

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Biokimika eta Biologia molekularra Gradua / Grado en Bioquímica y Biología molecular

Implicación de los microRNAs en la toxicidad asociada al Metotrexato en la Leucemia Linfoblástica Aguda Infantil.

Egilea/Autor:

Iparraguirre Gil, Leire.

Zuzendaria/Director/a:

García-Orad Carles, África.

Zuzendarikidea/Codirector/a:

Martín Guerrero, Idoia.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. Leucemia linfoblástica aguda	1
1.2. Tratamiento	1
1.3. Farmacogenética	2
1.4. MicroRNAs	2
1.5. Hipótesis	4
1.6. Objetivos	4
2. DESARROLLO	5
2.1. Materiales y métodos	5
2.2. Resultados	6
2.3. Discusión	9
3. CONCLUSIONES	11
4. FUTUROS ESTUDIOS	12
5. BIBLIOGRAFÍA	12
6. ANEXOS	II

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

La leucemia linfoblástica aguda infantil (LLA) es el cáncer pediátrico más común en países desarrollados donde representa el 25-30% de los cánceres infantiles (Pui et al., 2010). Se caracteriza por una proliferación y expansión clonal de células inmaduras linfoides (linfoblastos) que puede afectar a los linfocitos B o T, aunque en el 80-85% de los casos son LLA-B. Como consecuencia se da una acumulación de linfoblastos en la médula ósea provocando la supresión del proceso normal de hematopoyesis, produciéndose un fallo de la respuesta inmune así como una reducción de glóbulos rojos circulantes (anemia), plaquetas (trombocitopenia) y otros glóbulos blancos (especialmente neutropenia).

En las últimas décadas, la tasa de supervivencia ha aumentado hasta a un 80% debido, en parte, a los protocolos de tratamiento bien estandarizados (López-López et al., 2014).

1.2. TRATAMIENTO

El tratamiento suele durar entre 2-2,5 años, y consta de tres fases: inducción, consolidación y mantenimiento (Inaba et al., 2013). En los grupos de alto riesgo y muy alto riesgo, además, existe una fase de intensificación previa a la fase de mantenimiento. Uno de los protocolos de tratamiento utilizados es el LAL/SHOP, aprobado por la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica, en el que se combinan diferentes fármacos, entre ellos el metotrexato (MTX).

El MTX es uno de los pilares del tratamiento de la LLA. Se ha visto que un aumento en la dosis de MTX refleja un aumento de la supervivencia (Treon y Chabner, 1996) (Salazar et al., 2012) (Evans et al., 2015), por tanto, se administra la dosis máxima tolerable (HD-MTX). Por ello, el rango terapéutico del MTX es estrecho, es decir, que la diferencia entre la dosis eficaz y la dosis tóxica es pequeña (López-López et al., 2014). En consecuencia, a pesar del éxito de la terapia en la LLA, las toxicidades son frecuentes y en algunos pacientes se requiere una reducción de la dosis o el cese del tratamiento viéndose comprometida la supervivencia. Es por ello que uno de los retos de la medicina actual es encontrar marcadores que permitan detectar de forma precisa qué pacientes van a sufrir efectos adversos de forma que el tratamiento pueda ajustarse desde el principio y así mejorar la eficacia y seguridad del fármaco.

1.3. FARMACOGENÉTICA

En este contexto los estudios farmacogenéticos estudian las variantes genéticas heredadas, mayoritariamente polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) que afectan a la función de genes implicados en la administración, distribución, metabolismo y excreción de fármacos (genes ADME) y que por tanto pueden influir en la eficacia y toxicidad del mismo. A día de hoy se conocen todos los genes involucrados en la farmacodinamia y la farmacocinética del MTX (**Figura 1**).

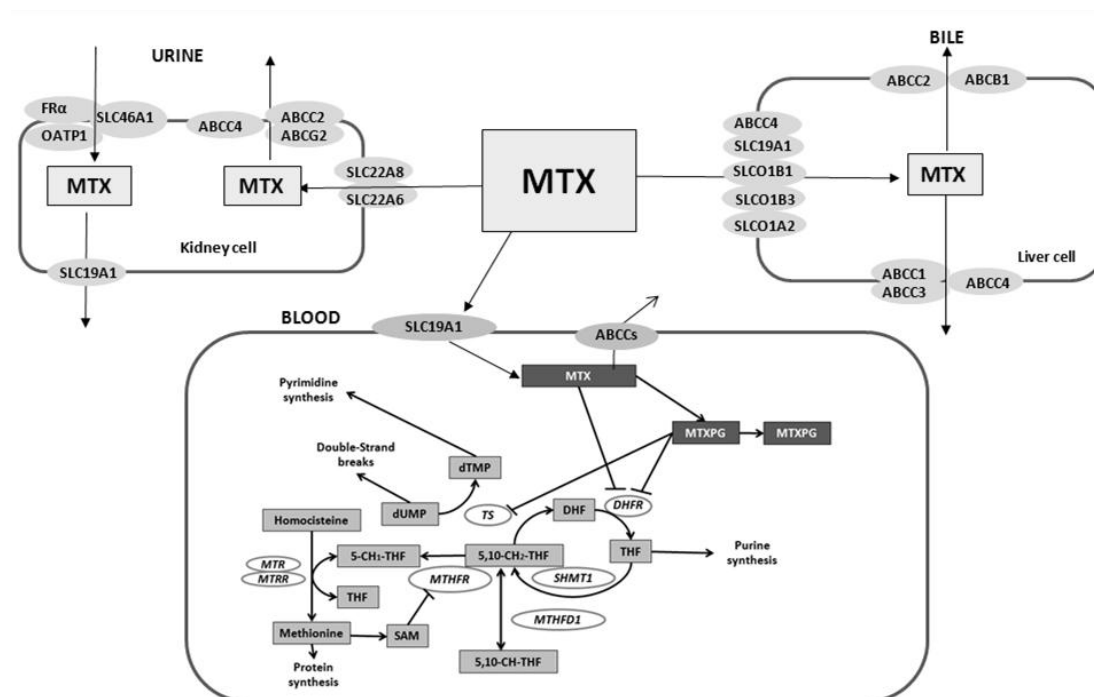


Figura 1. Genes implicados en la farmacodinamia y farmacocinética del MTX. Adaptado de PharmGKB

En los últimos años, se han realizado diversos estudios farmacogenéticos (Laverdiere et al., 2002) (Shimasaki et al., 2006) (Faganel et al., 2010) (Huang et al., 2008) (Ashton et al., 2009) (Radtko et al., 2013) que apuntan principalmente a transportadores del MTX, como posibles marcadores para la eficacia y toxicidad asociada al tratamiento en la LLA pediátrica. Entre ellos, uno de los trabajos realizados en nuestro grupo encontró un SNP en el gen ABCC4 y otro en ABCC2, asociados a los niveles de MTX en plasma de entre los cuales se observó que el SNP rs9516519 ($p=0.00026$) del gen ABCC4, se sitúa en el sitio de unión al miR-367 (López-López et al., 2013).

