido úrico no puede ser excretado completamente y al contrario se almacena como cristales en las articulaciones, produciendo los denominados tofos que producen un intenso dolor local (4).

La vía metabólica de la XO se ilustra en la Figura 4, en la que se observa que la adenina pasa después de varios eventos bioquímicos a la transformarse en hipoxantina; y esta última termina formando el ácido úrico (49):

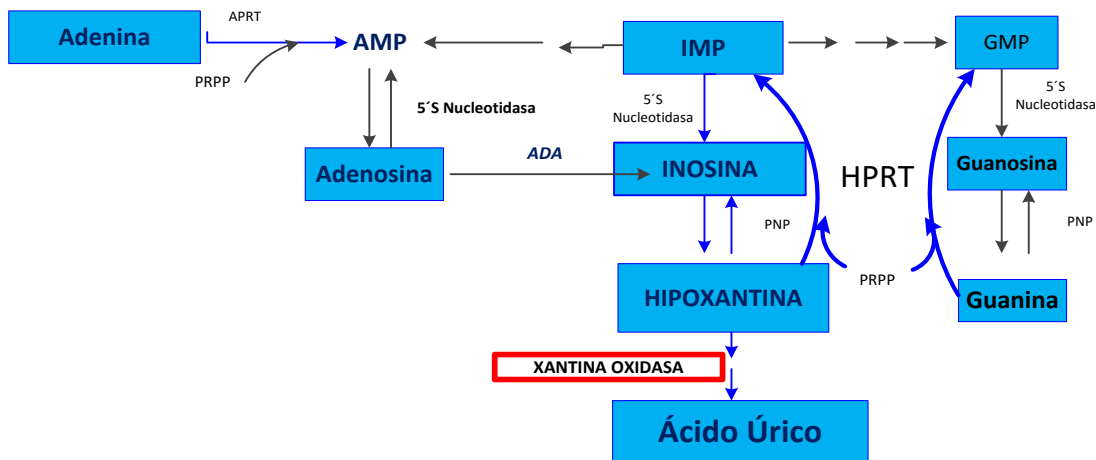


Figura 4 Síntesis de purinas y participación de Xantina Oxidasa.

Leyenda: APRT: Adenosin fosforibosil transferasa, PRPP: 5 Fosforibosil 1 pirofosfato, PNP: purina nucleósido fosforilasa, ADA: Adenosin desaminasa, HPRT: hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa.

1.8.1. Polimorfismos genéticos del gen de XO

Se conocen algunos polimorfismos genéticos, de los cuales se pueden mencionar los siguientes: *Arg149Cys*, *Pro555Ser*, *Thr623Ile*, *Ile703Val*, *Asn909Lys*, *Thr910Lys*, *Pro1150Arg*, *His1221Arg*, siendo los más relevantes *Arg607Gln* y *Cys1318Tyr*, los mismos que conducen a la reducción de la función de la XO en un 55.5 y 64.7% respectivamente en poblaciones caucásicas(50)

La inactivación de la XO, ya sea por algún cambio genotípico o inducida por alopurinol o MTX, puede disminuir el metabolismo de la 6-MP y su pro-fármaco azatioprina, lo cual conduce a reajustar la dosis alrededor de un 75% de la pauta posológica estimada, cuando se administran juntos (ver Figura 5) (51).

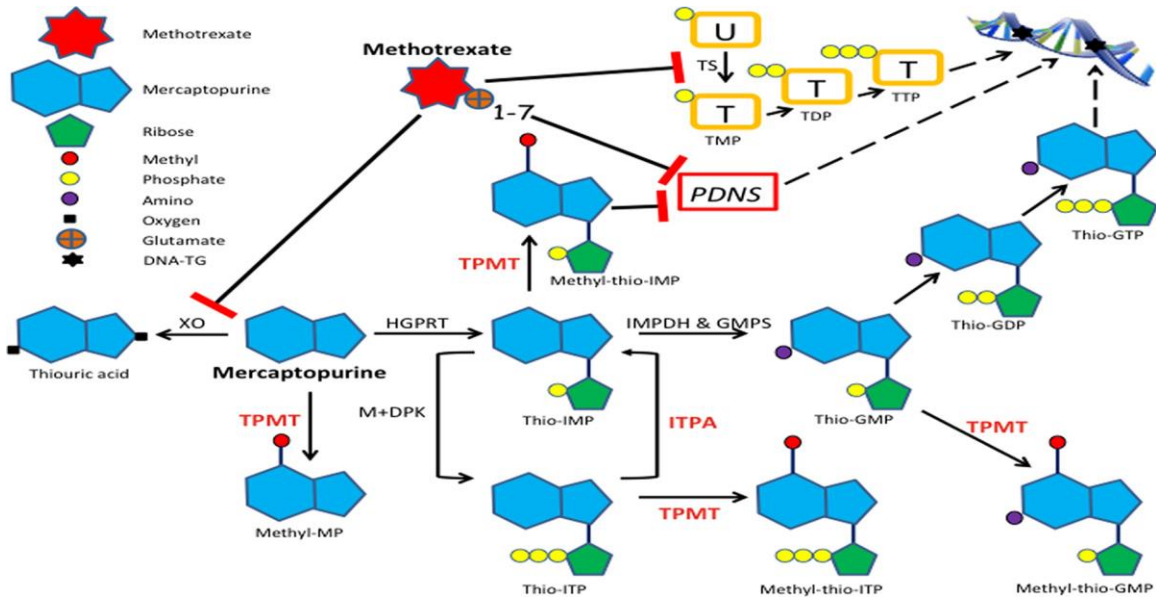


Figura 5 Mecanismo inhibitorio del MTX sobre XO.

Leyenda: TS: timidilato sintetasa; HGPRT, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa; TPMT, tiopurin metiltransferasa; ITPA, inosin trifosfatasa; U, uracilo; T, timina; TMP, timidin monofosfato; TDP, timidin difosfato; TTP, timidin trifosfato; IMPDH, Inosin monofosfato deshidrogenasa; XO, xantina oxidasa; GTP, guanosin trifosfatasa; PNDS: síntesis de novo de purinas; M+ DPK, mono y difosfato quinasa, DNA-TG, indica dinucleótidos de tioguanina incorporados al ADN. Tomado de Schmiegelow et al. 2014(52).

1.9. Transportadores de membrana y resistencia al MTX

Los transportadores moleculares sirven para introducir (influjo) y expulsar (eflujo) las sustancias de una célula. Por tanto, hay un grupo de transportadores que son de influjo (por ejemplo SLC19A1) y otros de eflujo (como los de la familia ABC). Un esquema general donde se presenta el movimiento del MTX entre la sangre, lumen intestinal, riñón e hígado está resumido en la Figura 6.

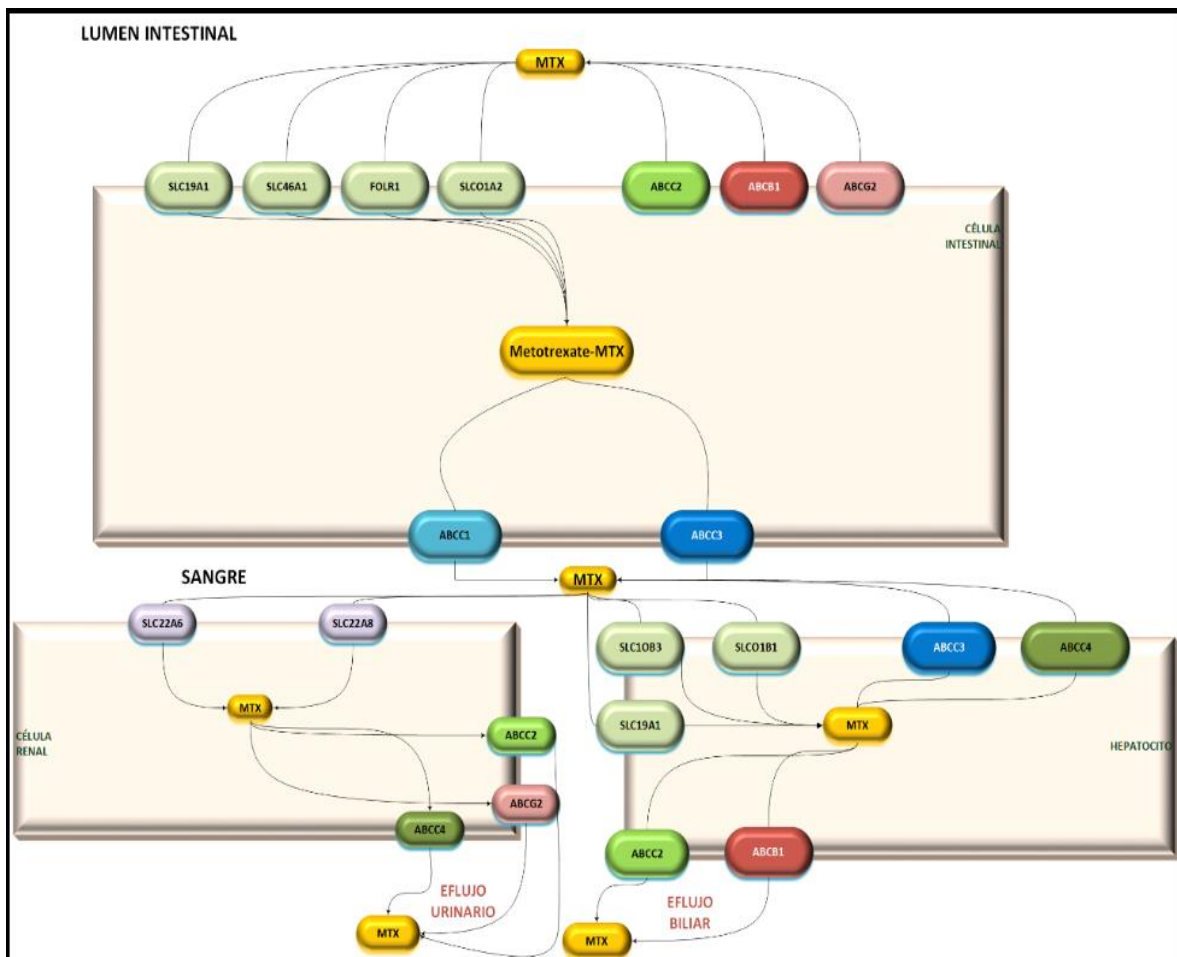


Figura 6 Distribución de transportadores moleculares en metabolismo de MTX. MTX: metotrexato, FOLR1. Receptor de folato tipo 1; SLC, Solute carriers family-familia de transportadores solubles; ABC, ATP_binding cassette family, familia de transportadores de ATP-asa. Tomado de PharmGKB <https://www.pharmgkb.org>

1.9.1. Transportadores de la familia de receptores de folato-RFC1 y COL18A1

Los transportadoras o acarreadores de folatos son las principales proteínas que facilitan el transporte activo transmembranal al interior de la célula. El gen que las codifica es *SCL19A1* (siglas en inglés Solute Carrier Family 19 type 1 ó folate transporter, member 1), tiene varios polimorfismos que repercuten la función influjo de folatos y de MTX. A continuación se mencionan algunos SNPs que tienen impacto sobre el metabolismo de MTX: rs1051266, rs1131596, rs11702425, rs2838956, rs7279445, rs7499, rs9977268, entre otros.

El SNP más común en este receptor es el RFC-1 A80G (rs1051266), el cual produce el cambio de una A por una G, lo cual repercute en la sustitución de una arginina por una histidina, la que produciría una alteración de la afinidad por el folato, produciéndose una alteración en las concentraciones celulares de MTX. Aunque se desconoce si este polimorfismo produce una alteración en la función de transporte de la proteína, se ha relacionado con niveles más bajos de folato y homocisteinemia(53). Se ha encontrado que pacientes que presentan el genotipo GG podrían desarrollar toxicidad asociada a la utilización de MTX, más frecuentemente que aquellos que presentan otros genotipos. Además dentro del grupo de polimorfismos relacionados con la entrada intracelular de MTX se ha identificado al rs2274808 que si bien no está en el gen *SLC19A1* sino en el vecino de colágeno *COL18A1*; el cual tiene al expresarse, favorece la producción endostatina cuya deficiencia causaría una grave patología por carencia de colágeno, denominada síndrome de Knobloch (54).

Por otra parte, este polimorfismo también interviene como un factor determinante en la pobre efectividad del MTX, por lo que requiere ser monitoreado (55).

1.9.2. Participación de las proteínas involucradas en la resistencia a fármacos (MDR1 y MRP5)

Las proteínas de transporte de membrana constituyen una clase de proteínas especializadas en regular el balance homeostático soluto-solvente. Después de secuenciación del genoma humano, se identificaron entre 500 y 1200 genes responsables de su producción (56, 57).

Una de las familias más grandes de transportadores activos son los transportadores que contienen un dominio de unión a ATP (58). En el ser humano, los transportadores ABC (siglas en inglés ATP-binding cassette) conocidas también como MDR (siglas de inglés Multidrug Resistance Proteins), desempeñan importantes funciones en una amplia variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Así, a nivel del hepatocito regulan el ingreso y egreso de las moléculas farmacológicas (59). Las MDR son codificadas por el gen *ABCB1*.

Otro grupo de proteínas relacionadas también con la resistencia a los fármacos, son MRP (siglas inglesas Multidrug related resistance proteins); estas son codificadas por el gen *ABCC5*(7).

En la tabla 2 se muestran varios miembros de la familia de proteínas que producen resistencia a los fármacos (ABCB y ABCC) con su respectivo gen codificante, su sitio de expresión y su localización.

Tabla 2 Características de proteínas de resistencia a fármacos MDR y MRP5.

Familia	Gen	Nombre		
		alternativo	Locus	Tejido
ABCB (MDR)	<i>ABCB1</i>	<i>MDR1</i>	7q21.1	K, L, B, I
	<i>ABCB4</i>	<i>MDR3</i>	7q21.2	L
	<i>ABCB11</i>	<i>SPGP</i>	2q24	L
ABCC (MRP)	<i>ABCC1</i>	<i>MRP1</i>	16p13.1	Multiorgánica
	<i>ABCC2</i>	<i>MRP2</i>	10q24	K, L, B, I
	<i>ABCC3</i>	<i>MRP3</i>	17q22	L, A, PL, K, I
	<i>ABCC4</i>	<i>MRP4</i>	13q32	Multiorgánica
	<i>ABCC5</i>	<i>MRP5</i>	3q27	Multiorgánica
	<i>ABCC6</i>	<i>MRP6</i>	16p13.1	L, K
	<i>ABCC10</i>	<i>MRP7</i>	6p12-21	K, B

K: riñón, L: hígado, B: cerebro, I: intestino delgado, PL: placenta,

Las mutaciones en los genes codificantes de los transportadores ABC resultan en diversas enfermedades genéticas, como la fibrosis quística (60), el síndrome de Dubin-Johnson (61), entre otras. Además, los transportadores ABC están relacionados con la farmacocinética de principios fármaco-activos (62, 63).

Los transportadores ABC tienen la característica de sobre-expresarse de los en las células tumorales lo cual representa un mecanismo de resistencia a los fármacos quimioterapéuticos. Por lo tanto, la investigación sobre la interacción de fármacos y transportadores ABC resulta idónea para determinar nuevos candidatos farmacológicos(64).

Wijnholds y *col.* realizaron la caracterización funcional de MRP5 en humanos y a partir de entonces se ha propuesto como un transportador fundamental en la resistencia a los fármacos contra el cáncer como es el caso de la tiopurina; 6-MP ,

tioguanina, y fármacos anti-VIH como 9-(2-fosfonilmetoxietil) adenina (PMEA). Esta resistencia se debe a un aumento de la extrusión de PMEa y monofosfato de 6-tioinosina de las células que sobre-producen MRP5. Se ha sugerido que las MRP5 estarían relacionadas con algunos casos de resistencia inexplicable a tiopurinas y antimetabolitos en la LLA y/o análogos de los nucleósidos antirretrovirales en pacientes afectados por el VIH (65). En la tabla 3 y 4 se resumen algunas de las variantes polimórficas relacionadas con las proteínas MDR1 y MPR5, respectivamente.

Tabla 3 Variantes alélicas de las Multidrug Resistance proteins 1(MDR1) con su expresión fenotípica

Polimorfismo	Posición	Función
61 A >G	Exón 1	A21D
307 T >C	Exón 5	F103L
548 A >G	Exón 7	N183S
548 A >G	Exón 7	G185V
1199 G >A	Exón 11	S400N
1236 C >T	Exón 12	SINÓNIMO
1474 C >T	Exón 13	R4892C
2650 G >T	Exón 21	SINÓNIMO
2677 G >T	Exón 21	A893S
2677 G >A	Exón 21	A893T
3320 A >C	Exón 26	Q1107P
3396 C >T	Exón 26	SINÓNIMO
3421 T >A	Exón 26	S1141T
3435 C >T	Exón 26	SINÓNIMO

A: alanina; C: cisteína; D: aspartato, F: fenilalanina; G: glicina; L: leucina; N: asparagina; P: prolina; Q: glutamina; R: arginina; S: serina; T: teronina; V: valina

Tabla 4 Variantes alélicas de las proteínas relacionadas con la resistencia a fármacos (Multidrug Resistance-Related Proteins type 5- MRP5).

Polimorfismo	Posición	Función
GC527-8 C>G	Exón 5	R176P
723 A >G	Exón 6	SINÓNIMO
1146 G> A	Exón 8	SINÓNIMO
1146 C> A	Exón 8	SINÓNIMO
1200 C >T	Exón 9	SINÓNIMO
1741 A >G	Exón 12	I581V
1782 T >C	Exón 12	SINÓNIMO
3624 T >C	Exón 25	SINÓNIMO
4148 C > A	Exón 29	T1383N

N: asparagina; I:isoleucina; P: prolina; R: arginina; S: serina; T: teronina; V: valina

1.10. Farmacocinética poblacional, farmacogenética y medicina personalizada

Diferentes estudios realizados sobre la farmacocinética de la MTX han reportado ciertas limitantes y sugieren una vigilancia permanente de los pacientes que deben recibir este fármaco, más aún en aquellos que se les administre por vía parenteral (66).

El MTX sufre un intenso efecto del primer paso hepático, determinado por la actividad directa de la DHFR, TS y otras enzimas. Además su transformación a metabolitos activos (poliglutamatos) favorecen la manifestación de eventos adversos que van de moderados a muy severos como mielosupresión, inmunodepresión e incluso riesgo de lesión renal (67). La terapia constante con este medicamento ha motivado la búsqueda de mecanismos de ajuste basados en terapia de rescate con ácido folínico para paliar los eventos mencionados, evento observado cuando las concentraciones plasmáticas a las 24 horas de MTX posterior a una administración, se encuentren niveles superiores a 1 μ M (68). Son muchos los

trabajos realizados para ajustar adecuadamente la dosis en los pacientes tratados con MTX cuyas expectativas y tendencias posológicas se han basado en el uso de la simulación y modelación matemática, generalmente basados en modelos bayesianos. Estos últimos además forman parte de los modelos farmacocinéticos denominados poblacionales (69).

Estos estudios se conocen como modelos de farmacocinética poblacional (PopPk) los cuales permiten incluir covariables que pudieran influir en la respuesta farmacocinética como son el sexo, peso, talla, índice de masa corporal, aclaramiento de creatinina, valores plasmáticos de medición fisiológica (bilirrubinas, transaminasas, albúmina, creatinina), polimorfismos genéticos, etc (70).

La evaluación cuantitativa de los parámetros farmacocinéticos de MTX resulta ser muy atractiva ya que es potencialmente importante como un factor pronóstico de quimioterapia del cáncer y más aún en población pediátrica (71).

1.11. Características de la modelación de farmacocinética poblacional.

La PopPk estudia a un grupo poblacional en lugar de realizar un análisis farmacocinético individual (72). Por tanto, este procesamiento desarrollado por Sheiner 1985(73), permite observar la influencia de la variabilidad inter e intra-individual, sobre la farmacocinética de los principios activos farmacológicos (74). La PopPk incorpora algoritmos bayesianos a la farmacocinética clínica (75).

La variabilidad de la población es un factor determinante de la respuesta farmacocinética/ farmacodinámica, la cual comprende dos tipos:

- 1.- Modelo de efectos fijos: variabilidad que se correlaciona con cada variable independiente, la misma se calcula por medio de un coeficiente de regresión.
- 2.- Variabilidad aleatoria o residual: esta tiene relación con el modelo de efectos aleatorios, siendo calculada por un análisis de varianza.

Grasela y *col.*, 1991(76) determinaron que para establecer un modelo poblacional idóneo se requiere la participación de 3 tipos de parámetros:

Parámetro de efectos fijos: los que explican la farmacocinética poblacional promedio, y sus relaciones entre los parámetros del modelo estructural y las características de cada individuo, por ejemplo es el caso del valor medio del volumen aparente de distribución (Vd) obtenido de una población específica con el aclaramiento de creatinina (CLcr). Son estos parámetros los que sientan las bases para las posologías recomendables a futuro en una población.

Parámetros de efecto aleatorio inter-individual: permiten la determinación de la variabilidad farmacocinética de un individuo con respecto a otro dentro de la misma población, por lo que se calcula de acuerdo a la dispersión de un parámetro farmacocinético individual con respecto al valor del parámetro poblacional. Este parámetro es útil porque orienta sobre la seguridad del fármaco, lo que obliga a realizar un monitoreo y un reajuste de dosis de ese fármaco.

Parámetros de efecto aleatorio intra-individual: estos valoran la variabilidad residual, en la que se incluye la variabilidad intra-sujetos, el error de la técnica analítica, el error de selección del modelo, la selección de los tiempos de toma de muestra, etc.(77)

Para la determinación de la PopPk se utilizan modelos no lineales de efectos mixtos, en las que se aplican algoritmos adecuados que involucran los parámetros de efectos fijos, aleatorios y/o residuales. Existen diferentes paquetes informáticos que facilitan este trabajo como son NONMEM(78), MONOLIX(79), WINNONLIN NLME, P-metrics, entre otros; sin embargo, se considera que aquellos que basan su estrategia de cálculo en algoritmos de maximización de verosimilitud, son los más adecuados y estables (80).

Uno de los desafíos de la medicina está en encontrar el tratamiento adecuado dirigido a un individuo particular, de ahí surge el término de medicina personalizada que se definen como la adecuación del tratamiento médico a las características individuales del paciente. Esto permitir plantear medidas preventivas que dan como resultado, la disminución del costo de la atención a largo plazo. Asimismo, permite afinar el diagnóstico e implementar un mejor tratamiento incrementando la

efectividad del mismo y disminuyendo los efectos adversos. Es decir, dar el tratamiento adecuado en el momento óptimo a la persona adecuada (81). El modelo así sugerido involucra el uso de la información farmacogenética y farmacogenómica del paciente para suministrarle un régimen posológico adecuado (82).

1.12. JUSTIFICACIÓN

La LLA tiene una alta prevalencia en México que tiende a incrementarse de manera progresiva. Su tratamiento con agentes antineoplásicos conlleva a un alto riesgo de intoxicación o de fracaso terapéutico en los pacientes en edad pediátrica. En particular, cuando se trata de medicamentos con un índice terapéutico estrecho como la 6-Mercaptopurina, vincristina y el MTX, utilizados en la fase de inducción a la remisión.

Además es imprescindible diseñar adecuados regímenes de tratamiento individualizado a partir del conocimiento farmacocinético/farmacogenético del MTX, que ayuden a reducir el riesgo de toxicidad (83).

En consecuencia, resulta evidente el impacto económico del tratamiento personalizado que se traduce en menos ingresos hospitalarios, menor tiempo de hospitalización y/o de requerimientos de recursos materiales y humanos sanitarios intra y extra hospitalarios, que benefician la relación costo/beneficio.

1.13. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Existe asociación de los polimorfismos genéticos de *FPGS*, *XO*, *RFC1*, *ABCB1* y *ABCC5* con la farmacocinética y la respuesta al tratamiento con MTX en pacientes pediátricos con LLA?

1.14. HIPÓTESIS

- Los polimorfismos genéticos de *FPGS*, *XO*, *RFC1*, *ABCB1* y *ABCC5* están asociados con la farmacocinética y la respuesta al tratamiento con MTX en pacientes pediátricos con LLA.

II. OBJETIVOS

General

- Determinar la asociación los polimorfismos genéticos de ***FPGS, XO, RFC1, ABCB1 y ABCC5*** con la farmacocinética de metotrexate (MTX) y la respuesta al tratamiento en pacientes pediátricos con LLA.

Específicos

1. Cuantificar los niveles plasmáticos de MTX en pacientes pediátricos con LLA.
2. Determinar la farmacocinética poblacional de MTX (V_c/F , V_p/F , Q/F , CL/F y Ke/F) en niños con LLA.
3. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos genéticos de la *FPGS, XO, RFC1, ABCB1 y ABCC5* en pacientes pediátricos con LLA.
4. Determinar la asociación de los polimorfismos genéticos de *FPGS, XO, RFC1, ABCB1 y ABCC5* con la farmacocinética de MTX en pacientes pediátricos con LLA.
5. Determinar la asociación de los polimorfismos genéticos de *FPGS, XO, RFC1, ABCB1 y ABCC5* con la respuesta al tratamiento con MTX en pacientes pediátricos con LLA.
6. Diseñar los ajustes posológicos de MTX en función de los parámetros farmacocinéticos/farmacogenéticos de la población.

