



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Secretaría de Investigación y Posgrado

**Escuela Nacional De Ciencias
Biológicas**

**Subdirección de Posgrado e
Investigación**

**“Farmacogenética del
metotrexato en pacientes
pediátricos con leucemia
linfoblástica aguda .”**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
maestría en**

Ciencias Quimicobiológicas

PRESENTA:

RAMÍREZ PACHECO ARTURO



Director: Dra. Mónica Moreno Galván.

Director: Dra. Elba Reyes Maldonado



Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación de Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” bajo la dirección de la M. en C. Mónica Moreno Galván y en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN bajo la dirección de la Dra. Elba Reyes Maldonado.

Este proyecto se realizó con el financiamiento obtenido de fondos federales HIM/2008/014.

INDICE GENERAL

Índice de Figuras.....	III
Índice de tablas.....	III
Lista de abreviaturas.....	IV
Resumen.....	V
Abstract.....	VI
I INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
Leucemias.....	2
Clasificación de las leucemias.....	3
Leucemia mieloblastica aguda.....	3
Leucemia mielocítica crónica.....	3
Leucemia linfocítica crónica.....	4
Leucemia linfoblástica aguda.....	4
Fármacos antineoplásicos.....	5
Acido fólico y folatos.....	8
Ciclo del acido ácido fólico.....	9
Metotrexato.....	11
Mecanismo de acción.....	12
Transportadores de membrana.....	13
RFC1 (SLC19A9).....	14
MTHFR.....	16
JUSTIFICACIÓN.....	20
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	21
HIPOTESIS.....	21
OBJETIVOS.....	22
II.-MATERIAL Y METODOS.....	23
Estrategia general.....	23
Tipo de Estudio.....	24
Universo de estudio.....	24
Criterios de inclusión.....	24
Criterios de exclusión.....	24
Obtención de información.....	24
Cuantificación de metotrexato en plasma.....	25
Extracción de DNA.....	25
Genotipificación del gen RFC1.....	25
Genotipificación del gen MTHFR.....	26

Análisis estadístico.....	27
Consideraciones éticas.....	27
Diagrama de flujo.....	28
III.-RESULTADOS.....	29
IV.-DISCUSION.....	36
V.-CONCLUSIÓN.....	39
VI.-ANEXOS.....	40
Apéndice 1.....	40
Apéndice 2.....	41
Apéndice 3.....	42
VII.-BIBLIOGRAFIA.....	44

INDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Mecanismos de acción de los principales grupos de fármacos antineoplásicos.....	7
Figura 2. Estructura química y nomenclatura del ácido fólico.....	8
Figura 3. Versión simplificada del ciclo metabólico del ácido fólico.....	10
Figura 4. Estructura química del metotrexato.....	11
Figura 5. Mecanismo de acción del metotrexato.....	12
Figura 6. Mapa genético del gen RFC1.....	15
Figura 7. Mapa genético del gen MTHFR.....	17
Figura 8: Distribución por intervalos de edad de los pacientes con LLA.....	30
Figura 9: Amplificación del gen RFC1 en 5 muestras de pacientes.....	31
Figura 10: Digestión del producto de PCR del gen RFC1 con la enzima Cfo.....	31
Figura 11: Amplificación del gen MTHFR en 5 muestras de pacientes.....	32
Figura 12: Digestión del producto de PCR del gen MTHFR con Hinf1.....	32

INDICE DE TABLAS:

Tabla1.- Transportadores de membrana y su asociación conocido con fármacos.....	14
Tabla 2.- Secuencias de los iniciadores del gen RFC1.....	26
Tabla 3.- Secuencias de los iniciadores del gen MTHFR.....	27
Tabla 4: Características generales de los pacientes con LLA.....	29
Tabla 5: Frecuencias de los genotipos de RFC1 y MTHFR de los pacientes en estudio.....	33
Tabla 6: Características clínicas y genotipo de RFC1 y MTHFR de los pacientes.....	33
Tabla 7: Asociación del genotipo de RFC1 y MTHFR con recaída.....	34
Tabla 8: Asociación del genotipo de RFC1 y MTHFR con niveles de MTX	34
Tabla 9: Asociación del genotipo de RFC1 y MTHFR con mucositis.....	35

Lista de abreviaturas.:

ABC: Del inglés ATP-binding cassette
DNA: Acido desoxirribonucleico
DHF: Dihidrofolato
DFHR: Dihidrofolato Reductasa
d TMF: dioxitimidil monofosfato
d UMF: dioxiuridil monofosfato
FPIA: Inmunoensayo por polarización de fluorescencia
LLA: Leucemia linfoblástica aguda.
LLC: Leucemia linfocítica crónica.
LMA: Leucemia mieloblástica aguda
LMC: Leucemia mieloblástica crónica
MTHF: Metiltetrahydrofolato
MTHFR: Metilentetrahydrofolato reductasa
MTX: Metotrexato
THF: Tetrahydrofolato
pb: pares de bases
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
RFC: Del inglés Reduced folate carrier.
RFLP: Fragmentos polimorficos de longitud variable
SAM: S-adenosil metionina
SNC: Sistema nervioso central

RESUMEN:

Antecedentes: El Metotrexato (MTX) es un componente clave de los regímenes de quimioterapia usado en el tratamiento de niños con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Resistencia y toxicidad, puede dificultar la eficacia del tratamiento. La enzima Metilentetrahidrofolato Reductasa (*MTHFR*) tiene un gran impacto sobre la regulación del ciclo del ácido fólico, cataliza la conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato (metilen-THF) a 5-metil-THF. El polimorfismo C677T ha sido demostrado que reduce la actividad enzimática y fue asociado con Resistencia a MTX en LLA. RFC1 es el principal transportador de folatos al interior de la célula. El polimorfismo G80A del gen RFC1 ha sido reportado que pacientes con la variante A80 tienen un mal pronóstico.

Nosotros investigamos si el polimorfismo del transportador de folatos reducido (RFC1) G80A o de la metiltetrahidrofolato reducido (MTHFR) C677T están asociados con niveles de MTX en plasma y el resultado de pacientes pediátricos con LLA.

Métodos. DNA genómico de 81 niños (1-19 años de edad) fue genotipificado identificando polimorfismos MTHFR C677T y RFC1 G80A. Los datos clínicos fueron recabados retrospectivamente. La asociación entre los polimorfismos y los niveles de MTX en plasma, mucositis y recaída fueron estudiados por regresión logística múltiple.

Resultados. No se observó asociación significativa entre genotipos MTHFR C677T, RFC1 G80A y los niveles de metotrexato en plasma y recaída. Pacientes con genotipo RFC1 GA y RFC1 AA fueron asociados con “protección” para el desarrollo de mucositis (RM=0.23, IC_{95%} =0.056-0.98) y (RM=0.15, IC_{95%}= 0.029-0.77) respectivamente. Pacientes con genotipo MTHFR CC tienen un incremento en el riesgo a desarrollar mucositis (OR=6.66, CI_{95%}=1.29-34.25).

Conclusión: Este estudio sugiere que el polimorfismo MTHFR C677T y RFC1 G80A pueden servir como predictores de toxicidad en pacientes pediátricos con LLA.

Abstract

Background. Methotrexate (MTX) is a key compound of chemotherapeutic regimens used in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL). Resistance and toxicity, may hamper the efficacy of this treatment. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) has a major impact on the regulation of the folic acid pathway due to conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate (methylene-THF) to 5-methyl- THF. The C677T polymorphism have been show to reduce anzyme activity and were associated with MTX resistance in ALL. RFC1 a major route for the transport of folates in cells. The RFC1 G80A polymorphisms have been reported that patients with the A80 variant had a worse outcome.

We investigated whether reduced folate carrier 1 (*RFC1*) G80A or methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T polymorphisms were associated with MTX plasma levels and childhood ALL outcome.

Methods. Genomic DNA of 81 children (1-19 years old) was genotyped to identify polymorphisms at *MTHFR* C677T and *RFC1* G80A. The clinical records were reviewed retrospectively. Association between MTX plasma levels, mucositis and relapse and polymorphisms were studied by multiple logistic regression

Results. No significant associations between genotypes *MTHFR* C677T, *RFC1* G80A and methotrexate plasma levels and relapse were observed. Patients with *RFC1* GA and *RFC1* AA were associated with “protection” to develop mucositis (OR=0.23, CI_{95%} =0.056-0.98) and (OR=0.15, CI_{95%}= 0.029-0.77) respectively. Patients with *MTHFR* CC genotype had an increased risk to develop mucositis (OR=6.66, CI_{95%}=1.29-34.25).

Conclusion. This study suggest that *MTHFR* C677T and *RFC1* G80A polymorphisms may serve as predictors of toxicity.

FARMACOGÉNÉTICA DEL METROTEXATO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.

INTRODUCCIÓN:

La quimioterapia es uno de los tratamientos contra el cáncer, sin embargo, sólo una proporción de pacientes responden favorablemente. Tanto la eficacia del medicamento como sus efectos secundarios varían entre pacientes, es por ello que la variabilidad genética ha tomado un lugar importante en la investigación clínica, pues ésta nos da las bases moleculares que pueden afectar la absorción, resistencia y toxicidad de un fármaco.

El metotrexato (MTX) es un antimetabolito, análogo del ácido fólico, que se utiliza para la consolidación y mantenimiento de la terapia de pacientes con leucemia linfoblástica aguda, el cáncer más frecuente en la población pediátrica, sin embargo, algunos pacientes desarrollan resistencia y/o efectos secundarios al fármaco. Los mecanismos de resistencia incluyen disminución del transporte de la droga, alteraciones estructurales en la dihidrofolato reductasa y disminución de la poliglutamización del MTX.

El principal transportador del MTX a la célula, es el transportador de membrana RFC1 cuya variabilidad genética ha sido estudiada en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), donde se sugiere su uso como posible biomarcador de resistencia, susceptibilidad y toxicidad del MTX. Su principal polimorfismo es el cambio de un solo nucleótido 80G>A en el exón 2, esta substitución produce un cambio de aminoácido de arginina por histidina en el codón 27. Este cambio se ha asociado con altos niveles de MTX en plasma y eventos adversos del fármaco en pacientes con LLA, siendo los pacientes con genotipo RFC1 "AA" los que presentan mayores niveles de MTX y peor pronóstico, que aquellos con el genotipo RFC1 "GG". En el presente estudio analizaremos las variantes alélicas del RFC1 en niños mexicanos con LLA y su asociación con los niveles de MTX en plasma y estado clínico.

ANTECEDENTES

LEUCEMIAS

La leucemia es una enfermedad maligna, progresiva, producida por la proliferación desordenada de una célula de origen hematopoyético a nivel de médula ósea. Estas células proliferan y reemplazan a los elementos normales en todas las regiones de la médula, invaden el tejido linfoide (ganglios) y la sangre periférica pudiendo así llegar a todos los tejidos. Dependiendo de su agresividad y del grado de diferenciación de las células neoplásicas, la leucemia se clasifica en dos tipos principales, aguda y crónica.¹

Las leucemias agudas se caracterizan por una acumulación de células inmaduras en médula ósea, predominantemente blastos. Suele ser de inicio súbito y el curso de la enfermedad es corto, de no lograrse una remisión, el paciente fallece a los pocos meses después del diagnóstico. Los síntomas varían según el tipo de leucemia, pero dentro de ellos pueden ser mencionados la astenia, anorexia, pérdida de peso, fiebre, dolores osteoarticulares, hepatomegalia y esplenomegalia.²

En las leucemias crónicas la médula ósea presenta acumulación de células maduras³, las cuales entran a la circulación produciendo una leucocitosis. Las leucemias crónicas son por lo general de iniciación gradual y si no se produce una remisión el paciente sobrevive más de un año después del comienzo de los síntomas.² Los pacientes con leucemia crónica pueden permanecer durante años sin síntomas aparentes. Sin embargo, en otros casos se puede notar fatiga, pérdida de peso, e inflamación de los ganglios o del bazo. Cuando la enfermedad se activa, progresa rápidamente y la persona puede presentar fatiga, anorexia, pesadez bajo las costillas del lado izquierdo, transpiración anormal o sudores nocturnos, anemia, fiebre y hemorragias; este tipo de leucemia a menudo causa la muerte.

Existen varios agentes predisponentes que aumentan la probabilidad de que una leucemia se desarrolle, tales como: radiaciones ionizantes, sustancias

químicas derivadas del benceno o medicamentos citotóxicos, algunas enfermedades hereditarias (síndrome de Bloom, anemia de Fanconi, síndrome de Down, anemia de Diamond-Blackfan, síndrome de Kostmann, etc.). En todas estas causas se producen daños al DNA, como mutaciones y/o translocaciones que pueden alterar genes primordiales para la regulación del crecimiento celular⁴.

Clasificación de las Leucemias.

Las leucemias se clasifican de acuerdo a su evolución clínica y con la línea celular afectada, así se reconocen 4 tipos de leucemias⁵:

- a) Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA)
- b) Leucemia Mielocítica Crónica o Granulocítica Crónica (LMC o LGC)
- c) Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)
- d) Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA)

Es una enfermedad caracterizada por la proliferación de linfocitos inmaduros (mieloblastos, promielocitos, eritroblastos, monoblastos, megacarioblastos, según el caso) que reemplazan a las células sanguíneas normales con la consecuente anemia, neutropenia y trombocitopenia. De acuerdo al linaje, se reconocen 8 subtipos de la enfermedad que van desde la M0 hasta M7^{3,6}.