1.4. MICRORNAS

Los microRNAs (miRNAs o miRs) son pequeñas moléculas de RNA no codificante de entre 18 y 22 nucleótidos que regulan la expresión a nivel postranscripcional de aproximadamente el 50% de los genes codificantes (Sana et al., 2012) incluidos los genes ADME. Se encuentran en regiones intergénicas o intrónicas y se transcriben el

núcleo como pri-miRNAs de doble hebra cuya secuencia condiciona su estructura secundaria. Éstos son procesados por acción de la RNasa Drosha a premiRNAs que se exportan al citoplasma donde son escindidos por la endonucleasa DICER para formar dos hebras de miRNA. Una de las hebras es habitualmente degradada y la otra se incorpora al complejo silenciador RISC, con el que ejercerá su función. Los miRNAs reconocen sus mRNAs diana mediante la unión parcialmente complementaria al extremo 3'UTR del gen diana, provocando así la inhibición de su traducción o facilitando la degradación del mRNA (Ryan et al., 2010) (Lin et al., 2010). Por ello, en el caso del

SNP rs9516519 en el gen ABCC4, la eliminación del sitio de unión del miR-367, podría afectar a la expresión del gen e influir así en la eliminación de MTX por vía renal (López-López et al., 2013) (**Figura 2**). Otros autores han encontrado también polimorfismos que afectan a los sitios de unión de los miRNAs. Mishra et al. (2009) observaron la presencia de un SNP en el sitio de unión del miR-24 al gen DHFR, sobre el que actúa el MTX, asociado con la resistencia a este fármaco. Más recientemente, Yu et al. (2010) encontraron un SNP en el gen SULT1A1 que afecta a la unión del miR-631 disminuyendo así la capacidad de metabolizar las aminas heterocíclicas.

Por otro lado, se ha visto que la desregulación de los microRNAs, afecta a la sensibilidad y resistencia al tratamiento en la LLA y otros cánceres (Rukov y Shomron, 2011).

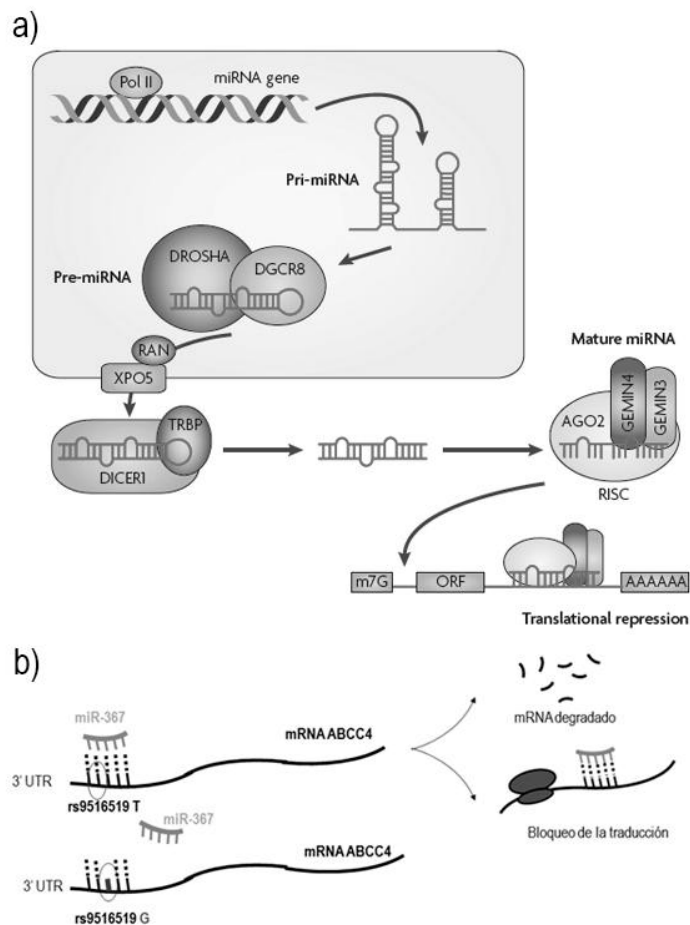


Figura 2. Biosíntesis y mecanismo de acción de los microRNAs.
a) Ruta de biosíntesis de microRNAs. Adaptado de Ryan et al. (2010).
b) Mecanismo de acción de los microRNAs e influencia de los SNPs en el sitio de unión. Ejemplo con el rs9516519 del gen ABCC4.

Tabla 1. Estudios farmacogenéticos realizados relacionados con cambios en los niveles de miRNAs.

Cáncer	microRNA	Fármaco	Referencia
Cáncer de mama	miR-7↓ y miR-345↓	Cisplatino	Rukov y Shomron (2011)
	miR-328↑	Mitoxantona	
	miR-125b↓	Calcitriol	Yokoi y Nakajima (2013)
Cáncer colorectal	miR-21↑	5-Fluorouracil	Rukov et al. (2014)
Cáncer de páncreas		Gemtabicina	
Cáncer de páncreas	miR-27a↑	Ciclofosfamida	
Adenocarcinoma de esófago y carcinoma de células escamosas	miR-148a↑	Cisplatino	
		5-Fluorouracil	
LLA	miR-125b↑, miR-99a↑ y miR-100↑	Vincristina Daunorubicina	Schotte et al. (2011)
	miR-708↓	Glucocorticoides	Han et al. (2010)
Osteosarcoma y cáncer de colon	miR-215↑	Metotrexato Tomudex	Song et al. (2010)

Por un lado, los niveles de expresión de los microRNAs pueden verse alterados por variantes genéticas en el pri- o pre-miRNA y son varios los estudios farmacogenéticos realizados que demuestran cómo estos pueden afectar a la regulación de los genes ADME (**Tabla 1**). Además de modificar los niveles de expresión de los miRNAs, cambios en la secuencia del miRNA pueden afectar también a la unión y función del mismo en la regulación de los genes ADME. De hecho, en este mismo año, el trabajo de Amstutz et al. (2015) relaciona el polimorfismo rs895819 en miR-27a con la toxicidad provocada por Fluoropiridina (5-FU).

1.5. HIPÓTESIS

Se plantea que variantes genéticas en el miRNA pueden afectar a la regulación de los genes ADME, y por tanto, a la respuesta al MTX.

