

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología molecular

IMPLICACIÓN DE rs924607 DEL GEN *CEP72* Y LA NEUROTOXICIDAD ASOCIADA A LA VINCRIPTINA EN DE LEUCEMINA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA)

Autor:

Beatriz De Vicente Martínez

Directora:

Dra. África García-Orad Carles

Co-Directora:

Dra. Idoia Martín Guerrero

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA INFANTIL	1
1.2. TRATAMIENTO DE LA LLA-B INFANTIL: LAL/SHOP- 94/99/2005....	1
1.3. FARMACOGENÉTICA	2
1.4. <i>CEP72</i> : PROTEÍNA CENTROSOMAL DE 72kDa.....	4
1.5. HIPÓTESIS	5
1.6. OBJETIVO	5
2. DESARROLLO.....	6
2.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
2.1.1. Pacientes.....	6
2.1.2. Tratamiento y evaluación de la toxicidad	6
2.1.3. Genotipado del SNP rs924607	7
2.1.4. Análisis estadístico.....	8
2.2. RESULTADOS	8
2.2.1. Características de los pacientes.....	8
2.2.2. Éxito del genotipado	9
2.2.3. Asociación del genotipo de rs924607 de <i>CEP72</i> con la toxicidad	9
2.3. DISCUSIÓN.....	11
3. CONCLUSIONES.....	12
3.1. CONCLUSIÓN	12
3.2. HIPÓTESIS PARA FUTUROS TRABAJOS	12
4. BIBLIOGRAFÍA.....	12

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA INFANTIL

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es el cáncer pediátrico más común que supone, aproximadamente, el 25% de todos los casos de cáncer infantil (Koppen *et al.*, 2010; Jonston *et al.*, 2010), y es una importante causa de muerte en niños menores de 15 años (Mullighan, 2011). Es una neoplasia de linfoblastos B o T, con afección a médula ósea y/o a sangre periférica. La adquisición de una serie de anormalidades genéticas por el precursor linfocítico altera su proceso de maduración normal, lo que lleva a la detención de la diferenciación y la proliferación de la célula transformada. Como consecuencia, hay una acumulación de clones de células B o T inmaduras. El 80-85% de todas las LLA son de linaje de células B (LLA-B) (Swerdlow *et al.*, 2008).

Una de las principales características de la LLA-B es su gran heterogeneidad, con marcadas diferencias entre individuos en el diagnóstico, en el comportamiento clínico y la respuesta a los quimioterápicos. En las últimas décadas, los avances terapéuticos han sido espectaculares, logrando aumentar la tasa de supervivencia de un 10% a un 80%. Estos avances son debidos, en parte, a la aplicación de protocolos de tratamiento estandarizados (Hunger *et al.*, 2013). Sin embargo, en algunos casos es necesario detener el tratamiento ya que algunos pacientes experimentan toxicidad, la cual puede llegar a causar la muerte. Por ello, uno de los retos de la medicina actual es encontrar marcadores que permitan ajustar el tratamiento desde el principio.

1.2. TRATAMIENTO DE LA LLA-B INFANTIL: LAL/SHOP- 94/99/2005

Uno de los protocolos más utilizados en el tratamiento de LLA infantil es el aprobado por la Sociedad de Hematología y Oncología Pediátrica, LAL/SHOP.

En él se clasifican a los pacientes en riesgo estándar (RE), alto riesgo (AR) y muy alto riesgo (MAR) en función de varios criterios como la edad, inmunofenotipo, citogenética, densidad de leucocitos sanguíneos, etc. El tratamiento consta de 3 o 4 fases sucesivas dependiendo del riesgo: inducción, consolidación, intensificación y mantenimiento. Uno de los fármacos más importantes en el tratamiento de la LLA-B es la vincristina (VCR).

La VCR ejerce su efecto citotóxico reclutando dímeros $\alpha\beta$ -tubulina y, de esta forma, interfiriendo en la formación de microtúbulos y en la dinámica del huso mitótico; así inhibe la mitosis y provoca la muerte celular (<http://smpdb.ca/view/SMP00437>). Sin embargo, tiene un efecto limitante debido a que puede causar neurotoxicidad, más concretamente neuropatía periférica. Esta neuropatía se debe a que la VCR impide la polimerización de los microtúbulos de la parte axonal de los nervios (Hartman *et al.*, 2009). De esta forma dificulta el transporte axonal y el resto de las funciones básicas celulares mediadas por los microtúbulos. La neuropatía asociada a la VCR se caracteriza por disfunciones sensoriales y motoras (deterioro de la destreza manual, del equilibrio y de los reflejos tendinosos profundos y alteración de la marcha) que pueden llegar a ser muy incapacitantes (Diouf *et al.*, 2015).