Leucemia Mielocítica Crónica (LMC)

La LMC es producida por el crecimiento rápido de las células mieloides precursoras, tanto en la médula ósea como en la sangre periférica y tejidos del cuerpo. Esta enfermedad presenta 3 etapas: fase inicial o crónica, que puede

durar meses o años durante los cuales se pueden o no presentar síntomas, los pacientes progresan a la fase acelerada donde las células leucémicas crecen más rápidamente, esta etapa precede a la aparición de la fase terminal o crisis blástica que marca la muerte del paciente.^{5, 7,8,9}

Leucemias Linfocítica Crónica (LLC)

La leucemia linfocítica crónica se caracteriza por un lento y progresivo aumento del número de linfocitos maduros en la médula ósea y en los ganglios linfáticos, posteriormente invaden la sangre periférica donde alcanzan un número muy elevado y finalmente se infiltran en los diversos órganos causando inmunosupresión de la médula ósea.^{6,10}

Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

En la LLA, las células linfoblásticas pierden su capacidad para madurar y especializarse en su función. Estas células se multiplican rápidamente y reemplazan las células normales. La persona se vuelve susceptible al sangrado e infección dado que las células sanguíneas normales se reducen en número (11). De acuerdo a las características morfológicas de los linfoblastos leucémicos, se reconocen 3 variantes de la enfermedad que van desde la L1 hasta L3^{3,6} (Apéndice 1).

Esta enfermedad representa el 80 % de las leucemias agudas pediátricas, con una incidencia máxima entre los 3 y los 7 años de edad. En adultos, representa el 20 % de las leucemias en esta población.¹

Las características clínicas principales son fatiga, palidez, aparición de púrpura petequial, dolores óseos o artralgias, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia, granulocitopenia absoluta e hipereosinofilia.¹ En la LLA, las células anormales se pueden acumular en el sistema nervioso central provocando dolores de cabeza y vómitos.¹¹ La mayoría de los casos parecen no tener una causa aparente; sin embargo, se cree que la radiación, algunos componentes químicos como el benceno, contribuyen a la inducción de la leucemia.^{1,6} La enfermedad también puede ser causada por alteraciones cromosómicas y/o

daños genéticos adquiridos (no heredados) en el DNA de las células en desarrollo dentro de la médula ósea, dando como resultado el crecimiento incontrolado y la acumulación de células llamadas "*blastos leucémicos*", que no funcionan como las células sanguíneas normales y el bloqueo de la producción de células normales en la médula, lo que resulta en una pancitopenia.^{6,11}

Los fármacos más utilizados en la fase de inducción, para tratamiento de la LLA son: prednisona, la vincristina, un antracíclico como daunorrubicina, o dexorrubicina y la L-asparginasa, con ellos se puede obtener una remisión hasta del 92%. En la fase de consolidación se usan medicamentos como Ara-C, 6-Mercaptopurina y ciclofosfamida, lo que mejora la duración media de la remisión a 23 meses y una sobrevida del 30%. El mantenimiento convencional con 6-mercaptopurina y MTX, en comparación con el mantenimiento reforzado, no ha mostrado diferencias significativas en la sobrevida libre de enfermedad a 5 años. La profilaxis en Sistema Nervioso Central (SNC) es necesaria ya que reduce las recaídas a menos de 5% y de no llevarse a cabo, éstas se reportan en un 21 a 50%. Se utilizan 15 mg de MTX intratecal a dosis total, más 4 mg de dexametasona intratecal a dosis total, 2 veces por semana.

El trasplante de médula ósea en la LLA queda reservado después de la segunda remisión, o en primera remisión en aquellos pacientes con citogenética de alto riesgo como es la translocación t(9;22).⁷

FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

La era moderna de la quimioterapia del cáncer comenzó después de la segunda guerra mundial con la introducción de las mostazas nitrogenadas, agentes alquilantes, aminopterina y un antagonista de los folatos. Estos compuestos produjeron remisiones notables en pacientes con linfoma y en niños con leucemia linfoblástica aguda. Desafortunadamente no se obtuvieron curaciones debido al rápido desarrollo de resistencia a los fármacos, un

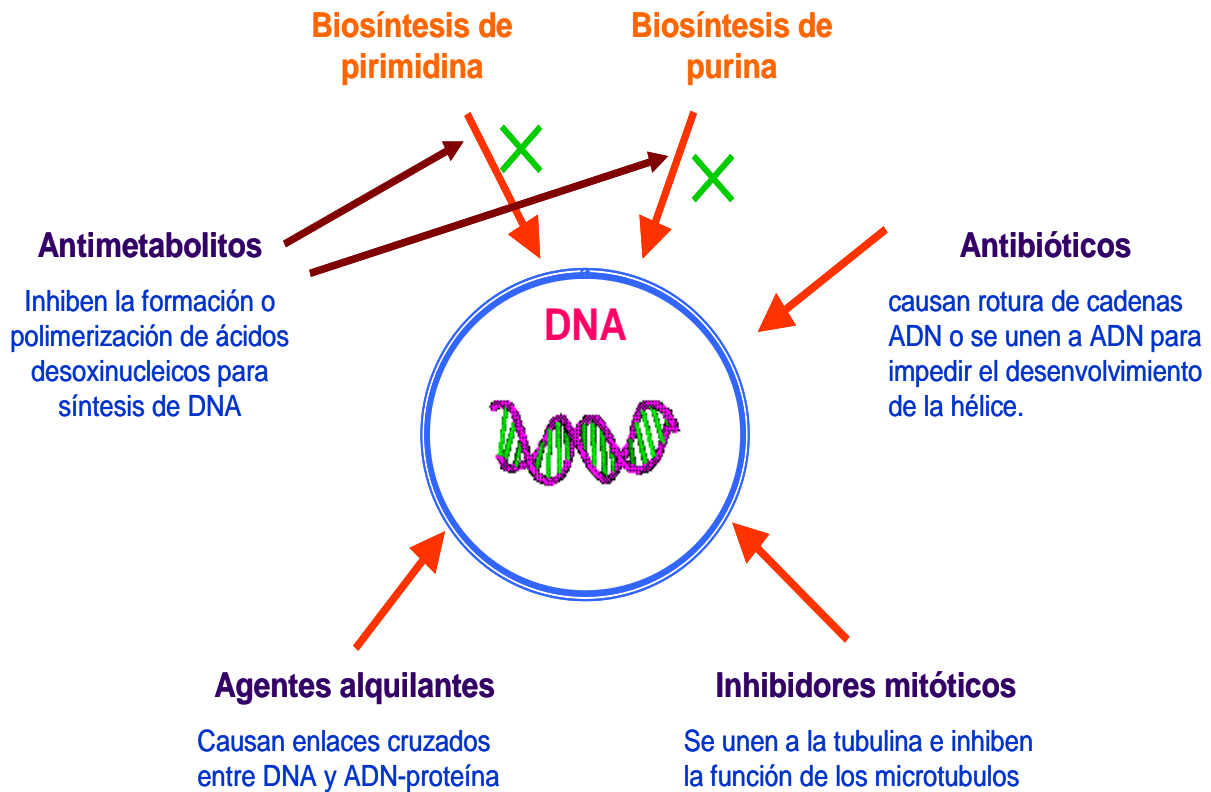
problema que se ha observado con la introducción de nuevos fármacos en la práctica clínica ^{12,13}.

Los métodos básicos para el tratamiento del cáncer se encuentran en cambio constante. Los agentes descubiertos, en los primeros 20 años de quimioterapia oncológica (1950-1970), interactuaban en gran medida con DNA o sus precursores, e inhibían la síntesis de nuevo material genético o causaban daño irreparable en el propio DNA. Dentro de los agentes quimioterapéuticos de enfermedades neoplásicas se encuentran los antimetabolitos y dentro de estos, los análogos del ácido fólico, como lo es el MTX; este fármaco inhibe la respuesta inmune celular y se ha utilizado como inmunosupresor, por ejemplo, en el trasplante alógeno de médula ósea y de órganos ^{12,13}.

Los fármacos antineoplásicos se clasifican con base en la fase del ciclo celular donde actúan, como:

- Independientes del ciclo: si afectan las células en cualquier fase del ciclo, incluidas las que se encuentran en reposo;
- Dependientes del ciclo: si solo afectan células en ciclos activos en el momento de exponerse al fármaco.
- Dependientes de fase: si actúan principalmente sobre células en una etapa específica del ciclo.

Un medio más útil de clasificar estos fármacos es con base en su mecanismo de acción y su origen. Se pueden designar 4 clases de antineoplásicos los cuales son: antimetabolitos, antibióticos, agentes alquilantes e inhibidores mitóticos ^{12,13}. (Figura 1).



Tomado de Harold Kalant 2002

Figura 1. Mecanismos de acción de los principales grupos de fármacos antineoplásicos. Se mencionan los fármacos antineoplásicos y donde actúan cada uno de ellos. (Tomado de Principios de Farmacología médica, Harold Kalant)¹³

Los antimetabolitos son fármacos sintéticos que actúan como inhibidores de vías bioquímicas fundamentales en la formación de DNA, que dan como resultado la formación de DNA anormal. Estos agentes tienden a ser dependientes del ciclo celular. Puesto que afectan células en división rápida, la toxicidad más común se observa en la mucosa gastrointestinal (diarrea) y medula ósea (neutropenia y trombocitopenia)^{12,13,14}.

ÁCIDO FÓLICO Y FOLATOS

Folato es un término que se ha utilizado de forma genérica para denominar a los compuestos derivados del ácido fólico (o ácido pteroilmonoglutámico) que exhiben la actividad biológica del ácido fólico. Los folatos son un grupo de compuestos heterocíclicos basados en el esqueleto del ácido 4-(pteridin-6-metil amino) benzoico conjugado con uno o más residuos de ácido L-glutámico (Figura 2)^{13,15}.

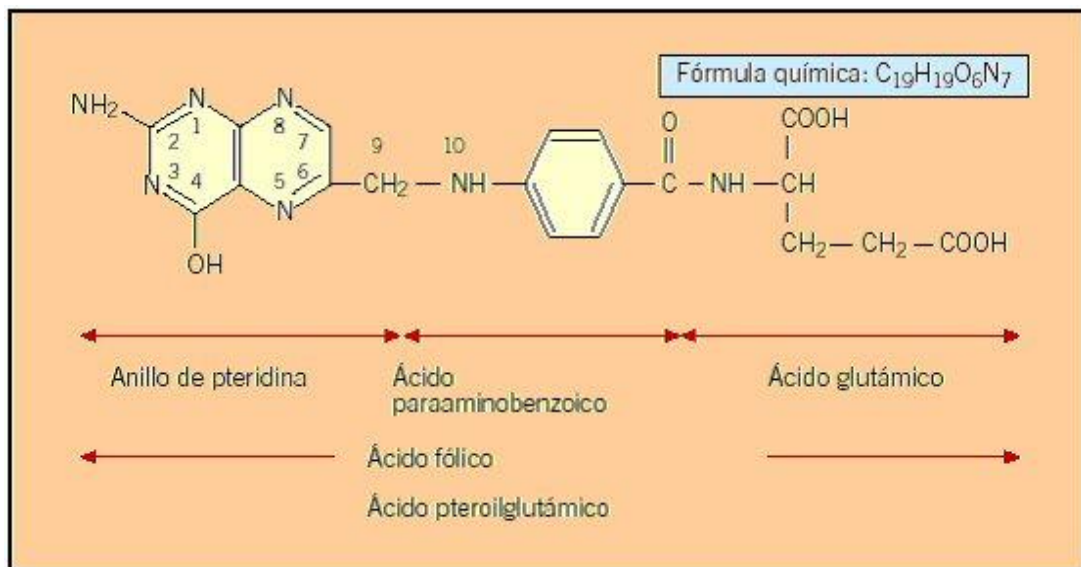


Figura 2: Estructura química del ácido fólico. El ácido fólico se forma a partir de 3 grupos distintos: Un anillo de **pteridina** heterocíclico bicíclico, la 6-metilpterina, el **ácido p-aminobenzoico** (PABA), y el **ácido glutámico** Tomado de Mathews 1998. (15).