1.6. OBJETIVOS

El objetivo principal del estudio es detectar los polimorfismos en miRNAs asociados a la toxicidad del MTX en pacientes de LLA-B pediátrica. Para ello, los objetivos específicos llevados a cabo son los siguientes:

1. Recolectar una amplia muestra de pacientes, todos ellos tratados con LAL/SHOP a fin de que sea homogénea.
2. Definir todos los genes de miRNAs descritos hasta el momento y SNPs.
3. Determinar la asociación de dichos SNPs con el aclaramiento del MTX.

2. DESARROLLO

2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1. Selección de la muestra

Se emplearon muestras de médula ósea y/o sangre periférica obtenidas entre 2000 y 2013, de 203 pacientes de B-LLA infantil, diagnosticados y tratados en las unidades de oncología pediátrica de tres hospitales de referencia (Hospital Donostia, Hospital Cruces y Hospital La Paz) a partir de los cuales se recogen datos sobre su sexo, edad, tratamiento, dosis y concentración de MTX en plasma. Para ello se obtuvo un consentimiento informado, firmado por los padres. Además se recogieron los datos clínicos de dichos pacientes.

2.1.2. Tratamiento y evaluación de la toxicidad

Todos los pacientes fueron tratados dentro del mismo protocolo LAL/SHOP 94/99/2005, que incluye tres dosis de MTX administradas en 24 horas de infusión, cada una de ellas de 3 o 5 g/m² junto con otros fármacos. Para cada paciente se recogen los datos de la concentración de MTX plasmática a las 48, 72 y 96 h tras el inicio de la infusión considerando tóxicos los valores a partir de C_{48h}>1μM (Suthandiram et al., 2014), C_{72h}>0.2μM y C_{96h}>0.2μM (López-López et al., 2013). Además se considera toxicidad total cuando en algún momento durante cualquiera de los ciclos se presentan concentraciones superiores al valor umbral establecido.

2.1.3. Selección de genes y polimorfismos

Dado que un mismo miRNA regula varios genes y que un mismo gen puede estar regulado por varios miRNAs, resulta difícil establecer qué miRNAs son los implicados en la regulación de los genes ADME. Por ello, se seleccionaron todos genes de miRNA descritos hasta el momento en mirbase (www.mirbase.org) y los SNPs presentes en los mismos empleando la base de datos miRNA SNIPER (<http://www.integratomics-time.com/miRNAs-SNIPER/>). Posteriormente, se introdujeron todos los SNPs en la base de datos dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) para la búsqueda de la frecuencia alélica mínima (MAF) y se terminaron seleccionando los SNPs con una MAF superior al 1% (MAF≥0,01) en la población caucásica.

2.1.4. Genotipado

Se extrajo el DNA de las muestras utilizando el método fenol-cloroformo previamente descrito por Sambrook y Russell (2001) y fue cuantificado utilizando PicoGreen (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Por cada muestra fueron genotipados 400ng de DNA

utilizando el GoldenGate Genotyping Assay con la tecnología Veracode de acuerdo con el protocolo de Illumina. Para la interpretación de los datos del genotipado, se empleó el software GenomeStudio.

2.1.5. Análisis estadístico

La asociación entre los niveles plasmáticos de MTX a las 48, 72 y 96 horas, la toxicidad total y los polimorfismos genéticos se ha evaluado mediante el test de la chi-cuadrado (χ^2) o test exacto de Fisher. Para el análisis los grupos de toxicidad se dicotomizaron como presencia versus ausencia de toxicidad en base a los niveles de MTX en plasma.

La medida de asociación del efecto se ha estimado mediante el odds-ratio (OD) a partir de regresión logística univariante. Para determinar la significancia estadística de cada SNP se ha escogido el modelo más significativo de entre el dominante o recesivo. En todos los casos el nivel de significancia se ha establecido al 5%. El análisis de las frecuencias genotípicas se ha realizado con el software R 3.0.1.

2.2. RESULTADOS

2.2.1. Características de los pacientes

La muestra de pacientes analizada incluye, 169 niños/as diagnosticados de LLA-B con una edad media de 5,16 años. En base a los datos clínicos recogidos se conoce que 51 niños (30.18%) presentan niveles de MTX tóxicos en plasma en algún momento a lo largo del tratamiento de entre los cuales 38 (22.49%) presentan toxicidad a las 48h y 37 (21.98%) la mantienen a las 72h (Tabla 2).

Tabla 2. Características de los pacientes incluidos en el estudio.

Nº de pacientes, n	169
Sexo, n (%)	
Mujeres	73 (43.20)
Hombres	96 (56.80)
Edad, promedio \pm SD, años	
	5.16 \pm 3.24
MTX dosis en consolidación, n (%)	
3 g/m ²	72 (42.60)
Tóxico	12 (16.67)
No tóxico	55 (76.39)
5 g/m ²	96 (56.80)
Tóxico	46 (47.92)
No tóxico	44 (45.83)
Toxicidad asociada a MTX, n (%)	
Total (en algún momento)	51 (30.18)
48 h (concentración plasmática >1 μ M)	38 (22.49)
72 h (concentración plasmática >0,2 μ M)	43 (25.44)
48h (>1 μ M) y 72h (>0,2 μ M)	37 (21.89)
96 h (concentración plasmática >0,2 μ M)	32 (18.94)

2.2.2. Resultados de genotipado.

De los 203 pacientes de LLA-B de partida, se obtuvo un genotipado satisfactorio del 83.26%, 169 muestras. De los 213 SNPs seleccionados en 206 miRNAs, un total de 59 fallaron en su genotipado por lo que se obtuvieron los resultados de 147 (71.36%).

2.2.3. Resultados de toxicidad.

Todos los pacientes siguen el protocolo LAL/SHOP de tratamiento y reciben una dosis elevada de MTX intravenoso (HD-MTX) en la fase de consolidación, sin embargo se distinguen dos grupos, a 96 (56.80%) de ellos se les administra una dosis de 5g/m² mientras que para otros 72 (42.6%) la dosis es de 3g/m² (**Tabla 2**). Se observa que hay una diferencia significativa en el porcentaje de casos con niveles de MTX tóxicos en sangre entre ambos grupos. De entre los pacientes que reciben la dosis más baja tan solo 12 de los casos (16,67%) presentan niveles tóxicos de MTX mientras que en el segundo de los grupos el número de casos que presentan concentraciones de MTX en plasma elevadas asciende a 46 (47,92%). Dado el escaso valor estadístico de un número tan bajo de pacientes que reciben la dosis de 3g/m² y presentan toxicidad, se decidió centrar el análisis de los resultados en el grupo de pacientes al que se le administra la dosis de 5g/m², por ser también aquellos que tienen un mayor riesgo de presentar toxicidades y por tanto, aquellos para los cuales podría ser más interesante encontrar un marcador de toxicidad que permita su predicción.