Algunos pacientes tratados con VCR experimentan esta neurotoxicidad, y es necesario interrumpir el tratamiento lo que disminuye sus probabilidades de supervivencia (Egbelakin *et al.*, 2011). Uno de los retos de la medicina actual es predecir qué pacientes van a sufrir toxicidad y de ese modo poder ajustar el tratamiento. Sin embargo, a día de hoy, no existen marcadores para predecir qué pacientes van a sufrir la neurotoxicidad debida a la VCR.

Las diferencias interindividuales en la respuesta a fármacos se deben en gran parte a características propias del individuo. En esta línea se centran los trabajos de farmacogenética.

1.3. FARMACOGENÉTICA

La farmacogenética tiene como objetivo predecir qué fármacos y dosis serán los más efectivos y seguros para cada paciente. Se basa en el estudio de variantes genéticas comunes de genes implicados en la absorción, distribución, metabolismo o excreción (farmacocinética) o en los efectos farmacológicos (farmacodinámica) (Paugh *et al.*, 2010). Una de las variantes genéticas más estudiadas son los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés). Hoy en día, los genes implicados en el metabolismo y transporte de fármacos se determinan por medio de la bibliografía y las bases de datos disponibles (PharmGKB: <https://www.pharmgkb.org/>)

Hasta el momento, que nosotros conozcamos, se han llevado a cabo seis estudios farmacogenéticos en relación a la toxicidad de la VCR en pacientes con LLA. Cinco de estos estudios analizan el gen de la enzima encargada del metabolismo de los derivados de la vinca (subclase CYP3A del citocromo P450 (CYP)). De entre ellos Egbelakin *et al.* (2011) y Renbarger *et al.* (2008) estudiaron la asociación entre los niveles de expresión del gen *CYP3A5* (encargado del 55-59% del metabolismo de la VCR (Deminson *et al.* (2006)) en 107 y 113 pacientes, respectivamente, y la neurotoxicidad asociada a la VCR. Ambos grupos observaron que los pacientes con una mayor tasa de expresión de *CYP3A5* experimentan, de manera significativa menor daño neuropático asociado a la VCR ($p=0,04$ y $p=0,007$, respectivamente). Moore *et al.* (2011), Hartmann *et al.* (2009) y Ceppi *et al.* (2014) estudiaron la asociación entre el polimorfismo rs776746 del gen *CYP3A5* y la neurotoxicidad asociada a la VCR, en 50, 34 y 339 pacientes, ninguno de ellos encontró una asociación significativa ($p=\text{sin dato}$, $p=0,49$ y $p=0,3$, respectivamente).

Hartman *et al.* (2009) también estudiaron la asociación entre la neurotoxicidad debida a la vincristina, y el haplotipo de *MAPT* y el genotipo de los SNPs rs1128503, rs2032582 y rs1045642 del gen *ABCB1*. No encontraron una asociación significativa de la neurotoxicidad con ninguna de estas variantes. Ceppi *et al.*, además del polimorfismo rs776746 del gen *CYP3A5*, estudiaron otros SNPs en los genes *ABCB1*, *ACTG1*, *CAPG*, *MAP4* y *TUBB*. Este grupo encontró que el alelo T de rs4728709 del gen *ABCB1* ($p=0,01$), el alelo G de rs1135989 del gen *ACTG1* ($p=0,02$), el alelo G de rs229668 del gen *CAPG* ($p=0,04$) y el alelo C de rs3770102 del gen *CAPG* ($p=0,03$) están asociados, de manera significativa, con un aumento en el riesgo de la neurotoxicidad asociada a la VCR.

En un reciente estudio de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) en el que se analizó el genoma de 321 pacientes de LLA en tratamiento con VCR, encontraron cinco SNPs asociados significativamente con la neurotoxicidad asociada a la VCR. (Diouf *et al.*, 2015). El resultado más significativo fue la asociación del genotipo TT del SNP rs924607 con un aumento en el riesgo y severidad de la neurotoxicidad relacionada con la VCR durante la etapa de continuación ($p=0,0004$). Este resultado es muy interesante, ya que el SNP rs924607 se encuentra en la región

promotora de la proteína centrosomal de 72kDa (*CEP72*, por sus siglas en inglés) que está claramente implicada en la polimerización de los microtúbulos, diana de la VCR.