III. ARTÍCULO 1

Association of *ABCB1*, *ABCC5* and *Xanthine Oxidase* Genetic Polymorphisms with Methotrexate Adverse Reactions in Mexican Pediatric Patients with ALL

3.1. Abstract

Background: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is one of the most frequent oncological disorders in pediatric populations. To date, the drug of choice for the treatment of ALL is methotrexate, a drug associated with a high risk of adverse reactions (ADRs). The xanthine oxidase (XO) polymorphisms, 1936A>G and 2107A>G, as well as the polymorphic variants derived from ATP-binding cassette transporter gene subfamilies, *ABCB1* and *ABCC5*, of drug resistant codifying genes, are implicated as precursors of drug-related neurologic, hepatic, and renal toxicities.

Objective: Our aim was to determine if the mentioned polymorphisms are risk or protective factors for development of adverse reactions by Methotrexate in our pediatric population with ALL **Methods:** Thirty five Mexican children from Centro Estatal de Cancerología-Durango, Mexico, with ALL and the previously noted polymorphisms as determined qPCR were studied. At the same time, a 12-month drug monitoring program was conducted in accordance with WHO-PAHO guidelines for pharmacovigilance. **Results:** The *ABCB1* 1936A>G and 2107A>G, and *ABCC5* 3414+434A>C polymorphisms were not associated with methotrexate ADRs. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *ABCB1* 1236C>T (OR 0.19, 95%CI 0.03-0.9, $p<0.05$) and *ABCC5* 3933+313T>C (OR 0.12, 95%CI: 0.027-0.58, $p<0.05$) were associated with Methotrexate ADRs. **Conclusion:** SNPs 1236C>T of *ABCB1* and *ABCC5* 3933+313T>C are not associated with development of typical ADRs by Methotrexate, in contrast showed a protective factor for myelosuppression in the studied sick population.

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

List of Abbreviations:

ALL: Acute lymphoblastic leukemia

MRD1: Multi-drug resistance proteins type 1

MDR5: Multi-drug resistance proteins type 5

ABC: ATP-binding cassette proteins family

CECAN: Centro Estatal de Cancerología

ADRs: Adverse drug reactions

3.2. Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a common worldwide hematologic malignancy of public health importance. Between 80-85% of pediatric patients with a diagnosis of leukemia have ALL (1) In northeast Mexico, the incidence and mortality of ALL is frequent (2)

Recently, the influence of proteins that determine drug resistance has been highlighted. The main function of these proteins, known as multi-drug resistance proteins (MDR1 and MRP5), is to enable efflux of pharmacologically active molecules from tumor cells (eg, lymphoblasts) (3-5).

Over-expression of *ABC* transporters in tumor cells is a primary mechanism of resistance to chemotherapeutic drugs (6). Since the functional characterization of MRP5, its importance has been identified in the resistance to anti-neoplastic and anti-HIV drugs (7). The antifolate mechanism of action of MTX compromises the gastrointestinal tract and bone marrow, and thereby increases the risk of toxicity (8, 9). Liu *et al* (10) found that the -24T allele of the *ABCC2* gene is associated with the

severity of MTX toxicity via its resultant long duration of high drug concentration. This suggests that individualization of methotrexate dosing might result in less toxicity.

By other side, xanthine oxidase (XO) is an enzyme that metabolizes purines and transforms them into uric acid. Kudo *et al* (11) conducted genotyping studies and found that certain polymorphisms can reduce enzyme function in approximately 64.7% of Caucasians. XO activity can be reduced by some genotypes or inhibition by allopurinol or MTX. Reduced XO activity results in a decrease in metabolism and elimination of natural and synthetic purines (eg, 6-mercaptopurine, oncologic treatments) in consequence could be a factor for develop ADRs(12).

Several researchers have found significant association between polymorphisms of ABCB1 with changes in efficiency and toxic responses by MTX in pediatric population with ALL (13-14). In contrast, reports about the role of ABCC5 genetic polymorphisms in the onset adverse drug reactions (ADRs) by MTX in Mexican pediatric patients with ALL are limited. Therefore, the main aim of this study was to determine if genetic polymorphisms of the membrane transport proteins *ABCB1* and *ABCC5*, or *XO* are associated with the development of ADRs by MTX in Mexican pediatric patients with ALL.

3.3. Methods

General study design

This was an observational, prospective, association study. Thirty-five pediatric patients were assessed in our study. All children satisfied the criteria of inclusion: being in pediatric age, both genders, having diagnostic of low and intermediated risk of ALL, agree on the Franco-American British Association criteria (15), giving signed informed consent by tutors and being in maintenance phase with treatment of low-dose of MTX . Our patients were admitted between August 2012 to November 2013 at the Hematology-Oncology Unit, Durango State Cancer Center (Centro Estatal de Cancerología, CECAN), Durango, México. This research was approved by the CECAN Ethic and Research Committee, Durango, Mexico in accordance with the

Helsinki Declaration and Mexican general health law. Each patient received chemotherapy courses agree the St. Jude TOTAL XV protocol (16). The study focused on the maintenance stage, which consists of 120 weeks, during MTX administration was done for low risk and moderate patients. We monitored 538 courses of chemotherapy in low-risk patients. The observations of courses of chemotherapy was evaluated in three stages: first consisted in a single dose of MTX (25-50mg/m²) i.m. with 6-mercaptopurine (6-MP) oral 75mg/m²/dose once a day, vincristine (2mg/m²/dose) and dexamethasone (8mg/m²/day for 5 days). For second stage, children received a single dose MTX (25-50mg/m²) i.m. in the morning and 6-MP 75mg/m²/dose in the night. The last stage we reviewed courses without administration of MTX for reach homogeneity of the results. For this research we focused the second phase to reduce interferences and drug interactions.

3.3.1. Genotyping

DNA extraction was carried out using a commercial kit (Macherey-Nagel®, Germany). DNA integrity and purity was evaluated by horizontal electrophoresis in 1% agarose gel stained with ethidium bromide. This was followed by quantification in a spectrophotometer (Nanodrop®, ThermoScientific, USA). Determination of *XO*, *ABCB1*, and *ABCC5* allelic variants was done using real-time polymerized chain reaction (qPCR) (Applied Biosystems StepOne™, USA). The catheter (Taqman®) and assays used are presented in Table 1.

3.3.2. Pharmacovigilance

The detection of ADRs by MTX, and documentation of simultaneously prescribed drugs within the therapeutic plan, were carried out in accordance with the modified algorithm of Naranjo *et al* (17), Federal Commission for Protection against Health Risks (COFEPRIS), and the World Health Organization (WHO) (18-20). The considered variables were age, sex, body weight, height, nutritional status, leukocyte count, leukoblasts count, hemoglobin, hematocrit, erythrocytes, thrombocytes, hepatic function tests, and renal function tests. To evaluate MTX toxicity in each treatment course, the level of myelosuppression, hepatotoxicity, mucositis, neurotoxicity, and nephrotoxicity were determined in maintenance phase.

Erythrocyte count, leukocyte count, hemoglobin value, hematocrit, and platelet were considered. Hepatotoxicity was determined with bilirubin values (direct, indirect, and total), transaminases, jaundice, choluria, hepatomegaly, and gastrointestinal reactions such as nausea, emesis, diarrhea, and flatulence. Oral mucositis was evaluated in accordance with WHO criteria and the National Cancer Institute (NCI) adverse event terminology (21). Neurotoxicity was evaluated by seizure activity, ataxia, apraxia, paresis, paralysis, level of consciousness, mood, and visual disorders. Finally, nephrotoxicity was assessed by oliguria, edema, dysuria, proteinuria, plasma urea, serum creatinine, and reduction in creatinine clearance.

3.3.3. Statistical Analyses

Hardy-Weinberg equilibrium and binding disequilibrium analyses were done from the expected and observed genotypic and allelic frequencies in the study population. SNPStats (Spain) online software was used (22).

The polymorphism frequencies and ADRs during the MTX maintenance phase were obtained. The associations of the *XO*, *ABCB1* and *ABCC5* genetic polymorphisms with ADRs by MTX were assessed by analysis of risk, expressed as the coefficient of the odds ratio (OR) and considered significant when the p value was <0.05 and 95% confidence interval (95%CI) was greater than 1. Test canonical regression was evaluated to search associations between all variables. SAS version 9.0 (USA, 2002) and Statistic version 7 (USA, 2004) were used.

3.4. Results

3.4.1. Genotyping results

Thirty-five patients with a diagnosis of ALL were studied. Demographic data are displayed in Table 2. Table 3 shows the genotype and allele frequencies. Twenty-one patients were homozygous for the *ABCB1* variant *1236C>T* that encodes for multidrug transporter MDR1, 4 subjects were heterozygotes (HT), and 10 were classified as wild-type homozygotes (WT). Moreover, *3414+434A>C* and *3933+313T>C* *ABCC5* polymorphisms that encoding for MRP5 were studied. Of the 35 children studied, eight were HM, four HT, and 23 were WT for the *3414+434A>C*

polymorphism. Fifteen were HT, six HM, and 14 WT for the 3933+313T>C polymorphism.

For the XO 1936A>G polymorphism, 21 subjects were HT, six were HM, and eight were WT. For the 2107A>G polymorphism, 21 subjects were HM, 15 were WT, and none were HT.

A Hardy-Weinberg equilibrium analysis revealed non-existence in the polymorphisms *ABCB1* (1236C>T), 3414+434A>C of *ABCC5* and XO (2107A>G) (see Table 3).

Linkage disequilibrium analysis of the *ABCC5* polymorphisms showed the following value $D' = 0.02$ ($p = 0.88$) and XO SNPs and $D' = 0.15$ ($p = 0.30$) for XO SNPs. This demonstrates non-independence in genetic co-segregation.

3.4.2. Pharmacovigilance results

The association between the risk of developed ADRs with the genotype of the 35 pediatric patients is shown in Table 4 where *ABCB1* 1236T>C and 3933+313T>C polymorphisms showed protective effect for myelosuppression with OR: 0.19(0.03-0.93) and 0.125(0.027-0.579) respectively.

3.4.3. Classification of ADRs by NCI nomenclature:

A total of 79 events of ADRs by MTX were scored according to NCI nomenclature. This classifies ADRs by severity, where grade 1 (G1) corresponds to a mild reaction, G2 to moderate, and G3 to severe (see supplementary data, Table 5). Myelosuppression reaction (anemia, leukopenia, and thrombocytopenia) were the most frequent, with many patients who experienced G2 and G3 reactions characteristic of MTX. Analysis of the genetic polymorphisms regulating drug resistance proteins found that patients with the homozygote *ABCB1* variant 1236T>C developed more events of myelosuppression (anemia, leukopenia and thrombocytopenia).

For the two *ABCC5* SNPs studied, carriers with the wild-type genotype had a greater frequency of adverse hematologic reactions when compared with those who were

heterozygote or homozygous variants. In case of the *3414+434A>C* polymorphism, 14 (17%) events were anemia, 16 (20%) were leukopenia, and 13 (14%) were thrombocytopenia. ADRs in the majority of variant genotypes (n=5) were leukopenia. Similar findings occurred with the *3933+313T>C* genotype. The most frequent adverse reaction occurred in WT subjects where there were 15(19%) cases of anemia, 19 (24%) occurrences of leukopenia, and 9 (11%) had thrombocytopenia. Subjects with HM carriers had more thrombocytopenic events.

Among *XO 1936A>G* polymorphic carriers, the heterozygotes developed similar numbers of myelosuppression reactions. In patients with the *2107A>G* polymorphism, the number of adverse reactions was higher among those with two allele variants -HM.

ADRs other organs (hepatotoxicity, nephrotoxicity, neurotoxicity, mucositis) were less frequent. The *XO* polymorphisms *1936A>G*, *2107A>G* and *ABCC5 3414+434A>C* were not correlated with MTX adverse events. Some ADRs were present for a short time during treatment and were resolved upon correction or modifications of the specific treatment plan. Oral mucositis was frequent in those receiving methotrexate. Eleven events occurred in and in the group WT with the 2 variant mutations both for *ABCB1 1236C>T*. Similar findings were seen in *3414+434A>C ABCC5* homozygote mutations. Finally, carriers of *XO* polymorphisms presented the highest number of cases of oral mucositis.

3.5. Discussion

Thirty-five patients with the *ABCB1 1236C>T* genetic polymorphism were studied. The highest allelic proportion of this gene was 57%. This value is similar to that reported by Levran *et al* (23). The *ABCB1* gene polymorphism results in over-expression of transport proteins as a consequence of the chemotherapeutic agents, and might have resulted from the effects of treatment. A similar finding was reported by Colom *et al* (24).

MDR1 proteins that are regulated by the *ABCB1* gene are associated with resistance to various drugs, such as digoxin and cyclosporine. This suggests that a variant TT genotype, instead of the CC wild-type genotype, is responsible for the high concentration of the noted drugs (25-26). This may explain the MTX ADRs, including leukopenia, thrombocytopenia, and mucositis. The five adverse events observed were in patients with mutated the *ABCB1* TT variant gene polymorphism. Moreover, five adverse reactions were seen in patients with WT genotype. On canonical regression analysis, the variant variable was significantly different for anemia and leukopenia in groups with the variant allele versus WT. This finding is different from that reported by Kotnik *et al* (27), who evaluated various polymorphisms similar to *3435C>T* and *2677G>T/A* but did not find an association with these adverse events.

The current study did not find severe neurotoxicity, which is one of the characteristics of MTX toxicity. This finding differs from that of Erddyi *et al* (26). Nevertheless, those authors reported that certain transporter carriers with wild-type and heterozygote genotypes show modest symptoms categorized as grade 1 neurotoxicity (28).

The allelic frequencies of these two variants has previously been reported in a Mexican population (29). The results of the current study suggest that these genes are over-expressed via induction by the oncological agents in a way that is similar to MRP4. This concurs with the report of McAller *et al* (30), who concluded that the action of thioguanine, cadmium chloride, and antimonium tartrate as causal agents of over-expression for MRP5 and MRP4 proteins. Mor-Cohen *et al* (31) found that between 3–31.2% of the variant alleles in a Jewish population may explain the appearance of severe adverse reactions.

The ADRs seen in patients with the *ABCC5* wild-type genotype were mild myelosuppression (G1), hepatotoxicity, and mucositis. However, a significant degree of neurotoxicity occurred in a heterozygote patient with a *3414+432A>C* polymorphism. Five patients with the *3933+313T>C* polymorphism developed mucositis, although this was less frequent than among those with the WT genotype.

XO heterozygotes were for *1936A>G*, this differs from findings in a Caucasian population with a genotypic frequency of 1 heterozygote among 19 patients (32). No heterozygotes were found for the *2107A>G* polymorphism; rather, homozygous variants predominated. This suggests that the genotypic frequency of the studied polymorphisms is variable in Mexican pediatric patients with ALL.

XO plays an important role in purine metabolism, and is the reason why drugs such as allopurinol and MTX that inhibit XO could alter hepatic metabolism of hypoxanthine and xanthine to uric acid. This implies that there is an increase of these metabolites in plasma that requires renal elimination. For this, transitory increases of xanthine at the level of the kidney could result in renal damage. However, in this study, MTX nephropathy was not seen, and might be explained by the low doses of MTX administered (33).

3.6. Conclusion

In our evaluated population, the XO polymorphisms *1936A>G*, *2107A>G*, and *ABCC5 3414+434A>C* were not correlated with MTX adverse events. SNPs *1236C>T* of *ABCB1* and *ABCC5 3933+313T>C* are not associated with development of ADRs by MTX, in contrast showed a probable protective effect for myelosuppression in patients with ALL, a fact that should be taken into consideration for the management of treatment with MTX in patients with ALL.

Acknowledgments

The authors acknowledge the following for their assistance with this research: Lic Pedro Cruz, Director General de Centro Oncológico Pediátrico de Baja California and Dr. Jesús Manuel Lozano García, Director Médico de Centro Oncológico Pediátrico of Baja California.

Dr. Miguel Reyes-López of Centro de Biotecnología Genómica del IPN- Reynosa Tamaulipas, México; Anne Nafziger MD, PhD of Albany Medical Center, St Peter's Hospital, NY, USA for review of manuscript and Dra. María Cristina Arias-Peláez of Departamento Fisiología-Universidad Juárez Estado Durango, México

3.7. References

1. Rodríguez L, González-Llano O, Mancias C, Pompa T, González G, Sandoval A, *et al*. Observaciones sobre la incidencia de leucemias agudas en el Noreste de México. *Rev Hematol Mex* 2010; 11:78-81.
2. Website: Dirección General de Información en Salud(DGIS). Base de datos de egresos hospitalarios por mortalidad en instituciones públicas; Available at: <http://www.sinais.salud.gob.mx>. Accessed 15 Oct 2014.
3. Website: King MW . Introducción a las Membranas Biológicas; Available at: <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/membranes-sp.php>. Accessed 14 Nov 2013.
4. Higgins CF. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Res. Microbiol* 2011;152:205-210.
5. Holland KA, Holland IB. Adventures with ABC-proteins: highly conserved ATP-dependent transporters. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2005; 52:309-322.
6. Gottesman M, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* 2005;2:48-58.
7. Wielinga P, Hooijberg JH, Gunnarsdottir S, Kathmann I, Reid G, Zelcer N, *et al*. The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. *Cancer Res* 2005;65:4425-4430.
8. Sanz-Sabrafen J, Besses- Raebel C, Vives-Corróns J , editors. *Hematología Clínica*. 5th ed. Madrid: Elsevier; 2006:889
9. Kremer J. Methotrexate pharmacogenomics. *Ann. Rheum. Dis* 2006; 65:1121-1123.
10. Liu Y, Yin Y, Sheng Q, Lu X, Wang F, Lin Z, *et al*. Association of ABCC2 224C.T Polymorphism with High-Dose Methotrexate Plasma Concentrations and Toxicities in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS One* 2014;9:1-7.

11. Kudo M, Sasaki T, Ishikawa M, Hirasawa N, Hiratsuka M. Kinetics of 6-Thioxanthine Metabolism by Allelic Variants of Xanthine Oxidase. *Drug Metab Pharmacokinet* 2010;25:361-366.
12. Massey V, Komai H, Palmer G, Elion G. On the Mechanism of inactivation of Xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazol[3,4-d]pyrimidines. *J Biol Chem* 1970;245: 2837-2844.
13. Gregers J, Gréen H, Christensen I J, Dalhoff K, Schroeder H, Carlsen N, *et al.* Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J* 2015;1-8
14. Zgheib NK, Akra-Ismail M, Aridi C, Mahfouz R, Abboud MR, Solh H, *et al.* Genetic polymorphisms in candidate genes predict increased toxicity with methotrexate therapy in Lebanese children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics* 2014; 24: 387-396
15. Website: Haematology BSo. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia hme page. Available at: http://www.bcshguidelines.com/pdf/chronicLL_050504.pdf. Accessed 01 Sep 2013.
16. Pui C, Relling M, Sandlund J, Downing JR, Campana D, Evans WE, *et al.* Rationale and design of Total Therapy Study XV for newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 2004;83:S124-126.
- 17 Naranjo C, Busto U, Sellers EM, Sandor P, Ruiz I, Roberts EA, *et al.* A method for estimating the probability of adverse drug reactions. *Clin Pharmacol Ther* 1981;30:239-246.
18. Organización Panamericana de la Salud. Buenas Prácticas de Farmacovigilancia para las Américas. Vol Red PARF Documento Técnico No. 5. Washington D.C: 2010;OPS:78.
19. SSA-COFEPRIS Guía de farmacovigilancia para la notificación de sospecha de reacciones adversas/ Reacciones adversas. In: COFEPRIS, ed. MEXICO DF: 2012:21

20. World Health Organization. Safety of Medicines: a guide to detecting and reporting adverse drug reactions. Geneva: World Health Organization.. 2002:20
21. National Cancer Institute-NCI .NCI Guidelines for investigators: Adverse event reporting requirements for DCTD (CTEP and CIP) and DCP INDs and IDEs. NCI; 2013: 34
22. Website: Institut Catalá d'Oncologia-ICO. SNPStats-Your web for SNP analysis. Available at: <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats/Cataluña>: Accessed: 04 Mar 2014.
23. Levran O, O'Hara E, Peles K, Li D, Barral S, Ray B, *et al.* *ABCB1* (MDR1) genetic variants are associated with methadone doses required for effective treatment of heroin dependence. *Hum Mol Genet* 2008;17:2219–2227.
24. Colom H, Farré R, Soy D, Peraire C, Cendros J, Pardo N, *et al.* Population pharmacokinetics of high-dose methotrexate after intravenous administration in pediatric patients with osteosarcoma. *Ther Drug Monit* 2009;31:76-85.
25. Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, Li Z, Ohyama C, Sato K, *et al.* Influence of CYP3A5 and MDR1 (*ABCB1*) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2004: 78:1182-1187.
26. Yates CR, Zhang W, Song P, Li S, Gaber A, Kotb M, *et al.* The effect of CYP3A5 and MDR1 polymorphic expression on cyclosporine oral disposition in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol* 2003;43:555-564.
27. Kotnik, B, Grabnar I, Bohanec P, Dolzan V, Jazbec J. Association of genetic polymorphism in the folate metabolic pathway with methotrexate pharmacokinetics and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia and malignant lymphoma. *Eur J Clin Pharmacol* 2011 67:993-1006.
28. Erdilyi D, Kamory E, Csokay B, Andrikovics H, Tordai A, Kiss C, *et al.* Synergistic interaction of *ABCB1* and *ABCG2* polymorphisms predicts the prevalence of toxic encephalopathy during anticancer chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2008;8:321-327. 29.

29. Website: Biosystems LT-A. Real-Time PCR Assays. Available at: <https://www.lifetechnologies.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays.html>. Accessed 2 Jan 2014.
30. McAleer MA, Breen MA, White NL and Mathews N. pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. *J Bio Chem* 2009;274:23541-23548.
31. Mor-Cohen R, Zivelin A, Rosenberg N, Shani M, Muallem S and Seligsohn . Identification and functional analysis of two novel mutations in the multidrug resistance protein 2 gene in Israeli patients with Dubin-Johnson syndrome. *J. Biol Chem* 2001;276:36923-36930.
32. Hawwa AF, Millership JS, Collier PS, Vandebroek K, McCarthy A, Dempsey S, *et al.* Pharmacogenomic studies of the anticancer and immunosuppressive thiopurines mercaptopurine and azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* 2008;66:517-518.
33. Bowman W, Shuster J, Cook B and Griffin T. Improved survival for children with B-cell acute lymphoblastic leukemia and stage IV small noncleaved-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1996;14:1252-126

Table 1 Characteristics of the studied single nucleotide polymorphisms (SNPs) with their National Center for Biotechnology Information (NCBI) and by Applied BioSystem references

SNPs	Locus	Id NCBI	Sequence	Id Catheter	Applied BioSystems®
ABCB1(MDR1) c1236T>C	Cr7	rs1128503	GCCCACTCTGCACCTTCAGGTTTCAG[A/G]CCCTTCAAGATCTACCAGGACGAGT	C_7586662_10	
ABCC5(MRP5) 3414+434A>C	Cr3	rs9838667	TCAATCACCCCTAGGGGCTAGAAGG[G/T]TTTATGTATATAACAGTATTGGGAA	C_26061042_10	
ABCC5(MRP5) 3933+313T>C	Cr3	rs3792585	GCCACGTTATATATCTTTTGCAT[A/G]TGTGGACGCTTCAAAGTATGTTACA	C_1738056_10	
Xanthine Oxidase 1936A>G	Cr2	rs17323235	GTCTCATCATTACAAATTCAGTTA[C/T]GTTACTCCAGGAACATCATCAGCG	C_25603303_20	
Xanthine Oxidase 2107A>G	Cr2	rs1701368	GGTCCATAAAAGGAGTTGTTCTTTA[C/T]AGCATCCTGAGGATCACAAAGAAGT	C_25472962_20	

Table 2. Demographic data, posology clinical biochemical tests for 35 pediatric oncology patients included in study

Variables	Median (range)
Age (years)	6.3 (2.5-18.1)
Sex (male/female)	22/13
Body weight (kg)	18.9 (12.3-55.1)
Height (m)	1.11 (0.91-1.71)
Body surface (m ²)	0.71 (0.50-1.7)
Body mass index (kg/m ²)	15.11 (12.4-28.1)
Methotrexate i.m, average dose	45.2mg*m ⁻²
Dosing interval	Week 2 and 3
Hemoglobin (g/dL)	12.05 (7-16.8)
Hematocrit (%)	36.1 (28.2-47.0)
Erythrocyte count (cell/mm ³)	3.59x10 ⁶ (2.85-5.89x10 ⁶)
Leukocyte count (cell/mm ³)	3220 (1079-13600)
Platelet count (cell/mm ³)	187x10 ³ (41.1-378x10 ³)
AST (UI/L)	44.5 (0.4-149)
ALT (UI/L)	61 (0.3-206)
LDH (UI/L)	644 (352-1496)
Uric acid (mg/dL)	3.4 (2-4.7)
Plasma urea (mg/dL)	18 (8-34)
Serum creatinine (mg/dL)	0.5 (0.3-0.7)
Alkaline phosphatase (UI/L)	249 (58-317)

Table 3. Genotype and allelic frequencies polymorphisms regulating drug resistance proteins (*ABCB1* and *ABCC5*) and xanthine oxidase (*XO*).