Se encontró asociación significativa bajo el modelo dominante entre los genotipos GG del SNP rs56292801 y CC del SNP rs35613341 del hsa-miR-5189 y la toxicidad total (p=0.005 y p=0.029 respectivamente) así como a las 48 (p=0.004 y p= 0.025), 72 (p=0.011 y p=0.036) y 96 horas (p=0.002 y p=0.019) tras la infusión de MTX (**Tabla 3**). A pesar de que no se puede comprobar el ligamiento entre estos dos SNPs dado que HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) no trabaja con la versión del GenomeBrowser (<https://genome.ucsc.edu/>) en la que aparecen estos, debido a la alta concordancia entre las frecuencias genotípicas de ambos, se postula que podrían estar ligados. Se encontraron también otros polimorfismos cuyo genotipo menos frecuente conlleva un efecto protector. En el caso del SNP rs78790512 del hsa-miR-6083 se encuentra que ninguno de los pacientes con genotipo AA presentan niveles tóxicos de MTX en plasma mientras que el 78.3% de los que tienen el genotipo GG presentan toxicidad (p=0.038). Esta asociación solo alcanza la significancia a las 48h (p=0.023) y 96h (p=0.005) aunque a las 72h el valor de p es próximo a 0.05 (p=0.067).

Por otro lado en el caso de los SNP rs1572687 del hsa-miR-5007 y rs2368392 que se encontraron en hsa-miR-604 son los genotipos de menor frecuencia, en este caso TT para ambos, los que muestran una asociación significativa con el incremento del riesgo a tener una excesiva concentración plasmática de MTX a las 48h (p=0.0246 y p= 0.0255 respectivamente) y a las 96h (p=0.002 y p=0.037), así como con el mantenimiento de una concentración elevada a las 48 y 72h (p=0.012 y p=0.033) (**Tabla 3**). Además de estos, se encuentran otros miRNAs menos significativos (miR-4792, miR-4432, miR-4520a y miR-4268) asociados a las concentraciones altas de MTX en plasma.

Tabla 3. Resultados de toxicidad más destacables en pacientes cuya dosis de MTX recibida es de 5g/m². Se indican resaltados los resultados significativos.

miRNA	Genotipo	Toxicidad Total			48h			72h			96h			48h y 72h		
		No Tox 44	Tox 46	Alelo riesgo Mod. OR Valor P	No Tox 52	Tox 33	Alelo riesgo Mod. OR Valor P	No Tox 46	Tox 41	Alelo riesgo Mod. OR Valor P	No Tox 55	Tox 26	Alelo riesgo Mod. OR Valor P	No Tox 54	Tox 31	Alelo riesgo Mod. OR Valor P
hsa-mir-5189 rs56292801 pre-maduro	GG	15 (37.5)	31 (67.4)	G	18 (37.5)	23 (69.7)	G	16 (38.1)	27 (65.9)	G	21 (41.2)	20 (76.9)	G	19 (38.0)	22 (71.0)	G
	AG	22 (55.0)	13 (28.3)	Dom. 0.29	26 (54.2)	9 (27.3)	Dom. 0.26	23 (54.8)	12 (29.3)	Dom. 0.32	26 (51.0)	5 (19.2)	Dom. 0.21	27 (54.0)	8 (25.8)	Dom. 0.25
	AA	3 (7.5)	2 (4.3)	0.005251	4 (8.3)	1 (3.0)	0.004003	3 (7.1)	2 (4.9)	0.01085	4 (7.8)	1 (3.8)	0.002388	4 (8.0)	1 (3.2)	0.003513
rs35613341 pre-maduro	CC	15 (37.5)	28 (60.9)	C	18 (37.5)	21 (63.6)	C	16 (38.1)	25 (61.0)	C	21 (41.2)	18 (69.2)	C	19 (38.0)	20 (64.5)	C
	CG	20 (50.0)	15 (32.6)	Dom. 0.39	23 (47.9)	11 (33.3)	Dom. 0.34	21 (50.0)	13 (31.7)	Dom. 0.39	23 (45.1)	7 (26.9)	Dom. 0.31	24 (48.0)	10 (32.3)	Dom. 0.34
	GG	5 (12.5)	3 (6.5)	0.02985	7 (14.6)	1 (3.0)	0.020058	5 (11.9)	3 (7.3)	0.03628	7 (13.7)	1 (3.8)	0.01869	7 (14.0)	1 (3.2)	0.01959
hsa-mir-6083 rs78790512 pre-maduro	GG	23 (57.5)	36 (78.3)	G	28 (58.3)	27 (81.8)	G	25 (59.5)	32 (78.0)	G	30 (58.8)	23 (88.5)	G	30 (60.0)	25 (80.6)	G
	AG	3 (32.5)	10 (21.7)	Dom. 0.38	16 (33.3)	6 (18.2)	Dom. 0.31	13 (31.0)	9 (22.0)	Dom. 0.41	17 (33.3)	3 (11.5)	Dom. 0.19	16 (32.0)	6 (19.4)	Dom. 0.36
	AA	4 (10.0)	0 (0.0)	0.03800	4 (8.3)	0 (0.0)	0.02288	4 (9.5)	0 (0.0)	0.06714	4 (7.8)	0 (0.0)	0.005089	4 (8.0)	0 (0.0)	0.04801
hsa-mir-5007 rs1572687 pre-maduro	CC	12 (30.0)	12 (26.1)	T	13 (27.1)	11 (33.3)	T	13 (31.0)	11 (26.8)	T	13 (25.5)	9 (34.6)	T	14 (28.0)	10 (32.3)	T
	CT	23 (57.5)	22 (47.8)	Rec. 2.47	29 (60.4)	11 (33.3)	Rec. 3.50	24 (57.1)	18 (43.9)	Rec. 3.06	32 (62.7)	6 (23.1)	Rec. 5.50	30 (60.0)	10 (32.3)	Rec. 4.03
	TT	5 (12.5)	12 (26.1)	0.1092	6 (12.5)	11 (33.3)	0.02456	5 (11.9)	12 (29.3)	0.04743	6 (11.8)	11 (42.3)	0.002814	6 (12.0)	11 (35.5)	0.01265
hsa-mir-604 rs2368392 pre-maduro	CC	29 (72.5)	26 (56.5)	T	35 (72.9)	16 (48.5)	T	30 (71.4)	22 (53.7)	T	36 (70.6)	12 (46.2)	T	36 (72.0)	15 (48.4)	T
	CT	10 (25.0)	18 (39.1)	Dom. 2.03	12 (25.0)	15 (45.5)	Dom. 2.86	11 (26.2)	17 (41.5)	Dom. 2.16	14 (27.5)	12 (46.2)	Dom. 2.80	13 (26.0)	14 (45.2)	Dom. 2,74
	TT	1 (2.5)	2 (4.3)	0.1217	1 (2.1)	2 (6.1)	0.02545	1 (2.4)	2 (4.9)	0.09321	1 (2.0)	2 (7.7)	0.03752	1 (2.0)	2 (6.5)	0.03302

2.3. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la correlación entre 213 SNPs en 206 microRNAs y los niveles de MTX plasmáticos asociados a toxicidad en 169 niños diagnosticados de LLA-B y tratados con el protocolo estandarizado de LAL/SHOP. Hemos encontrado un total de 9 SNPs significativos en 8 miRNAs diferentes asociados con altos niveles de MTX en plasma en aquellos pacientes tratados con 5g/m^2 (**Tabla anexa 1**). Entre ellos, cabe destacar el rs56292801 y rs35613341 en el miR-5189, que mostraron asociación con los niveles de MTX en plasma a las 48, 72 y 96h, así como para la toxicidad total.