1.4. *CEP72*: PROTEÍNA CENTROSOMAL DE 72kDa

A priori, el gen *CEP72* es un buen gen candidato para el estudio de neurotoxicidad asociada a la VCR. Este gen codifica una proteína centrosomal esencial en la formación de microtúbulos.

La proteína *cep72* interacciona con la γ -tubulina y es esencial en el proceso de nucleación y polimerización del microtúbulo (Oshimori *et al.*, 2009). Como ya se ha comentado anteriormente, la VCR actúa reclutando dímeros $\alpha\beta$ -tubulina e impide la polimerización del microtúbulo, por lo que la asociación entre unos niveles bajos de expresión de *CEP72* y la neurotoxicidad asociada a la VCR podría deberse a un efecto aditivo que resultase en una disminución de polimerización de microtúbulos. (**Figura 1**)

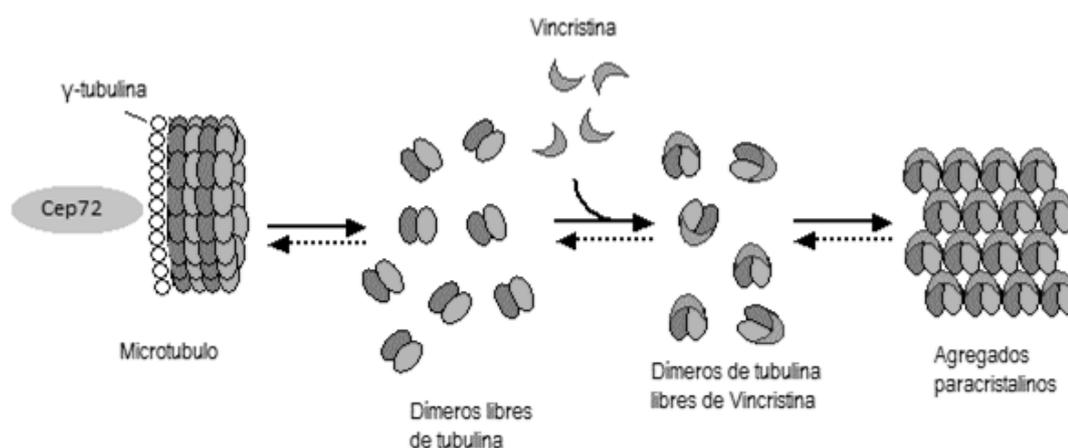


Figura 1 Esquema del mecanismo de acción de la vincristina y de *cep72*. Imagen adaptada de *Newcastle University Staff Publishing* (<https://www.staff.ncl.ac.uk/i.r.hardcastle/antibiotics.html>)

Diouf *et al.* (2015) encontraron que los pacientes homocigóticos para el alelo T del SNP rs924607, localizado en la región promotora del gen *CEP72*, presentan una expresión significativamente menor del ARNm (en comparación con los heterocigotos o con los homocigotos para el alelo salvaje C). Además determinaron mediante varios estudios funcionales y en diferentes líneas celulares que un nivel bajo de expresión del

gen *CEP72* está relacionado con una mayor sensibilidad a la VCR. Por último, describieron que la variante T en el SNP rs924607 genera un sitio de unión para el factor de transcripción NKX-6.3 (represor). Por tanto, la existencia del alelo T promueve la unión de NKX-6.3 disminuyendo así la expresión del ARNm de *CEP72*.

El genotipo TT de *CEP72* puede ser un potencial marcador de la neurotoxicidad asociada a la VCR. Sin embargo, hay que tener en consideración que existen diferencias en el número y concentración de las dosis administradas entre los distintos protocolos. En consecuencia, la posible aplicabilidad debe ser confirmada en otras cohortes y para diferentes tratamientos.

1.5. HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, la hipótesis de este trabajo es que el polimorfismo rs924607 en el gen *CEP72* podría ser un marcador general de neurotoxicidad de la VCR.

1.6. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es validar la asociación del SNP rs924607 y la toxicidad de la vincristina en una nueva cohorte de población española tratada de manera homogénea según el protocolo LAL/SHOP.