Gene	Polymorphism (SNP)	Frequencies					
		Genotypes ^a			Alleles ^b		
		WT	HT	HM	<i>p</i>	<i>q</i>	Hardy-Weinber
<i>ABCB1</i> (MDR1) n=35	1236C>T	10C/C (0.29)	4C/T (0.11)	21T/T (0.60)	24 (0.43)	46 (0.57)	p<0.0001
<i>ABCC5</i> (MRP5) n=35	3414+434A>C	23A/A (0.66)	4A/C (0.11)	8C/C (0,23)	50 (0.71)	20 (0.29)	p<0.0001
<i>ABCC5</i> (MRP5) n=35	3933+313T>C	14T/T (0.40)	15T/C (0.43)	6C/C (0,17)	43 (0.61)	27 (0.39)	p=0.72
<i>XO</i> n=35	1936A>G	8A/A (0.23)	21A/ G (0.60)	6G/G (0,17)	37 (0.53)	33 (0.47)	p=0.32
<i>XO</i> n=35	2107A>G	15A/A (0.43)	0A /G (0.00)	20G/G (0.57)	30 (0,43)	40 (0.57)	p<0.0001

WT: wild type, HT: heterozygote, HM: homozygote mutated or variant, XO: xanthine oxidase, SNP: single nucleotid polymorphism

a.- Number of patients and their respective proportion in parenthesis

b.- Hardy-Weinberg notation for allelic frequencies where *p* represents the value of wild-type allelic frequency and *q* mutated allele *p*<0.05.

Table 4. Frequencies of pediatric patients who had adverse reactions by genetic polymorphism.

POLYMORPHISM	Genotype	MYELO SUPPRESSION*		HEPATO TOXICITY		NEPHRO TOXICITY		NEURO TOXICITY		MUCOSITIS	
		YES	NO	YES	NO	YES	NO	YES	NO	YES	NO
ABCB1 1236C>T	CC	7	3	22	9	1	9	2	8	2	8
	CT+TT	8	18	3	1	2	23	3	2	9	16
	p value	0.033		0.440		0.458		0.318		0.22	
	OR (CI)	0.19(0.03-0.93)		1.22(0.11-13.43)		0.78(0.06-9.74)		0.54(0.07-3.89)		2.25(0.39-12.97)	
ABCC5 3414+434A>C	AA	10	13	2	21	1	22	2	21	9	14
	AC+CC	5	7	2	10	2	10	3	9	2	10
	p value	0.229		0.318		0.232		0.1715		0.129	
	OR(CI)	0.93(0.23-3.82)		2.10(0.26-17.14)		4.40(0.36-54.37)		3.50(0.49-24.66)		0.31(0.05-1.76)	
ABCC5 3933+313T>C	TT	10	4	3	11	2	12	4	10	7	7
	TC+CC	5	16	1	20	1	20	1	20	4	17
	p value	0.006		0.146		0.292		0.0648		0.049	
	OR(CI)	0.13(0.03-0.56)		0.18(0.02-1.98)		0.30(0.024-3.67)		0.13(0.01-1.27)		0.24(0.05-1.06)	
Xanthine Oxidase 1936A>G	AA	6	9	0	8	0	8	1	7	1	7
	AG+GG	9	11	4	23	3	24	4	23	10	17
	p value	0.258		0.335		0.447		0.432		0.161	
	OR(CI)	1.23(0.36-4.77)		ND		ND		1.22(0.12-12.75)		4.12(0.44-38.52)	
Xanthine Oxidase 2107A>G	AA	6	9	1	14	1	14	2	13	3	12
	AG+GG	9	11	3	17	2	18	3	17	8	12
	p value	0.258		0.326		0.435		0.368		0.137	
	OR(CI)	1.23(0.36-4.77)		2.47(0.23-26.46)		1.56(0.13-18.95)		1.15(0.17-7.89)		2.67(0.57-12.557)	

*Adverse reactions of anemia, leukopenia, and thrombocytopenia are included in myelosuppression.

Analysis of Fisher’s exact probabilities OR: odds ratio; p<0.05; 95%CI: Confidence interval.

Supplementary material

Table 5. Classification of adverse reactions according to National Cancer Institute (NCI) nomenclature and ATP-binding cassette transporter or xanthine oxidase genotype

POLYMORPHISM		Adverse Reactions in Other Organs														
		Myelosuppression														
		Anemia		Leukopenia			Thrombo-cytopenia		Hepato-toxicity		Nephro-toxicity		Neuro-toxicity		Mucositis	
G1	G2	G1	G2	G3	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2		
ABCB1 1236C>T	<i>WT</i>	5	1	5	1	0	5	0	1	0	1	0	2	0	1	1
	<i>HT</i>	3	0	3	0	0	6	1	1	1	1	0	3	0	2	4
	<i>HM</i>	5	4	5	4	0	2	3	1	0	1	0	1	0	4	1
ABCC5 3414+434A>C	<i>WT</i>	10	4	12	2	1	10	3	11	4	1	0	2	0	5	6
	<i>HT</i>	2	0	1	1	0	2	0	1	0	1	0	3	0	1	0
	<i>HM</i>	1	1	4	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0
ABCC5 3933+313T>C	<i>WT</i>	11	4	14	3	1	7	2	3	0	2	0	5	0	4	4
	<i>HT</i>	1	0	1	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	<i>HM</i>	1	1	2	0	0	4	2	0	0	1	0	1	0	3	2
XO 1936A>G	<i>WT</i>	2	1	4	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0
	<i>HT</i>	10	4	13	5	0	11	3	2	1	3	0	3	0	5	4
	<i>HM</i>	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	0	1	2
XO 2107A>G	<i>WT</i>	5	2	9	1	0	4	1	1	0	1	0	3	0	2	1
	<i>HT</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>HM</i>	8	3	8	3	1	9	3	2	1	2	0	3	0	5	5

ABCB1 and ABCC5: ATP-binding cassette transporter gene subfamilies; XO: xanthine oxidase; WT: wild type; HT, heterozygote; HM, adverse Homozygote mutation; G1: Grade 1- mild reactions, G2: Grade 2- moderate adverse reactions, G3: Grade 3-Severe

IV. ARTÍCULO 2

Impacto de polimorfismos genéticos de la vía metabólica del metotrexato sobre la sobrevida de niños mexicanos con leucemia linfoblástica aguda (LLA)

4.1. Resumen

ANTECEDENTES: La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es un padecimiento oncológico importante en la población pediátrica mexicana, cuya base genética pudiera modificar la efectividad de la quimioterapia del antifolato metotrexato (MTX) y el tiempo de sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida total.

OBJETIVO: Determinar la asociación de 10 polimorfismos genéticos de la vía del folato: en transportadores celulares (*COL18A1*, *SLC19A1*, *ABCB1* y *ABCC5*) y las enzimas folilpoliglutamil sintetasa (*FPGS*) y xantina oxidasa (*XO*), con la sobrevida de los niños con leucemia linfoblástica aguda.

MÉTODOS: En el Centro Estatal de Cancerología de Durango- México, se estudiaron 39 niños con leucemia linfoblástica aguda tratados con MTX y 102 controles sin la enfermedad, a quienes mediante qPCR, se les determinaron 10 polimorfismos en la vía del folato. Durante 5 años de seguimiento se determinó la sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida total, y su relación con su genotipo.

RESULTADOS: Cuatro polimorfismos no estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg *COL18A1* (rs2274808), *ABCC5* (rs9838667 y rs3792585) y *XO* (rs17011368). Únicamente el rs17011368 de *XO* se asoció con riesgo de estar presente en los pacientes con leucemia linfoblástica aguda cuyo OR fue 9.771(IC95% 4.974-19.196, p=0,001). El *FPGS* (rs1544105) afectó la sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida total (Log Rank p<0.05).

CONCLUSIONES: El polimorfismo (rs17011368) de la *XO* presentó riesgo para leucemia linfoblástica aguda; así mismo, se encontró una asociación importante entre los portadores del polimorfismo *FPGS* (rs1544105) que modificaría la sobrevidas de los pacientes tratados con MTX.

Palabras clave: metotrexato, xantina oxidasa, supervivencia, Leucemia Linfoblástica, genotipo.

Abstract

Background: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a major cancer disease in Mexican pediatric population, where the genotype could affect the effectiveness of chemotherapy in which the methotrexate (MTX) is involved and consequently the time of disease free survival and overall survival.

Objective: To determine the association of 10 genetic polymorphisms of folate pathway: in cellular carriers (*COL18A1*, *SLC19A1*, *ABCB1* and *ABCC5*) and in enzymes as folypolyglutamate synthetase (*FPGS*) and xanthine oxidase (*XO*), with survival of children with acute lymphoblastic leukemia.

Methods: Thirty-nine children with acute lymphoblastic leukemia from the State Cancer Center in Durango (Mexico) treated with MTX and 102 healthy controls, were qPCR analyzed for 10 polymorphisms in the folate pathway. During 5 years of follow up, the disease-free survival and overall survival rates were investigated in relation with their genotypes.

Results: Four polymorphisms were not in Hardy-Weinberg Equilibrium *COL18A1* (rs2274808), *ABCC5* (rs9838667 and rs3792585) and *XO* (rs170113685). Only *XO* (rs170113685) was associated with risk of being present in patients with ALL whose odds ratio was 9.771 (95% 4.974-19.196, p=0.001). The polymorphism rs1544105 for *FPGS* affected disease free survival and overall survival (Log Rank test p<0.05).

Conclusion: Polymorphism (rs17011368) of *XO* showed risk association for acute lymphoblastic leukemia; likewise, an important association was found between carriers of the *FPGS* (rs1544105) and increased survival times of patients treated with methotrexate.

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

4.2. Introducción

En los últimos años, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) ha sido uno de las enfermedades oncológicas más frecuentes en pediatría, la cual ha crecido de manera permanente a nivel mundial (1). En México, los últimos reportes del 2012 de la Secretaría de Salud, indican que LLA es una de las causas de morbilidad y mortalidad en pacientes en edad pediátrica, especialmente en los estados de Sinaloa, Baja California y Durango (2, 3). Dentro del tratamiento farmacológico de la LLA se utilizan fármacos que emplean la vía del folato, la cual está regulada por la función coordinada de varias enzimas como metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (4), Tiopurin-metil transferasa (TPMT), timidilato sintetasa (TS), folilpoliglutamil sintetasa (FPGS) (5), xantina oxidasa (XO), entre otras. La FPGS cumple un papel fundamental en la transformación del ácido fólico a poliglutamato que es el metabolito activo y precursor indispensable en la síntesis de purinas (6). Estas últimas, ingresan a la vía de la XO (7) para su transformación en ácido úrico que facilita su eliminación renal. El metotrexato (MTX), antifolato que forma parte del tratamiento de elección en todas las etapas de quimioterapia de los pacientes con LLA, por su semejanza con el folato, usa la misma vía metabólica a partir de su paso por la FPGS (8). Adicionalmente, el MTX es inhibidor selectivo de la XO (9) altamente tóxico (10).

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

Por otro lado, se han identificado varios transportadores de diferentes familias, con capacidad de generar fármaco-resistencia. Un grupo importante de estas proteínas está constituido por los transportadores de folato reducido de tipo 1 (Reduced Folic Carrier type 1-RFC1) codificados por el gen *SLC19A1* que esencialmente se

encargan de introducir el folato y antifolatos a la célula, localizándose a lo largo de la membrana celular (13). Existen otros transportadores, igualmente distribuidos en la región membranal, que participan en el eflujo activo de sustancias extrañas o de desecho conocidas como proteínas de resistencia a fármacos que usan la energía de ATP, tales como Multi-drug resistance proteins (MDR1) y Multidrug related resistance proteins (MRP5) codificados por *ABCB1* y *ABCC5* respectivamente (14), genes altamente polimórficos que modifican consecuentemente su función y su sobre-expresión (15).

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

4.3. Métodos

4.3.1. Pacientes y controles

Se trata de un estudio ambispectivo, observacional, comparativo y de asociación. Se incluyeron 39 pacientes pediátricos de ambos sexos atendidos en el Servicio de Hemato-oncología Pediátrica del Centro Estatal de Cancerología (CECAN) de la Secretaría de Salud de Durango-México desde enero de 2009 a junio de 2014. Todos los pacientes fueron diagnosticados con LLA de acuerdo al criterio de la Asociación Franco-Americana-Británica de Hematología (18). Esta investigación fue aprobada por el Comité de ética e investigación del CECAN validado de acuerdo a la declaración de Helsinki y a la Ley General de Salud de México. Cada paciente incluido en este estudio estuvo bajo tratamiento de quimioterapia de acuerdo al protocolo de St Jude XV y por tanto recibieron MTX en diferentes vías y esquemas

conforme a su fase de esquema de tratamiento (19), también se incluyeron los pacientes en vigilancia, es decir, niños que no reciben tratamiento farmacológico. Además, se evaluó un grupo de 102 niños sin LLA como control.

4.3.2. Genotipificación

El ADN se obtuvo a partir de sangre total utilizando un kit comercial (Macherey-Nagel® Alemania), se determinó su integridad y pureza por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se realizó la cuantificación por espectrofotometría en Nanodrop® (Thermoscientific, EE.UU.). Los polimorfismos *COL18A1* (rs2274808), *SLC19A11* (rs2838956), *ABCB1* (rs1045642, rs1128503), *ABCC5* (rs9838667, rs3792585), *FPGS* (rs1544105, rs4451422) y *XO* (rs17323235, rs17011368) se determinaron por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) (Applied Biosystems StepOne®, USA).

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

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

4.3.4. Análisis estadístico

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

entre las frecuencias alélicas y la presencia de LLA mediante un χ^2 y odds ratio (OR).

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

4.4. Resultados

4.4.1. Características generales de los pacientes y controles.

Se incorporaron al estudio 39 niños con diagnóstico de LLA del estado de Durango. El género que predominó fue el masculino con $n=24$ (61,50%) y sus edades corresponden a una mediana de 7,92 años con un IC de 2,5-18,08 años. El tiempo de seguimiento de tratamiento fue aproximadamente 70 semanas (25-286 semanas). En la Tabla 1 se presentan las características generales y clínicas de los niños, en la cual se puede observar el número de pacientes que tuvieron recaídas, la SLE y el número de fallecimientos durante el período de estudio.

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

4.4.2. Resultados de genotipos

Se obtuvieron las frecuencias genotípicas y alélicas de los 39 pacientes con LLA, las cuales se muestran en la Tabla 2, además se presenta el valor de EHW. Varios SNPs presentaron un genotipo con el alelo variante, lo que repercutió sobre el EHW. Así, en el caso de los SNPs de *COL18A1* rs2274808, *ABCC5* (rs9838667 y

rs3792585) y XO rs17011368 donde tanto el grupo con LLA y el control estuvieron en fuera EHW.

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

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

De otra parte, en la Tabla 3 se presenta la asociación de las frecuencias alélicas de cada SNPs con el riesgo de presentar LLA, únicamente el SNPs de XO rs17011368 (2107A>G) presentó diferencias significativas entre grupos, lo que indica que los portadores del alelo recesivo (“mutado”) tienen cerca de 10 veces mayor probabilidad de asociarse con LLA (OR: 9,771; IC95% 4,974-19,196).

4.4.4. Resultados de análisis de sobrevida.

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

En la Tabla 4 se observan los valores de ST comparados con el genotipo, con sus respectivos valores de log Rank. Se puede observar que en la mayoría de los SNPs del grupo de los niños sobrevivientes no se encontraron diferencias en la ST entre subgrupos WT comparados con los HT y HM, excepto en los casos con los

polimorfismos de *FPGS* rs1544105 y de *XO* rs17011368 (Tabla 4), no obstante, en el grupo de los fallecidos, el polimorfismo *FPGS* rs1544105 mostró un valor de $p < 0,05$. Por otro lado, al evaluar la influencia del SNP *FPGS* rs1544105 en la SLE se encontró un incremento de aproximadamente 500 días en comparación con los silvestres, tal como se presenta en las curvas de Kaplan-Meier ilustradas en la Figura 3.

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

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

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

4.4.5. Asociación de los polimorfismos genéticos con la mortalidad

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

4.5. Discusión

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

Las proteínas transportadoras relacionadas con la vía de folato dependen de genes altamente polimórficos. En este trabajo investigativo encontramos que los SNPs de *COL18A1* (rs2274808) y *SLC19A11* (rs2838956) estudiados y que expresan para proteínas transportadoras específicas de folatos y de otros principios farmacológicos como el MTX presentaron el alelo alterno de manera importante (33% y 36% respectivamente), por lo cual este cambio mínimo impactaría en la función de los *SLC19A1* (21). El SNP (rs2274808) mostró genotipo mayoritario silvestre o “wild type” (WT) en el grupo de niños con LLA (59%), mientras que los portadores heterocigotos (HT) y homocigotos mutados (HM) estuvieron en frecuencias elevadas causando el desequilibrio de Hardy Weinberg. Sin embargo, el OR de 1,540(IC95%; 0,871-2,719) indica ausencia de riesgo de padecer LLA, aunque no se descartaría la probabilidad de ser responsable en parte, de la aparición de eventos adversos mediados por MTX, tal como lo reportó Owen *et al.* (13). El polimorfismo *SLC19A1* (rs2838956) se encontró en un importante número de pacientes con HT y HM; lo cual favorecería la posible presentación de reacciones gastro-intestinales adversas por MTX, como se ha asociado en población portuguesa (22, 23). Además, los SNPs de *SLC19A1* pudieran estar asociados a riesgos tóxicos en pacientes tratados con altas dosis de MTX tal como lo indica Faganel *et al.* (24).

Los SNPs de transportadores de *ABCB1* son trascendentales para el eflujo de fármacos al interior de las células, están relacionados con cambios sobre la glicoproteína P (P-gp). El trabajo de Kimchi- Sarfaty *et al.* (25) concluyó que los portadores del alelo alterno (*CT* o *TT*) del SNP *3435C>T* (rs1045642) de esta subfamilia que expresa a las MDR1 y glicoproteína P (P-gp), pueden experimentar una disminución de su función de transporte de eflujo. En esta investigación

obtuvimos un número importante de niños con estas variantes genotípicas, quienes potencialmente verían disminuida la actividad de las P-gp en varios órganos claves. Encontramos también que la distribución del alelo recesivo en nuestra población mexicana (45%) fue inferior a la que encontró (61,5% del alelo alterno). Kim *et al.* en 2012 (26) en pacientes coreanos. Al comparar las frecuencias alélicas de grupos enfermos con el grupo sano (Tabla 3) no encontramos diferencias estadísticamente significativas, por tanto, no hay evidencia de que se asocie con LLA; pero se podría inferir que estas variantes pudieran evitar el deterioro progresivo y las recaídas de nuestros pacientes, tal como lo refiere Stanulla *et al.* (27) en pacientes con genotipo *CT* y *TT* en los que se reduce el riesgo de recaídas sobre el SNC.

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

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

El proceso metabólico enzimático de MTX consta de la función de la *FPGS*, cuyo mecanismo es producir metabolito activo de poliglutamato-MTX. El SNP rs1544105 de *FPGS* se encontró en la población de pacientes HT y HM (36% en ambos casos), lo cual resulta en un 72% de población portadora del mencionado polimorfismo. Este última distribución genotípica es muy diferente a lo que reportó Liu *et al.* (32) quienes

en una muestra de población china (n=164) encontraron alto número de HT y HM que sumaron 150 casos (91,4%). Además, esta última población mostró desequilibrio ($p < 0,0001$), lo que indicaría que la población pediátrica enferma pudiera estar posiblemente relacionada con la sobreexpresión de *FPGS*, hecho que afectaría el tratamiento con MTX y otros sustratos que usen esta vía metabólica. Además, Sharma *et al.* (33) evaluaron una muestra de la población hindú y reportaron que la variante mutada rs1544105 estaba asociada con la respuesta disminuida al MTX en los pacientes, pero no comentan sobre cambios importantes en la SLE o en la ST.

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

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

En nuestra población pediátrica con LLA se presentaron 6 fallecimientos y 7 pacientes hicieron recaídas durante el tiempo de observación, de los cuales cinco niños recayeron a nivel de médula ósea y dos sobre el sistema nervioso central (SNC). Del total de los niños fallecidos, 3 recayeron durante su tratamiento; sin embargo, de acuerdo al promedio de SLE y ST no encontramos diferencias importantes en la mayoría de SNPs y sólo fue significativo para *FPGS* (rs1544105) y *XO* (rs170113689). Este hallazgo relacionado con los SNPs de *FPGS* también fue descrito por Gómez Y *et al.* (35), quienes estudiaron el A22G de *FPGS*, un SNP

similar a los evaluados por nuestro grupo de investigación, y concluyeron que éste disminuye la ST en individuos HT y HM. Cabe destacar que los SNPs de genes que codifican enzimas que se presentan en los niños HT y HM superan ampliamente a los WT, llegando a extenderse su SLE por más de 25 meses, lo que presumiblemente se deba a la presencia del alelo recesivo. Este hecho también lo encontró en población china el equipo de Liu, S *et al.* (32) quienes afirman que los portadores del CC (silvestre) tienen una ligera disminución de la SLE y que contribuye a incrementar el riesgo de toxicidad y cambios farmacocinéticos del MTX (36). Finalmente consideramos que esta investigación realizó un estudio piloto, será muy importante monitorear un mayor número de nuevos casos para corroborar estos hallazgos.

4.6. Conclusión

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

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

Conflicto de intereses: los autores y colaboradores de esta investigación declaramos no tener ningún conflicto de intereses.

4.7. Referencias

1. Mejía-Aranguré J, Flores-Aguilar H, Juárez-Muñoz I, Vázquez-Langle J, Games-Eternod J, Pérez-Saldívar L, et al. Edad de aparición de los diferentes tumores malignos en la infancia. *Rev Med IMSS*. 2005;43(1):25-37.
2. Dirección General de investigación en Salud. Base de datos de egresos hospitalarios por mortalidad en instituciones públicas México: Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS); 2013 [updated 2013; cited 2014 10/15]. Available from: <http://www.sinais.salud.gob.mx>.
3. Rodríguez L, González-Llano O, Mancias C, Pompa T, González G, Sandoval A, et al. Observaciones sobre la incidencia de leucemias agudas en el Noreste de México. *Rev Hematol Mex*. 2010;11(2):78-81.
4. Lasecka L, Dixon PH, Molokhia M, Sharma N, Schleh A, Wang CM, et al. 667C>T and 1298A>C polymorphisms of MTHFR do not predict response to methotrexate in patients with gestational trophoblastic neoplasia. *Gynecologic oncology*. 2011;123(3):605-9.
5. Leil TA, Endo C, Adjei AA, Dy GK, Salavaggione OE, Reid JR, et al. Identification and characterization of genetic variation in the folylpolyglutamate synthase gene. *Cancer Res*. 2007;67(18):8772-82.
6. Leclerc GJ, Sanderson C, Hunger S, Devidas M, Barredo JC. Folylpolyglutamate synthetase gene transcription is regulated by a multiprotein complex that binds the TEL-AML1 fusion in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research*. 2010;34(12):1601-9.
7. Kudo M, Sasaki T, Ishikawa M, Hirasawa N, Hiratsuka M. Kinetics of 6-Thioxanthine Metabolism by Allelic Variants of Xanthine Oxidase. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2010;25(4):361-6.