Los folatos naturales comprenden una amplia familia de mono- y poliglutamatos (generalmente 5-7 residuos glutamil) de ácido pterico, los cuales exhiben cualitativamente la actividad del ácido fólico. El anillo de pteridina es reducido para dar el 7,8-dihidrofolato y por consiguiente 5,6,7,8-

tetrahidrofolato. Estas formas reducidas pueden ser sustituidas con una unión covalente a un-carbono unido al nitrógeno por las posiciones 5 o 10, o una unión puente entre estas dos posiciones. La unión de los residuos glutamato se realiza a través de una unión γ -péptido.¹⁶

El ácido fólico no posee actividad coenzimática, pero sí su forma reducida, el ácido tetrahidrofólico, representado frecuentemente como FH₄. Actúa como transportador intermediario de grupos formilo, necesarios en la síntesis de purinas, primordiales en la síntesis de DNA durante la fase S del ciclo celular, y por lo tanto para la división celular.¹⁶

CICLO DEL ÁCIDO FÓLICO

El metabolismo del ácido fólico tiene la finalidad de lograr niveles adecuados de metilación del DNA, necesario para el proceso de morfogénesis. En la figura 3 se muestra un esquema general del metabolismo del ácido fólico, reflejando 3 procesos importantes: la formación de tetrahidrofolato (THF), formación de pirimidinas y metilación de DNA. El ciclo incluye la internalización del folato a la célula mediante los receptores RCF y hFR, el cual es doblemente reducido para formar THF. Esta cascada de reacciones garantiza que se donen grupos metilo, imprescindibles para la metilación de la homocisteína, con la ayuda del cofactor B12, y logra la formación de la metionina y de la S adenosil metionina (SAM), la mayor proteína donante de metilo intracelular.¹⁶ Por otra parte, en la síntesis de DNA, con la conversión del dioxiuridil monofosfato (d UMF) en dioxitimidil monofosfato (dTMF), se logran niveles elevados de dihidrofolato, que se incorpora al ciclo, transformándose en tetrahidrofolato (Figura 3)^{16,17}.

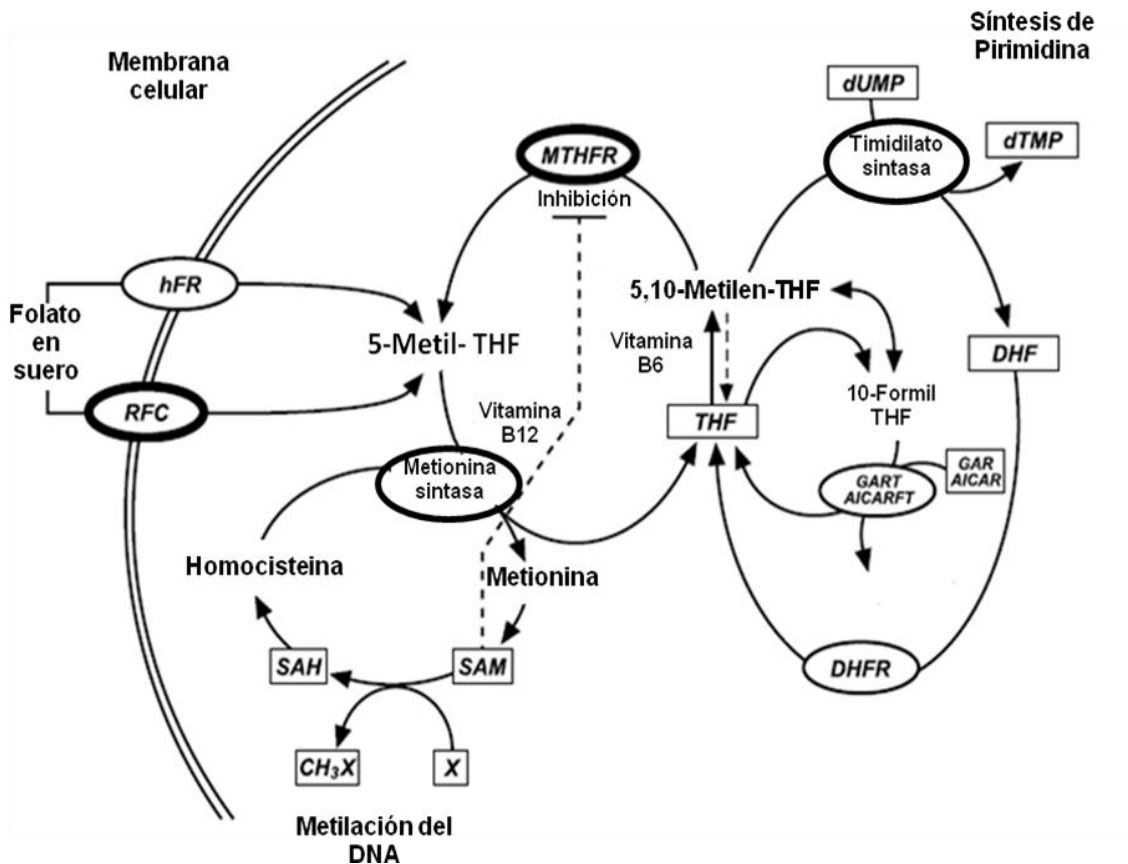


Figura 3: Versión simplificada del ciclo metabólico del ácido fólico. El folato es internalizado a la célula mediante los receptores RFC y hFR. Este, se reduce a tetrahidrofolato (THF). El 5,10-metilen THF, mediante la enzima MTHFR, (metiltetrahidrofolato reductasa), se transforma en 5 metil THF, y esta a su vez, mediante la enzima metionina sintasa, da lugar al THF. El THF se transforma a 5.10-metilen THF por la participación de la vitamina B6. Adicionalmente, el 5,10-metilen THF, actúa como sustrato de la enzima timidilato sintasa para la formación de DHF (dihidrofolato) y DHFR (dihidrofolato reductasa) y de nuevo a THF. En la síntesis de pirimidinas, la timidilato sintasa actúa sobre dUMP (deoxiuridin monofosfato) para formar dTMP (deoxitimidin monofosfato). Durante el paso de 5-metilen THF a THF se libera metionina que se transforma a SAM (S-adenosilmetionina) como sustrato para la metilación de DNA, este paso libera SAH (S-adenosilhomocisteína) para su transformación a homocisteína, sustrato para la metionina sintasa, que también libera metionina.
 Tomado de Ulrich 2005(17).

METOTREXATO (MTX)

El MTX (ácido 4-amino-N¹⁰-metilpteroilglutámico) es un antimetabolito, análogo del ácido fólico. Es un inhibidor reversible de la dihidrofolato reductasa, enzima necesaria para la conversión del ácido fólico a su forma activa, el tetrahidrofolato. Este último compuesto sirve como donador de un fragmento de carbono para la síntesis de la timidina *in vivo*. De esta forma el MTX actúa como un potente inhibidor de la síntesis del DNA. Se clasifica como un agente específico de fase, ya que elimina células durante la fase S del ciclo celular y tiene su mayor eficacia cuando inicia la fase logarítmica de su proliferación. Los efectos tóxicos del MTX no pueden ser revertidos ni siquiera con dosis altas de ácido fólico. Sin embargo, el ácido folínico (factor leucovorin), que es el análogo del tetrahidrofolato, puede inhibir el bloqueo enzimático si se administra en las primeras 48 horas después de dar MTX .^{13,18,19}

EL MTX contiene un anillo timidilato, un ácido para-aminobenzoico y un ácido glutámico, su estructura es muy similar a la del ácido fólico. En la figura 4 se muestra su estructura.

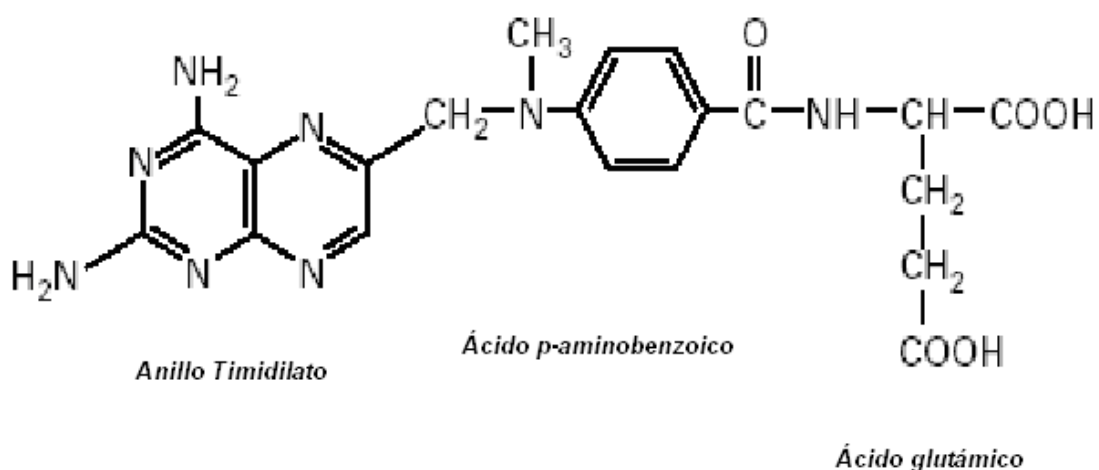


Fig. 4: Estructura química del metotrexato

Mecanismo de acción

El ingreso del MTX a la célula es mediado vía receptor de folatos y por el transportador de membrana RFC (del inglés reduced folate carrier).^{13,19,20} Cuando está en el interior de la célula es poliglutamizado por la enzima poliglutamato sintasa¹⁶, tanto el MTX como el MTX poliglutamizado inhiben a la enzima dihidrofolato reductasa, evitando así la formación del tetrahidrofolato. Al eliminar el tetrahidrofolato se inhibe la formación de purinas y en consecuencia la síntesis de DNA (Fig.5).⁷

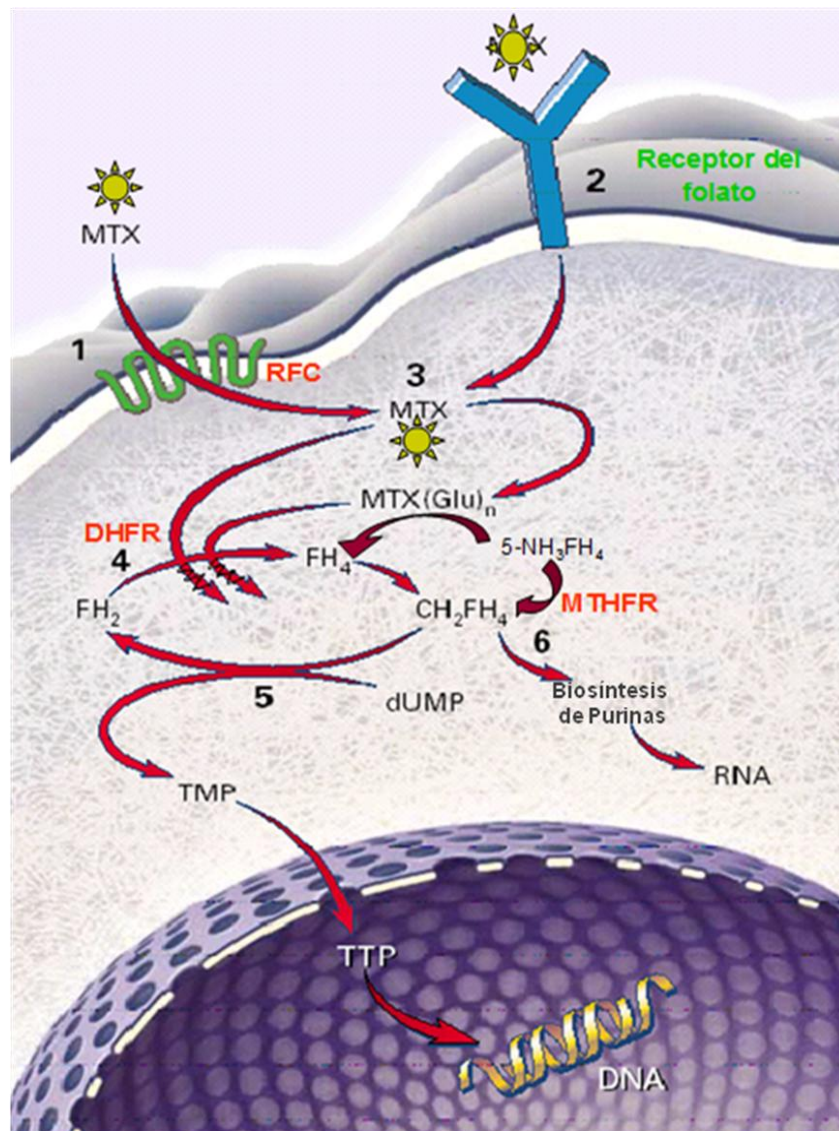


Fig. 5: Mecanismo de acción del Metrotexato. TMP timidinmonofosfato; dUMP desoxiuridinmonofosfato; FH₂ dihidrofolato; FH₄ tetrahidrofolato; TTP timidintrifosfato; RFC proteína acarreadora de folato, DHFR dihidrofolato reductasa; MTHFR metil tetrahidrofolato reductasa Tomado de Gorlick 2007(21) ..

TRANSPORTADORES DE MEMBRANA

Los transportadores de membrana son proteínas que se expresan en diferentes tejidos del cuerpo como hígado, cerebro y pulmón entre otros. Su función fisiológica es la absorción de nutrientes, sin embargo, se ha reportado que tienen afinidad por algunos fármacos, es por ello que se les considera como un factor importante en el metabolismo, disponibilidad y toxicidad de dichos fármacos. Los transportadores de membrana también están directamente relacionados con la quimiosensibilidad y resistencia de las células carcinogénicas.^{22,23}

Existen dos superfamilias de proteínas transportadoras de membrana, éstas son: 1) los transportadores ABC (del inglés ATP-binding cassette) y 2) los transportadores de solutos (SLC). Los transportadores ABC están asociados con la disminución de la acumulación del fármaco y desarrollo de resistencia de las células tumorales.²⁴ Los SLC incluyen a los transportadores de folatos, nucleósidos y aminoácidos.