Para alcanzar este objetivo, marcaremos los siguientes objetivos concretos:

- Seleccionar una muestra de pacientes de LLA-B, todos ellos tratados homogéneamente con el protocolo LAL/SHOP
- Crear una base de datos disociada con los datos clínicos de dichos pacientes (edad, sexo, toxicidad, tratamiento)
- Determinar el genotipo de las muestras
- Determinar si existe asociación entre el SNP rs924607 y la neurotoxicidad durante la fase de inducción y en etapas posteriores.

2. DESARROLLO

2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1. Pacientes

Este es un estudio retrospectivo, en el que se incluyeron 142 niños españoles, caucásicos, todos ellos diagnosticados de LLA-B entre el 2000 y el 2011 en las unidades de oncología pediátrica de tres hospitales de referencia (Hospital Cruces, Hospital Donostia y Hospital La Paz). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes o de sus padres antes de la recogida de muestras. Se obtuvo la aprobación del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) de la Universidad del País Vasco.

2.1.2. Tratamiento y evaluación de la toxicidad

Todos los pacientes incluidos en este estudio fueron tratados siguiendo los protocolos españoles estándar LAL/SHOP 94/95/2005. Estos protocolos incluyen 4 dosis de vincristina ($1,5\text{mg}/\text{m}^2$) durante la inducción, y entre 6 y 16 dosis ($1,5\text{mg}/\text{m}^2$) en fases posteriores del tratamiento, con un total de entre 10 y 20 dosis.

Los datos de toxicidad se recogieron sin conocer el genotipo de los pacientes. La neurotoxicidad se evaluó de acuerdo a la versión 1.0 del Criterio de Terminología Común para los Efectos Adversos (CTCAE, de sus siglas en inglés). Los pacientes con grado 2, 3 y 4 se consideraron como casos de neuropatía. La neurotoxicidad se consideró en la fase de inducción, debido a que durante esta fase hay una alta homogeneidad en cuanto a la dosis administrada a los pacientes (4 dosis de $1,5\text{mg}/\text{m}^2$); y en fases posteriores del tratamiento (excepto en la consolidación, porque no se administra VCR). Se recopilaban de manera sistemática otros datos relevantes como la edad en el momento del diagnóstico, sexo, número de dosis de VCR y el grupo de riesgo.

2.1.3. Genotipado del SNP rs924607

El ADN genómico fue extraído de sangre periférica o de la médula ósea, de pacientes en remisión, usando el método de fenol-cloroformo descrito previamente (Sambrook y Russell, 2001). El ADN se cuantificó usando NanoDrop™.

El genotipado del SNP rs924607 se llevó a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) alelo específica utilizando 25ng de ADN. Este tipo de PCR se basa en la amplificación de la región en la que se sitúa el polimorfismo mediante el uso de dos parejas de cebadores, que permiten diferenciar cada uno de los alelos. Los cebadores empleados se diseñaron mediante la herramienta bioinformática Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Las características de los cebadores están recogidas en la **Tabla 1**. La mezcla de reacción consistió en DNTPs (0,2mM), MgCl₂ (2mM), ImmoBuffer (1X), cebadores (10pmol cada uno de ellos), polimerasa (IMMOLASE™) (0,5U) en un volumen final de 25µL.

El proceso de la reacción fue el siguiente: Una primera pre-incubación a 95°C durante 10 minutos para activar a la IMMOLASE™, y 35 ciclos de reacción que se dividen, a su vez en 3 etapas de 30 segundos cada una y que se caracterizan por la temperatura a la que tienen lugar: desnaturalización (95°C), hibridación (62°C) y extensión (72°C).

Los cebadores están diseñados de manera que se solapan en la ubicación del polimorfismo rs924607, pero cada pareja solo se une perfectamente a uno de los alelos. Cada una de las parejas tiene un cebador en sentido 5´- 3´ (Directo) y otro en sentido 3´- 5´ (Reverso). Además, los dos pares de cebadores están diseñados con el objetivo de que sus productos de PCR sean de una longitud significativamente diferente. De modo que el producto del amplificado consta de una banda no-alelo específica y la banda alelo-específica correspondiente al alelo del polimorfismo. Las características de los cebadores se especifican en la **Tabla 1**.

Tabla 1 Características de los cebadores empleados.

Alelo	Cebador	Secuencia	Tm	%GC	Tamaño producto (pb)
C	Directo	5´-GTTACGTGACGATCTGCACTC-3´	58	52	194
	Reverso	5´-TGGCTGTCTCCACTGACAAC-3´	60	55	
T	Directo	5´-TGCTTCTGAAGAGCCAGGAT-3´	60	55	220
	Reverso	5´-CCGAACACTCAGCATTCTTA-3´	59	50	

Abreviaturas: %GC: Porcentaje de bases C+G. pb: Pares de bases.