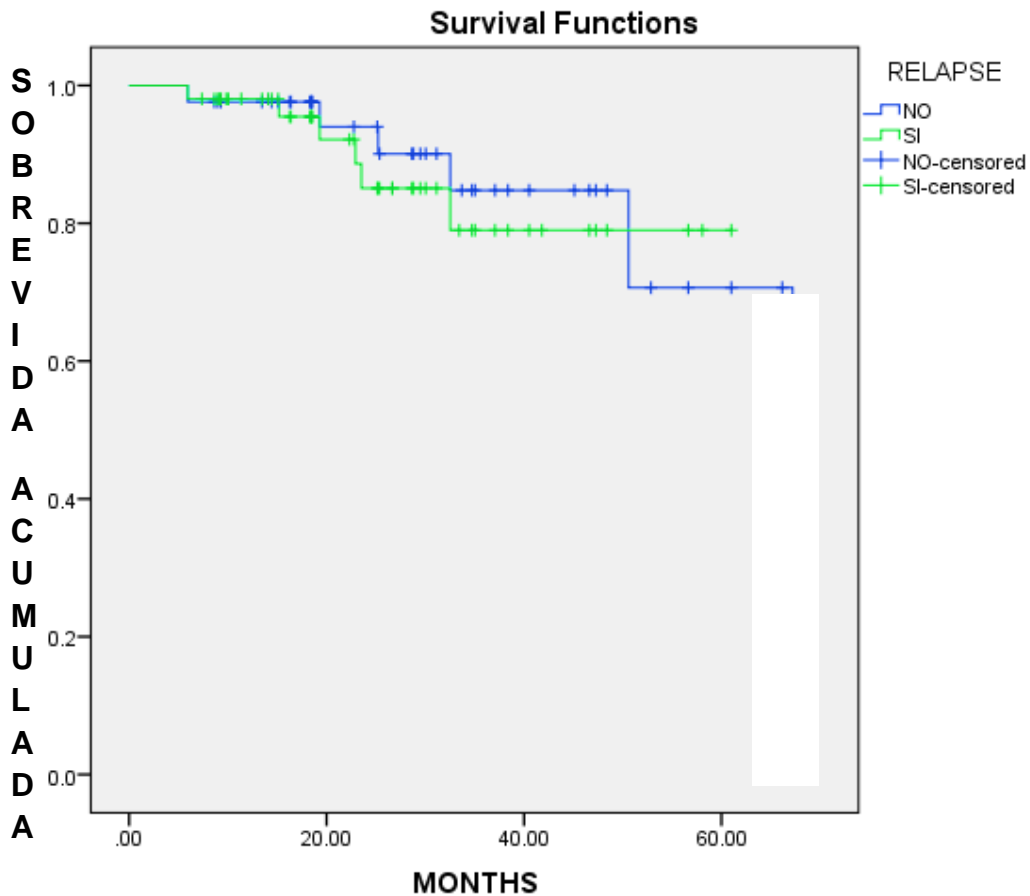
8. Kremer J. Methotrexate pharmacogenomics. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(9):1121-3.
9. Crews KR, Zhou Y, Pauley JL, Howard SC, Jeha S, Relling MV, et al. Effect of allopurinol versus urate oxidase on methotrexate pharmacokinetics in children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 2010;116(1):227-32.
10. Schmiegelow K. Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review. *British journal of haematology.* 2009;146(5):489-503.
11. Mahajan VB, Olney AH, Garrett P, Chary A, Dragan E, Lerner G, et al. Collagen XVIII mutation in Knobloch syndrome with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(11):2875-9.
12. Galbiatti AL, Castro R, Caldas HC, Padovani JA, Jr., Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Alterations in the expression pattern of MTHFR, DHFR, TYMS, and SLC19A1 genes after treatment of laryngeal cancer cells with high and low doses of methotrexate. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.* 2013;34(6):3765-71.
13. Owen SA, Hider SL, Martin P, Bruce IN, Barton A, Thomson W. Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics J.* 2013;13:227–34.
14. Adema AD, Floor K, Smid K, Honeywell RJ, Scheffer GL, Jansen G, et al. Overexpression of MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5) confer resistance to the nucleoside analogs cytarabine and troxacitabine, but not gemcitabine. *Springerplus.* 2014;3:732.
15. Brambila-Tapia AJL. MDR1 (ABCB1) polymorphisms: functional effects and clinical implications. *Rev Inv Clin.* 2013;55(5):445-54.
16. Gillet JP, Gottesman MM. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods in molecular biology.* 2010;596:47-76.

17. Gregers J, Gréen H, Christensen IJ, Dalhoff K, Schroeder H, Carlsen N, et al. Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2015.
18. Haematology BSo. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia: BSH; 2006 [cited 2013 09]. 12]. Available from: http://www.bcsghguidelines.com/pdf/chronicLL_050504.pdf.
19. Pui C, Pei D, Sandlund J, Ribeiro R, Rubnitz J, Raimondi S, et al. Long-term results of St Jude Total Therapy Studies 11, 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2010;24(2):371-82.
20. d'Oncologia IC. SNPStats. Cataluña: ICO; 2006.
21. Zhao R, Goldman D. Folate and Thiamine Transporters mediated by Facilitative Carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and Folate Receptors. *Molecular aspects of medicine*. 2013;34:1-23.
22. Lima A, Bernardes M, Sousa H, Azevedo R, Costa L, Ventura F, et al. SLC19A1 80G allele as a biomarker of methotrexate-related gastrointestinal toxicity in Portuguese rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*. 2013;15(6):807-20.
23. Lima A, Bernardes M, Azevedo R, Monteiro J, Sousa H, Medeiros R, et al. SLC19A1, SLC46A1 and SLCO1B1 Polymorphisms as Predictors of Methotrexate-Related Toxicity in Portuguese Rheumatoid Arthritis Patients *Toxicol Sci*. 2014;141(2):first published online August 14, 2014.
24. Faganel Kotnik B, Grabnar I, Bohanec Grabar P, Dolzan V, Jazbec J. Association of genetic polymorphism in the folate metabolic pathway with methotrexate pharmacokinetics and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia and malignant lymphoma. *European journal of clinical pharmacology*. 2011;67(10):993-1006.
25. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar S, et al. A "Silent" Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity *Science*. 2007;315(5811):525-8

26. Kim IW, Yun HY, Choi B, Han N, Park SY, Lee ES, et al. ABCB1 C3435T genetic polymorphism on population pharmacokinetics of methotrexate after hematopoietic stem cell transplantation in Korean patients: a prospective analysis. *Clinical therapeutics*. 2012;34(8):1816-26.
27. Stanulla M, Schäffeler E, Arens S, Rathmann A, Schrauder A, Welte K, et al. GSTP1 and MDR1 Genotypes and Central Nervous System Relapse in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *International journal of hematology*. 2005;81(1):39-44.
28. Scheiner MA, Motta-Damasceno A, Ciuvalschi- Maia R. ABCB1 single nucleotide polymorphisms in the Brazilian population. *Molecular Biology Reports*. 2010;37(1):111-18.
29. Zgheib NK, Akra-Ismaïl M, Aridi C, Mahfouz R, Abboud MR, Solh H, et al. Genetic polymorphisms in candidate genes predict increased toxicity with methotrexate therapy in Lebanese children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics*. 2014;24(8):387-96.
30. Wielinga P, Hooijberg JH, Gunnarsdottir S, Kathmann I, Reid G, Zelcer N, et al. The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. *Cancer Res*. 2005;65(10):4425-30.
31. Guo Y, Ko K, Ritter CA, Chen Z-S, Grube M, Jedlitschky G, et al. Expression of ABCC-Type Nucleotide Exporters in Blasts of Adult Acute Myeloid Leukemia: Relation to Long-term Survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(5):1762-69.
32. Liu S-G, Chao G, Rui-Dong Z, Ying J, Lei C, Wei-Jing L, et al. FPGS rs1544105 polymorphism is associated with treatment outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell International*. 2013;13(107):1-8.
33. Sharma S, Das M, Kumar A, Marwaha V, Shankar S, Singh P, et al. Purine biosynthetic pathway genes and methotrexate response in rheumatoid arthritis patients among north Indians. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19(10):823-28.

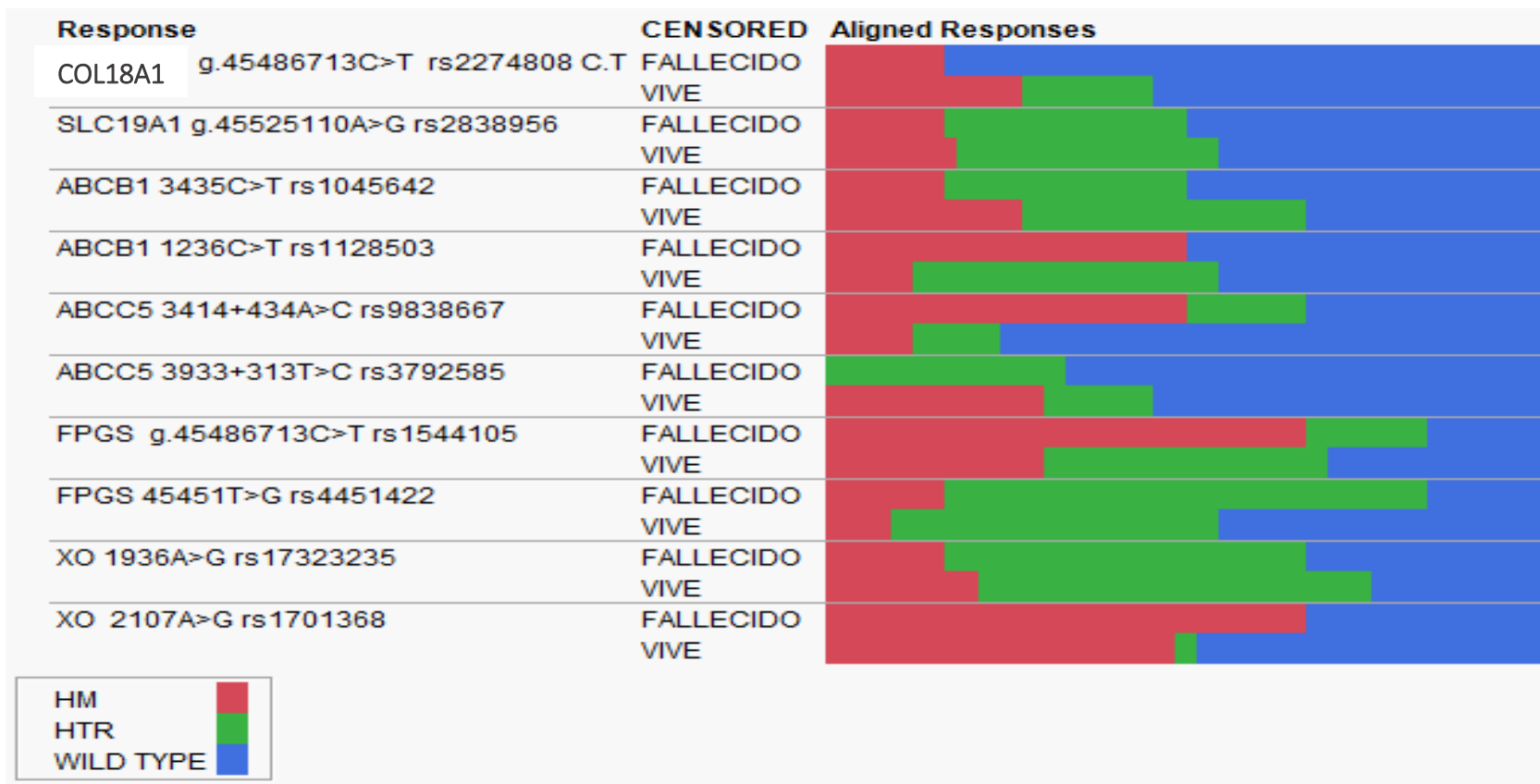
34. den Boer E, de Rotte MCJF, Pluijm SMF, Heil SG, Hazes JM, de Jonge R. Determinants of Erythrocyte Methotrexate Polyglutamate Levels in Rheumatoid Arthritis *J Rheumat.* 2014.
35. Gómez-Gómez Y, Organista-Nava J, Rangel-Rodriguez CA, Illades-Aguiar B, Moreno-Godínez ME, Alarcón-Romero LDC, et al. Effect of folylpolyglutamate synthase A22G polymorphism on the risk and survival of patients with acute lymphoblastic leukemia. *Oncology Letters.* 2014;8(2):731-35.
36. Wang S-M, Sun L-l, Zeng W-x, Wu W-s, Zhang G-l. Influence of genetic polymorphisms of FPGS, GGH, and MTHFR on serum methotrexate levels in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014.

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



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

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



Legenda: HM: homocigoto mutado, HTR: heterocigoto, WILD TYPE: silvestre. Response: polimorfismo; CENSORED: estado de censura. Aligned responses: distribución de cada genotipo en el grupo censurado

Figura 3 Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia determinadas por el *FPGS* rs1544105

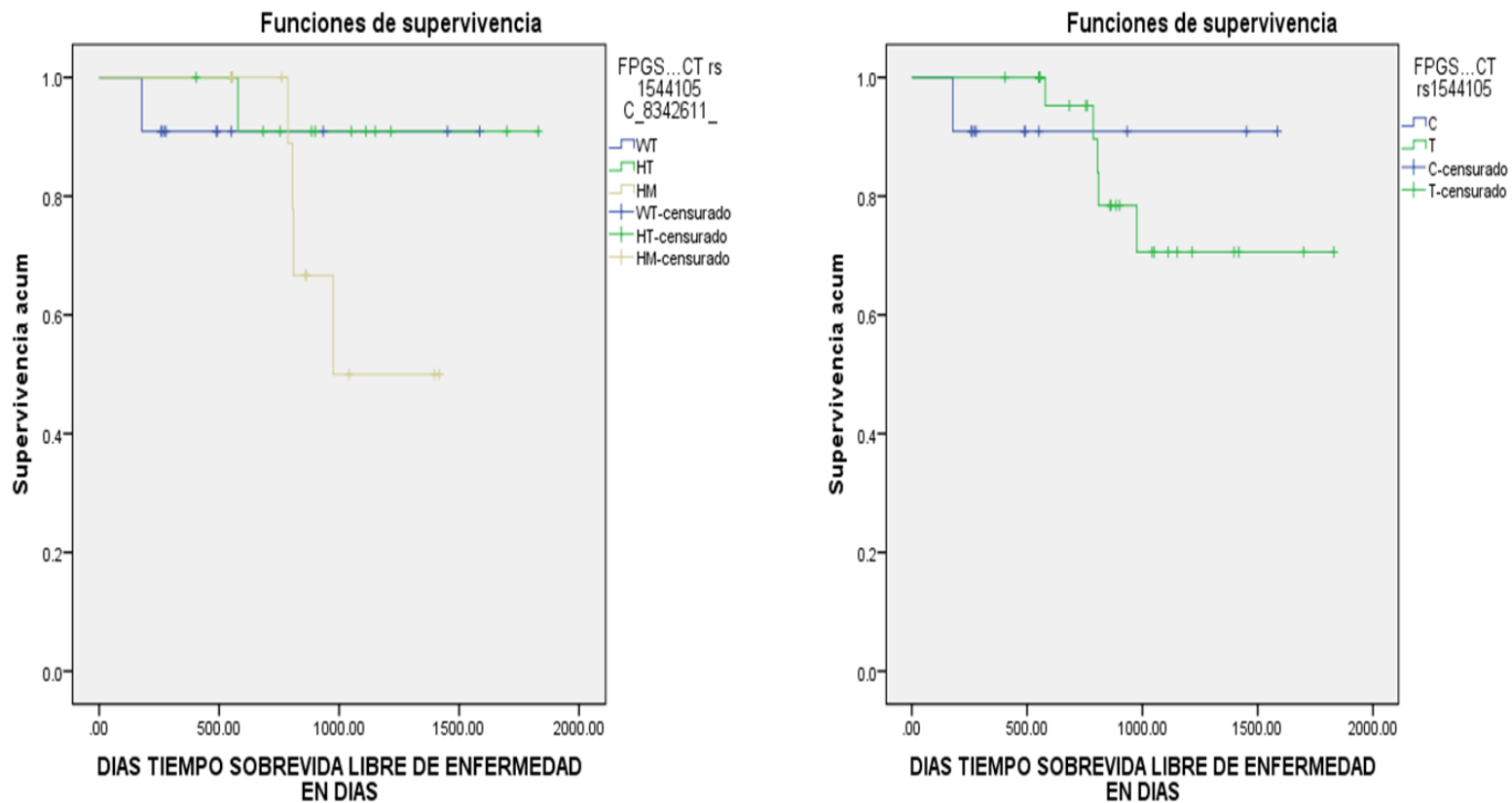


Tabla 1 Características generales de los pacientes con LLA y controles

Variables	Pacientes con LLA	Controles
	N=39 (mediana, rango)	N:102 (mediana, rango)
Edad(años)	7.92(2.5-18.08)	5.85(1.43-16.13)
Género (Masculino/Femenino)	24(61.50%)/15(38.50%)	51(50%)/51(50%)
Peso (Kg)	18.9(12.3-55.1)	22.9(15.3-53.7)
Talla (m)	1.11(0.91-1.71)	1.22(0.67-1.63)
Superficie corporal (m ²)	0.71(0.50-1.7)	0.77(0.57-1.34)
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	15.11(12.36-28.1)	21(18.5-27.5)
Tiempo de vigilancia(semanas)	73 (25-286)	-
Dosis MTX (mín-máx)	45.2 mg*m ² -5g*m ²	-
Hemoglobina (g/dL)	12.05(7-16.8)	12.55(11.06-14.3)
Hematocrito (%)	36.1(28.2-47.0)	36.6(34.6-45.1)
Recuento de eritrocitos (cél/mm ³)	3.59 (2.85-5.89) x10 ⁶	4.3(4.0-6.54) x10 ⁶
Recuento leucocitario (cél/mm ³)	3.22(1.079-13.6)x10 ³	7.06(5.9-14.2) x10 ³
Conteo plaquetas (cél/mm ³)	187(41.1-378) x10 ³	255(241-790) x10 ³
TGO (UI/L)	44.5(0.4-149)	14.0(9.2-39.5)
TGP (UI/L)	61(0.3-206)	19.4(1.9-69)
Acido úrico (mg/dL)	3.41(2-4.7)	3.77(3.1-4.86)
Urea (mg/dL)	18.0(8.89-34.3)	34.2(10.7-63.2)
Creatinina (mg/dL)	0.64(0.32-1.22)	0.8(0.42-1.32)
Fosfatasa alcalina (UI/L)	249(58-317)	62(42-335)
Número de pacientes con recaídas	0 : 32(82.05)	-
Tiempo de sobrevida sin la enfermedad(días)	757(555.03-885.01)	-
Número de fallecidos	6(15.38%)	-

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

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

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

Tabla 3 Riesgo de asociación del alelo recesivo con LLA

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

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

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

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

V. MANUSCRITO 1

Genetic polymorphisms encoding to folate transporters as predictors of increased risk of acute lymphoblastic leukemia occurrence.

5.1. Abstract

Background: Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is a frequent neoplasia in pediatric age and the gold drug used is Methotrexate (MTX), an anti-folate drug. Literature report the role of folate transporters in ALL prognosis and the potential importance of genetic polymorphisms encoding to such transporters in increased risk for ALL occurrence. **Objective:** To determine the association of 6 genetic polymorphisms, in 4 genes encoding to folate transporters pathway, with susceptibility to ALL occurrence.

Methods: Case-control study were performed with 73 ALL children and 133 controls (healthy children), all from North and Northwestern of Mexico. Six polymorphisms were assayed: *COL18A1* (rs2274808), *SLC19A1* (rs2838956), *ABCB1* (rs1045642 and rs1128503) and *ABCC5* (rs9838667 and rs3792585) by qPCR. Hardy Weinberg Equilibrium was determined. Statistical analysis were performed using chi-square test, binary logistic regression, OR 95% and artificial neural networks.

Results: Increased risk for children ALL occurrence was associated with CT heterozygous of *COL18A1*-rs2274808 (OR=2.55, CI95%, 1.11-5.83, p=0.0001) and T homozygous (OR=21.05, CI95%, 5.62-78.87, p<0.0001), AG heterozygous of *SLC19A1*-rs2838956 (OR=44.69, CI95%, 10.42-191.63, p=0.0001), T homozygous of *ABCB1*-rs1045642 (OR=13.76, CI95%, 5.94-31.88, p=0.0001); AC heterozygous of *ABCC5*-rs9838667 (OR= 2.61, CI95% 1.05-6.48, p<0.05) and, C homozygous of *ABCC5*-rs3792585 (OR=9.99, CI95%, 3.19-31.28 p=0.004). Five genotypic combinations of polymorphisms were found to risk: *COL18A1* (rs2274808)+ *SLC19A1*(rs2838956), C/C+A/G (OR=2.62, CI95%,1.71-4.01 p<0.0001), C/T+A/G (OR=4.12, CI95%, 2.59-6.54 p<0.0001), T/T+A/G (OR=5.42, CI95%, 3.38-8.70

$p < 0.0001$), and T/T+G/G (OR=2.69, CI95%, 1.39-5.19 $p=0.003$); *ABCB1*(rs1045642+rs1128503), T/T+C/T (OR=1.64, CI95%, 1.01-2.66 $p=0.040$), T/T+T/T (OR=2.00, CI95%, 1.06-3.75 $p=0.029$), and *ABCC5*(rs9838667+rs3792585), CC/CC (OR=5.33, CI95%, 2.59-10.91 $p < 0.0001$). Two combinations of *ABCC5* (A/C+T/T and A/C+T/C) were of protection for ALL (OR=0.61, CI95%, 0.40-0.91 $p=0.017$) and (OR=0.62, CI95%, 0.39-0.98 $p=0.041$) respectively.

Conclusion: Children carriers of rare allele (*COL18A1* rs2274808, *SLC19A1* rs2838956, *ABCB1* rs1045642 and *ABCC5* rs3792585) showed an increased susceptibility for ALL occurrence. In addition, from binary combinations of polymorphisms our results showed that 5 were found for risk for ALL, and *ABCC5* (A/C+T/T and A/C+T/C) were not.

Keywords: Precursor Cell Lymphoblastic Leukemia-Lymphoma/*drug therapy/genetics, genetic polymorphisms, ATP-binding cassette transporter gene, *COL18A1*, *SLC19A1*

5.2. Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant cancer disorder whose prevalence in Mexican pediatric population is between 34 to 35:100.000 children, accounting for 80-85% of all childhood leukemias in northwestern Mexico (1).

Chemotherapy treatment of choice is based on the protocol St. Jude Total XV, and essentially used antifolate drugs such methotrexate (MTX) (2, 3). Cellular MTX influx into target cell membrane depends on receptor proteins, known as solute carriers (SLCs), mainly by reduced folate carrier 1 (RFC1), also called *SLC19A1*, encoded by *RFC1* (4)/*SLC19A1* which is located on chromosome 21 (locus 21q22.2-q22.3) (5). Moscow *et al.* demonstrated that *RFC1* over-expressed mainly in cancer cell lines breast cancer and leukemia, also determined an association with the development of in vitro cytotoxicity due to contact with MTX, which would explain the affinity of these receptors with antifolates (5). The function of transporter of RFC is enhanced by collagen type XVIII that is encoded by gene *COL18A1* (locus 21q22.3), which it

has been involved as a factor of development of malignant processes due to production of endostatin (6), a powerful inhibitor de angiogenesis and tumor growth (7).

An important family of transporters proteins of efflux of drugs and their metabolites are Multidrug Resistance Proteins (MDR1)and Multidrug resistance- associated proteins (MRP5) (8), specially from cancer cells (9). These proteins derived from genes highly polymorphic (*ABCB1* y *ABCC5* respectively) that alter the effectiveness of oncologic treatments (10), specifically against the antifolate therapy (11) so that influence the risk of relapses, and the development of ALL (12). Therefore, the objective of this study was to determine the association of 6 polymorphisms (*COL18A1 RFC1*, *ABCB1* and *ABCC5*) with susceptibility to develop ALL.

5.3. Materials and Methods:

5.3.1. General study design

This was a case-control, observational, prospective, association study. This research was approved by the CECAN Ethic and Research Committee, Durango, Mexico in accordance with the Helsinki Declaration and Mexican General Health Law. Signed informed consent was obtained from all tutor of patients and controls before participation in the study.

Seventy three pediatric patients with ALL were admitted between August 2012 to December 2014 at the Hematology-Oncology Unit, Durango State Cancer Center (Centro Estatal de Cancerología, CECAN), Durango, Mexico. The diagnosis of ALL was based on the Franco-American British Association criteria (13). We recruited 133 children without ALL as control group.

5.3.2. Genotyping

DNA extraction was obtained from total blood samples obtained by venous puncture using a commercial kit (Macherey-Nagel®, Germany). After extraction, DNA integrity and purity was evaluated by horizontal electrophoresis in 1% agarose gel stained with ethidium bromide. The concentration and quality were analyzed in a NanoDrop

2000® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Determination of single nucleotide polymorphisms (SNPs) were analyzed using real-time polymerized chain reaction (qPCR) by 48-well plate StepOne® Real Time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) with TaqMan probes by Applied Biosystems StepOne™ (Foster City, CA, USA). The SNPs *COL181* (rs2274808), *SLC19A1* (rs2838956), *ABCB1* (rs1045642, rs1128503), and *ABCC5*(rs9838667, rs3792585) were determined by a typical reaction contained 15ng of DNA, 0.625µL of 40X Taqman SNP genotyping assay and 5.0 µL of Taqman genotyping Master Mix (Foster City, CA, USA). The amplification conditions were initial denaturation at 95°C for 10 min, 92°C during 15s, and 60 °C for 90s (47 cycles) with one additional cycle at 60°C during 30s. Samples were processed by duplicate.