Los SLC están asociados con el incremento de la quimiosensibilidad por la introducción a la célula de fármacos hidrofílicos. La quimiosensibilidad también se ve afectada por efectos indirectos, como la entrada de nutrientes a la célula por la modulación de los gradientes electroquímicos a través de la membrana, modificando así las vías de apoptosis o la eficiencia de la difusión del fármaco dentro de las células.²³ En la tabla 1 se muestra un ejemplo de los principales transportadores de membrana que se han asociado con la respuesta a fármacos anticancerígenos.

Tabla1. Transportadores de membrana y su asociación conocida con fármacos.

GEN	NOMBRE COMÚN	LOCALIZACIÓN	SUSTRATOS
<u>Transportadores ABC</u>			
ABCA2	ABCA2	Cerebro	Estramustina, mitoxantrone.
ABCA3	ABC3	Pulmón, Hígado Cerebro	Doxorubicina
ABCB1	Pgp/MDR1	Hígado, Intestino, Riñón, Cerebro, Placenta	Antracíclicas, taxanos, alcaloides, imatinib, etopósido
ABCB4	MDR2/MDR3	Piel	Paclitaxel, vinblastine
<u>Transportadores SLC</u>			
SLC19A1	RFC1	Ubicuo	N ⁵ -metiltetrahidrofolato, metotrexato
SLC19A3 SLC28	THTR2 Transportador de nucleosido concentrado	Ubicuo	Tiamina, doxorubicina
SLC28A1	CNT1	Hígado, Riñón, Intestino	Nucleosidos, Ara C, 5- fluorouridina

RFC1 (SLC19A1)

El RFC1 es un transportador de membrana con alta afinidad para los folatos reducidos y el fármaco antifolato MTX, es el primer transportador SLC reportado que es capaz de transportar y mediar resistencia al MTX.²⁴

El RFC1 se encarga de introducir el 5-metil-tetrahidrofolato al interior de la célula. En tumores resistentes al MTX se ha visto una disminución de la expresión del RFC1, la cual se ha atribuido a las variables genéticas de esta proteína que afectan la función de factores de transcripción y metilación del promotor.^{25,26,27} Estos cambios, alterarían la entrada del fármaco a la célula y por lo tanto su viabilidad y eficacia terapéutica.^{26,28} A la fecha se han reportado varias mutaciones en el RFC1 en líneas celulares carcinogénicas que *in vitro* se han hecho resistentes a los antifolatos, sin embargo, estas mutaciones no se han detectado en células de tumores primarios de pacientes.^{29,30,31}

El gen que codifica para el RFC1 se encuentra localizado en el cromosoma 21q22.3 (Fig. 6). Su principal polimorfismo reportado es el cambio de un solo nucleótido 80G>A en el exón 2, esta sustitución produce un cambio de aminoácido de arginina por histidina en el codón 27, este cambio se ha asociado con los niveles de folato en plasma, siendo más altos en aquellos individuos con el genotipo “80AA”, que en aquellos con 80GG.³²

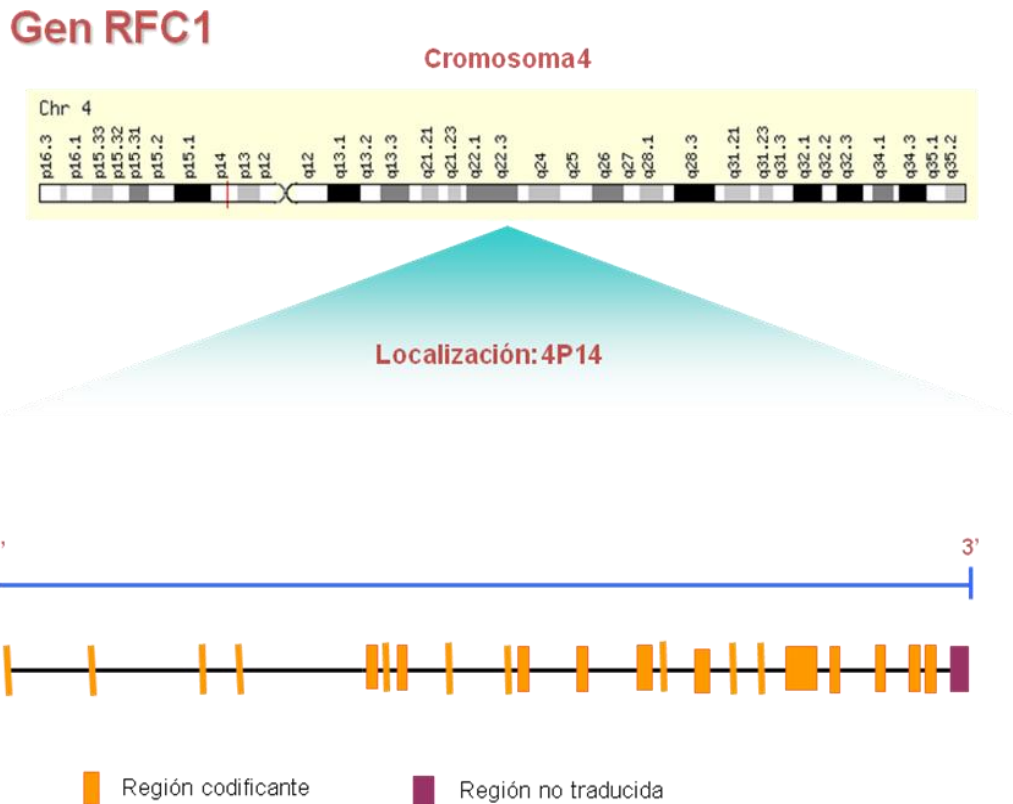


Figura 6. Mapa genético del gen RFC1. El gen RFC1 está localizado en la región 14 del brazo corto del cromosoma 4, está integrado por 21 exones con intrones de longitud variable Tomado de Laverdiere 2002(32).

Este mismo polimorfismo y su asociación con la farmacocinética del MTX se ha estudiado en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda, donde se ha demostrado que aquellos pacientes con el genotipo “AA” tenían niveles más altos de MTX en plasma y un peor pronóstico, que aquellos con el genotipo “GG” lo que sugiere que existe una alteración que no permite actuar al fármaco

y por ende, disminuye la eficacia terapéutica.³³ Por otro lado, se encontró que los pacientes (de población japonesa) tratados con dosis altas de MTX (3 g/m²) y con genotipo RFC1 GG, tuvieron mayor cantidad de eventos adversos al fármaco (mayor número de vómitos) que aquellos con genotipo RFC1 AA, sugiriendo una posible contribución del polimorfismo de RFC1 en la respuesta interindividual hacia el MTX.³⁴

Kanger et al. estudiaron de la habilidad de las células leucémicas para acumular MTX poliglutamizado como un importante determinante de los efectos antileucemia de MTX, midieron la acumulación de MTX poliglutamizado en células leucémicas de 101 niños con leucemia linfoblástica aguda de linaje B y linaje T, encontrando una baja expresión del RFC (proteína acarreadora de folatos), una baja expresión del FPGS (poliglutamato sintasa la cual cataliza la formación de MTX poliglutamato) en el linaje T y una alta acumulación de MTX poliglutamato en ambos subtipos de LLA, esta información revela distintos mecanismos participantes en la acumulación de MTX poliglutamizado y las posibles causas de fallo en el tratamiento de la LLA con MTX^{34,35}.

MTHFR (Metilentetrahidrofolato Reductasa)

La MTHFR es la enzima encargada de proveer los grupos metilo a la célula, cataliza la conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato en 5-metiltetrahidrofolato (5-MTF), que es la forma circulante predominante del folato. El 5-MTF participa en la remetilación de la homocisteína, proceso dependiente de vitamina B12, donando un grupo metilo para la síntesis de metionina, reacción catalizada por la enzima metionina sintasa, la cual utiliza vitamina B12 como cofactor. La metionina es metabolizada por la enzima metionina adenosiltransferasa a S-adenosil metionina (SAM), la cual actúa como donador universal de grupos metilo en humanos por medio de la enzima metil transferasa, en procesos de metilación de DNA, proteínas, neurotransmisores y fosfolípidos. El producto de esta reacción genera S-adenosil homocisteína, que es metabolizada por la enzima adenosilhomocisteinasa, que elimina adenosina y forma homocisteína.

La MTHFR tiene un papel paralelo, importante ya que el 5-MTF participa en la producción de dTMP vía timidilato sintasa y síntesis de purina, por lo tanto, juega un papel importante en la provisión de nucleótidos esenciales para la síntesis de DNA.^{35,36}

El gen que codifica para la enzima MTHFR está localizado en el cromosoma 1p36.3 y contiene 11 exones los cuales tienen una extensión variable de entre 102 a 432 pares de bases y 10 intrones Fig. 7.

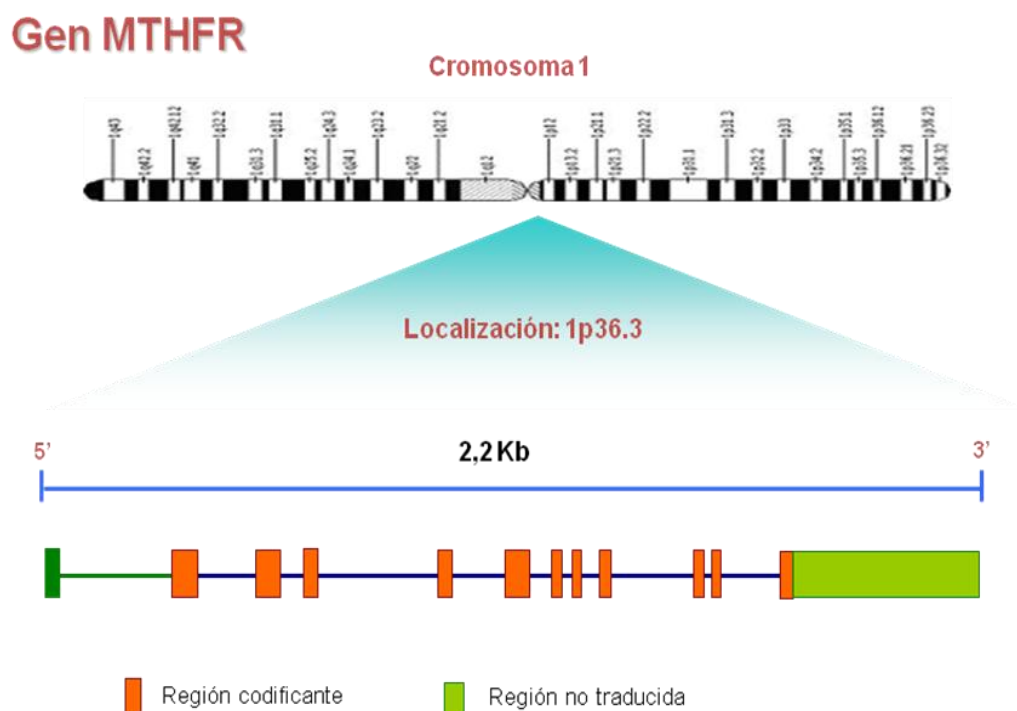


Figura 7. Mapa genético del gen MTHFR. El gen MTHFR está localizado en la región 36.3 del brazo corto del cromosoma 1, esta integrado por 11 exones e intrones de longitud variable ^{Tomado de Botto 2000 (37).}

La variabilidad de la MTHFR se ha asociado con aumento de toxicidad en pacientes con LLA; un ejemplo de ello es el estudio de Chiusolo y col. Donde encontraron que el genotipo TT del gen MTHFR (677T) estaba asociado con un incremento en la toxicidad del MTX en medula ósea, hígado y mucosas en pacientes italianos con LLA ³⁸.

La homocigocidad para el alelo MTHFR “TT” C677T, resulta en una disminución de su actividad en 70% , en comparación con sujetos no homocigotos para este polimorfismo, con un aumento en los niveles de homocisteína en el caso de ingesta baja de ácido fólico. Otro polimorfismo en el gen *MTHFR* es la transición A1298C, la cual en la enzima, resulta en la sustitución de glutamato por alanina en el aminoácido 429, dentro del dominio regulatorio de la MTHFR. Se ha reportado que la homocigocidad del alelo A1298C (mutado) induce una disminución en la actividad enzimática. De acuerdo con algunos estudios, los individuos heterocigotos para los alelos C677T y A1298C, los cuales presentan un genotipo C677T/A1298C, tienen una reducción en la actividad *in vitro* de la MTHFR de 40 a 50% y un perfil bioquímico similar al observado en individuos con homocigocidad para el alelo C677T, con incremento en los niveles de homocisteína y disminución de los niveles de folato.^{36,37,38,39}

A la fecha, además de los dos polimorfismos ya descritos, los cuales disminuyen la actividad enzimática, se han identificado más de 20 mutaciones en el gen *MTHFR*, que causan deficiencia enzimática severa. Algunos otros cambios descritos son poco frecuentes y sólo están presentes en algunas familias con un cuadro clínico que incluye: retardo psicomotor, debilidad muscular proximal, marcha inestable, patología vascular (trombosis vascular) y homocistinuria.^{37,38}

La prevalencia del polimorfismo varía dependiendo de la población estudiada. Se ha encontrado una mayor frecuencia en población italiana (44 a 47%), en hispanos de Atlanta y California (41.1 y 42%), así como en población de Francia y Japón (36 y 34%, respectivamente)³⁹.