El resultado más significativo se encontró en el SNP rs56292801 del hsa-miR-5189. Bajo el modelo dominante, el genotipo GG se asoció con la concentración elevada de MTX en plasma en todos los análisis realizados. Además un segundo SNP, rs35613341, en el mismo miRNA mostró también asociación en todos los análisis. Según la base de datos miRNASNP V2 (Gong et al., 2012), ambos se localizan en el pre-miRNA y provocan un cambio en la estructura del mismo (5kcal/mol y 4.1kcal/mol respectivamente) (**Figura 3**).

Esto podría afectar a su procesamiento y por tanto, provocar una reducción de los niveles del miR-5189 maduro de forma que la expresión de sus genes diana quedaría menos reprimida. Entre las dianas potenciales de

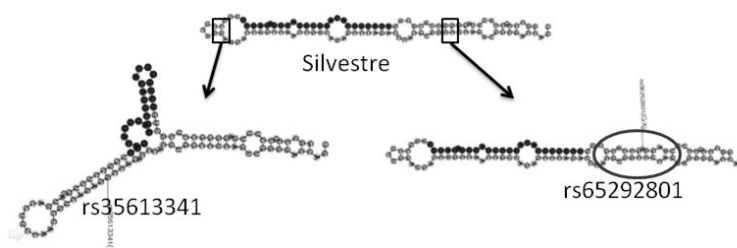


Figura 3. Efecto de un SNP en la estructura secundaria de un microRNA. Diagrama representativo del cambio de estructura provocado por un SNP localizado en el pre-miRNA-5189. Adaptado de miRNASNP.

este miRNA según la base de datos miRWalk 2.0 (Dweep et al., 2011), se encuentran los genes MTHFD1 y SLC46A1, ambos relacionados con la farmacodinamia y farmacocinética del MTX respectivamente. El gen SLC46A1 codifica un transportador conocido como SLC46A1 o PCFT (Proton Coupled Folate Transporter) que a pesar de que su papel principal es el de participar en la absorción intestinal de folatos y análogos de folato como el MTX, se localiza también en otros tejidos, entre ellos en hígado y riñón (Hou y Matherly, 2014) (Desmoulin et al., 2012), más concretamente en la membrana apical de las células del túbulo renal proximal (Matherly et al., 2014). Diferentes trabajos plantean que el PCFT podría participar en la reabsorción de folatos y fármacos desde la orina a pesar de que a día de hoy aún no está claro (Lee et al., 2005). Teniendo en cuenta que el PCFT media la reabsorción de MTX desde la orina, bajos niveles del miR-5189 provocados por un procesamiento alterado podrían dar lugar a una sobreexpresión de transportadores PCFT en el riñón, y con ello un aumento de la reabsorción de MTX,

siendo un incremento de la concentración de MTX en sangre la consecuencia final. Además del SLC46A1, miR-5189 regula también el gen MTHFD1 cuya sobreexpresión podría estar relacionada con la acumulación de metabolitos intermediarios de la ruta del MTX, entre ellos S-Adenosil-L-Metionina (SAM) que inhibe la actividad de MTHFR. Se ha visto que la reducción de la actividad de MTHFR está relacionada una mayor concentración de metotrexato en suero pasadas 48h desde el inicio de la infusión (Imanishi et al., 2007) (De Mattia y Toffoli, 2009).

El segundo resultado más relevante se obtiene con miR-6083 que se asocia con niveles tóxicos de MTX a las 48 y 96h y cuyos resultados nos indican que el alelo A muestra un efecto protector muy potente, pues ningún paciente cuyo genotipo sea AA presenta toxicidad. Una ampliación de la muestra podría demostrar la importancia de este genotipo en protección. Por otro lado, a día de hoy no hay ninguna diana predicha para este miRNA, por lo que no se conoce cuál puede ser su mecanismo de acción.

Otro resultado interesante fue el encontrado en el SNP rs2368392 en el pre-miR-604 que provoca un cambio en la estructura del miRNA y podría afectar a los niveles de expresión del mismo. De hecho, Lin y colaboradores (2012) ya sugirieron que el SNP analizado afecta a los niveles de procesamiento del miR-604 y lo asociaron en este caso con el riesgo de muerte en pacientes en el estadio III de cáncer de colon tratados con quimioterapia basada en fluoropiridina (5-FU). Este miRNA regula también el gen SLC46A1 y MTHFR, por lo que de igual manera, los cambios en los niveles de hsa-miR-604 podrían influir en la función de los genes implicados en la ruta de MTX y por tanto en la concentración y la toxicidad asociada a este. A pesar de que no está completamente descrito el valor predictivo de MTHFR como marcador de toxicidad, diversos estudios como el realizado por Imanishi et al. (2007) y De Mattia y Toffoli, (2009) indican que aquellos pacientes en los que se observa una reducción en la actividad de MTHFR, tienen una mayor concentración de metotrexato en suero pasadas 48h desde el inicio de la infusión. Por tanto, el cambio de estructura del pre-miRNA provocado por el SNP podría dar lugar a un cambio en su procesamiento y aumento en los niveles de miRNA maduro que regulan este gen provocado una mayor represión del gen MTHFR con un efecto similar al asociado a la disminución de su actividad.

En el caso del hsa-miR-5007 regula los genes MTR, MTRR y SLCO1A2 (**Figura 4**). Éste último gen codifica para un transportador situado en el hígado que media la entrada de fármacos al hígado. Se han visto polimorfismos en este transportador para los cuales ciertos genotipos concretos tienen un índice de aclaramiento menor que otros aunque la diferencia no llega a ser significativa ($p=0.075$) (Yamakawa et al., 2011). Por ello, se plantea que un incremento en la cantidad de miR-5007 maduro podría reducir la expresión de SLCO1A2 y junto con ella eliminación del MTX por vía biliar de forma que

aumentarían los niveles de MTX en plasma. Por otro lado, una disminución de los niveles de expresión de miR-5007 podría afectar a los niveles de expresión de MTR y MTRR y con ellos a la concentración de SAM, con efecto directo sobre la actividad de MTHFR que se ha visto relacionada con los niveles de MTX plasmáticos.