5.3.3. Statistical Analyses

Hardy-Weinberg equilibrium and binding disequilibrium analyses were done from the expected and observed genotypic and allelic frequencies in the study population. SNPStats (2006, Catalan Institute of Oncology, Barcelona, Spain) software was used (14).

The associations of the *COL18A1*, *ABCB1* and *ABCC5* genetic polymorphisms with susceptibility to ALL were assessed relative risk and was expressed as the coefficient of the odds ratio (OR) p value <0.05 and 95% confidence interval (95%CI). In addition, an analysis of association between binary combinations of polymorphisms of same locus with ALL were made to stablish the relationship of close SNPs with the pathology. Finally, we made a modelling of artificial neural network and logistic regression considering as dependent variable presence or absence of ALL. SAS v9.0 (USA, 2002) and Statistica v7 (USA, 2004) were used.

5.4. Results

Seventy three pediatric patients with ALL (cases) and 133 controls were enrolled in this study. The population showed a median of age of 7.92 and 5.85 years for case and control group respectively. The anthropometric characteristics and biological

parameters are presented in la table 1. As expected, a difference in pathognomonic variables was observed between groups.

5.4.1. Genotyping results

The Table 2 shows the allelic and genotypic frequencies and Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) value of the studied groups. We found that five evaluated SNPs were in HWE except *ABCC5* (rs1128503). In addition, we determined significant differences in allelic frequencies between groups SNPs rs2274808 and rs3792585.

5.4.2. Results of association between polymorphisms with ALL

Initially lower values were obtained in accordance with the Akaike and bayesian criterion to determine the best model for genotypic distribution and its association with the ALL risk. The reference model was considered to the codominant. (XX: wild type, XY: heterozygous, YY: homozygous). Table 3

The association between the polymorphisms with ALL was determined by the OR test, with CI 95% y $p < 0.05$. The results of the Table 3 emphasize that the *CT* carriers for the *COL18A1* rs2274808 had 2.55 times more risk to present ALL (CI95%, 1.11-5.83). This behavior was also found in the dominant model *C/T- T/T* in regards to the genotype wild type. In the *SLC19A1* rs2838956, the best model was the over – dominant where the *A/G* subjects showed an atypical risk with values of OR:44.69. The *ABCB1* rs1045642 showed risk on the carriers of the variation *T/T* genotype, which response was present for the codominant model as well as to the recessive model. The *ABCB1* rs1128503 did not present risk.

The genotype *A/C* of the *ABCC5* rs9838667 showed susceptibility for ALL about 2.61 times (CI 95% 1.05-6.48). Meanwhile, the *ABCC5* rs3792585 did present risk for ALL in the carriers of the variation genotype *C/C*; in addition, this behavior was the same of the recessive model.

5.4.3. Results of association between genetic binary combinations of polymorphisms with ALL

The Table 4 shows the combinations by pairs for the closer SNPs on each gen and its association with the presence of ALL. It was determined that for the pair *COL18A1* (rs2274808) + *SLC19A1* (rs2838956), with reference to the genotypes wild-type

(CC+AA) there was risk with the C/C+ A/G, C/T+ A/G, T/T+A/G and T/T+G/G combinations. Meanwhile for the combination of the pair *ABCB1* (rs1045642+rs1128503) was observed that the combinations T/T+C/T and T/T+ T/T presented susceptibility for ALL. Finally, the total homozygote combination C/C+ C+C showed risk for ALL, OR: 5.33(CI 95% 2.59-1097); in contrast to this tendency, the A/C+T/T and A/C +T/C combinations showed protection against ALL which OR and IC values were below 1

5.4.4. Results of analysis of artificial neural network and logistic regression.

The analysis of the result of artificial neural network determined that the best general model was of 1 layer with 48 hidden neurons and an error-assay of 11.7% and an error-training of 14.8% finding that the most important normalized variables for the response of the presence of ALL were *ABCB1* rs1045642 (72.8%), *COL18A1* rs2274808 (56.7) and *ABCC5* rs3792585 (40.9%); giving as a result the regression expression:

$$\text{ALL_susceptibility} = 4.201 - 0.921 * \text{rs2274808} - 1.647 * \text{rs1045642} - 1.066 * \text{ABCC5} \\ \text{rs3792585}$$

5.5. Discussion

Many factors are implied with the ALL susceptibility in pediatric patients, being the mainly physical, chemical and genetic causes, with the participation of gens that codifies for enzymes such as xanthine deshidrogenase (15) and transporters (16), which even makes difficult their remission of the disease, given that the function of the molecular transporters is modified and as a consequence they alter the flow and residence of important pharmaceuticals for the abnormal cells (17). This investigation was focused to determine the impact of the SNPs transporters with the susceptibility of ALL, we found that SNPs (*COL18A1* rs2274808, *SLC19A1* rs2838956, *ABCB1* rs1045642 and *ABCC5* rs3792585) were associated with this disease.

For the SNPs *COL18A1* rs2274808, it was found that represents a risk factor for ALL were the carriers of the alternate allele (*CT* and *TT*), which OR and IC values were superior to 1. In addition, the dominant model that groups these 2 subpopulations suggests a similar behavior. The activity of the gen *COL18A1* has been related with strong evidence on Salvadoran population (18, 19) to the development of rare pathologies based in synthesis of endostatin its antiangiogenic function as in the case of Knoblock syndrome and ALL; however, some authors indicate that in children with ALL may present very variable levels of endostatine (20) which makes it difficult to explain accurately its relation with the disease (21).

The polymorphism of *SLC19A1* rs2838956 in our study showed a very insidious behavior for the presence of ALL (adjusted to the dominant model *A/G*). It is known that such behavior is similar to the reports of de Jonge *et al.* (22) who found that a SNP very analogous to the one studied by our group, the 80G>A, its OR=1.5 (1.1-2.1, 95% CI; p=0.02) heterozygote and 2.1(1.3-3.2) for the mutated homozygote (22). In contrast to our findings, Yeoh *et al.*(23) found children with ALL, carriers of genotype *G>A* showed protection against the disease. On the other hand, after the analysis of binary combinations of the SNPs we found that 4 of them showed a higher tendency to develop ALL, a fact that has not been cited in previous research. The SNPs of *ABCB1* (*MDR1*) are important for the efflux function of the toxic substances which in consequence determines the susceptibility in cellular function (24). It has not been unknown that this polymorphism is related to ALL as the one referred in the meta-analysis published by Limin *et al.* (25). In this study it was found that the rs1045642 (known as 3435C>T) is associated with the risk of presenting ALL. This fact coincides with the research performed by Jamroziac *et al.* (26) whom reported that Polish children carriers of the genotype *TT* had an OR=1.80 (1.10-3.10), with p=0.037 and Qian *et al.* (27) whom evaluated the pediatric Chinese population observing the risk for leukomogenesis in individuals *CT/TT* vs. *CC*, with OR: 1.29(95% CI: 1.11 – 1.50, p=0.284). However, the study by Hua-Jie *et al.* on Chinese population indicated that none SNPs are associated with the disease (28); and better than that, Drain *et al.* (29) suggest that the carriers of this polymorphism rs1045642 would have a beneficial impact because the overall survival would be extended. In

the risk analysis of the *ABCB1* rs11288503, no relation with the susceptibility with the ALL was found, opposite to what was reported by Limin *et al.* (30). When we performed the combination study of both SNPs for the *ABCB1* rs1045642+rs1128503 (1236C>T and 3435C>T respectively) we determined that the series with the rare allele were the ones showing the higher risk for ALL, *T/T+C/T* and *T/T+T/T*, which explains why the children carriers of such alleles are more likely to present the disease than those who have a lesser presence of rare allele, which is similar with the reference of Semsei *et al.* (31), whom in spite of not finding significant differences between cases and controls of the individual polymorphisms, contrary if determined in the tested genotypic combinations.

The subfamily of efflux transporters of xenobiotics *ABCC5* has been over expressed in the biological barriers of the brain, which explains an interesting mechanism that would determine the presence of ALL with relapse in the central nervous system (32), therefore some genotypic modification, would enhance the severity for ALL. In this research the evaluated SNPs of *ABCC5* (rs9838667 and rs3792585) were found that individually just the rs3792585 showed the susceptibility for ALL on carriers of the rare allele (CC) with an OR:9.99(3.19-31.28), which means a risk of almost 10 times more to develop the disease. However, when two polymorphisms were combined and evaluated their OR, we found that the only combination that showed risk for leukomogenesis was the one were both polymorphisms are homo zygotes (OR: 5.23). Meanwhile, the *A/C+T/T* and *A/C+A/T* carriers were manifested as protection factors for ALL. This fact will suggest that the inter-individual variability of each patient influences the development or not of the ALL. Finally, we consider that a limitant of this study were size of sample of cases, but our results could give a preliminary tendency of our Mexican pediatric population for susceptibility of develop ALL.

5.6. Conclusion

In this study we found that 4 SNPs present in children (*COL18A1* rs2274808, *SLC19A1* rs2838956, *ABCB1* rs1045642 and *ABCC5* rs3792585) showed a higher risk for ALL. The analysis of OR of the binary combinations *COL18A1* rs2274808,

SLC19A1+ rs2838956 showed that 4 of them exhibited risk for ALL; for the combination of *ABCB1* (rs1045642+rs1128503), two of them presented risk and, finally for *ABCC5* (rs9838667+ rs3792585) only the homozygotes *C/C+C/C* had susceptibility for ALL; in contrast, the carriers of *A/C+T/T* and *A/C+T/C* the OR indicated protection against ALL.

Acknowledgments:

The authors acknowledge for their assistance with this research to: Lic Cristina Venzor, principal of CECAN- Nurse Service Unit, Durango-Mexico, Lic Pedro Cruz, General Director of Oncologic Pediatric Center of Baja California, Mexico; Dr. Jesús Manuel Lozano García, Medical Director of Oncologic Pediatric Center of Baja California, Mexico and Carolyn Di Pietro-Arias for support in review of English translation.

Conflict of interest:

The authors declare have not any conflict of interest,

5.7. References.

1. Rodríguez L, González-Llano O, Mancias C, Pompa T, González G, Sandoval A, et al. Observaciones sobre la incidencia de leucemias agudas en el Noreste de México. *Rev Hematol Mex.* 2010;11(2):78-81.
2. Pui CH, Pei D, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, et al. Long-term results of St Jude Total Therapy Studies 11, 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2010;24(2):371-82.
3. Pui C-H, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, et al. Treating Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia without Cranial Irradiation. *New England Journal of Medicine.* 2009;360(26):2730-41.
4. Jansen G, Pieters R. The role of impaired transport in (pre) clinical resistance to methotrexate: insights on new antifolates. *Drug Resistance Updates.* 1998;1(3):211-8.

5. Moscow JA, Connolly T, Myers TG, Cheng CC, Paull K, KH. C. Reduced folate carrier (RFC1) expression and anti-folate resistance in transfected and non-selected cell lines. *Int J Cancer*. 1997;72:184-92.
6. Digtyar A, Pozdnyakova N, Feldman N, Lutsenko S, Severin S. Endostatin: current concepts about its biological role and mechanisms of action. *Biochemistry*. 2007;72(3):235-46.
7. Sertie A, Sossi V, Camargo A, Zatz M, Brahe C, Passos-Bueno M. Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure (Knobloch syndrome). *Human molecular genetics*. 2000;9(13):2051-8.
8. Higgins CF. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Res Microbiol*. 2001;152:205–10.
9. Holland KA, Holland IB. Adventures with ABC-proteins: highly conserved ATP-dependent transporters. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*. 2005;52(3):309-22.
10. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP–dependent transporters. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(1):48-58.
11. Wielinga P, Hooijberg JH, Gunnarsdottir S, Kathmann I, Reid G, Zelcer N, et al. The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. *Cancer Res*. 2005;65(10):4425-30.
12. Choi CH. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer cell international*. 2005;5:30.
13. Lilleyman JS, Hann IM, Stevens RF, Eden OB, Richards SM. French American British (FAB) morphological classification of childhood lymphoblastic leukaemia and its clinical importance. *Journal of Clinical Pathology*. 1986;39(9):998-1002.

14. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928-9.
15. Steinberg KK, Relling MV, Gallagher ML, Greene CN, Rubin CS, French D, et al. Genetic Studies of a Cluster of Acute Lymphoblastic Leukemia Cases in Churchill County, Nevada. *Environmental Health Perspectives*. 2007;115(1):158-64.
16. Ross DD, Doyle LA. Mining our ABCs. *Cancer Cell*. 2004;6(2):105-7.
17. Sparreboom A, Danesi R, Ando Y, Chan J, Figg WD. Pharmacogenomics of ABC transporters and its role in cancer chemotherapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2003;6(2):71-84.
18. Mahajan VB, Olney AH, Garrett P, Chary A, Dragan E, Lerner G, et al. Collagen XVIII mutation in Knobloch syndrome with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(11):2875-9.
19. Xiaopan W, Jia W, Zhenhui X, Huifen W, Xilin Z, Liping P, et al. A 3' UTR SNP in COL18A1 Is Associated with Susceptibility to HBV Related Hepatocellular Carcinoma in Chinese: Three Independent Case-Control Studies. *PLoS ONE*. 2012;7(3):1-6.
20. Dagdas S, Ozet G, Yilmaz M, Albayrak M, Ceran F. Assessment of Plasma Endostatin Levels in Patients with Acute Myeloblastic and Lymphoblastic Leukemia. *Akut Myeloblastik ve Lenfoblastik Lösemili Hastalarda Plazma Endostatin Düzeylerinin Değerlendirilmesi*. 2011;21(4):210-6.
21. Schneider P, Vasse M, Corbiere C, Legrand E, Marie-Cardine A, Boquet C, et al. Endostatin variations in childhood acute lymphoblastic leukaemia—comparison with basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. *Leukemia research*. 2007;31(5):629-38.
22. de Jonge R, Tissing WJ, Hooijberg JH, Jansen G, Kaspers GJ, Lindemans J, et al. Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2009;113(10):2284-9.

23. Yeoh AE-J, Lu Y, Chan JY-S, Chan YH, Ariffin H, Kham SK-Y, et al. Genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia shows protection in Malay boys: Results from the Malaysia-Singapore ALL Study Group. *Leukemia research*. 2010;34(3):276-83.
24. Brisson GD, Alves LR, Pombo-de-Oliveira MS. Genetic susceptibility in childhood acute leukaemias: a systematic review. *Ecancermedicalscience*. 2015;9(519-548):1-28.
25. Limin M, Linhai R, Hongchao L, Haiping Y, Yanming F. ABCB1 C3435T polymorphism is associated with leukemia susceptibility: evidence from a meta-analysis. *OncoTargets & Therapy*. 2015;8:1009-15.
26. Jamroziak K, Młynarski W, Balcerczak E, Mistygacz M, Trelńska J, Mirowski M, et al. Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *European Journal of Haematology*. 2004;72(5):314-21.
27. Qian X, Cao S, Yang G, Dong J, Jin G, Shen Y, et al. Variant genotypes of MDR1 C3435T increase the risk of leukemia: evidence from 10 case-control studies. *Leukemia & lymphoma*. 2012;53(6):1183-7.
28. Hua-Jie D, Kou-Rong M, Chun Q, Yun Z, Wen-Yi S, Ming H, et al. Polymorphisms and haplotypes in multidrug resistance 1 gene are not associated with chronic lymphocytic leukemia susceptibility and prognostic parameters of chronic lymphocytic leukemia in Chinese population. *Leukemia & lymphoma*. 2011;52(6):1003-9.
29. Drain S, Catherwood MA, Orr N, Galligan L, Rea IM, Hodgkinson C, et al. ABCB1 (MDR1) rs1045642 is associated with increased overall survival in plasma cell myeloma. *Leukemia & lymphoma*. 2009;50(4):566-70.
30. Limin MA, Hongchao LIU, Linhai R, Xuewen Y, Haiping Y, Yanming F. Multidrug resistance gene 1 C1236T polymorphism and susceptibility to leukemia: A meta-analysis. *Biomedical Reports*. 2015;3(1):83-7.

31. Semsei ÁF, Erdélyi DJ, Ungvári I, Kámory E, Csókay B, Andrikovics H, et al. Association of some rare haplotypes and genotype combinations in the MDR1 gene with childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia research*. 2008;32(8):1214-20.

32. Warren MS, Zerangue N, Woodford K, Roberts LM, Tate EH, Feng B, et al. Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human. *Pharmacological Research*. 2009;59(6):404-13.

Table 1 Anthropometric characteristics and biological parameters of case-control groups

Variable	Case N=73 (median, range)	Control N=133 (median, range)	P -value <0.05
Age(years)	7.92(1.15-18.08)	5.85(1.43-16.13)	0.022
Gender (Mail/Femail)	40(54.79)/33(45.21)	62(47%)/71(53%)	0.612
Body Weight (Kg)	17.5(11.4-55.1)	22.9(15.3-53.7)	0.120
Height (m)	1.07(0.65-1.71)	1.22(0.67-1.63)	0.216
Body surface (m²)	0.67(0.43-1.7)	0.77(0.57-1.34)	0.450
BMI (Kg/m²)	16.65(12.36-28.1)	21(18.5-27.5)	0.030
Time of treatment(weeks)	76 (25-289)	-	-
Dose MTX (low-high)	40.1 mg*m ² -5g*m ²	-	-
Hemoglobin (g/dL)	11.97(7.00-16.8)	12.55(11.06-14.3)	0.876
Hematocrit (%)	35.45(27.2-47.0)	36.6(34.6-45.1)	0.667
Erythrocyte count (cell/mm³)	4.15 (2.85-5.89) x10 ⁶	4.3(4.0-6.54) x10 ⁶	0.890
Leukocyte count (cell/mm³)	3.61(1.079-17.6)x10 ³	7.06(5.9-14.2) x10 ³	0.011
Platelet count (cell/mm³)	185.2(22.2-378) x10 ³	255(241-790) x10 ³	0.003
TGO (UI/L)	36.85(0.4-149)	14.0(9.2-39.5)	0.010
TGP (UI/L)	46.6(2.3-210)	19.4(1.9-69)	0.006
Uric Acid (mg/dL)	3.42(2.05-4.77)	3.77(3.1-4.86)	0.758
Urea(mg/dL)	11.49(8.89-61.75)	34.2(10.7-63.2)	0.035
Creatinine (mg/dL)	0.70(0.24-1.54)	0.8(0.42-1.32)	0.870
Alkaline Phosphatase (UI/L)	257(46-359)	62(42-335)	0.001

Table 2 Allelic and genotypic frequencies and Hardy Weinberg equilibrium

Gene	Polymorphism	Genotypes				Alleles		
		Case n(%)	HWE pvalue	Control n(%)	HWE p value	Case n(%)	Control n(%)	χ^2 *signif p<0.05
COL18A1	rs2274808	C/C 39(0.53)	<0.0001	107(0.80)	0.205	C 93(0.64)	237(0.89)	36.57*
		C/T 15(0.21)		23(0.17)		T 53(0.36)	29(0.11)	
		T/T 19(0.16)		6(0.02)				
SLC19A1	rs2838956	A/A 0(0.00)	<0.0001	48(0.36)	0.42	A 75(0.51)	156(0.59)	1.74
		A/G 71(0.97)		60(0.45)		G 71(0.49)	110(0.41)	
		G/G 2(0.03)		25(0.19)				
ABCB1	rs1045642	C/C 35(0.48)	0.006	70(0.53)	0.541	C 93(0.64)	191(0.72)	2.53
		C/T 23(0.32)		51(0.38)		T 53(0.36)	75(0.28)	
		T/T 15(0.21)		12(0.09)				
	rs1128503	C/C 35(0.48)	0.441	76(0.57)	0.09	C 99(0.68)	196(0.74)	1.32
		C/T 29(0.40)		44(0.33)		T 47(0.32)	70(0.26)	
		T/T 9(0.12)		13(0.10)				
ABCC5	rs9838667	A/A 47(0.64)	<0.0001	88(0.66)	0.139	A 109(0.75)	213(0.80)	1.36
		A/C 15(0.21)		37(0.28)		C 37(0.25)	53(0.20)	
		C/C 11(0.15)		8(0.06)				
	rs3792585	T/T 18(0.25)	0.0004	93(0.70)	0.541	T 145(0.74)	222(0.83)	6.21*
		T/C 20(0.27)		36(0.27)		C 51(0.26)	44(0.17)	
		C/C 35(0.48)		4(0.03)				

Table 3 Odds Ratios for ALL including for SNPs of carriers and best adjusted model

<i>Gene</i>	<i>Model</i>	<i>SNPs</i>	<i>Case n(%)</i>	<i>Control n(%)</i>	<i>OR</i>	<i>95%CI</i>	<i>p- value</i>	<i>AIC</i>	<i>BI C</i>
COL18A1 rs2274808									
	<i>Codominant</i>	<i>C/C</i>	39(53.4%)	107(80.5%)	1.00	<i>Reference</i>	0.0001	240.0	260.0
		<i>C/T</i>	15(20.6%)	23(17.3%)	2.55	(1.11-5.83)			
		<i>T/T</i>	19(26%)	3(2.3%)	21.05	(5.62-78.87)			
	<i>Dominant</i>	<i>C/C</i>	39(53.4%)	107(80.5%)	1.00	<i>Reference</i>	<0.0001	248.6	265.2
		<i>C/T-T/T</i>	34(46.6%)	26(19.6%)	5.01	(2.48-10.13)			
SLC19A1 rs2838956									
	<i>Codominant</i>	<i>A/A</i>	0(0%)	48(36.1%)	1.00	<i>Reference</i>	<0.0001	200.5	220.5
		<i>A/G</i>	71(97.3%)	60(45.1%)	0.00	NA			
		<i>G/G</i>	2(2.7%)	25(18.8%)	0.00	NA			
	<i>Overdominant</i>	<i>A/A-G/G</i>	2(2.7%)	73(54.9%)	1.00	<i>Reference</i>	<0.0001	202.9	219.6
		<i>A/G</i>	71(97.3%)	60(45.1%)	44.69	(10.42-191.63)			
ABCB1 rs1045642									
	<i>Codominant</i>	<i>C/C</i>	15(20.6%)	70(52.6%)	1.00	<i>Reference</i>	<0.0001	223.6	243.6
		<i>C/T</i>	23(31.5%)	51(38.4%)	1.67	(0.77-3.63)			
		<i>T/T</i>	35(48%)	12(9.0%)	17.43	(6.91-43.97)			
	<i>Recessive</i>	<i>C/C-C/T</i>	38(52%)	121(91.0%)	1.00	<i>Reference</i>	<0.0001	223.3	239.9
		<i>T/T</i>	35(48%)	12(9.0%)	13.76	(5.94-31.88)			
ABCB1 rs1128503									
	<i>Codominant</i>	<i>C/C</i>	35(48%)	76(57.1%)	1.00	<i>Reference</i>	0.68	271.7	291.7
		<i>C/T</i>	29(39.7%)	44(33.1%)	1.33	(0.71-2.50))			
		<i>T/T</i>	9(12.3%)	13(9.8%)	1.19	(0.45-3.15)			
	<i>Overdominant</i>	<i>C/C-T/T</i>	44(60.3%)	89(66.9%)	1.00	<i>Reference</i>	0.13	236.0	248.5
		<i>C/T</i>	29(39.7%)	44(33.1%)	1.64	(0.86-3.16)			
ABCC5 rs9838667									
	<i>Codominant</i>	<i>A/A</i>	47(64%)	88(66%)	1.00	<i>Reference</i>	0.41	235.8	251.4
		<i>A/C</i>	15(21%)	37(28%)	2.61	(1.05-6.48)			
		<i>C/C</i>	11(15%)	8(6.0%)	1.10	(0.46-2.62)			
	<i>Overdominant</i>	<i>A/A-C/C</i>	44 (60.3%)	96(72%)	1.00	<i>Reference</i>	0.11	269.8	286.5
		<i>A/C</i>	29(39.7%)	37(28%)	1.29	(0.70-2.35)			
ABCC5 rs3792585									
	<i>Codominant</i>	<i>T/T</i>	35(48%)	93(69.9%)	1.00	<i>Reference</i>	0.003	250.9	270.8
		<i>T/C</i>	20(27.4%)	36(27.1%)	1.42	(0.72-2.81)			
		<i>C/C</i>	18(24.7%)	4(3%)	11.2	(3.50-35.91)			
	<i>Recessive</i>	<i>T/T-T/C</i>	55(75.3%)	129(97%)	1.00	<i>Reference</i>	0.004	249.9	266.5
		<i>C/C</i>	18(24.7%)	4(3%)	9.99	(3.19-31.28)			

Table 4 Risk of association of ALL with combinations of SNPs of carriers

PAIR SNPs	CASE	CONTROL	OR	CI	P-value
COL18A1 (rs2274808)+ SLC19A1(rs2838956)					
<i>C/C+A/A</i>	39	155	1.00	-	-
<i>C/C+A/G</i>	110	167	2.618	(1.71- 4.01)	<.0001*
<i>C/C+G/G</i>	41	132	1.234	(0.75-2.03)	0.404
<i>C/T+A/A</i>	15	71	0.839	(0.43-1.62)	0.602
<i>C/T+A/G</i>	86	83	4.118	(2.59-6.54)	<.0001*
<i>C/T+T/T</i>	17	48	1.408	(0.73-2.71)	0.305
<i>T/T+A/A</i>	19	54	1.398	(0.74-2.63)	0.295
<i>T/T+A/G</i>	90	66	5.419	(3.38-8.70)	<.0001*
<i>T/T+G/G</i>	21	31	2.692	(1.39-5.19)	0.003*
ABCB1 (rs1045642+rs1128503)					
<i>C/C+C/C</i>	70	146	1.00	-	-
<i>C/C+C/T</i>	64	114	1.171	(0.77-1.77)	0.460
<i>C/C+T/T</i>	44	83	1.106	(0.69-1.75)	0.670
<i>C/T+C/C</i>	58	127	0.953	(0.62-1.45)	0.821
<i>C/T+C/T</i>	52	95	1.143	(0.73-1.77)	0.557
<i>C/T+T/T</i>	32	64	1.043	(0.62-1.73)	0.872
<i>T/T+C/C</i>	50	88	1.185	(0.75-1.85)	0.458
<i>T/T+C/T</i>	44	56	1.639	(1.01-2.66)	0.040*
<i>T/T+T/T</i>	24	25	2.002	(1.06-3.75)	0.029*
ABCC5 (rs9838667+ rs3792585)					
<i>A/A+T/T</i>	82	181	1.00	-	-
<i>A/A+T/C</i>	67	124	1.192	(0.80-1.77)	0.382
<i>A/A+C/C</i>	65	92	1.319	0.86-2.01)	0.199
<i>A/C+T/T</i>	50	181	0.609	(0.40-0.91)	0.017 [‡]
<i>A/C+T/C</i>	35	124	0.623	(0.39-0.98)	0.041 [‡]
<i>A/C+C/C</i>	33	92	0.864	(0.54-1.36)	0.537
<i>C/C+T/T</i>	46	101	1.005	(0.65-1.55)	0.981
<i>C/C+T/C</i>	31	44	1.555	(0.91-2.63)	0.100
<i>C/C+C/C</i>	29	12	5.334	(2.59-10.97)	<.0001*

VI. MANUSCRITO 2

Asociación de los polimorfismos genéticos de *FPGS* rs1544105 y rs4451422 sobre la farmacocinética poblacional de MTX en bajas dosis en niños con LLA, un estudio piloto

6.1. Resumen

Antecedentes: El MTX es un antifolato activado por folilpoliglutamil sintetasa (*FPGS*) utilizado para tratar patologías oncológicas infantiles como leucemia linfoblástica aguda. Debido a su estrecho margen terapéutico y los polimorfismos genéticos (SNPs) de *FPGS* se determina su comportamiento farmacocinético, requerido para realizar el ajuste de dosis adecuado.