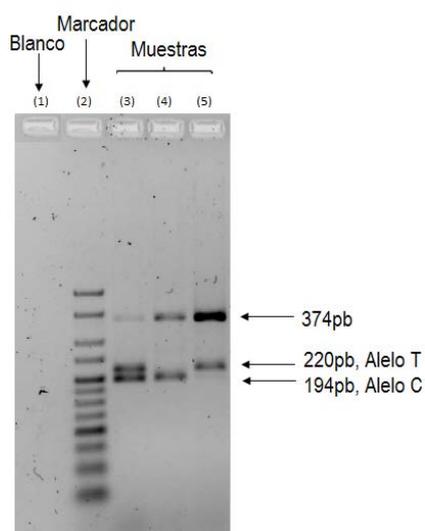


Figura 2. Resultados del genotipado de rs924607 en un gel de agarosa al 2%.

El producto del amplificado se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 2% (90V y una duración aproximada de una hora). El marcador empleado fue HyperLadder™ V. En el caso de los individuos homocigóticos para el alelo C se obtuvieron dos bandas de 194 y 374 pares de bases (pb) (calle 4), los individuos homocigóticos para el alelo T generaron dos bandas de 220 y 374 pb (calle 5) y los heterocigóticos obtuvieron tres bandas de 194, 220 y 374 pb (calle 3). La representación de las bandas en un gel de agarosa se muestra en la **Figura 2**.

2.1.4. Análisis estadístico

La asociación entre la neurotoxicidad y el polimorfismo genético se evaluó mediante χ^2 o el test exacto de Fisher. El efecto del riesgo se estimó mediante la razón de momios (RM) –en inglés, *odds ratio* (OR)- de una regresión logística univariable. Se realizó un análisis para determinar la relación entre el genotipo de rs924607 y la neurotoxicidad total (grado 2-4) en la fase de inducción, la neurotoxicidad leve (grado 2) y grave (grado 3-4) durante la inducción y la neurotoxicidad en etapas posteriores (grado 2-4). Para determinar el posible efecto de diferentes covariables, –sexo, edad y número de dosis de vincristina recibidas-, en la neurotoxicidad se utilizaron regresiones logísticas univariadas y multivariadas. En todos los casos el nivel de significancia se instauró en un 5%. Los análisis se realizaron empleando el programa informático R v3.1.1 (*The R foundation for Statistical Computing*).

2.2. RESULTADOS

2.2.1. Características de los pacientes

Las características de la población estudiada se muestran en la **Tabla 2**. La neurotoxicidad producida por la VCR no mostró una asociación significativa con ninguna de las covariables analizadas: edad en el momento del diagnóstico ($p=0,51$),

sexo ($p=0,34$) y número de dosis de VCR recibidas ($p=0,07$). Por ello, no incluimos estas covariables en los subsiguientes análisis de asociación.

Tabla 2 Características de la población de estudio

Características	No total (%) de pacientes (N=142)	No. Pacientes con neuropatía provocada por Vincristina	Valor P
Edad en el diagnóstico (años)			
<1	1 (0,7)	0	0,51
1-10	124 (87,9)	31	
>10	16 (11,3)*	5	
Sexo No. (%)			
Niños	81 (57)	23	0,34
Niñas	61 (43)	13	

* No se consiguió el dato de la edad de 1 paciente.

2.2.2. Éxito del genotipado

El éxito en la determinación del genotipo fue del 100%. Se obtuvo satisfactoriamente el genotipo de las 142 muestras.

2.2.3. Asociación del genotipo de rs924607 de *CEP72* con la toxicidad

El 25,4% de los pacientes (36 de 142) desarrollaron neurotoxicidad durante la inducción, mientras que sólo el 4,2% (6 de 142) desarrollaron neurotoxicidad en fases posteriores del tratamiento.

En la etapa de inducción no se ha encontrado una asociación significativa entre el genotipo TT del SNP rs924607 y la toxicidad total ($p=0,5$), siendo las frecuencias alélicas iguales en ambas poblaciones ($p=1$). Tampoco se ha encontrado asociación entre el genotipo estudiado y la toxicidad grave ($p=0,76$). Así mismo, en fases posteriores del tratamiento, el genotipo de rs924607 y la neurotoxicidad no presentan asociación ($p=0,68$). Sin embargo, debido al escaso número de pacientes que presentaron neurotoxicidad en las fases posteriores este resultado puede ser poco representativo (**Tabla 3**).