Shimasaki y col. 2006 investigó si dosis altas de MTX induce toxicidad diferente acorde a la presencia del polimorfismo del gen *MTHFR* y *RFC1*, en pacientes pediátricos japoneses con leucemia linfoblástica aguda tratados con altas dosis de MTX, encontrando que la toxicidad hematológica fue más frecuente, apareciendo en el 87% de los pacientes, no encontraron diferencias

significativas con el desarrollo de otros tipos de toxicidad o en las concentraciones de MTX en plasma para los diferentes polimorfismos encontrados del gen MTHFR y RFC1. Este estudio no sugiere que el polimorfismo del gen RFC1 pudiera contribuir a la variabilidad interindividual en respuesta a dosis altas de MTX.³³

Es un hecho que la variabilidad entre individuos es una de las causas principales que afectan la eficacia de la terapia en pacientes con cáncer, es por ello que en el presente estudio analizamos las variantes alélicas del RFC1, MTHFR y su asociación con los niveles de MTX en plasma y características clínicas de pacientes pediátricos con LLA. Los resultados obtenidos serán de utilidad para sentar las bases para futuros estudios de farmacogenética y terapia individualizada en México.

JUSTIFICACION:

El MTX es un fármaco utilizado para la consolidación y mantenimiento de la terapia de pacientes con leucemia linfoblástica aguda, el cáncer más frecuente en la población pediátrica, sin embargo algunos pacientes desarrollan resistencia y/o efectos secundarios al fármaco.

La resistencia al MTX es una causa importante en la falla del tratamiento, los mecanismos de resistencia incluyen disminución del transporte de la droga, alteraciones estructurales en la metilentetrahidrofolato reductasa y disminución de la poliglutamización del MTX.

Dos puntos principales relacionados con la resistencia al MTX son la enzima MTHFR y el transportador RFC1. La MTHFR es una enzima clave en el metabolismo de los folatos y homocisteína, proporcionando los sustratos necesarios para la metilación del DNA. Presenta un polimorfismo en el alelo C677T, se caracteriza por una mutación puntual en la posición 677 del exón 4 del gen, que consiste en una transición de una citosina (C) por timina (T). Esta mutación determina la sustitución del aminoácido alanina por valina en el dominio catalítico de la enzima, asociado con una disminución de 50% de la actividad enzimática y aumento de la toxicidad hepática. El transportador de membrana RFC1 es el principal transportador del MTX a la célula, cuya función es reconocida como un blanco frecuente de resistencia a antifolatos. En líneas celulares con resistencia a los antifolatos y en pacientes con linfoblastos, se encontraron alteraciones genéticas del RFC1 que afectaban sus propiedades de transporte. Su principal polimorfismo se encuentra en la posición 80 que reemplaza G por A, lo que representa un cambio de His por Arg en la posición 27 de la proteína del RFC1. La variante "G" se correlacionó con bajos niveles de folato en plasma y altos niveles de homocisteína en personas sanas. En pacientes con LLA se ha asociado con los niveles de MTX en plasma y eventos adversos del fármaco; siendo los pacientes con genotipo RFC1 "AA" los que presentan niveles mayores de MTX y peor pronóstico.

La investigación en los transportadores de membrana es un área novedosa con grandes posibilidades de desarrollo. Los estudios reportados hasta ahora son principalmente en líneas celulares y en pacientes adultos. En la población infantil existen muy pocos estudios y han sido realizados en población canadiense y japonesa, donde no se tienen resultados concluyentes, pues además de la diferencia étnica entre estos, el número de pacientes estudiados difiere enormemente (de 200 a 15 pacientes por estudio). El análisis de RFC y MTHFR es de gran importancia debido a que estos aspectos son primordiales en el metabolismo del MTX. El presente proyecto es el primero en realizarse en población mexicana, los resultados serán la base fundamental para desarrollar futuros proyectos de investigación en farmacogenética y terapia individualizada.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

Basándose en el hecho de que la variabilidad entre individuos es una de las causas principales que afectan la eficacia de la terapia en pacientes con cáncer ¿Es posible obtener una variable del gen MTHFR y RFC1 que indique cierta susceptibilidad a desarrollar eventos adversos del MTX en pacientes pediátricos con LLA?

HIPÓTESIS:

Si el polimorfismo en el gen RFC1 modifica la respuesta al MTX en pacientes con LLA, entonces aquellos pacientes con genotipo RFC1 (80 AA) , tendrán mayor probabilidad de presentar un aumento de la concentración de MTX en plasma y peor pronóstico, en comparación con aquellos con el genotipo GA y GG.

Si el polimorfismo en el gen MTHFR modifica la respuesta al MTX en pacientes con LLA, entonces aquellos pacientes con genotipo *MTHFR* (677 TT), tendrán mayor probabilidad de presentar un aumento de la concentración de MTX en plasma y peor pronóstico, en comparación con los genotipos CT y CC.

OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar la asociación entre el polimorfismo G80A del *RFC1* y el gen C677T del *MTHFR* con los niveles del MTX en plasma y el estado clínico de pacientes pediátricos con LLA.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Identificar el genotipo del gen *RFC1*, presente en pacientes con LLA
- Identificar el genotipo del gen *MTHFR* presente en pacientes con LLA.
- Analizar la relación del genotipo *RFC1* y *MTHFR* con la concentración de MTX en plasma, y el estado clínico del paciente (Toxicidad).

II MATERIAL Y MÉTODOS:

Estrategia general:

Se obtuvieron muestras de pacientes pediátricos diagnosticados con LLA del Hospital Infantil de México Federico Gómez de Agosto de 2007 a Mayo de 2009, que cumplieran con los criterios de inclusión. A cada paciente que acepto participar, previa firma de consentimiento informado por el padre o tutor del niño, se le trató de forma habitual de acuerdo a las guías clínicas del diagnóstico del departamento de Oncología del HIM Federico Gómez. Se les tomaron 2 mL de sangre para la determinación del genotipo. Esta toma se puede realizar en cualquier momento del tratamiento y no altera el mismo.

Después de obtener las muestras de sangre periférica se realizó la extracción de DNA por medio de un método en columna utilizando un Kit de extracción marca Qiagen, una vez obtenido el DNA éste se almacenó a -20°C.

Por otro lado se realizó la estandarización del PCR-RFLP del gen RFC1 y MTHFR, realizando curvas de concentración de MgCl₂ y de temperatura de alineación, una vez obtenidas las condiciones óptimas de amplificación se realizó el PCR de cada gen con cada una de las muestras de DNA. Posteriormente se estandarizó la digestión del amplificado realizando curvas de concentración de enzima y una vez obtenidas las condiciones óptimas se digirió el PCR de cada una de las muestras.

La determinación de los niveles plasmáticos de MTX se realizaron a las 42 hrs después de la administración del fármaco. La medición de la concentración de metotrexato en plasma se obtuvo por FPIA (Inmunoensayo por polarización de fluorescencia), los datos de las pruebas de función hepática antes y después de la infusión con metotrexato se obtuvieron a partir de la revisión de expedientes clínicos. Para analizar la relación del genotipo con concentración de metotrexato, pruebas de función hepática, mucositis y recaída. Se realizó el análisis mediante regresión logística, utilizando el programa SPSS versión 15.

Tipo de Estudio:

El presente, es un estudio de corte piloto, retrospectivo. Los niveles de MTX se analizaron en forma retrospectiva.

Universo de estudio:

En México no existe una frecuencia reportada del genotipo de RCF1 y MTHFR, por lo que el presente es un estudio donde se analizaron 81 pacientes pediátricos con LLA del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", obtenidos desde mayo de 2007 a mayo del 2009. Esto nos dará un estimado de las frecuencias alélicas que servirán para estudios posteriores.

Criterios de Inclusión:

Los pacientes pediátricos con LLA.

Que den su consentimiento para participar en el estudio.

Que no tengan ninguna otra enfermedad genética u oncológica.

Criterios de exclusión:

Quienes voluntariamente deseen salir del protocolo de estudio.

Pacientes que abandonaron el tratamiento.

Defunción del paciente antes de concluir las determinaciones programadas.

Obtención de Información:

Para la obtención de información de cada paciente se realizó una revisión de expediente para recabar datos generales, información clínica que incluyen datos de recaída, mucositis, etc., la aplicación del MTX.

A cada paciente se le realizo pruebas de laboratorio que incluyen:

- Pruebas de función hepática: transaminasas, bilirrubina indirecta, bilirrubina directa y bilirrubina total. Éstas se realizaron antes y después de la administración del fármaco
- Determinación de niveles de metotrexato a las 42 h después de la infusión con el fármaco.

Cuantificación del MTX:

La medición del MTX en plasma se realizó 42 h después de iniciada la infusión del fármaco.

La cuantificación se realizó por FPIA (Inmunoensayo por Polarización de Fluorescencia) en el equipo "TDx" de acuerdo al manual de procedimientos del laboratorio central del HIM "Federico Gómez".

Extracción de DNA:

Para la obtención de DNA se utilizaron 2 mL de sangre periférica. El DNA se obtuvo por el método de columna de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial (Quiagen, QIAamp DNA blood, midi kit) Ver apéndice 2.

Genotipificación del gen *RFC1* :

Para la estandarización del PCR se realizaron curvas de concentración de $MgCl_2$ a 1 mM, 1.5 mM, 2 mM y 2.5mM. y se probaron varias temperaturas de alineamiento para determinar las condiciones optimas de amplificación para el gen estudiado.

La identificación de los alelos del gen *RFC1* se realizó por PCR-RFLP de la siguiente manera:

El DNA genómico se amplificó en un volumen de 50 μ L de mezcla de PCR, con 0.2 μ M de cada iniciador (tabla 2), 2.5 mM de dNTP's, regulador 1X (20 mM Tris-HCl, 2 mM $MgSO_4$) y 1U de Taq DNA polimerasa (marca New England). El ciclaje obtenido fue el siguiente: 94 °C por 3 min inicial, y a 94 °C por 55 seg, 56°C por 55 seg, 72°C por 80 seg por 30 ciclos y 72 °C por 7 min. El producto

de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Tabla 2: Secuencias de los iniciadores empleados para la amplificación de gen RFC1.

GEN	Secuencia	Posición	Producto de Amplificación (pb)
<i>RFC1 A</i>	5' AGTGTCACCTTCGTCCC 3'	51 a 70	230 pb
<i>RFC1 B</i>	3' TCCCGCGTGAAGTTCTTG 5'	263 a 280	

Después de la amplificación, el producto del PCR se digirió en un volumen de 20 µL de reacción y 10 µL del producto de PCR, con 1.5 U de enzima de restricción Cfol a 37°C por 4 horas, y el producto de la digestión se visualizó en un gel de agarosa al 2%.

Genotipificación del gen *MTHFR*

Para la estandarización del PCR se realizaron curvas de concentración de MgCl₂ a 1 mM, 1.5 mM, 2 mM y 2.5mM. y se probaron varias temperaturas de alineamiento para determinar las condiciones óptimas de amplificación para el gen estudiado.

La identificación de alelos del gen *MTHFR* se realizó por PCR-RFLP de la siguiente manera:

El DNA genómico se amplificó en un volumen de 50 µL de mezcla de PCR, con 0.2 µM de cada iniciador (tabla 3), 2.5 mM de dNTP's, regulador 1X (20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄) y 1U de Taq DNA polimerasa (marca New England). El ciclaje obtenido fue el siguiente: 93°C por 5 min. inicial, y 30 ciclos a 93°C por 60 seg., 58°C por 60 seg, 72°C por 60 seg. y final 72 °C por 7 min. El producto de PCR fue analizado en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Tabla 3: Secuencias de los iniciadores empleados para la amplificación de gen MTHFR.

GEN	Secuencia	Producto de Amplificación (pb)
<i>MTHFR A</i>	5' TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA 3'	198 pb
<i>MTHFR B</i>	3' AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG 5'	

Después de la amplificación el producto del PCR se digirió en un volumen de 20 µL de reacción y 10 µL del producto de PCR, con 1.5 U de enzima de restricción Hinf I a 37°C por 4 horas, y el producto de la digestión se visualizó en un gel de agarosa al 2%.

Análisis Estadístico:

Para analizar si existía relación entre los niveles de MTX y características clínicas de los pacientes con LLA con los diferentes genotipos de RFC1 y MTHFR, se realizó usando regresión logística considerando estadísticamente significativo una $p < 0.05$. Se realizó el análisis estadístico utilizando el programa SPSS versión 15.

Consideraciones éticas:

Este estudio se realizó de conformidad con los principios que establece la 18^a Asamblea Médica Mundial y todas las modificaciones aplicables establecidas por las Asambleas Médicas Mundiales y los lineamientos ICH para la Buena Práctica Clínica (GCP). Es un estudio de riesgo mínimo.