Objetivo: determinar la asociación de 2 polimorfismos genéticos de *FPGS* sobre la farmacocinética poblacional de MTX en niños con LLA

Métodos: A 17 pacientes del Centro Estatal de Cancerología (CECAN)-Durango, diagnosticados con LLA se identificó el genotipo de *FPGS*-rs1544105 y rs4451422 por qPCR. La cuantificación de los niveles plasmáticos de MTX se realizó por HPLC. La determinación de la farmacocinética poblacional (PopPk) se utilizó el modelo de efectos mixtos con el software MONOLIX MLXTRAN v4.3.2s donde los SNPs fueron incorporados como covariables categóricas.

Resultados: se encontró que la frecuencia alélica para el *FPGS*-rs1544105 y rs4451422 fue de 50 y 32% respectivamente, sin modificación del equilibrio de Hardy Weinberg. El análisis de la PopPk de MTX reveló un modelo de bicompartimental de baja capacidad predictiva, cuyo $CL/F=6.09$ L/h y $V_c/F=6.78$ L, con una variabilidad interindividual de 40.7% y 31.5% respectivamente y una variabilidad residual de 31.2%. Ninguno de los SNPs estudiados explicaron el comportamiento del modelo final a pesar que el rs4451422 presentara valor del $AIC=41.52$, comparado con el modelo base ($AIC=43.54$). Sin embargo, sólo el peso disminuyó 7.22 veces la función objetivo, en el cual el $-2LL=7.02$, $p=0.007$), estableciendo una baja del $CL/F=2.50$ L/h

Conclusión: El modelo poblacional desarrollado de MTX a dosis bajas para los pacientes pediátricos con LLA con baja capacidad predictiva, fue

bicompartimental en el cual el efecto de las covariables *FPGS*- rs1544105 y rs4451422 no influyeron en el modelo final; a diferencia del peso que disminuyó el CL/F sustancialmente, aspecto a considerar para realizar un mejor ajuste de dosis.

Palabras clave: farmacocinética poblacional, metotrexate, *FPGS*, polimorfismos

Abstract

Background: MTX is an antifolate activated folylpolyglutamyl synthetase (*FPGS*) used to treat children's oncological diseases such as acute lymphoblastic leukemia. Because of its narrow therapeutic range and genetic polymorphisms (SNPs) of *FPGS* would modify population pharmacokinetics of MTX and intra and interindividual variabilities, data required for appropriate dose adjustment.

Objective: To determine the association between two SNPs of *FPGS* *FPGS*-rs1544105 and rs4451422 with the PopPk of MTX in children with ALL

Methods: Seventeen patients State Cancer Center of Durango with ALL, were identified their genotype of *FPGS*-rs1544105 and rs4451422 by qPCR. The plasmatic levels of MTX was performed by HPLC. To determine the parameters of PopPk, the software of mixed effects MONOLIX MLXTRAN v4.3.2s was used, where SNPs were incorporated as categorical covariates.

Results: it was found that the allelic frequency was 50 and 32% for *FPGS*-rs1544105 and rs4451422 respectively, unchanged from Hardy-Weinberg Equilibrium. Analysis of PopPk of MTX revealed a two-compartment model whose CL/F=6.09L/h and Vc/F=6.78 L, with an interindividual variability of 40.7% and 31.5% respectively and 31.2% for residual variability. None of evaluated SNPs could explain the final model, despite that *FPGS*-rs4451422 showed a value of Akaike Information Criterion-AIC = 41.52 compared to base model (AIC = 43.54). However, only the covariate weight decreased 7.22 times the objective function, in which the -2LL = 7.02, p = 0.007), establishing a low CL / F = 2.50 L / h.

Conclusion: The PopPk model of MTX to lower doses for pediatric patients with ALL was two compartment and the effect of SNPs of *FPGS* did not influence in

the on the final model. However, the covariate weight could explain the final model and that considers to make a better fit dose.

Key words: Population pharmacokinetics, methotrexate, FPGS, polymorphisms

6.2. Introducción

El MTX es un antimetabolito de la vía de folato utilizado como agente para enfermedades inmunológicas y oncológicas, de manera importante en leucemia linfoblástica aguda y linfomas (1). El MTX es aplicado por diferentes vías y pautas de dosificación de acuerdo a la etapa de tratamiento según el protocolo de St Jude Total XV (2, 3). De hecho, son frecuentes las reacciones adversas derivadas de la mielosupresión por lo que debe ser monitorizado en plasma para mejorar el régimen de dosificación (4). Además, se ha podido evidenciar en varios trabajos científicos (5, 6) que las respuestas terapéuticas y no deseadas dependen de cambios polimórficos del genotipo de los pacientes, especialmente a nivel de transportadores de folato SLC19A1, ABCB1, ABCC5 y de varias enzimas como Tiopurin metiltransferasa (TPMT), metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), y especialmente la folilpoliglutamil sintetasa (FPGS) (7), cuya función es la de producir los metabolitos activos de poliglutamatos (MTXPGx). Por tanto el objetivo de este trabajo fue determinar la asociación de dos importantes polimorfismos genéticos de *FPGS*- rs1544105 y rs4451422 en la farmacocinética poblacional (PopPk) del MTX administrado a bajas dosis.

6.3. Materiales y métodos

6.3.1. Pacientes

Esta investigación fue autorizada por el Comité de Bioética e Investigación del Hospital General de SSA, Durango-México. Además se obtuvo el consentimiento firmado de los tutores de los niños y también el asentimiento informado de aquellos pacientes que estaban en condiciones de firmarlo. Se evaluaron 17 niños diagnosticado con LLA, 10 varones (58.8%) y 7 mujeres (41.2%), en edades comprendidas entre 3.53-16.53 años, quienes estuvieron en fase de mantenimiento recibiendo dosis bajas de MTX (40-50mg/m²/semana) por vía i.m.

6.3.2. Genotipificación

Se realizó el genotipo y la determinación de las frecuencias alélicas a partir de la extracción de ADN de sangre total determinándose su integridad por electroforesis en gel de agarosa 1% y su concentración por espectrofotometría en Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Los polimorfismos genéticos de *FPGS* (rs1544105 y rs4451422) se identificaron por la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR) en equipo StepOne® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) con sondas TaqMan (Applied Biosystems by StepOne®, Foster City, CA, USA) llevado a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del CIIDIR-Durango.

6.3.3. Farmacocinética poblacional del metotrexate

Un total de 74 muestras de sangre venosa total (1.5mL), fueron obtenidas de 17 niños con LLA, de las que se determinó las respectivas concentraciones de MTX posterior a una dosis de 40-50mg/m². El muestreo utilizado fue aleatorio y esparcido, en el cual la primera muestra se obtuvo 2 horas antes de la administración i.m. de MTX, la segunda durante el intervalo en el que el fármaco alcanzó su concentración máxima (1-3 horas) y la(s) siguiente(s) en la etapa de decaimiento de las concentraciones, es decir, en fases de distribución y eliminación, en tiempos comprendidos de 3-12 horas posterior a la administración de las dosis de MTX. La técnica utilizada para la determinación de las concentraciones plasmáticas de MTX fue la descrita por Biberoglou y *col.* (8). Para cada muestra por triplicado se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) cuyo equipo consta de una bomba cuaternaria modelo 515, un autoinyector modelo 717, un detector UV/Vis modelo 2487, todos marca Waters® (Milford, MA, USA) en el Laboratorio de Farmacología Clínica de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría. Como fase estacionaria se utilizó una columna Phenomenex® C18 110A 5µm de 150 x 4.6 mm (Gemini, California, USA), La fase móvil fue fosfato ácido de sodio (Na₂HPO₄) 0.05M pH:4.85 ajustado con NaOH y tetrahidrofurano (95:5 v/v), a un flujo isocrático de 1.2mL/min con presión de 1200psi, detectadas a una longitud de onda de 313nm. El volumen de inyección fue de 100 µL. El tiempo de corrida fue de 6 minutos.

6.3.4. Análisis farmacocinético poblacional de MTX

Los parámetros PopPk como individuales fueron obtenidos luego de su análisis no lineal de efectos mixtos, que se basa en la medida de una media poblacional y la variabilidad interindividual. Se determinó con el software MONOLIX v4.3.3.MLXTRAN(9). Para la construcción del modelo básico estructural se realizaron 472 distintos modelos, en los que se evaluaron de 1, 2, 3 compartimentos y no compartimentales.

Modelado farmacocinético poblacional: se estimó los parámetros PopPk promedio, entre los parámetros farmacocinéticos con y sin efecto de las covariables, la variabilidad interindividual (η) y la variabilidad residual (ϵ o error residual), que representa la desviación entre las concentraciones predichas y las observadas en cada niño. El modelo poblacional final determinó la variabilidad de los parámetros PopPk (intra e interindividual), la variabilidad residual (efectos aleatorios), y la diferencia de los parámetros predichos por las covariables (efectos mixtos). Los parámetros poblacionales son calculados mediante análisis Bayesiano.

El modelaje se llevó en 3 fases: determinación del modelo básico, obtención del modelo con covariables de interés y determinación del modelo final. Los parámetros iniciales fueron fijados para biodisponibilidad F, constante de velocidad de absorción de acuerdo a estudios previos (10-17). La determinación del mejor modelo dado por la estimación del menor valor de función objetivo se validó como una aproximación de la función de verosimilitud.

Los parámetros farmacocinéticos poblacionales PK_i se calcularon con la siguiente ecuación:

$$Y_{ij} = f(D_i, PK_i, t_{ij}) + \epsilon_{ij}$$

Donde Y_{ij} = observaciones en función del tiempo j-ésimo en el individuo i-ésimo; f es la función del modelo estructural dado por la dosis administrada a cada paciente D_i , y la diferencia residual obtenida de restar el valor predicho o predictivo del modelo y el observado en el individuo i-ésimo al tiempo j-ésimo.

Modelo farmacocinético poblacional por efecto de covariables: se estimó considerando las características de los sujetos (covariables) que pueden explicar la variabilidad farmacocinética observada entre los sujetos de una misma población. Las covariables evaluadas fueron de tipo intrínseco como edad, peso, sexo, IMC, talla, polimorfismos, etc.; y extrínsecas como número de recaídas, tiempo de exposición al fármaco, polifarmacia. Para realizar la ejecución del cálculo se ordenaron poniendo en primer lugar a las covariables cuantitativas y posteriormente a las cualitativas.

La expresión matemática de las covariables cualitativas o discretas utilizada para el cálculo de los PKi fue la siguiente:

$$p_i = \theta_1 + (\theta_2 * COV)$$

Donde p_i es el parámetro farmacocinético p obtenido en el individuo i , θ_1 es el valor del parámetro poblacional cuando la covariable presenta un valor igual a cero, y θ_2 representa la modificación del parámetro por unidad de cambio de la covariable COV.

6.3.5. Modelo estadístico

El análisis estadístico se enfocó en determinar la variabilidad interindividual y residual. Para la primera se consideró como p_i a un valor individual dentro del vector PKi el cual se explica con la siguiente ecuación:

$$p_i = \theta_{p,pop} * e^{\eta p_i}$$

donde $\theta_{p,pop}$ representa el valor típico (o medio) poblacional de los parámetros, común a todos los individuos de la población, y ηp_i es la desviación del valor de p_i con respecto a $\theta_{p,pop}$. Como la población estudiada fue de 17 individuos, los valores ηp_i son $\eta p_1, \eta p_2, \eta p_3 \dots \eta p_{18}$. Donde cada valor de ηp_i representan la desviación de los parámetros de cada niño con relación al valor promedio de la población. Además esta desviación presentará una distribución aleatoriamente simétrica aproximadamente alrededor de cero y con una varianza ω^2_p que explica la variabilidad interindividual asociada al parámetro p . Por otro lado, como el vector PKi puede presentar varios parámetros según el modelo farmacocinético compartimental evaluado (por ejemplo las constantes de

absorción, K_a ; de eliminación, K_e , volumen aparente de distribución total, V_d); en compartimento central, V_c ; en el compartimento periférico, V_p ; aclaramiento, CL ; etc. se determinará también una variabilidad interindividual que viene expresada por $\omega^2_{K_a}$, $\omega^2_{K_e}$, $\omega^2_{V_d}$, $\omega^2_{V_c}$, $\omega^2_{V_p}$, ω^2_{CL} , etc.

La variabilidad residual ε se estableció en función de la distribución aleatoria cercana a cero con una varianza σ^2

El modelo de regresión de covariables fue estructurado de acuerdo a las de mayor significancia sobre los parámetros farmacocinéticos de estudio con mayor relevancia en su aplicación clínica (V_c/F y CL/F). Las covariables se separaron como cuantitativas (edad, peso, talla, índice de masa corporal, superficie corporal) y cualitativas (sexo y los polimorfismos), siendo incorporadas una a una (por pasos).

El error residual que explica la variación de las concentraciones predichas frente a las observadas fue calculado dentro de cada modelo, aplicándose varios tipos: aditivo, proporcional, exponencial y combinados, provistos en el paquete MONOLIX v4.3.2 (18). Clínicamente un valor elevado de variabilidad residual explica la probabilidad de que las concentraciones del MTX se encuentren fuera del intervalo terapéutico y por tanto con poca efectividad o con riesgo de toxicidad. Con el modelo final se estimó el V_c/F y el CL/F mediante la modelación bayesiana dada por el MONOLIX. Finalmente el algoritmo utilizado fue el SAEM (Stochastic Approximation Expectation Maximization) que permite explicar la tendencia de los datos reales a los probabilísticos. Finalmente se empleó el Software PkSolver (19) para determinar los valores individuales de áreas bajo la curva AUC, T_{max} y C_{max} .

6.4. Resultados

En la Tabla 1 presentan los datos demográficos, antropométricos y parámetros bioquímicos de los 17 pacientes estudiados

Tabla 1 Características antropométricas, parámetros hematológicos y bioquímicos de los pacientes

Características de pacientes	Mediana, rango
Edad(años)	7.92(2.5-18.08)
Género (%Masculino/%Femenino)	10(58.8)/7(41.18)
Peso (Kg)	28.0(16.8-54.0)
Talla (m)	1.21(0.96-1.65)
Superficie corporal (m²)	1.10(0.70-1.54)
Índice de masa corporal (kg/m²)	15.11(12.36-28.1)
Hemoglobina (g/dL)	11.03(7.5-15.5)
Hematocrito (%)	36.9(29.5-42.40)
Recuento de eritrocitos (cél/mm³)	3.35 (2.85-4.99) x10 ⁶
Recuento leucocitario (cél/mm³)	3.22(1.079-13.6)x10 ³
Conteo plaquetas (cél/mm³)	180x10 ³ (46.5-321) x10 ³
TGO (UI/L)	28.5(0.4-38)
TGP (UI/L)	21(0.3-110)
Acido úrico (mg/dL)	3.71(2-4.7)
Urea (mg/dL)	18.0(8.89-34.3)
Creatinina (mg/dL)	0.84(0.32-1.12)
Fosfatasa alcalina (UI/L)	66(55-87)
Dosis MTX i.m.	40(28-60) mg*m ²

6.4.1. Resultados de genotipo

Las frecuencias genotípicas y alélicas como el equilibrio de Hardy Weinberg (EHW) se muestran en la Tabla 2. En esta se puede observar que para el *FPGS*-rs1544105 hubo un número importante de niños ($n=11$) que presentaron el alelo raro T y *FPGS*-rs4451422, se identificaron 7 niños heterocigotos y 2 homocigotos GG. Sin embargo, en ninguno de los dos polimorfismos se encontró fuera del equilibrio de Hardy Weinberg

Tabla 2 Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de FPGS en la población de estudio

POLIMORFISMO	FRECUENCIAS GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		EHW Valor $p < 0.05$
	WT	HT	HM	p	q	
<i>FPGS</i>-rs1544105 C/T	6(35.29)	5(29.41)	6(35.29)	17(0.50)	17(0.50)	0.089
<i>FPGS</i>-rs4451422 T/G	8(47.06)	7(41.18)	2(11.76)	23(0.68)	11(0.32)	0.809

6.4.2. Resultados de farmacocinética poblacional

En la Tabla 3 se presentan los valores promedios de los parámetros farmacocinéticos poblacionales del modelo estructural con su respectivo error estándar relativo. El modelo más adecuado con la menor función objetivo de acuerdo al criterio de verosimilitud, criterio de Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC) fue el bicompartimental de absorción, con modelo de error residual tipo "proporcional", dado por la ecuación $y = f * b * c * e$, donde y es la concentración esperada en i -ésimo tiempo; b , σ que representa a la varianza de ε (o variabilidad residual), $c * e$, ponderación del modelo.

Se observó que los parámetros con la más baja variación (determinada por el valor de error estándar relativo) fueron el K_a/F cuyo valor promedio fue de 0.35 h^{-1} , el $CL/F = 6.09 \text{ L/h}$ y $V_c/F = 6.78 \text{ L}$. Se determinó además que la variabilidad interindividual para los parámetros de CL/F y V_c/F fue de 40.7% y 31.5% respectivamente y el variabilidad residual fue de 31.2%.

Tabla 3 Valores promedios de los parámetros farmacocinéticos poblacionales

Parámetros	Promedio	E.E.R%
Modelo estructural		
Ka/F (h⁻¹)	0.35	16
CL/F (L*h⁻¹)	6.09	16
Vc/F (L)	6.78	25
Q/F (L*h⁻¹)	0.24	203
Vp/F (L)	209	143
Modelo estadístico: variabilidad interindividual		
ω Ka %	18.0	92
ω CL %	40.7	29
ω Vc %	31.5	88
ω Q %	188	80
ω Vp %	119	100
b %	31.2	41
Estimación de Log verosimilitud por linearización		
-2Log verosimilitud	19.54	
AIC	43.54	
BIC	53.54	

Leyenda: Ka/F: constante de absorción; Cl/F, aclaramiento de eliminación; Vc, volumen aparente de distribución en compartimento central, Q/F, aclaramiento de distribución; Vp, volumen aparente de distribución periférico, ω, desviación estándar de la estimación de variabilidad interindividual (VII); b, variabilidad intraindividual; AIC: criterio de información de Akaike, BIC, criterio de información bayesiano; E.E.R,error estándar relativo

Tabla 4 Resultados de parámetros farmacocinéticos individuales sin covariables

ID	Ka/F (1/h)	CL/F (L/h)	Vc/F (L)	Q/F (L/h)	Vp/F (L)	*AUC _{0-t} (mg/L*h)	*AUC _{0-inf} (mg/L*h)	*Tmax (h)	*Cmax (mg/l)
1	0.37	5.48	6.52	0.51	405.91	4.33	4.41	1.00	1.62
2	0.40	8.58	7.57	0.55	464.69	6.21	6.21	1.00	2.29
3	0.34	6.89	8.22	0.56	473.70	3.12	3.90	1.00	1.43
4	0.32	6.05	8.08	2.14	363.19	1.22	1.23	1.00	0.45
5	0.36	9.38	7.36	1.08	503.84	3.84	3.86	1.00	1.42
6	0.31	7.99	8.16	10.21	420.28	1.61	1.61	1.00	0.59
7	0.33	7.49	8.70	1.50	412.11	2.90	2.91	1.00	1.07
8	0.34	8.69	7.08	1.71	431.03	1.43	1.54	0.69	0.82
9	0.34	7.14	6.40	1.73	387.65	1.69	1.70	1.00	0.63
10	0.38	3.95	5.85	0.25	399.86	7.02	7.31	1.00	2.69
11	0.35	7.03	7.50	0.86	441.02	5.23	5.25	1.00	1.93
12	0.35	6.60	7.78	0.70	457.27	5.23	5.25	1.00	1.93
13	0.39	3.23	4.85	0.33	340.91	7.25	7.25	0.86	3.11
14	0.34	4.75	6.75	0.43	411.94	8.78	8.78	1.00	3.23
15	0.35	9.80	7.79	1.33	481.12	3.47	3.48	1.00	1.28
16	0.36	4.36	7.35	0.23	462.49	3.84	3.91	1.00	1.44
17	0.43	4.12	5.95	0.24	383.08	6.04	6.06	1.00	2.23
Promedio	0.36	6.56	7.17	1.43	425.89	4.31	4.39	0.97	1.66
Desv. Est	0.03	2.00	1.00	2.34	44.33	2.25	2.24	0.08	0.85
CV%	8.60	30.51	14.01	163.30	10.41	52.16	51.05	8.26	51.16

Leyenda: Ka/F, constante de absorción, CL/F, aclaramiento; Vc/F, volumen en compartimento central, Q/F, aclaramiento intercompartimental; Vp/F, volumen periférico; AUC_{0-t}; área bajo la curva desde 0 hasta tiempo t; AUC_{0-inf}, área bajo la curva desde 0 hasta infinito; Tmax, tiempo máximo, Cmax, concentración máxima de MTX; * calculado con PK solver.

La Tabla 4 muestra los parámetros farmacocinéticos individuales (Θ) estimados con el mejor modelo, así también el valor calculado de área bajo la curva (AUC_{0-t}) desde el tiempo 0 hasta el último tiempo donde se obtuvo la concentración final y, ($AUC_{0-\infty}$) desde el tiempo 0 hasta infinito; en la que se destaca también que los parámetros con menor coeficiente de variación (CV%) fueron el K_a/F , CL/F , V_c/F , V_p/F y T_{max} con valores inferiores a 30%.

Los valores exhibidos en la Tabla 5 corresponden a los parámetros farmacocinéticos poblacionales determinados en función de las covariables evaluadas que se propusieron como relevantes para el modelo básico. Se puede notar que solamente el *FPGS-rs4451422* influyó sobre el modelo estructural básico, cuyo AIC fue de 41.51. Sin embargo, por la limitación de este criterio estadístico, que no incluye un valor de probabilidad que explique su significancia estadística, se consideró estimarlo en función del criterio de -2Log verosimilitud (2.42), donde la covariable citada si bien disminuye la función objetivo, pero no lo suficiente como para explicar el modelo final ($p=0.119$). Gráficamente se muestra en la Figura 1 dicho comportamiento en la cual los perfiles farmacocinéticos individuales están distribuidos de acuerdo al citado alelo (Group#2); así los mayores niveles de C_{max} , menores T_{max} y mayores valores AUC. Además se presenta una línea de corte que corresponde al nivel de concentraciones de riesgo de toxicidad, mismo que clínicamente se espera que sea inferior a $1.5\mu\text{M}$ (o $3.3\mu\text{g/mL}$) a las 24 horas.