2.3.2. Resumen de resultados

Variantes genéticas en microRNAs (miR-5189, miR-6083, miR-604 y miR-5007) que regulan los genes (SLC46A1, SLCO1A2, MTHFR, MTHFD1, MTR y MTRR) se han visto asociados con niveles altos de MTX en plasma.

3. CONCLUSIONES

Variantes genéticas de los microRNAs (miR-5189, miR-6083, miR-604 y miR-5007) pueden ser consideradas como nuevos marcadores de toxicidad del MTX en LLA-B pediátrica ya que podrían afectar a la regulación de genes implicados en su farmacodinamia y farmacocinética (**Figura 4**).

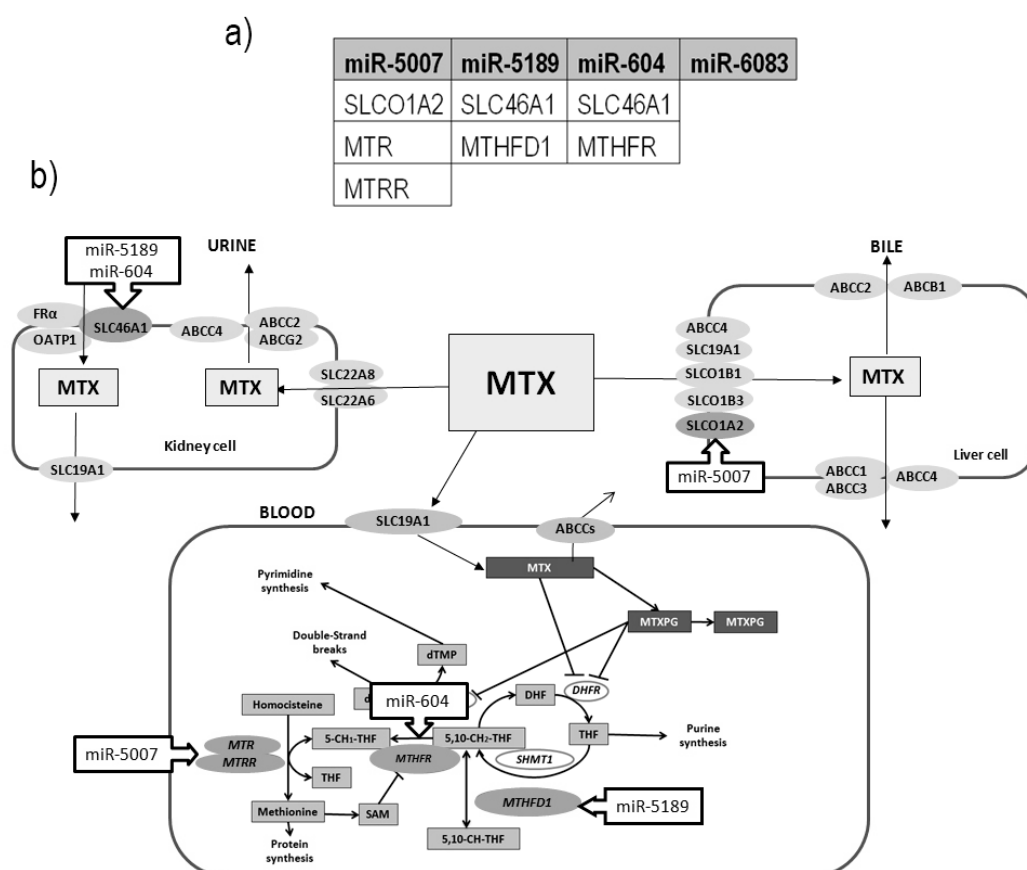


Figura 4. Genes relacionados con la farmacodinamia o farmacocinética del MTX que están regulados por uno o varios de los miRNAs significativos. a) Tabla resumen de los genes regulados por cada uno de los miRNAs significativos. b) Representación gráfica de los genes implicados en la farmacodinamia y farmacocinética del MTX regulados por los distintos microRNAs significativos.

4. FUTUROS ESTUDIOS

Validar los resultados significativos en una segunda muestra para lo que pretendemos realizar el análisis de los 5 SNPs significativos en una nueva cohorte de LLA-B de la Universidad de Rotterdam. En caso de confirmarse nuestros resultados sería de interés determinar el efecto de los polimorfismos en la expresión de los miRNAs mediante estudios funcionales.

5. BIBLIOGRAFÍA

Amstutz, U., Offer, E.M., Sistonen, J. et al. 2015. Polymorphisms in MIR27A Associated with Early-Onset Toxicity in Fluoropyrimidine-Based Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*. 21:2038-2044.

Ashton, L.J., Gifford, A.J., Kwan, E. et al. 2009. Reduced folate carrier and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: associations with clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 23:1348–1351.

De Mattia, E., Toffoli, G. 2009. C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, challenge for antifolate and fluoropyridine-based therapy personalisation. *European Journal of Cancer*. 45: 1333-51.

Desmoulin, S.K., Hou, Z., Gangjee, A. et al. 2012. The human proton-coupled folate transporter. Biology and therapeutic applications to cancer. *Cancer Biol Ther*. 13:1355-1373.

Dweep, H., Sticht, C. et al. 2011. MiRWalk-Database: Prediction of posible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J Biomed Inform*. 44: 839-847.

Evans, W.E., Pharm, D., Relling, M.V. et al. 2015. Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 338: 499-506.

Faganel, K.B., Dolzan, V., Grabnar, I., Jazbec, J. 2010. Relationship of the reduced folate carrier gene polymorphism G80A to methotrexate plasma concentration, toxicity, and disease outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma*. 51:724–726.

Gong, J., Tong, Y., Zhang, H-M. et al. 2012. miRNASNP: a database of miRNA related SNPs and their effects on miRNA function. *BMC Bioinformatics*. 13:A2

Han, B.W., Feng, D.D., Li, Z.G. 2011. A set of miRNAs that involve in the pathways of drug resistance and leukemic stem-cell differentiation is associated with the risk of relapse and glucocorticoid response in childhood ALL. *Human Molecular Genetics*. 20: 4903-4915.

Hou, Z., Matherly, L.H. 2014. Biology of the Major Facilitative Folate Transporters SLC19A1 y SLC46A1. *Curr Top Membr*. 73: 175-204.