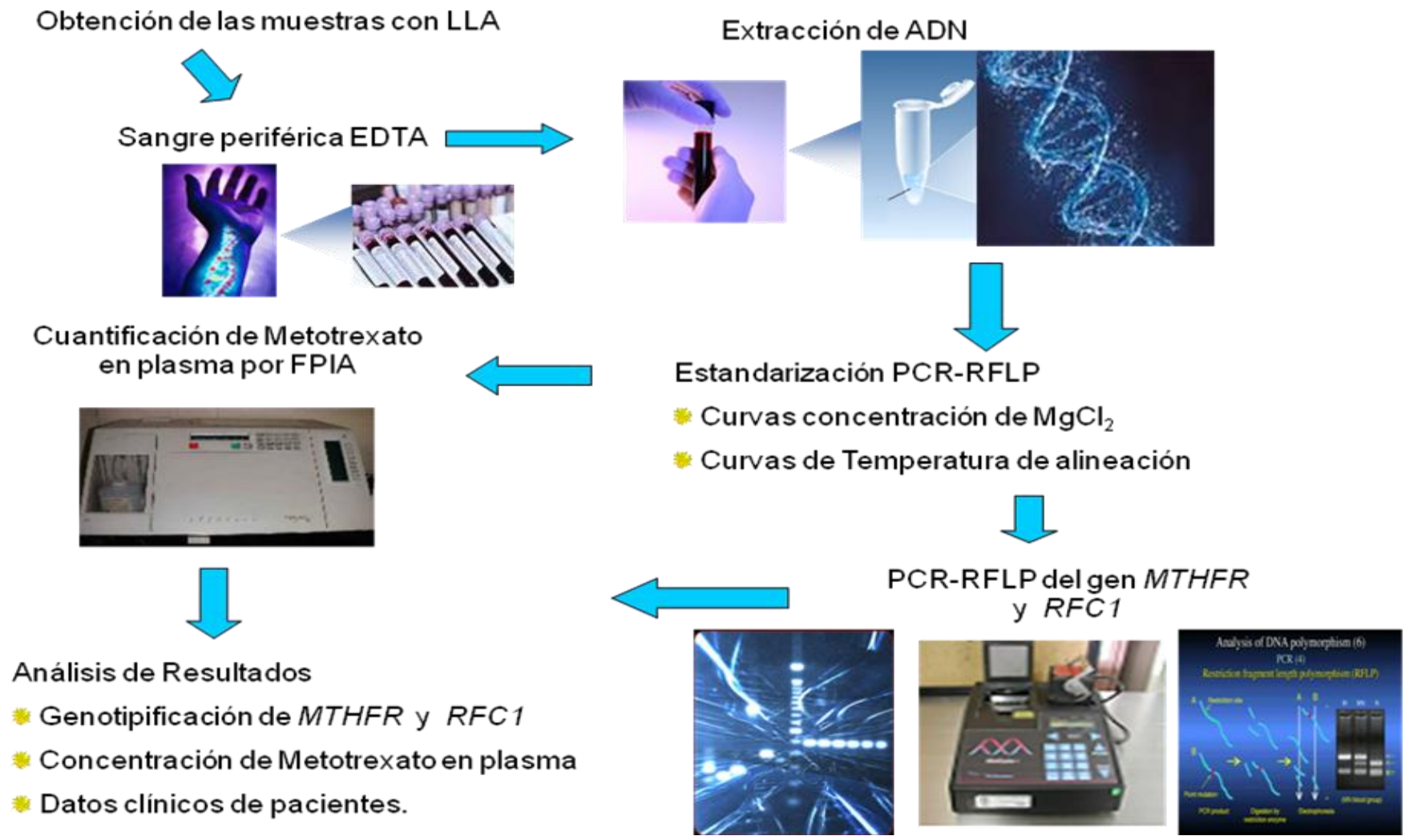


Diagrama de flujo

III.-RESULTADOS:

En el presente estudio se analizaron 81 pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda, de los cuales 39 (48.1 %) fueron mujeres y 42 hombres (51.9 %). La edad media fue de 7.9 años (rango de 1 a 19 años) (Tabla 4). La mayor proporción de los pacientes se encontró entre 2 meses y 10 años de edad (Figura 8). El 43 % de los pacientes fueron diagnosticados como LLA L1, el 56 % como LLA L2 y el 1 % como LLA L3 (Tabla 4).

Tabla 4. Características generales de los pacientes en estudio.

CARACTERÍSTICAS		
EDAD		
Media	7.9 años	
Mínima	1	
Máxima	19	
	N	%
SEXO		
Mujeres	39	48.1
Hombres	42	51.9
DIAGNÓSTICO		
LLA1	35	43
LLA2	45	56
LLA3	1	1
NIVELES DE MTX		
>1	53	65
<1	28	35
RECAÍDA		
con recaída	16	19.8
sin recaída	65	80.2
MUCOSITIS		
con mucositis	15	18.5
sin mucositis	66	81.5

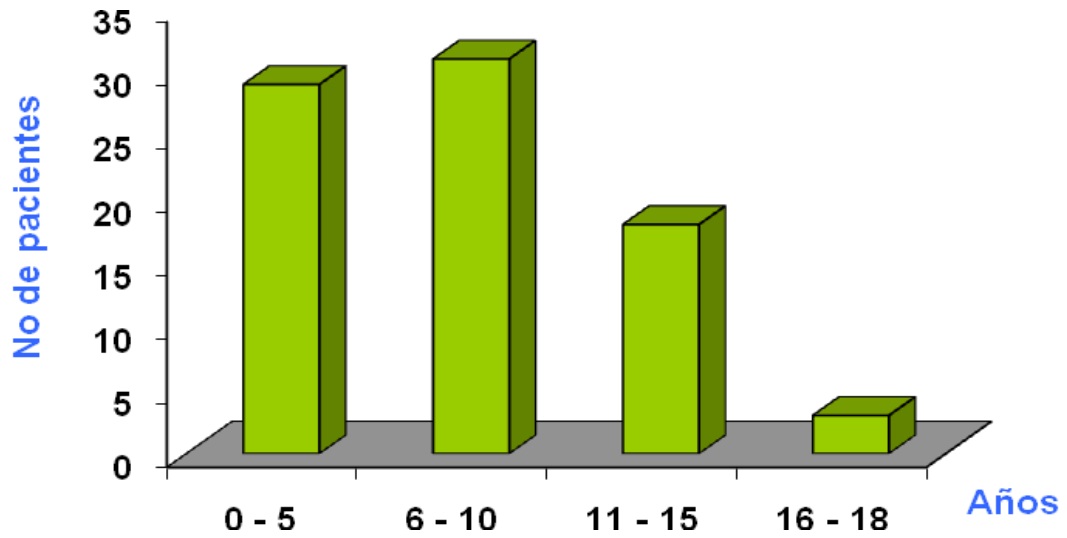


Figura 8: Distribución por los intervalos de edad de los pacientes con LLA.

Se obtuvieron los productos del PCR de RFC1 y MTHFR para cada paciente. En la figura 9 se muestra el producto del PCR (230 pb) del gen RFC1 de 5 pacientes.

De la digestión con la enzima CfoI, se obtuvieron los patrones de bandeo de acuerdo al genotipo del paciente, para el gen RFC1 GG corresponden tres bandas, de 125, 68 y 37 pb; para el RFC1 GA, dos bandas de 162 y 68 pb; y para RFC1 AA, una banda de 230 pb (Figura 10).

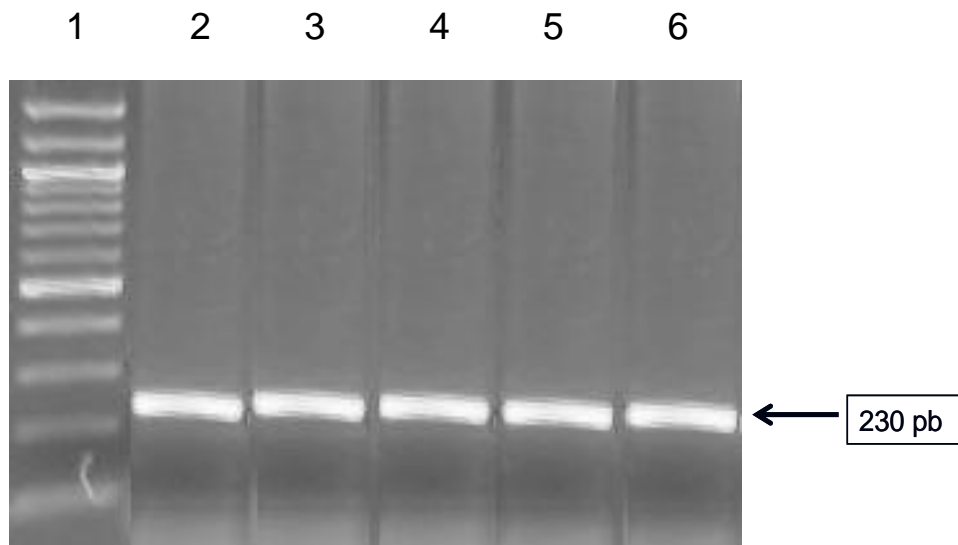


Figura 9. Amplificación del gen RFC1. Imagen de un gel de agarosa al 2 % en el cual se observa el producto de PCR del gen RFC1 (230 pb). Línea 1: Marcador de peso molecular de 100 pb, línea 2-6: Muestras de pacientes.

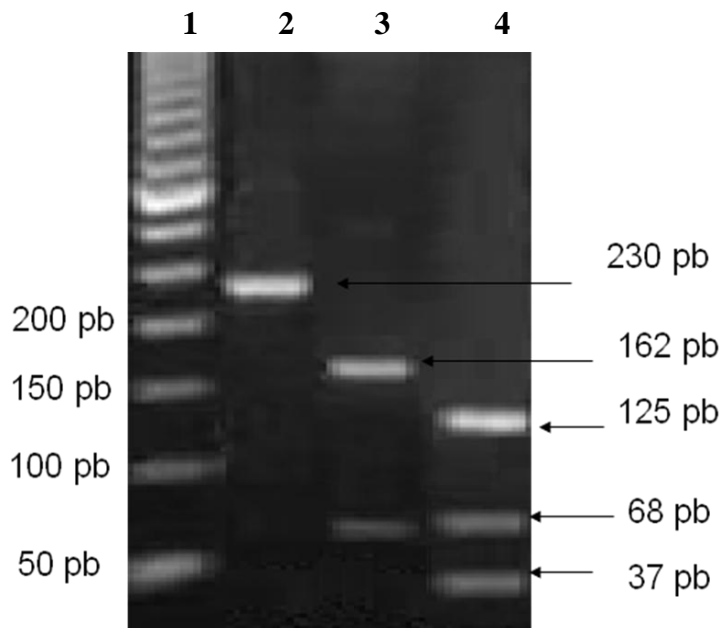


Figura 10. Digestión del PCR del gen RFC1 con la enzima Cfo. Imagen de un gel de agarosa al 2 % en el cual se observa la digestión del PCR del gen RFC1. Línea 1: Marcador de peso molecular de 50 pb, línea 2: Fragmento de 230 pb correspondientes al genotipo AA, línea 3: Fragmentos de 230 y 68 pb, correspondientes al genotipo GA, línea 4: Fragmentos de 125, 68 y 37 pb correspondientes al genotipo GG.

En la figura 11 se muestra un ejemplo del producto del PCR (198 pb) del gen MTHFR de 3 pacientes. De la digestión con la enzima HinfI, se obtuvieron los patrones de bandeado que de acuerdo al genotipo del paciente, para el MTHFR CC fue una banda de 198pb; para el MTHFR CT dos bandas de 198 y 175pb y para el MTHFR TT una banda de 175pb (Figura 12).

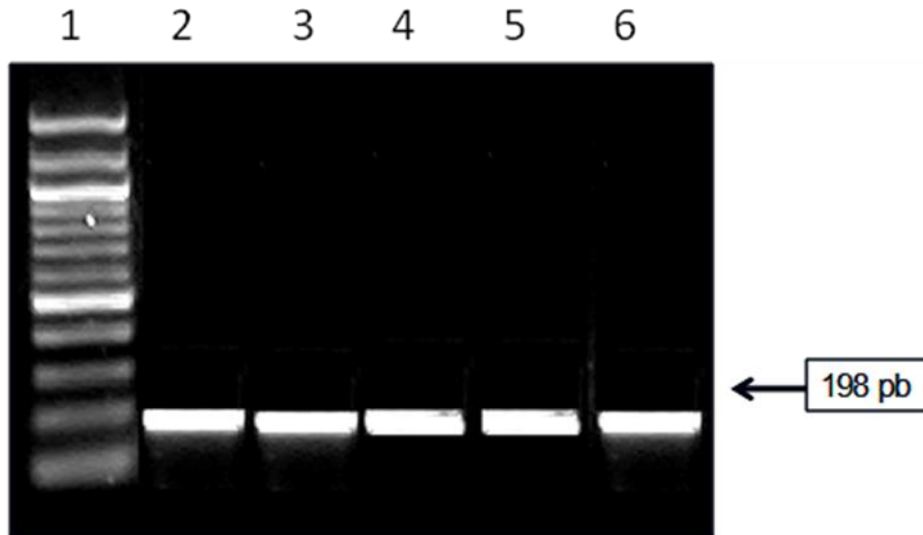


Figura 11: Amplificación del gen MTHFR en 5 muestras de pacientes con LLA. Imagen de un gel de agarosa al 2 % en el cual se observa el producto de PCR del gen MTHFR (198 pb). Línea 1: Marcador de peso molecular de 100 pb, línea 2-6: Muestras de pacientes.