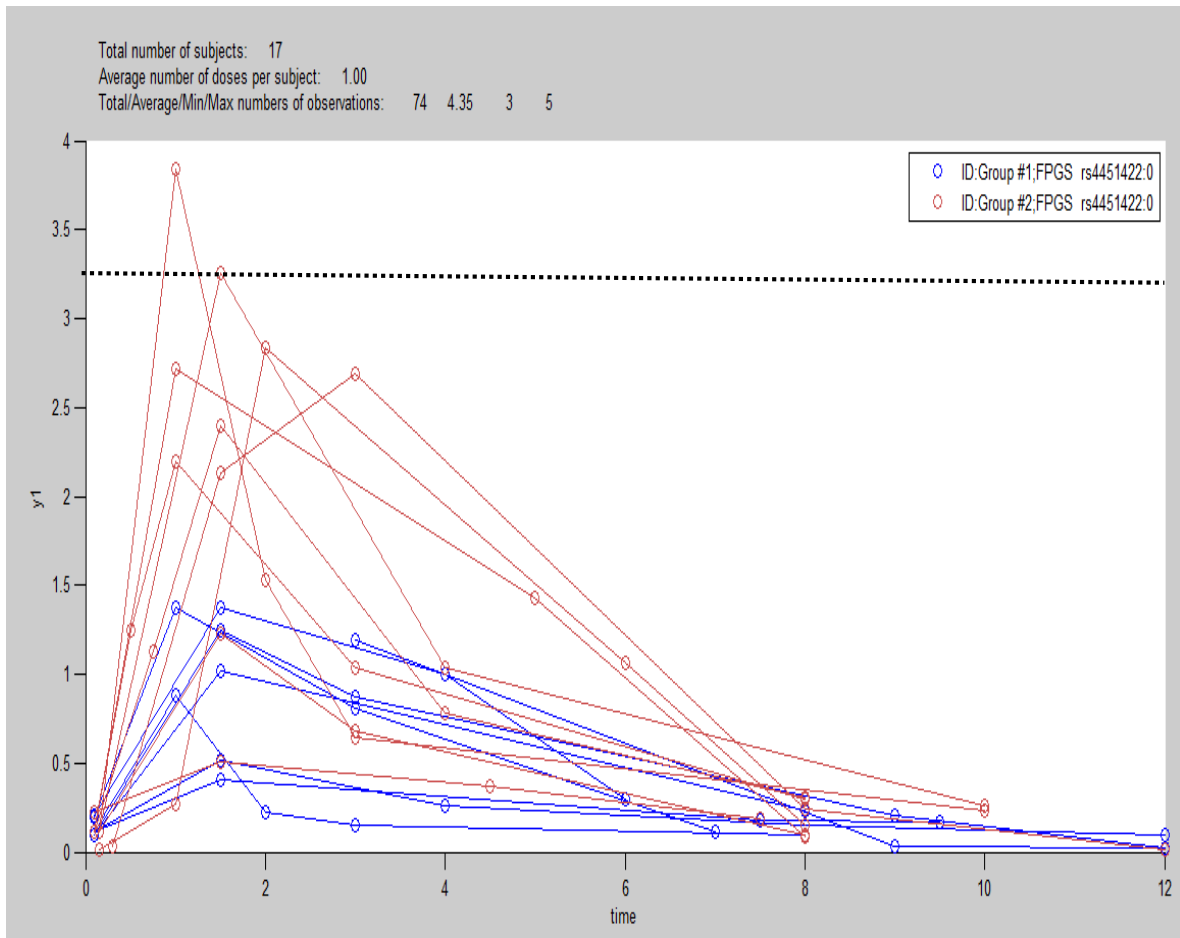


Figura 1 Distribución de los perfiles farmacocinéticos de MTX de acuerdo a la presencia del polimorfismo de *FPGS* rs4451422 (Group#1 niños sin alelo, Group#2 niños con alelo) Línea de toxicidad 3.3ug/ml=1.5uM

Modelo de mejor ajuste: se determinó que éste se adecuó a una cinética bicompartimental donde los parámetros iniciales simulados fueron de 1.4, 9.58, 19.3, 5.38 y 21.7 para K_a/F , CL/F , V_c/F , Q/F y V/F respectivamente. En la Figura 2 se describe el comportamiento individual de cada perfil utilizado para ajustar los parámetros iniciales, donde también aparecen los respectivos valores de los parámetros estimados para cada paciente de acuerdo a sus concentraciones, cuyos perfiles son producto de la simulación dada por 2000 cadenas de Monte-Carlo.

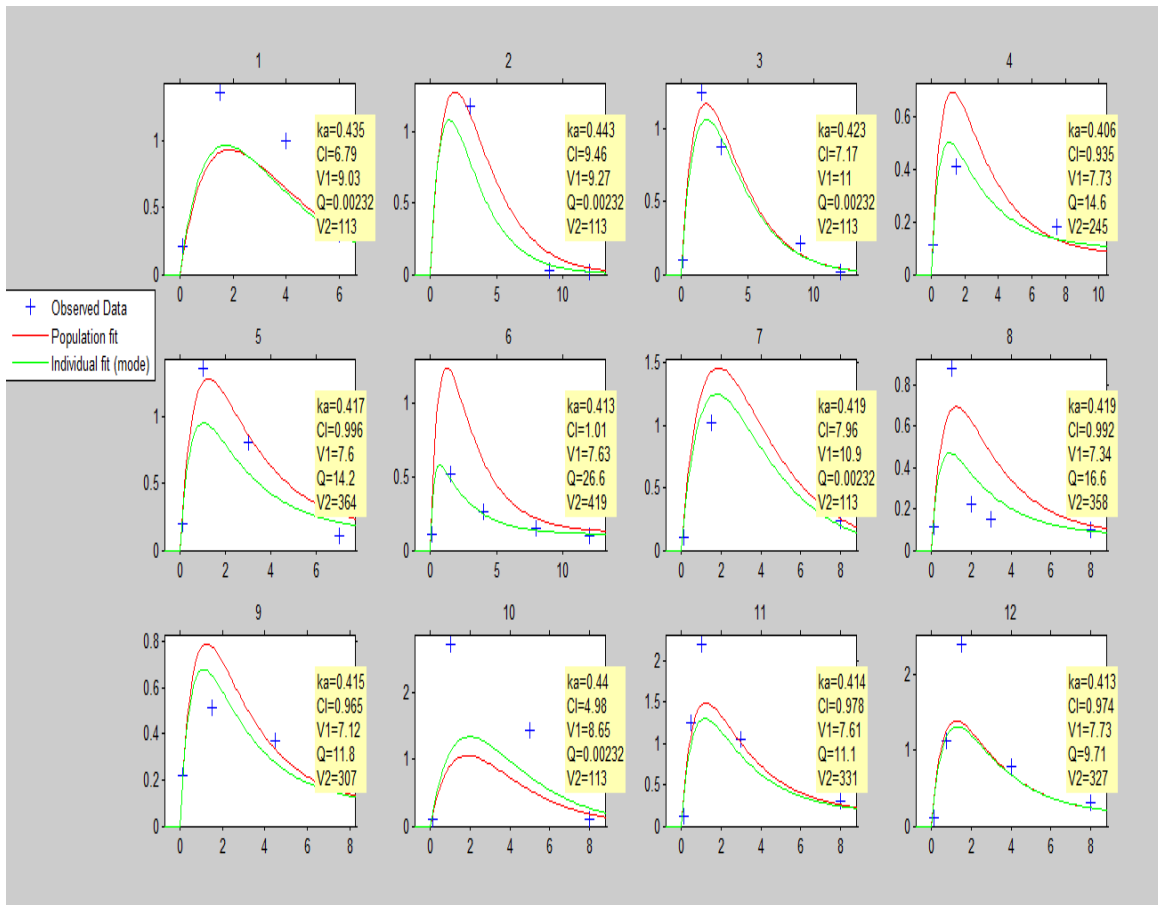


Figura 2 Ajuste de efectos fijos individuales

El procesamiento con las covariables de interés se realizó considerando las más adecuadas para en un futuro puedan formar par de una expresión matemática que permita explicar el modelo poblacional. Así se evaluaron 17 covariables, 11 categóricas en las que se consideraron los polimorfismos, recaída y 5 cuantitativas (edad, peso, talla, IMC, parámetros hematológicos).

La Figura 3 muestra el comportamiento de la variación residual dada por la variación de las concentraciones predichas y observadas tanto individuales como poblacionales. En esta gráfica se puede observar que a medida que la concentración supera el nivel de 1.5ug/L la distribución sufre una mayor variabilidad, lo que resta precisión debido al poco número de observaciones en esa área.

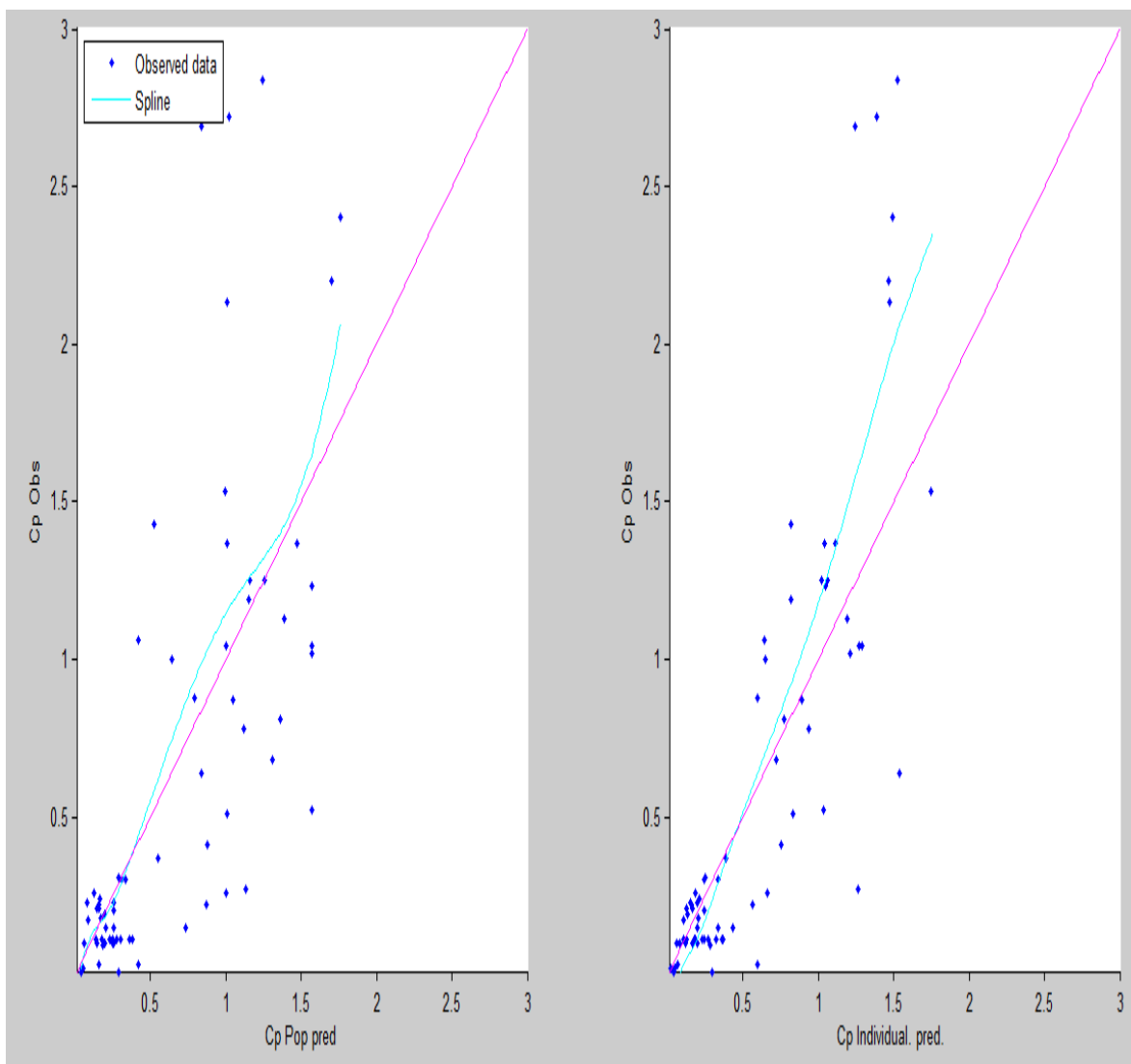


Figura 3 Distribución de las concentraciones predichas y observadas de MTX

Tabla 5 Parámetros farmacocinéticos poblacionales del modelo base con covariables y evaluación de la robustez del modelo

Covariable	CL/F (L/h)	β CL	% CL E.E.R	Vc/F(L)	β Vc	% Vc E.E.R.	ω CL	ω Vc	b	c	b- E.E.R.(%)	c- E.E.R.(%)	-2log verosi militud	AIC	BIC
Modelo base	6.09		16	6.78		25	0.41	0.32	1.04	1	14	41.5	19.54	43.54	53.54
EDAD	4.61	0.04	26.00	6.48	0.06	133.00	0.44	0.278	0.74	1.24	13.00	10.00	1.90	55.90	78.40
SEXO	5.66	0.24	30.00	17.80	-0.72	44.00	0.32	0.207	0.64	1.13	13.00	10.00	4.03	58.03	80.53
PESO	2.50	0.03	40.00	3.18	0.04	106.00	0.23	0.243	NA	NA	NA	NA	-7.22	46.78	69.28
TALLA	5.50	0.00	18.00	0.00	8.74	56.00	0.33	0.536	0.70	NA	NA	NA	-1.94	52.06	74.56
IMC	4.70	0.01	45.00	8.79	0.02	167.00	0.37	0.391	0.60	1.07	14.00	12.00	4.55	58.55	81.04
SUPERF. CORPORAL	0.01	19.90	3.4*E+12	1.5*E+10	0.60	6.5*E+11	1.67	0.344	8.4*E+8	1.00	20.00	409.00	158.51	212.51	235.00
FPGS-rs1544105	4.82	0.44	119.00	8.71	-0.59	75.00	0.41	0.408	0.73	1.19	13.00	10.00	8.14	52.14	70.47
FPGS-rs4451422	6.28	-1.92	75.00	9.75	-0.32	61.00	0.28	0.179	0.70	1.19	14.00	9.00	-2.49	41.51	59.84

Leyenda: Ka/F: constante de absorción; Cl/F, aclaramiento de eliminación; Vc, volumen aparente de distribución en compartimento central, Q/F, aclaramiento de distribución; ω , desviación estándar de la estimación de variabilidad interindividual (VII); b, variabilidad intraindividual; c, varianza de variabilidad residual; E.E.R, error estándar relativo; AIC, criterio de información de Akaike, BIC, criterio de información bayesiano; NA: no aplica

El polimorfismo *FPGS*-rs4451422 como covariable que pudiera explicar el modelo, permitió identificar que los portadores del alelo mutado no disminuyeron su capacidad de depuración determinada por el aclaramiento (CL/F), como se puede apreciar en la Figura 4, donde se distingue dicho comportamiento en el gráfico de cajas y posterior al análisis de varianza (ANOVA), se determinó que no presentaron diferencias entre grupos.

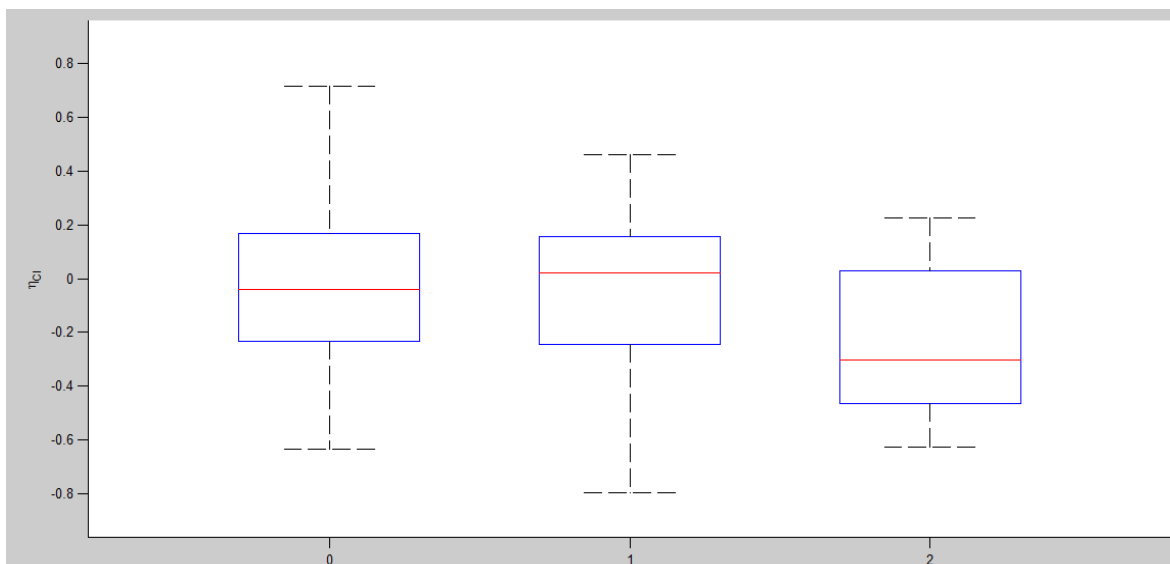


Figura 4 Comparación del aclaramiento (CL/F) de los individuos con genotipo heterocigoto (1) y mutado (2) frente al silvestre (0)

6.5. Discusión

En el presente estudio se investigó la asociación de dos polimorfismos genéticos de *FPGS* como parte de la vía metabólica del folato con el comportamiento *PopPk* e individual del MTX, administrados a bajas dosis en niños con LLA. Encontramos que el genotipo GG del *FPGS*-rs4451422 aparentemente afectó el CL/F el modelo farmacocinético poblacional básico de MTX, presentándose un incremento de su valor, aunque su potencial predictivo no fue estadísticamente significativo. Sin embargo, la covariable peso tuvo un importante impacto en el modelo final.

El efecto del MTX en pacientes oncológicos en general presenta diferencias en su respuesta farmacológica, lo que obedece a múltiples factores relacionados con la variabilidad metabólica interindividual e intraindividual de cada paciente con LLA

(20); hecho que lleva a que determinados pacientes muestren efectos tóxicos y otros de resistencia (21).

En la vía metabólica de folato interviene una gran variedad de enzimas donde destacan las TPMT, MTHF (22), transportadores y FPGS. Varios polimorfismos han sido considerados como marcadores de enfermedades inmunológicas como artritis reumatoidea (23), LLA (24) y como modificadores de la respuesta del MTX (25). En este trabajo pudimos evidenciar que el gen que codifica FPGS muestra una característica polimórfica interesante donde el porcentaje de pacientes con el alelo raro fue notable con un 50% para el rs1544105, aunque muy por debajo de lo que encontró Liu *y col* (26) y Wang *y col.* (13) ambos en población china. En cuanto al rs4451422 se encontró que un 32% de los niños presentaron el alelo mutado. Estos hallazgos permiten inferir que el nivel de expresión de la enzima FPGS estaría disminuido en los pacientes HT y HM. En población mexicana no se han reportado frecuencias genotípicas y alélicas de estos polimorfismos, aunque Gómez-Gómez *y col.* (27) encontraron una alta frecuencia alélica (45.71%) de otro polimorfismo importante A22G y se lo asoció con una disminución del tiempo de supervivencia de los pacientes GG y AG frente a los portadores del alelo silvestre.

La determinación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales de MTX, como el V_c/F y CL/F , son fundamentales para obtener los ajustes de dosis necesarios que derivan de modelos matemáticos adecuados con un mínimo valor de función objetivo (28). En este trabajo, el modelo más óptimo respondió al de dos compartimentos, tal como varios autores lo determinaron en sus poblaciones de estudio esencialmente con MTX en altas dosis (11, 14-16). Según nuestra evidencia encontramos que el V_c/F fue de 6.78 L y el CL/F fue de 6.09 l/h, este último presentó valores cercanos al reportado por Martelli *y col* (29).

Del análisis con covariables se pudo observar que el polimorfismo rs4451422 permitió explicar el modelo cuyo valor de AIC fue de 41.52. Gráficamente en la Figura 2 se aprecia que los portadores del alelo mutado mostraron perfiles farmacocinéticos más grandes que los pacientes con alelo silvestre. Este comportamiento también ha sido observado por otros investigadores aunque con

dosis elevadas de MTX. Sin embargo, no se pudo identificar un riesgo tóxico por acumulación de MTX, donde haya requerido la intervención con rescate de ácido folínico (Leucovorín®), como lo sugiere Grabnar L y *col* (30). Se encontró además que el nivel de CL/F aumentó de 6.09 a 6.28 mg/h en los pacientes que presentaron el polimorfismo, lo que sugiere ser considerado para un posterior ajuste de dosis.

El nivel de AUC permite identificar la cantidad de MTX que llegó a la circulación general, y por tanto, sugiere el riesgo de presentar cuadros de toxicidad. En esta investigación encontramos que los niveles de AUC_{0-inf} de MTX estuvieron en los niños con alelo silvestre en 4.16 mg/l*h (2.91-8.78 mg/l*h) y 3.86 mg/L*h (1.23-7.25) para los pacientes con el alelo mutado, lo que puede sugerir que los pacientes con el SNP tuvieron mayor predisposición a acelerar su aclaramiento. En todo caso, ninguno de los grupos presentó niveles exagerados de permanencia de MTX, que al compararlos con lo reportado por Hiraga y *col*. (31) (2.55uM equivalente a 5.5 mg/l*h), estuvieron por debajo de ese promedio.

6.6. Conclusiones

Al parecer, el modelo farmacocinético poblacional obtenido de MTX a dosis bajas para los pacientes pediátricos con LLA fue bicompartimental y el efecto de los *FPGS*- rs1544105 y rs4451422 no influyó en el modelo final. Sin embargo, el peso fue la única covariable que estadísticamente si entró en el modelo final.

Agradecimientos

A la Lic. Cristina Venzor jefe del departamento de enfermería de la Unidad de Hemato-oncología pediátrica del CECAN. A la Tec. Blanca Ramírez Mendiola por su apoyo en el laboratorio de farmacología clínica del Instituto Nacional de Pediatría. Al CONACYT por el apoyo financiero para la beca doctoral.

Conflicto de intereses.

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

6.7. Referencias.

1. McGuire JJ: Anticancer antifolates: current status and future directions. *Current pharmaceutical design* 9: 2593-2613, 2003.
2. Pui C-H, Campana D, Pei D, et al.: Treating Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia without Cranial Irradiation. *New England Journal of Medicine* 360: 2730-2741, 2009.
3. Pui CH, Pei D, Sandlund JT, et al.: Long-term results of St Jude Total Therapy Studies 11, 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 24: 371-382, 2010.
4. Bhojwani D, Sabin ND, Pei D, et al.: Methotrexate-induced neurotoxicity and leukoencephalopathy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32: 949-959, 2014.
5. Rocha JCC, Cheng C, Liu W, et al.: Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 105: 4752-4758, 2005.
6. Hijjiya N, Panetta JC, Zhou Y, et al.: Body mass index does not influence pharmacokinetics or outcome of treatment in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 108: 3997-4002, 2006.
7. Leil TA, Endo C, Adjei AA, et al.: Identification and characterization of genetic variation in the folylpolyglutamate synthase gene. *Cancer Res* 67: 8772-8782, 2007.
8. Biberoglu G, Uluoglu C, Timlioglu O, Oguz A and Hazanoglu A: High performance liquid chromatographic determination of methotrexate inserum. *Gazi Med J* 8: 80-84, 1997.
9. Mentré F and Lavielle M: Estimation of nonlinear mixed effects model in pharmacokinetics with the SAEM algorithmimplemented in MONOLIX.2008.

10. Aumente D, Buelga D, Lukas J, Gomez P, Torres A and García M: Population Pharmacokinetics of High-Dose Methotrexate in Children with Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Clinical pharmacokinetics* 45: 1227-1238, 2006.
11. Comandone A, Passera R, Boglione A, Tagini V, Ferrari S and Cattel L: High dose methotrexate in adult patients with osteosarcoma: Clinical and pharmacokinetic results. *Acta Oncologica* 44: 406-411, 2005.
12. Rask C, Albertioni F, Bentzen SM, Schroeder H and Peterson C: Clinical and Pharmacokinetic Risk Factors for High-dose Methotrexate-induced Toxicity in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Acta Oncol* 37: 277-284, 1998.
13. Wang S-m, Sun L-l, Zeng W-x, Wu W-s and Zhang G-l: Influence of genetic polymorphisms of FPGS, GGH, and MTHFR on serum methotrexate levels in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 74: 283-289, 2014.
14. Thompson PA, Murry DJ, Rosner GL, et al.: Methotrexate pharmacokinetics in infants with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 59: 847-853, 2007.
15. Faganel Kotnik B, Grabnar I, Bohanec Grabar P, Dolzan V and Jazbec J: Association of genetic polymorphism in the folate metabolic pathway with methotrexate pharmacokinetics and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia and malignant lymphoma. *European journal of clinical pharmacology* 67: 993-1006, 2011.
16. Chladkova J, Hak J, Martínková J and Chládek J: High-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia: 7-hydroxymethotrexate systemic exposure and urinary concentrations at the steadystate correlate well with those of methotrexate. *Arzneimittelforschung* 60: 769-775, 2010.
17. Batey MA: Population pharmacokinetics of adjuvant cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil (CMF). *European journal of cancer* 38 1081-1089, 2002.