- Huang, L., Tissing, W.J., de Jonge, R., van Zelst, B.D., Pieters, R. 2008. Polymorphisms in folate-related genes: association with side effects of high-dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 22:1798–1800.
- Imanishi, H., Okamura, N., Yagi, M. et al. 2007. Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. *J. Hum. Genet.* 52: 166-171.
- Inaba, H., Greaves, M., Mullighan, C.G. 2013. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 381: 1943-1955.
- Laverdiere, C., Chiasson, S., Costea, I. et al. 2002. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100:3832–3834.
- Lee, W., Glaeser, H., Smith L.H. et al. 2005. Polymorphisms in Human Organic Anion-transporting Polypeptide 1A2 (OATP1A2). *J Biol Chem*. 280:9610-9617.
- Lin J, Horikawa, Y, Tamboli, P. et al. 2010. Genetic variations in microRNA-related genes are associated with survival and recurrence in patients with renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 31:1805-1812.
- Lin, M., Gu, J., Eng, C. et al. 2012. Genetic polymorphisms in microRNA-related genes as predictors of clinical outcomes in colorectal adenocarcinoma patients. *Clin Cancer Res*. 18: 3982-3991.
- Lopez-Lopez, E., Ballesteros, J., Piñan, M.A. 2013. Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenetics and Genomics*. 23: 53-61.
- Lopez-López, E., Gutierrez-Camino, Á., Bilbao-Aldaiturriaga, N. et al. 2014. Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics*. 15: 1383-1398.
- López-López, E., Martín-Guerrero, I., Ballesteros, J., et al. 2011. Polymorphisms of the SLCO1B1 Gene Predict Methotrexate-Related Toxicity in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr. Blood Cancer*. 57: 612-619.
- Matherly, L.H., Wilson, M.R., Hou, Z. 2014. The Major Facilitative Folate Transporters Solute Carrier 19A1 and Solute Carrier 46A1: Biology and Role in Antifolate Chemotherapy of Cancer. *Drug Metabolism and Disposition*. 42: 632-649.
- McDonagh, E.M., Whirl-Carrillo, M., Garten, Y. et al. 2011. From pharmacogenomic knowledge acquisition to clinical applications: the PharmGKB as a clinical pharmacogenomic biomarker resource. *Biomark Med*. 5: 795-806.
- Pui, C.H. 2010. Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Formos Med Assoc*. 109:777-787

- Radtke, S., Zolk, O., Renner, B. et al. 2013. Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 121:5145–5153.
- Rukov, J.L., Shomron, N. 2011. MicroRNA pharmacogenomics: Post-transcriptional regulation of drug response. *Trends in Molecular Medicine*. 17: 412-423.
- Rukov, J.L., Wilentzik, R., Jaffe, I. et al. 2014. Pharmaco-miR: linking microRNAs and drug effects. *Briefings in Bioinformatics*. 15: 648-659.
- Ryan, B.M., Robles, A.I., Harris, C.C. 2010. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nature Review Cancer*. 10:389-402.
- Salazar, J. Altés, A., Del Río, E., et al. 2012. Methotrexate consolidation treatment according to pharmacogenetics of MTHFR ameliorates event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenomics Journal*. 12: 379-385.
- Sambrook, J., Russell, D. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. *CSHL Press: Cold Spring Harbor*. 6:4-12.
- Sana, J., Faltejškova, P., Svoboda, M. et al. 2012. Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *Journal of Translational Medicine*. 10:103.
- Schotte, D., De Menezes, R.X. et al. 2011. MicroRNA characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 98: 703-711.
- Shimasaki, N., Mori, T., Samejima, H. et al. 2006. Effects 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*. 28:64–68.
- Song, B., Wang, Y., Titmus, M.A. et al. 2010. Molecular mechanism of chemoresistance by miR-215 in osteosarcoma and colon cancer cells. *Molecular Cancer*. 9:96
- Suthandiram, S., Gan G.G., Zain, S.M. et al. 2014. Effect of polymorphisms within methotrexate pathway genes on methotrexate toxicity and plasma levels in adults with hematological malignancies. *Pharmacogenomics*. 15:1479-1494.
- Treon, S.P., Chabner, B.A. 1996. Concepts in use of high-dose methotrexate therapy. *Clinical Chemistry*. 42: 1322-1329.
- Widemann, B.C., Adamson, P.C. 2006. Understanding and Managing Methotrexate Nephrotoxicity. *The Oncologist*. 11: 694-703.
- Yamakawa, Y., Hamada, A., Shuto, T. et al. 2011. Pharmacokinetic Impact of SLCO1A2 Polymorphisms on Imatinib Disposition in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Pharmacol Ther*. 90: 157-163.
- Yu, X., Dhakal, I.B., Beggs, M. et al. 2010. Functional Genetic Variants in the 3'-Untranslated Region of Sulfotransferase Isoform 1A1 (SULT1A1) and Their Effect on Enzymatic Activity. *Toxicological Sciences*. 118:391-403.

6. ANEXOS

Tabla anexa 1. Resultados de toxicidad en pacientes cuya dosis de MTX es de 5g/m². Se indican resaltados los resultados significativos