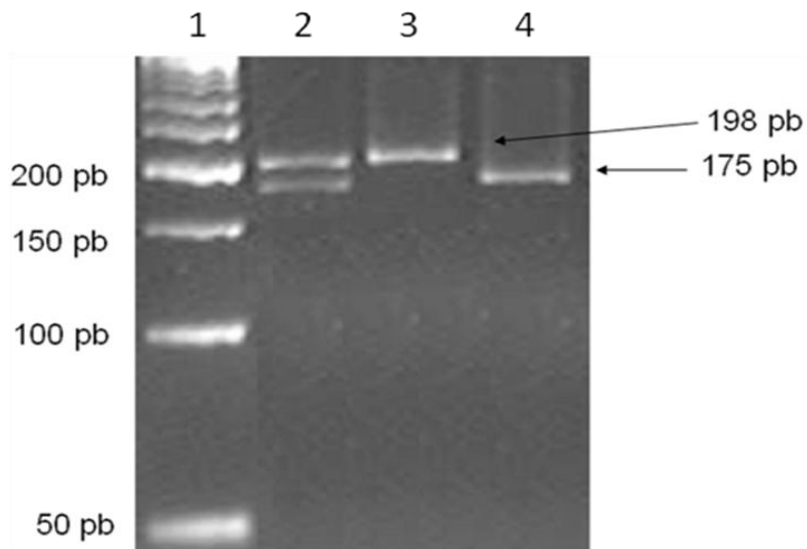


Figura 12: Digestión del producto del PCR del gen MTHFR con la enzima HinfI. Imagen de un gel de agarosa al 2 % en el cual se observa la digestión del PCR del gen MTHFR. Línea 1: Marcador de peso molecular de 50 pb, línea 2: fragmentos de 198pb y 175pb correspondientes al genotipo CT, línea 3: fragmento de 198 pb correspondiente al genotipo CC, línea 4: fragmento de 175 pb correspondiente al genotipo TT.

Tabla 5. Frecuencia de los genotipos de RFC1 y MTHFR de los pacientes estudiados.

Genotipo	n	%
RFC1		
GG	29	36
GA	51	1
AA	1	63
MTHFR		
CC	28	34.6
CT	27	33.3
TT	26	32.1

La mayor frecuencia del polimorfismo del gen RCF1 fue de 58 % para RFC1 GA, seguida de RFC1 GG con un 33% y para RFC1 AA el 1% . Para el gen MTHFR se encontró una frecuencia del genotipo MTHFR CC del 34.7%, para MTHFR CT del 33.3% y finalmente, MTHFR TT del 32.1% (Tabla 5).

En la tabla 6, se muestra de manera general la frecuencia de las características clínicas distribuidas de acuerdo a los genotipos.

Tabla 6: Características clínicas y genotipo de RFC1 y MTHFR de los pacientes.

Genotipo	RFC1			MTHFR		
	AA	GA	GG	CC	CT	TT
Recaída	0	10	6	7	5	4
Sin recaída	1	41	23	21	22	22
Mucositis	0	9	6	10	3	2
No mucositis	1	42	23	18	24	24
↑ Niveles de MTX en plasma	0	19	8	7	11	9
↓ Niveles de MTX en plasma	1	32	20	20	16	17

No encontramos asociación entre los genotipos de RFC1 y MTHFR con la recaída (Tabla 7). De igual manera, no se encontró asociación significativa entre genotipo y niveles de MTX (Tabla 8).

Tabla 7. Asociación del genotipo de RFC1 y MTHFR con recaída.

Genotipo	Recaída	Sin recaída	RM (IC _{95%})	p
RFC1				
GG	6	23	1.0	
GA	10	41	1.4 (0.38-5.12)	p= 0.61
AA	0	1	1.83 (0.46-7.18)	p= 0.38
MTHFR				
CC	7	21	0.54 (0.13-2.13)	p=0.38
CT	5	22	0.80 (0.18-3.38)	p=0.76
TT	4	22	1.0	

Tabla 8. Asociación del genotipo de RFC1 y MTHFR con niveles altos y de MTX.

	Niveles altos de MTX.	Niveles bajos de MTX.	RM (IC _{95%})	p
RFC1				
GG	8	20	1.0	
GA	19	32	2.2 (0.69-6.99)	p= 0.18
AA	0	1	1.58 (0.49-5.15)	p= 0.44
MTHFR				
CC	7	20	0.63 (0.19-2.0)	p=0.44
CT	11	16	1.29 (0.42-3.95)	p=0.64
TT	9	17	1.0	

En cuanto a la asociación de los polimorfismos con la mucositis, encontramos que los genotipos RFC1 GA y RFC1 AA son protectores con una OR de 0.23 (IC, 0.056-0.98) y 0.15 (IC, 0.029-0.77) respectivamente. Mientras que para el gen MTHFR encontramos que el genotipo MTHFR CC como de riesgo para desarrollar mucositis (OR, 6.66 (1.29-34.25) (Tabla 9).

Tabla 9. Asociación del genotipo de RFC1 y MTHFR con mucositis.

	Mucositis	Sin Mucositis	RM (IC_{95%})	p
RFC1				
GG	6	23	1.0	
GA	9	42	0.23 (0.056-0.98)	0.047
AA	0	1	0.15 (0.029-0.77)	0.023
MTHFR				
CC	10	18	6.66 (1.29-34.25)	0.023
CT	3	24	1.50 (0.23-9.79)	0.67
TT	2	24	1.0	

DISCUSIÓN:

El metotrexato es un agente quimioterapéutico de tipo antifolato muy utilizado en el tratamiento de LLA, la utilización de las dosis altas de este fármaco están asociadas con toxicidad. A pesar de que diversas investigaciones han propuesto que el estudio de los polimorfismos en los genes involucrados en las rutas del folato brindan información que permite entender la correlación entre los patrones genéticos con el resultado del tratamiento, y las diferencias en el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo los resultados obtenidos han sido inconsistentes.

Con el objetivo de estudiar la farmacogenética del metotrexato en la LLA pediátrica, el presente estudio se enfocó a evaluar la asociación entre el polimorfismo del gen RFC1 (G80A) y del gen MTHFR (C677T), con los niveles del metotrexato en plasma, la presencia de mucositis y recaída en 81 pacientes pediátricos con LLA.

En primer lugar, en cuanto a la frecuencia genotípica, para RFC1 encontramos que el genotipo con mayor frecuencia fue el RFC1 "GA" con un 62.96%, seguido del homocigoto silvestre RFC1 "GG" con un 35% y el genotipo RFC1 "AA" tuvo una frecuencia de 6.24%. Estas frecuencias varían en comparación con las reportadas en población pediátrica japonesa por Shimasaki en el 2006 para el gen RFC1, quien obtuvo GG 27%, GA 47% y AA 27%.³³

Estudios previos sugieren que el polimorfismo G80A del gen RFC puede estar asociado a efectos secundarios del MTX como toxicidad, mucositis, vómitos, alteraciones hematológicas y otros. Un ejemplo de ello es el estudio realizado en niños Canadienses con LLA, donde se encontró que el genotipo RFC1 "AA" se asocio con un mal pronóstico incluyendo niveles altos de MTX en plasma, recaída y/o fallecimiento (OR,3.2; 95% CI, 1.0-10.1)³². En este estudio encontramos al mismo genotipo con un efecto opuesto, sugiriéndose a este como de "protección" y/o bajo riesgo (OR,0.15; 95% IC, 0.29 - 0.77). Esta diferencia puede deberse principalmente a que la frecuencia de este genotipo fue muy baja, pues solo tuvimos un paciente con el genotipo RFC1 "AA", el cual no presentó mucositis. Sin embargo, también encontramos que los

pacientes portadores del genotipo RFC1 "GA", en su mayoría no presentaron mucositis (OR, 0.23; 95% CI, 0.056-0.98), sugiriendo a este genotipo como "protector" y/o de bajo riesgo, para el desarrollo de mucositis. El peso del alelo "A" en este efecto protector, deberá ser analizado con mayor detalle.

Adicionalmente, al analizar la asociación del gen RFC1 con la recaída y los niveles de MTX en plasma, no encontramos asociación significativa; Esto concuerda con lo publicado por Shimasaky, 2006 en niños japoneses con LLA y Linfoma³³. Sin embargo, en estos últimos cuando se realizó un análisis entre pacientes con evento (episodios de vomito) y sin evento; encontraron una asociación significativa con el gen RFC, específicamente con el alelo "G" (OR, 3.1, 95% IC; 1.08-9.07).

El gen MTHFR ha sido muy estudiado con respecto al metabolismo del metotrexato. Sin embargo, las inconsistencias obtenidas en los estudios publicados han mostrado los problemas en el estudio de la farmacogenética del MTX. El polimorfismo C677T se asocia con efectos funcionales al reducir la actividad de la enzima y predecir que los pacientes con actividad enzimática reducida, pueden ser más susceptibles a la toxicidad por el MTX, sin embargo, es difícil determinar como tales polimorfismos pueden influenciar la eficacia de la droga. Varios estudios han evaluado el efecto del polimorfismo del gen MTHFR sobre el resultado del tratamiento con MTX en diversas poblaciones y enfermedades, obteniendo resultados distintos. En este estudio encontramos que el MTHFR CC se presentó en un 34.7% de los pacientes analizados, el MTHFR CT en un 33.3% y el MTHFR TT en un 32.1%. Estas frecuencias varían respecto a las reportadas en población japonesa para el mismo gen CC 53%, CT 40% y TT 7%.^{33,36}

El genotipo MTHFR CC se asoció significativamente con pacientes que presentaron mucositis (OR, 6.67, 95% IC; 1.13-50.57, $p = 0.031$), sugiriendo que puede ser un marcador de riesgo para mucositis. En contraste a nuestros resultados, Ruiz-Argüelles (2008), encontró que 16 de 28 pacientes mexicanos adultos analizados con LLA, presentaron episodios de mucositis asociada a MTX, 10 de ellos portaban el genotipo MTHFR TT. Ulrich y col. (2001) en pacientes sometidos a regímenes de condicionamiento para trasplante de

médula ósea con diversas enfermedades, encontraron asociación entre el genotipo MTHFR TT y la presencia de mucositis (OR, 21.6, 95 % IC, 16.8 – 26.4) . Chiusolo y col.(2002), en población italiana con un rango de edad de 12 a 72 años, con LLA, encontró asociación significativa entre el genotipo TT con incremento de la toxicidad (evaluada en medula ósea, hígado y mucosa oral) durante la administración de MTX. Shimasaki (2006) en población pediátrica japonesa, no encontró asociación significativa entre el polimorfismo del gen MTHFR con la toxicidad inducida por MTX. Parshant Aggarwal (2006), tampoco encontró asociación entre el polimorfismo del gen MTHFR y la toxicidad o la eficacia del tratamiento con MTX en pacientes hindús con artritis reumatoide. Por otro lado, Fisher y col. (2009) en población americana con artritis reumatoide si encontró asociación entre el polimorfismo C677T con incremento en la toxicidad del MTX (RM = 1.71, 95% IC=1.32-2.21, p=0.001). Gemmati (2007), en pacientes italianos con linfoma de Hodking también encontró asociación entre el genotipo TT con mucositis (OR=4.85; 95%CI, 1.47-15.97; p=0.009). Todo lo anterior nos indica que es necesario estudiar más a fondo el papel del polimorfismo del gen MTHFR en pacientes mexicanos, aumentando el número de muestras y adicionalmente la variante A1298C del gen MTHFR, por ser otro polimorfismo también asociado con baja actividad de la enzima MTHFR ^{17,33,38,40,41,42} .

Las discrepancias obtenidas entre los diversos estudios pueden ser debidas entre otras cosas a las diferencias en el diseño de los estudios, el número de pacientes analizados, población analizada, tipo de enfermedad y el contexto de la terapia con metotrexato (dosis, tiempo y rescates); y que algunos estudios incluyen únicamente a pacientes que reciben infusiones de metotrexato sin otros agentes quimioterapéuticos citotóxicos sistémicos, mientras que otros trabajos evalúan la toxicidad después de administrar tratamientos crónicos con dosis altas de metotrexato acompañados de otros agentes. Además, en el presente estudio la toxicidad inducida por metotrexato pudo haber sido atenuada por el rescate con ácido folínico, mientras que en otros trabajos en los que se usaron dosis altas de metotrexato, el rescate no fue realizado.

Por consiguiente, es importante realizar más estudios que permitan aclarar las inconsistencias con un tamaño de muestra mayor y así poder determinar con claridad en población mexicana, el papel de estos polimorfismos o bien, estudiar otros marcadores genéticos involucrados en el metabolismo de este fármaco para poder desarrollar tratamientos individualizados con metotrexato, evitando los efectos adversos y mejorando el éxito del tratamiento.

CONCLUSIONES:

- Para el gen RFC1 el genotipo GA es el que presenta una mayor frecuencia 62.96%, y el AA es de menor frecuencia con 1.24%.
- Para el gen MTHFR el genotipo CC para el gen es el presenta una mayor frecuencia 34.5% y el TT es de menor frecuencia con 32.1%.
- Se sugiere un genotipo del gen MTHFR (CC) como de “riesgo” a mucositis.
- Nuestros resultados sugieren que ambos genotipos del gen RFC1 (GA) y (AA) como de “protección” para mucositis.
- No encontramos asociación con recaída y niveles de MTX en plasma para ambos genes.