18. Lixoft: MONOLIX V4.3.2, A software for the analysis of nonlinear mixed effects models. Lixoft, France, 2014.
19. Zhang Y, Huo M, Zhou J and Xie S: PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer methods and programs in biomedicine* 99: 306-314, 2010.
20. Lopez-Lopez E, Gutierrez-Camino A, Bilbao-Aldaiturriaga N, Pombar-Gomez M, Martin-Guerrero I and Garcia-Orad A: Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics* 15: 1383-1398, 2014.
21. Rots MG, Pieters R, Kaspers GJL, Veerman AJP, Peters GJ and Jansen G: Classification of Ex vivo methotrexate resistance in acute lymphoblastic and myeloid leukaemia *British journal of haematology* 110: 791-800, 2000.
22. Erculij N, Faganel Kotnik B, Debeljak M, Jasbek J and Dolzan V: The influence of folate pathway polymorphisms on high-dose methotrexate- related toxicity and survival in children with non-Hodgkin malignant lymphoma. *Radio Oncol* 48: 282-292, 2014.
23. Halilova KI, Brown EE, Morgan SL, et al.: Markers of treatment response to methotrexate in rheumatoid arthritis: where do we stand? *International journal of rheumatology* 20122012.
24. Piwkhram D, Siriboonpiputtana T, Beuten J, et al.: Mutation Screening and Association Study of the Folylpolyglutamate Synthetase (FPGS) Gene with Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* 16: 4727-4732, 2014.
25. Sharma S, Das M, Kumar A, et al.: Purine biosynthetic pathway genes and methotrexate response in rheumatoid arthritis patients among north Indians. *Pharmacogenet Genomics* 19: 823-828, 2009.
26. Liu S-G, Gao C, Zhang R-D, et al.: FPGS rs1544105 polymorphism is associated with treatment outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell International* 13:107 13: 1-8, 2013.

27. Gómez-Gómez Y, Organista-Nava J, Rangel-Rodriguez CA, et al.: Effect of folylpolyglutamate synthase A22G polymorphism on the risk and survival of patients with acute lymphoblastic leukemia. *Oncology Letters* 8: 731-735, 2014.
28. Joerger M: Covariate Pharmacokinetic Model Building in Oncology and its Potential Clinical Relevance. *AAPS Journal* 14: 119-132, 2012.
29. Martelli N, Mathieu O, Margueritte G, et al.: Methotrexate pharmacokinetics in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prognostic value? *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* 36: 237-245, 2011.
30. Grabnar I, Faganel Kotnik B, Jović P, Pišlar M, Dolžan V and Jazbec J: Bayesian Estimation of Methotrexate Pharmacokinetics in Children with Acute Lymphoblastic Leukaemia and Prediction of Folinic Acid Rescue. *PAGE2011*.
31. Hiraga Y, Yuhki Y, Itoh K, Tadano K, Takahashi Y and Mukai M: Pharmacokinetics and efficacy of low-dose methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 14: 135-142, 2004.

VII. CONCLUSIONES GENERALES

El modelo farmacocinético poblacional de MTX a dosis bajas para los pacientes pediátricos con LLA fue bicompartimental y el efecto de los *FPGS*- rs1544105 y rs4451422 no influyó en el modelo final. Sin embargo, el peso fue la única covariable que estadísticamente entró en el modelo final.

Los polimorfismos genéticos *ABCB1* 1236C>T y *ABCC5* 3933+313T>C se encontraron como factores de protección frente a la mielosupresión.

El polimorfismo *FPGS* rs1544105 se relacionó con un incremento de la sobrevida de los pacientes pediátricos con LLA.

VIII. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

Consideramos que esta investigación requiere un mayor tamaño de muestra que permita establecer con mayor certeza las frecuencias genotípicas y alélicas. Además, sería muy importante realizar este mismo estudio en diferentes grupos étnicos en nuestro país y países latinoamericanos.

Además, sería de mucho valor el confirmar los hallazgos realizados de los parámetros farmacocinéticos poblacionales del MTX en un número mayor de niños con más tomas de muestras, en los procesos cinéticos de distribución y eliminación.

Sugerimos también realizar un análisis farmacocinético poblacional asociado con los polimorfismos estudiados en niños en la etapa de consolidación con dosis altas de MTX (superior a 2g/m² infusión intravenosa). Esto proveerá la información necesaria para el monitoreo adecuado del MTX, basado en ajustes de dosis y en el óptimo rescate con ácido folínico.

Validar la técnica analítica de HPLC para cuantificar el MTX en líquido cefalorraquídeo; ya que consideramos que un interesante trabajo a futuro consistirá en evaluar farmacocinética poblacional y la respuesta farmacodinámica por vía intratecal de MTX, considerando las covariables farmacogenéticas.

Continuar con el seguimiento farmacoterapéutico y la farmacovigilancia en un mayor número de pacientes tratados con MTX, para observar la eficacia y seguridad del tratamiento a largo plazo.

Planteamos evaluar más polimorfismos de transportadores, *FPGS*, *TS*, *TPMT*, etc. en estudios futuros que integren el análisis de haplotipos encaminados a mejorar los esquemas posológicos.

Finalmente, sugerimos que este proyecto se maneje en el contexto de la medicina traslacional, cuyo propósito es llevar el beneficio inmediato de los estudios básicos a la cama de los pacientes, fundamentados en una medicina personalizada.

IX. BIBLIOGRAFÍA DE PARTE INTRODUCTORIA

1. Matarama M. Medicina Interna, Diagnóstico y Tratamiento. La Habana: Edicmed; 2005.
2. Mejía-Aranguré J, Flores-Aguilar H, Juárez-Muñoz I, Vázquez-Langle J, Games-Eternod J, Pérez-Saldívar L, et al. Edad de aparición de los diferentes tumores malignos en la infancia. *Rev Med IMSS*. 2005;43(1):25-37.
3. Rodríguez L GO, Mancías C, Pompa T, González G. *Revista de Hematología México*. 2010;11(2):78-81.
4. Tyerney L MS, Papadakis M. Diagnóstico Clínico y Tratamiento. Madrid: Manual Moderno; 2006.
5. Gregory JF, S.D. Bhandari, L.B. Bailey, J.P. Toth, T.G. Baumgartner y J.J. Cerda. Relative bioavailability of deuterium-labelled monoglutamyl and hexaglutamyl folates in human subjects. *Am J Clin Nutr*. 1991(53: 736-740).
6. Pui C-H EW. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Lancet*. 2008;371: 1030–43.
7. King MW. Introducción a las Membranas Biológicas. 2012.
8. Reiter A SM. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. *Blood*. 1996:3122-33.
9. Campbell Myriam FM, Tordecilla Juan, Joannon Pilar, Rizzardini Carlos. Leucemia linfoblástica aguda. Características al diagnóstico de 100 niños. *Revista Chilena de Pediatría*. 2012:70-6.
10. Pui C-H, Relling MV, Downing JR. Acute Lymphoblastic Leukemia- Mechanisms of disease *N Engl J Med*. 2004;350: 1535-48.
11. Arico M VM, Camitta B,. Outcome of treatment in children with. London: *New Eng J Med*; 2000.

12. Philip L. Manuel of Pediatric Hematology and Pediatric. London: Elsevier; 2005.
13. Pizzo PA PD. Principles and Practice of Pediatric Oncology. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.
14. Pui CH RM, Sandlund J et al. Rationale and design of Total Therapy Study XV for newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol.* 2004;83 (suppl 1) S124-126).
15. Pui CH, Pei D, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, et al. Long-term results of St Jude Total Therapy Studies 11, 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2010;24(2):371-82.
16. Maloney KW SJ, Murphy S, Pullen J, Camitta BA. Long-term results of treatment studies for childhood acute lymphoblastic leukemia: Pediatric Oncology Group studies from 1986–1994. *Leukemia.* 2002;14(2): 2276–85.
17. Leone G ea. Therapy related leukemias: susceptibility, prevention. *Leukemia Lymphoma.* 2001;41: 255–76.
18. Mikkelsen Torben S TCF, Yang Jun J, Ulrich Cornelia M, French Deborah, Zaza Gianluigi, Dunnenberger Henry M, Marsh Sharon, McLeod Howard L, Giacomini Kathy, Becker Mara L, Gaedigk Roger, Leeder James Steven, Kager Leo, Relling Mary V, Evans. Phaway Methotrexate Pathway (Brain Cell), *Pharmacokinetics*2011.
19. Larson RA DR, Burns CP, et al. A five-drug remission induction regimen with intensive consolidation for adults with acute lymphoblastic leukemia: cancer and leukemia group B study 8811. *Blood.* 1995;85: 2025–37.
20. O'Brien TA ea. Results of consecutive trials for children ewly diagnosed with acute myeloid leukemia from the Australian and New Zealand Children's Cancer Study Group. *Blood.* 2002;100: 2708–16.

21. Zhao R, Goldman, ID. Resistance to antifolates Oncogene. 2003(22:7431-7457.).
22. Masson E, et al. Accumulation of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts is a determinant of antileukemic effects in vivo. A rationale for high-dose methotrexate. J Clin Invest. 1996(97:73-80.).
23. Plard C BF, Fakhoury M, Zhang D, Yacouben K, Rieutord A, Jacqz-Aigrain E. A limited sampling strategy to estimate individual pharmacokinetic parameters of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. Cancer Chemother Pharmacol. 2007(60:609–620).
24. Australia PSo. Australian Pharmaceutical Formulary and Handbook. Canberra: Sansom, Lloyd; 2012.
25. De Cock RF PC, Krekels EH, Danhof M, Allegaert K, Knibbe CA. The role of population PK-PD modelling in paediatric clinical research. Eur J Clin Pharmacol. 2011(67 Suppl 1:5–16).
26. Mentré F, Lavielle M. Estimation of nonlinear mixed effects model in pharmacokinetics with the SAEM algorithm implemented in MONOLIX2008.
27. Shih C HL, Mendelsohn LG, Chen VJ, Schultz RM. Multiple folate enzyme inhibition: mechanism of a novel pyrrolopyrimidine-based antifolate LY231514(MTA). Adv Enzyme Regul. 1998(38:135–52.).
28. Craig Ch SR. Modern Pharmacology with Clinical Applications. New York: Lippincott; 2008.
29. Pauley JL, Panetta JC, Crews KR, Pei D, Cheng C, McCormick J, et al. Between-course targeting of methotrexate exposure using pharmacokinetically guided dosage adjustments. Cancer chemotherapy and pharmacology. 2013;72(2):369-78.
30. 4to Boletín Informativo. México DF: Cofepris, 2010.

31. Kishi S, Cheng C, French D, Pei D, Das S, Cook EH, et al. Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood*. 2007;109(10):4151-7.
32. Jothi H LA. *Estructure based Drug Discovery*. Dordrecht: Springer; 2007.
33. Muse. G. *A Primer of Genome Science*. London: Sinauer Associates; 2004.
34. de Graaff L, van Schaik R, van Gelder T. A clinical approach to pharmacogenetics. *system*. 2013;5:1.
35. Sanz Sabrafen J BRC, Vives Corrons JL. *Hematología Clínica*. Madrid: Elsevier; 2006.
36. Kremer J. Toward a better understanding of Methotrexate. *Arthritis Rheum*. 2004(50:1370-82).
37. Kremer J. Methotrexate pharmacogenomics. *Ann Rheum Dis*. 2006(65: 1121-3).
38. Comandone A, Passera R, Boglione A, Tagini V, Ferrari S, Cattel L. High dose methotrexate in adult patients with osteosarcoma: Clinical and pharmacokinetic results. *Acta Oncologica*. 2005;44(4):406-11.
39. López MAC. Mucositis por metotrexate. (Spanish). *Revista Mexicana de Reumatología*. 2004;19(6):405-6.
40. UCSC. *Genome Bioinformatics*2009.
41. Tarek A. Leil CE, Araba A. Adjei, Grace K. Dy, Oreste E. Salavaggione, Joel R. Reid,Matthew M. Ames, Alex A. Adjei. Identification and Characterization of Genetic Variation in the Folylpolyglutamate Synthase Gene. *CancerRes*. 2007((67):8772-83).
42. Moran RG WW, Zakrzewski SF. Folate metabolism in mammalian cells in culture.I. Partial characterization of the folate derivatives present in L1210 mouse leukemia cells. *J Biol Chem*. 1976((251) 3569–75.).

43. Zhao R TS, Gao F, Moran RG, Goldman ID. Molecular analysis of murine leukemia cell lines resistant to 5,10-dideazatetrahydrofolate identifies several amino acids critical to the function of folylpolyglutamate synthetase. *J Biol Chem.* 2000(275:26599–606).
44. Liani E RL, Bunni MA, Smith CA, Jansen G, Assaraf YG. Loss of folylpoly-g-glutamate synthetase activity is a dominant mechanism of resistance to polyglutamylation-dependent novel antifolates in multiple human leukemia sublines. *Int J Cancer.* 2003(103:587–99.).
45. Nagy ZB, Csanád M, Tóth K, Börzsönyi B, Demendi C, Rigó Jr J, et al. Current concepts in the genetic diagnostics of rheumatoid arthritis. 2010.
46. Masson E RM, Synold TW , et al. Accumulation of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts is a determinant of antileukemic effects in vivo. A rationale for high-dose methotrexate. *J Clin Invest.* 1996(97:73–80.).
47. Biosystems A. Life Technologies 2013.
48. University. JH. Gene Map Advanced Search. 2012.
49. Scriver Ch BA, Sly W, Valle D. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease Vol II. Kingsport: McGraw-Hill; 1995.
50. Kudo M ST, Ishikawa M, Hirasawa N, Hiratsuka M. Kinetics of 6-thioxanthine metabolism by allelic variants of xanthine oxidase. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2010;25(4):361-6.
51. Massey V KH, Palmer G, Elion G. On the Mechanism of inactivation of Xhantine oxidase by allopurinol and other pyrazol[3,4-d]pyrimidines. *J Biol Chem.* 1970:2837.
52. Schmiegelow K, Nielsen SN, Frandsen TL, Nersting J. Mercaptopurine/Methotrexate Maintenance Therapy of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical Facts and Fiction. *Journal of Pediatric Hematology Oncology.* 2014;36(7):503-17.

53. El-Fadili A RD, Kundig C, Ouellette M. Effect of polyglutamylation of methotrexate on its accumulation and the development of resistance in the protozoan. *Biochem Pharmacol.* 2003(66:999–1008.).
54. Kliemann SE, Waetge RT, Suzuki OT, Passos-Bueno MR, Rosenberg S. Evidence of neuronal migration disorders in Knobloch syndrome: clinical and molecular analysis of two novel families. *American Journal of Medical Genetics Part A.* 2003;119(1):15-9.
55. Owen SA, Hider SL, Martin P, Bruce IN, Barton A, Thomson W. Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics J.* 2013;13:227–34.
56. Juliano RL LV. *Biochim Biophys. Acta.* 1976;455:152-62.
57. Thiebaut F Tt, Hamada et al. N-Acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal on the Absorption of Etoposide in Rats. Beijing: Pro Nat 1987.
58. Holland K HB. Adventures with ABC-proteins: highly conserved ATP-dependent transporters. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2005;52, 309-22.
59. Biotechnology S. Hepatic Barrier 2013.
60. Riordan JR, Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 1989;245, 1066-73.
61. Kartenbeck J, Leuschner, U., Mayer, R., and Keppler, D. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology.* 1995;23, 1061-6.
62. Ayrton A, and Morgan, P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica.* 2001;31, 469-97.
63. Borst P, and Elferink, R.O. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem.* 2002;71, 537-92.

64. Gottesman MM, Fojo,T., and Bates,S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2, 48-58.
65. Wijnholds J, Jansen,G., Peters,G., and Borst,P. The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. *Cancer Res.* 2005;65, 4425-30. .
66. Rundles RW EG. Mercaptopurine “bioavailability”. *N Engl J Med* 1984;310:929.
67. Widemann BC AP. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist.* 2006(11(6):694–703).
68. Widemann BC BF, Kempf-Bielack B, et al. High-dose methotrexate-induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma. *Cancer.* 2004(100(10):2222–32).
69. Jelliffe R. W. SA, Van Guilder M., Liu M., Hu L., Maire P. Individualizing drug dosage regimens: Roles of population pharmacokinetic and dynamic models, bayesian fitting, and Adaptive Control. *Ther Drug Monit.* 1993(15: 380-393.).
70. Calvo MalvarM. BEAJ. Papel de los modelos farmacocinéticos de población. Revisión de Métodos. *Química Clínica.* 2004(23 (6) 417-422).
71. Aumente D BD, Lukas JC, et al. Population pharmacokinetics of high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Clin Pharmacokinet.* 2006(45(12):1227–38.).
72. Barranco Garduño LM, Neri Salvador JC, León Molina H, Carrasco Portugal MdC, Flores Murrieta FJ, Patiño Camacho SI. La farmacocinética poblacional y su importancia en la terapéutica. *Med Int Mex.* 2011;27(4):370-7.
73. Sheiner LB, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics.* 1980;8(6):553-71.

74. Mandema JW, Welling P, Tse F. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics. DRUGS AND THE PHARMACEUTICAL SCIENCES. 1995;67:411-.
75. Rodriguez J. Estudio de la variabilidad poblacional en farmacocinética y farmacodinamia (I). Conceptos generales. Cienc Pharm. 1996;6:96-106.
76. Grasela Jr TH, Sheiner LB. Pharmacostatistical modeling for observational data. Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics. 1991;19(3):25S-36S.
77. Calvo Malvar M, Benítez Estévez AJ. Papel de los modelos farmacocinéticos de población. Revisión de métodos. Química Clínica 2004;23(6):417-22.
78. NONMEM. Development of a population PK model using NONMEM® - Case Study II Multiple oral dose.
79. Delattre M, Lavielle M. Maximum likelihood estimation in discrete mixed hidden Markov models using the SAEM algorithm. Computational Statistics & Data Analysis. 2012;56(6):2073-85.
80. Girard P, Mentré F. A comparison of estimation methods in nonlinear mixed effects models using a blind analysis. PAGE 14Abstr. 2005;834.
81. Brown NJ. Patient-oriented Research in the Era of Personalized Medicine. Clinical and translational science. 2012;5(2):119-20.
82. Auffray C, Chen Z, Hood L. Systems medicine: the future of medical genomics and healthcare. Genome Med. 2009;1(1):2.
83. Chang K-L, Weitzel K, Schmidt S. Pharmacogenetics: Using Genetic Information to Guide Drug Therapy. American Family Physician. 2015;92(7):588-94.

X. AGRADECIMIENTOS

- A Dios, a mi Morenita y Churonita por ser y estar ahí siempre conmigo
- Al CONACYT por haberme brindado su apoyo como becario en estos 48 meses y parte del financiamiento para mi estancia en la Universidad de Salamanca, España.
- A nuestros pequeños pacientes y a sus tutores, que gracias a su espíritu cívico y disposición nos allanaron sin tropiezos este arduo camino científico.
- Al Dr. Ismael Lares Asef, por haber sido un auténtico mentor, amigo, compañero e incluso, una figura paternal; cuya comprensión, paciencia, respaldo, generosidad y enseñanzas, me sirvieron para conseguir este anhelo personal, donde el sentido común indica que se debe investigar para servir.
- Al Dr. Aarón Reyes Espinoza, por haber facilitado nuestro trabajo en la Unidad de Onco-hematología pediátrica del CECAN
- Al Dr. Miguel Ángel Reyes, por todo el apoyo en la coordinación general de este doctorado y por su atención y preocupación permanentes en el seguimiento de mi formación como científico.
- A la Dra. Veónica Loera, por su carisma, generoso sustento logístico y entrega de conocimientos en temas tan complejos de biología molecular y genética médica.
- A la Dra. Martha Sosa Macías, por su aporte oportuno en biología molecular y farmacogenética, lo que me permitió evacuar mis reiteradas dudas.

- Al Dr. Carlos Galavíz Hernández, por facilitarme las instalaciones del laboratorio de biología molecular. Por su incondicional y cordial atención dirigida a mis reiteradas consultas en el campo de biología molecular, PCR, expresión; pues esas opiniones y comentarios tan bien estructurados con altísimo rigor científico me valieron mucho para mi formación científica.
- Al Dr. Horacio Almanza, quien fuera una pieza fundamental en la ampliación del tamaño muestral, en la toma de muestras, captura de información de los pacientes de Baja California.
- A la Lic. Cristina Venzor, por su apoyo en el muestreo de los niños
- A las compañeras de archivo del CECAN: Blanquita, Mirza y Jesús.
- A Blanca Ramírez Mendiola, por su estupendo y oportuno aporte en la cuantificación del MTX en el Instituto Nacional de Pediatría.
- A la Dra. Carole Sautier y Dr. Frank Laville, por renovarnos gratuitamente la licencia del software Monolix.
- Al Dr. Isaías Chairez, por estar siempre atento a mis permanentes consultas y dudas en el manejo estadístico, interpretación de los resultados y por encaminarme correctamente a cómo plasmar los hallazgos en la literatura especializada.
- Al Dr. José Salas Pacheco, por darme la oportunidad de utilizar varios recursos del Instituto de Investigación Científica de la UJED.
- Al Dr. José Bernardo Proal, por su apoyo en gestionar mi estancia en la Universidad de Salamanca (USAL)-España, y por iniciarme en la estructura de papers científicos.

- Al Dr. José Natividad Gurrola, como ex coordinador del doctorado por gestionar la documentación requerida cada vez que se lo solicité.
- A la Dra. María José García Sánchez, por recibirme y darme las bases en monitorización de medicamentos en el Departamento de Tecnología Farmacéutica de la USAL.
- Al Dr. Paulo Teixeira, por su desmedido apoyo y deferencia en el manejo de modelaje de efectos mixtos con NONMEM y PIRANHA, así como en el manejo de Meta análisis y gestores de referencias.
- A los (as) Drs. Samuel Pérez, María Dolores Santos, Hinójal Zazo por su gran apoyo en el laboratorio de tecnología farmacéutica de la USAL.
- A la Dra. Noemí Rebollo, por haberme permitido hacer una inolvidable estancia en el departamento de farmacocinética clínica del Hospital de la Sanidad de Castilla y León, en Salamanca, España.
- Al Dr. Michael Neely del Laboratorio de Farmacocinética Aplicada la University of South California, USC por apoyarnos en el uso de Pmetrics y la licencia de BestDose.
- A la Dra. Anne Nafziger y Carolyn Di-Pietro Arias por la revisión de la traducción inglesa de los manuscritos.
- A la Dra. Aurea Rosa Lima, mi reconocimiento y gratitud a esta experta en MTX; pues su gigantesco aporte tuvo protagonismo en el tercer manuscrito.
- A mis compañeros: Ossy, Marcos, Mirelle, Marcela, Alejo y Saúl por su aprecio, amistad, consejos, cariño y solidaridad.

- A la Maestra Mayra Burciaga por todas las atenciones en el área administrativa y por ser una estupenda guía y consejera.
- A todo el personal de apoyo en CIIDIR-IPN, INP, CECAN.
- A toda mi familia por estar siempre ahí pendientes de mis avances y por revelarme ese aliento a la distancia lleno de amor, comprensión y admiración.
- Quiero agradecer también a este hermoso país y a su gente que nos acogieron como propios y nos hicieron identificarnos también dueños de esta nación y sus raíces, tierra hermosa a la cual llegué venerándola y he terminado amándola como a la mía.
- Finalmente, agradezco nuevamente a Nuestro Creador por tenerme siempre ese el mejor de sus regalos, su amor materializado en la mujer de mi vida, mi esposa y compañera de mil batallas Cris, quien sin pensarlo demasiado, se aventuró y se embarcó conmigo en esta ruta plagada de desafíos y oportunidades, de vicisitudes y aciertos, ilusiones y desilusiones, de desaliento y esperanza; para llegar a obtener no sólo la cima académica sino la más difícil, la calidez humana. Y cómo no ser grato también con mis hijos, quienes en silencio y con cierta dosis de inconsciencia, inocencia y miedo, se solidarizaron con la decisión de sus padres, y llegaron a comprender que las oportunidades se deben aprovechar a pesar de haber experimentado innumerables difíciles momentos de carencia, limitaciones económicas, de soledad y de transitoria desesperanza, nunca nos torcieron el camino señalado al éxito, la paz y la felicidad. Hijos amados, disfrutemos también juntos de este el fruto de nuestro sacrificio.