miRNA	Genotipo	Toxicidad Total			48h			72h			96h			48h y 72h		
		No Tox 44	Tox 46	Alelo riesgo Mod. OR Valor P	No Tox 52	Tox 33	Alelo riesgo Mod. OR Valor P	No Tox 46	Tox 41	Alelo riesgo Mod. OR Valor P	No Tox 55	Tox 26	Alelo riesgo Mod. OR Valor P	No Tox 54	Tox 31	Alelo riesgo Mod. OR Valor P
hsa-mir-5189 rs56292801 pre-maduro	GG	15 (37.5)	31 (67.4)	G	18 (37.5)	23 (69.7)	G	16 (38.1)	27 (65.9)	G	21 (41.2)	20 (76.9)	G	19 (38.0)	22 (71.0)	G
	AG	22 (55.0)	13 (28.3)	Dom. 0.29	26 (54.2)	9 (27.3)	Dom. 0.26	23 (54.8)	12 (29.3)	Dom. 0.32	26 (51.0)	5 (19.2)	Dom. 0.21	27 (54.0)	8 (25.8)	Dom. 0.25
	AA	3 (7.5)	2 (4.3)	0.005251	4 (8.3)	1 (3.0)	0.004003	3 (7.1)	2 (4.9)	0.01085	4 (7.8)	1 (3.8)	0.002388	4 (8.0)	1 (3.2)	0.003513
rs35613341 pre-maduro	CC	15 (37.5)	28 (60.9)	C	18 (37.5)	21 (63.6)	C	16 (38.1)	25 (61.0)	C	21 (41.2)	18 (69.2)	C	19 (38.0)	20 (64.5)	C
	CG	20 (50.0)	15 (32.6)	Dom. 0.39	23 (47.9)	11 (33.3)	Dom. 0.34	21 (50.0)	13 (31.7)	Dom. 0.39	23 (45.1)	7 (26.9)	Dom. 0.31	24 (48.0)	10 (32.3)	Dom. 0.34
	GG	5 (12.5)	3 (6.5)	0.02985	7 (14.6)	1 (3.0)	0.020058	5 (11.9)	3 (7.3)	0.03628	7 (13.7)	1 (3.8)	0.01869	7 (14.0)	1 (3.2)	0.01959
hsa-mir-6083 rs78790512 pre-maduro	GG	23 (57.5)	36 (78.3)	G	28 (58.3)	27 (81.8)	G	25 (59.5)	32 (78.0)	G	30 (58.8)	23 (88.5)	G	30 (60.0)	25 (80.6)	G
	AG	3 (32.5)	10 (21.7)	Dom. 0.38	16 (33.3)	6 (18.2)	Dom. 0.31	13 (31.0)	9 (22.0)	Dom. 0.41	17 (33.3)	3 (11.5)	Dom. 0.19	16 (32.0)	6 (19.4)	Dom. 0.36
	AA	4 (10.0)	0 (0.0)	0.03800	4 (8.3)	0 (0.0)	0.02288	4 (9.5)	0 (0.0)	0.06714	4 (7.8)	0 (0.0)	0.005089	4 (8.0)	0 (0.0)	0.04801
hsa-mir-5007 rs1572687 pre-maduro	CC	12 (30.0)	12 (26.1)	T	13 (27.1)	11 (33.3)	T	13 (31.0)	11 (26.8)	T	13 (25.5)	9 (34.6)	T	14 (28.0)	10 (32.3)	T
	CT	23 (57.5)	22 (47.8)	Rec. 2.47	29 (60.4)	11 (33.3)	Rec. 3.50	24 (57.1)	18 (43.9)	Rec. 3.06	32 (62.7)	6 (23.1)	Rec. 5.50	30 (60.0)	10 (32.3)	Rec. 4.03
	TT	5 (12.5)	12 (26.1)	0.1092	6 (12.5)	11 (33.3)	0.02456	5 (11.9)	12 (29.3)	0.04743	6 (11.8)	11 (42.3)	0.002814	6 (12.0)	11 (35.5)	0.01265
hsa-mir-604 rs2368392 pre-maduro	CC	29 (72.5)	26 (56.5)	T	35 (72.9)	16 (48.5)	T	30 (71.4)	22 (53.7)	T	36 (70.6)	12 (46.2)	T	36 (72.0)	15 (48.4)	T
	CT	10 (25.0)	18 (39.1)	Dom. 2.03	12 (25.0)	15 (45.5)	Dom. 2.86	11 (26.2)	17 (41.5)	Dom. 2.16	14 (27.5)	12 (46.2)	Dom. 2.80	13 (26.0)	14 (45.2)	Dom. 2.74
	TT	1 (2.5)	2 (4.3)	0.1217	1 (2.1)	2 (6.1)	0.02545	1 (2.4)	2 (4.9)	0.09321	1 (2.0)	2 (7.7)	0.03752	1 (2.0)	2 (6.5)	0.03302
hsa-mir-4792 rs11714172 pre-maduro	TT	19 (47.5)	15 (32.6)	G	23 (47.9)	9 (27.3)	G	20 (47.6)	12 (29.3)	G	24 (47.1)	5 (19.2)	G	24 (48.0)	8 (25.8)	G
	GT	11 (27.5)	24 (52.2)	Dom 1.87	13 (27.1)	21 (63.6)	Dom. 2.45	12 (28.6)	23 (56.1)	Dom. 2.20	15 (29.4)	17 (65.4)	Dom. 3.73	14 (28.0)	20 (64.5)	Dom. 2.65
	GG	10 (25.0)	7 (15.2)	0.15857	12 (25.0)	3 (9.1)	0.0590584	10 (23.8)	6 (14.6)	0.08466	12 (23.5)	4 (15.4)	0.014093	12 (24.0)	3 (9.7)	0.043984
hsa-mir-4432 rs243080 pre-maduro	TT	9 (23.1)	19 (43.2)	T	13 (27.7)	12 (38.7)	T	9 (22.0)	18 (46.2)	T	14 (28.6)	11 (44.0)	T	13 (26.5)	12 (41.4)	T
	CT	19 (48.7)	13 (29.5)	Dom. 0.39	22 (46.8)	9 (29.0)	Dom. 0.61	19 (46.3)	12 (30.8)	Dom. 0.33	21 (42.9)	6 (24.0)	Dom. 0.51	2 (44.9)	9 (31.0)	Dom. 0.51
	CC	11 (28.2)	12 (27.3)	0.05109	12 (25.5)	10 (32.3)	0.3082	13 (31.7)	9 (23.1)	0.02123	14 (28.6)	8 (32.0)	0.1881	14 (28.6)	8 (27.6)	0.1774
hsa-mir-4520a rs8078913 maduro	CC	12 (32.4)	18 (42.9)	T	14 (32.6)	12 (38.7)	T	13 (33.3)	15 (40.5)	T	17 (35.4)	9 (37.5)	T	15 (33.3)	11 (37.9)	T
	CT	22 (59.5)	17 (40.5)	Rec. 2.27	26 (60.5)	12 (38.7)	Rec. 3.89	23 (59.0)	15 (40.5)	Rec. 2.80	28 (58.3)	9 (37.5)	Rec. 5.00	27 (60.0)	11 (37.9)	Rec. 4.45
	TT	3 (8.1)	7 (16.7)	0.24642	3 (7.0)	7 (22.6)	0.05332	3 (7.7)	7 (18.9)	0.1436	3 (6.2)	6 (25.0)	0.02815	3 (6.7)	7 (24.1)	0.03361
hsa-mir-4268 rs4674470 pre-maduro	TT	31 (77.5)	26 (56.5)	C	35 (72.9)	20 (60.6)	C	31 (73.8)	24 (58.5)	C	36 (70.6)	16 (61.5)	C	35 (70.0)	20 (64.5)	C
	CT	9 (22.5)	15 (32.6)	Dom. 2.65	12 (25.0)	11 (33.3)	Dom. 1.75	11 (26.2)	13 (31.7)	Dom. 2.00	13 (25.5)	9 (34.6)	Dom. 1.50	14 (28.0)	9 (29.0)	Dom. 1.28
	CC	0 (0.0)	5 (10.9)	0.03814	1 (2.1)	2 (6.1)	0.2454	0 (0.0)	4 (9.8)	0.14009	2 (3.9)	1 (3.8)	0.4255	1 (2.0)	2 (6.5)	0.6084