ANEXOS:

Apéndice 1

Clasificación Morfológica de la LLA propuesta por el Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico

Tipo	Características de los linfoblastos leucémicos
L1	Pequeños, citoplasma escaso, apariencia uniforme, nucleolos no visibles, cromatina homogénea.
L2	Grandes, mas citoplasma, nucleolos visibles, heterogéneos en tamaño y forma.
L3	Grandes, citoplasma basófilo moderadamente abundante, vacuolización citoplásmica prominente.

Apéndice 2

Extracción de DNA (Quiagen)

- Tomar 2mL de sangre y pasarla a un tubo Falcon
- Centrifugar 5 min. a 5000 rpm.
- Desechar el plasma
- Adicionar 25 μ l de Proteinasa K
- Adicionar 200 μ l de solución AL (protegido de la luz)
- Agitar en Vortex
- Incubar 70°C 10 min.
- Adicionar 210 μ l de etanol y agitar en vortex
- Transferir todo el contenido a una columna de extracción
- Centrifugar 8000 rpm 1 min.
- Pasar las columnas a tubo nuevo
- Adicionar 500 μ l de solución AW1
- Centrifugar 1 min a 8000 rpm
- Pasar las columnas a tubo nuevo
- Adicionar 500 μ l de solución AW2
- Centrifugar 1 min. A 8000 rpm
- Centrifugar 2 min 13000 rpm
- Pasar a los tubos finales
- Adicionar al filtro de la columna 50 μ l de solución de elución AE (precalentado a 70°C)
- Incubar a temperatura ambiente 3 min.
- Centrifugar a 8000 rpm 1 minuto
- Guardar el DNA en un tubo nuevo a -20°C.

Apéndice 3: GLOSARIO

Ácido desoxirribonucleico, frecuentemente abreviado como **DNA** (y también **DNA**, del inglés *DeoxyriboNucleic Acid*), es un tipo de ácido nucleico, una macromolécula que forma parte de todas las células. Contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, siendo el responsable de su transmisión hereditaria.

Antimetabolito: Aquellos fármacos que afectan la síntesis de ácidos nucleicos.

Antineoplásicos son sustancias que impiden el desarrollo, crecimiento, y/o proliferación de células tumorales malignas. Estas sustancias pueden ser de origen natural, sintético o semisintético.

Cáncer: Es una entidad clínica y anatomopatológica de carácter maligno que afecta a un paciente, y cuyas características histopatológicas son la alteración morfológica y funcional seguida por la proliferación descontrolada de las células de un tejido que invaden, desplazan y destruyen, localmente y a distancia otros tejidos sanos del organismo.

Enzima de restricción (o endonucleasas de Restricción) es una enzima que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de DNA y cortar el DNA en ese punto en concreto, llamado sitio o diana de restricción, o en un sitio no muy lejano a éste, dependiendo de la enzima. Los sitios de restricción cuentan con entre 4 y 12 pares de bases, con las que son reconocidos.

Especificidad: Es la probabilidad de clasificar correctamente a un paciente sano, es decir, la probabilidad de que un individuo sano obtenga un resultado negativo.

Exón: Cada una de las regiones de un gen que contienen la información para producir la proteína codificada en el gen. Cada exón codifica una porción específica de la proteína completa. En eucariotas los exones están separados por regiones de DNA (llamadas intrones) que no codifican.

Fármaco es toda sustancia química purificada utilizada en el tratamiento, cura, prevención o el diagnóstico de una enfermedad, o para evitar la aparición de un proceso fisiológico no deseado.

Farmacogenética: Es el estudio de la forma en que las características genéticas de una persona determinan el grado de eficacia de un fármaco en su organismo, así como que efectos secundarios son los que mayor probabilidad tienen de aparecer en esa persona.

Fenotipo: Es la expresión del genotipo, cualquier característica detectable de un organismo (estructural, bioquímico, fisiológico o conductual) determinado por una interacción entre su genotipo y su medio en un determinado ambiente.

Gen: La unidad física y funcional de la herencia, que se pasa de padres a hijos. Los genes están compuestos por DNA y la mayoría de ellos contiene la información para elaborar una proteína específica.

Genotipo: Es el contenido genético específico de un individuo en forma de DNA.

Intrón: Es una región del DNA que debe ser eliminada del transcrito primario de RNA, es decir es una región de DNA que no se expresa, también se dice que son fragmentos de DNA carentes de información.

Leucemia es un grupo de enfermedades malignas de la médula ósea (cáncer hematológico) que provoca un aumento incontrolado de leucocitos (glóbulos blancos) clonales en la médula ósea, que suelen pasar a la sangre periférica.

Marcador genético: Un segmento de DNA con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear. Un marcador puede ser un gen, o puede ser alguna sección del DNA sin función conocida. Dado que los segmentos del DNA que se encuentran contiguos en un cromosoma tienden a heredarse juntos, los marcadores se utilizan a menudo como formas indirectas de rastrear el patrón hereditario de un gen que todavía no ha sido identificado, pero cuya ubicación aproximada se conoce.

Mucositis oral: es la inflamación aguda que tiene lugar en el epitelio oral no queratinizado, a consecuencia de los tratamientos para cáncer tales como radioterapia, quimioterapia, o la combinación de ambos.

Nucleótido: Es un compuesto monomérico formado por una base nitrogenada, un azúcar de cinco átomos de carbono (pentosa) y ácido fosfórico, es la unidad que forma el DNA.

Polimorfismo: Es la existencia de dos o más alelos de un gen presentes en una población, en una frecuencia significativa.

Quimioterapia: es, de forma general, cualquier tratamiento médico basado en la administración de sustancias químicas (fármacos). En medicina se llama tratamiento quimioterápico al que se administra para curar la tuberculosis, algunas enfermedades autoinmunes y el cáncer.

RFLP Polimorfismo de fragmentos de longitud variable o (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el DNA que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción (también llamadas endonucleasas de restricción) y que varían entre individuos.

BIBLIOGRAFIA:

1. Murphy P, Lawrence W. Oncología clínica. Editorial Organización Panamericana de la salud y organización mundial de la salud. 2nd Edición 1996; 562-585.
2. Henry J. Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. Editorial Salvat. 1ra Edición 1994; 713-718.
3. Roitt, Brostoff, Male. Inmunología. Editorial Harcourt Mosby. Madrid España 5ta. Edición 1998; 345-348
4. Gutiérrez Romero M. Síndromes Hematológicos su relación con las enfermedades que las producen. Editorial Prado, México 1era. Edición 2006; 480-484
5. Grignaschi V. J. Diagnostico citológico de las hemopatías. Editorial Médica Panamericana. España 1991; 491-494.
6. Mckenzie B. Hematología clínica. Editorial Manual Moderno. México 1998; 284-291, 315-327.
7. Wang LY, Bagg A. Chronic myelogenous leucemia: laboratory diagnosis and monitoring. Genes, chromosomes & cancer 2001; 32:97-111.
8. O'Dwyer ME, Mauro MJ, Kurilik M. The impact of clonal evolution on response to Imatinib mesylate (STI571) in accelerated phase CML. Blood 2002; 5: 1628-1633.
9. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. New England Journal of Medicine 1995; 333(16): 1052-1057.
10. Godin I, Cumano A. The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. Nature Rev. Immunol 2002; 2: 593-604.
11. Nathan O. Hematology of infancy and childhood. Editorial Saunders. 5ta. Edición USA 1998; 2: 1147-1182.
12. Sans-Sabrafen J., Besses Raebel C., Vives Corrons J.L., Hematología Clínica, 5ta. Edición, Edit. Elsevier, 2006; 168-170.
13. Kalan Harold, Walter H.E. Principios de Farmacología Médica. Editorial Oxford University Press. México D.F. 2002; 757-763
14. McGuire JJ. Anticancer antifolates: current status and future directions. Curr Pharm Des 2003; 9:2593 2613.
15. Mathews, Van Holde, Bioquímica, Edit. McGraw Hill Interamericana, 2da. Edición 1998; 800-806.

16. Hider SL, Bruce IN, Thomson W. The pharmacogenetics of methotrexate. *Rheumatology* 2006; 46:1520-1524.
17. Ulrich CM, Yutaka Y, Rainer S, Schubert M, Wagner JL, Bigler J, Kiley SA, Keener CL, Li S, Hao Liu, Farin F, Potter JD. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, *Blood* 2001; 231-234
18. Cheok M H, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia: A model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2006; 6: 117 – 129.
19. Bodo A, Bakos E, Szeri F, Varadi A, Sarkadi B. The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity. *Toxicology letters* 2003; 140: 133 – 143.
20. Anderle P, Huang Y, Sadee W. Intestinal membrane transport of drugs and nutrients: Genomics of membrane transporters using expression microarrays. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004; 21: 17 – 24.
21. Gorlick R, Goker E, Trippet T, Waltham M, Banerjee D, Bertino J. Intrinsic and Acquired resistance to methotrexate in acute leukemia. *The New England Journal of Medicine* 2007; 1041-1048.
22. Huang Y, Sadee W. Membrane transporters and channels in chemoresistance and sensitivity of tumor cells. *Cancer letters* 2006; 239: 168 – 182.
23. Gottesman M M, Fojo T, Bates S E. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 48 – 58.
24. Wong SC, Proefke SA, Bhushan A, Matherly L H. Isolation of human cDNAs that restore methotrexate sensitivity and reduced folate carrier activity in methotrexate transport-defective Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 17468 – 17475.
25. Rothem L, Stark M, Kaufman Y, Mayo L, Assaraf YG. Reduced folate carrier gene silencing in multiple antifolate-resistant tumor cell lines is due to a simultaneous loss of function of multiple transcription factors but no promoter methylation. *Journal of biological chemistry* 2004; 279:374-384.
26. Worm J, Kirkin AF, Dzhandzhugazyan K N, Guldberg P. Methylation-dependent silencing of the reduced folate carrier gene in inherently methotrexate-resistant human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 39990 – 40000.

27. Ranganathan P, McLeod HL. Methotrexate pharmacogenetics: The first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2006; 54: 1366-1377.
28. Gifford AJ, Haber M, Witt T L, Whetstone J R, Taub J W, Matherly L H. Role of the E45K-reduced folate carrier gene mutation in methotrexate resistance in human leukemia cells. *Leukemia* 2002; 16: 2379 – 2387.
29. Kaufman Y, Ifergan I, Rothen L, Jansen G, Assaraf, Y G. Coexistence of multiple mechanisms of PT523 resistance in human leukemia cells harboring 3 reduced folate carrier alleles: Transcriptional silencing, inactivating mutations, and allele loss. *Blood* 2006; 107: 3288-3294
30. Zhao R, Assaraf Y, Golfini I D. A mutated murine reduced folate carrier (RFC1) with increased affinity for folic acid, decreased affinity for methotrexate, and an obligatory anion requirement for transport function. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 19065-19071.
31. Chango A, Emery-Filion N, de Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, Nicolas JP. A polymorphism (80G>A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Gen Metab* 2000; 70:130-315.
32. Laverdiere C, Chiasson S, Costea L, Moghrabi A, Krajcinovic M. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 100: 3832:3834.
33. Shimasaki N, Mori T, Samejima H, Sato R, Shimada H, Yahagi N, Torii CH, Yoshihara H, Tanigawara, Y, Takashi T, Kosaki K. Effect of methylenetetrahydrofolate reductase and reduced folate carrier 1 polymorphisms on high-dose methotrexate-induced toxicities in children with acute lymphoblastic leukemia or lymphoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2006; 28:64-68.
34. Blackwell, Pharmacogenetic determinants of outcome in acute lymphoblastic leukaemia, *British Journal of Haematology*, 2004, 125, 421-434.
35. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994; 7: 195-200.
36. Frosst P, Blom H, Milos R. Identification of a candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111-3.

37. Botto LD. 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies. *AhuGE Review. Am J Epidemiol* 2000; 151: 862-77.
38. Chiusolo P, Reddiconto G, Casorelli, Laurenti L, Sora F, Mele L, Annino L, Leone G, Sica S. Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate. *European Society for Medical Oncology* 2002; 1915-1918
39. Sánchez-Urbina Rocío, Galaviz-Hernández Carlos, Sierra-Ramírez Alfredo, Morán-Barroso Verónica, García-Cavazos Ricardo, Trascendencia de los factores ambientales y genéticos en cardiopatías congénitas: el caso de la enzima MTHFR, ambientales y genéticos en cardiopatías congénitas, *Perinatol Reprod Hum*; 20:39-47
40. Prabha Ranganathan, Howard L. McLeod. Methotrexate Pharmacogenetics, *Arthritis and Rheumatism* 2006; 1366-1377
41. Fisher M, Cronstein B. Meta-analysis of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms affecting methotrexate toxicity. *J Rheumatol* 2009; 539-545.
42. Gemmati D, Ongaro A, Scapoli G, Della Porta M, Tognazzo S, Serino M, Di Bona E, Rodeghiero F, Gilli G, Reverberi R, Caruso A, Pasello M, Pellati A, Mattei M, Common Gene Polymorphisms in the Metabolic Folate and Methylation Pathway and the Risk of Acute Lymphoblastic Leukemia and non-Hodkins's Lymphoma in Adults. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*; 2004: 787-794.