Tabla 3 Estudio de asociación de *CEP72* rs924607 y la Neurotoxicidad relacionada con la vincristina.

Genotipo	Total n (%)	Neurotoxicidad en la inducción							Neurotoxicidad en fases posteriores del tratamiento			
		G 0-1 n (%)	G 2-4 n (%)	P (G 0-1 vs 2-4)	RM (95% IC)	G 3-4 n (%)	P (G 0-1 vs 3-4)	RM (95% IC)	G 0-1 n (%)	G 2-4 n (%)	P (G 0-1 vs 2-4)	RM (95% IC)
CC	46 (32,4)	35 (33)	11 (30,6)		Recesivo	1 (16,7)		Recesivo	43 (31,6)	3 (50)		Recesivo
CT	80 (56,3)	58 (54,7)	22 (61,1)	0,5	0,65 (0,17-2,43)	4 (66,7)	0,76	1,43 (0,15-13,23)	78 (57,4)	2 (33,3)	0,68	1,61 (0,18-14,7)
TT	16 (11,3)	13 (12,3)	3 (8,3)			1 (16,7)			15 (11)	1 (16,7)		
C	172 (60,6)	128 (60,4)	44 (61,1)			6 (50)			164 (77,4)	8 (66,7)		
T	112 (39,4)	84 (39,6)	28 (38,9)	1	0,96 (0,53-1,73)	6 (50)	0,55	1,52 (0,39-5,89)	108 (22,6)	4 (33,3)	0,76	0,75 (0,16-2,92)

Abreviaturas: RM: Razón de momios; IC: Intervalo de confianza; P: valor de significancia; G: grado de toxicidad

2.3. DISCUSIÓN

En este trabajo, no hemos encontrado una asociación significativa entre el genotipo de rs924607 en *CEP72* y la neurotoxicidad relacionada con la vincristina en la cohorte española de LLA-B tratada según el protocolo LAL/SHOP durante ninguna de las fases de tratamiento.

Estos resultados difieren de los obtenidos por Diouf *et al.*, (2015) quienes detectaron asociación entre el genotipo TT de rs924607 y la toxicidad periférica inducida por VCR durante el tratamiento de continuación. Cuando nosotros analizamos la neurotoxicidad en fases del tratamiento posteriores a la inducción encontramos que sólo el 4,23% de los pacientes desarrollan neurotoxicidad frente al 26,79% de los pacientes del estudio de Diouf *et al.* (2015). Esta diferencia en cuanto al porcentaje de pacientes que desarrollan neurotoxicidad puede deberse a que existen diferencias en el protocolo de tratamiento. En el estudio de Diouf *et al.* (2015) los pacientes pertenecían a dos cohortes diferentes tratadas con los protocolos St Jude Total XIII B (Pui *et al.* (2004) y Kishi *et al.* (2007)) y COG AALL0433 (<https://clinicaltrials.gov/show/NCT00381680>), que administran un número total de 36 y 39 dosis de VCR (1,5mg/m²). Sin embargo, en el protocolo seguido en nuestro estudio, LAL/SHOP, el número de dosis totales de VCR es de entre 10 y 20 (1,5mg/m²). Por otra parte, el escaso número de pacientes de nuestra cohorte que desarrollan neurotoxicidad en esta fase, puede ser causa de que no se alcance el poder estadístico suficiente para detectar asociación. Por ello, nuestro estudio no puede contradecir ni confirmar el GWAS.

No obstante, en nuestro estudio, un gran número de pacientes (25,4%) sufren neurotoxicidad relacionada con la VCR durante la fase de inducción. Diouf *et al.* (2015) no aportan datos relacionados con esta fase, por lo que no podemos compararlo. En nuestro trabajo, al estudiar la asociación de rs924607 con la neurotoxicidad producida durante la inducción, no observamos una asociación significativa, ni con la neurotoxicidad total (grado 2-4), ni con la neurotoxicidad grave (grado 3-4). En este caso es probable que la falta de resultados significativos se deba a que la toxicidad durante la inducción este más relacionada con la cinética que con la dinámica del fármaco. Es decir, las diferencias en cuanto a la toxicidad provocada en los distintos

individuos, se puede deber a diferencias en la concentración del fármaco en las neuronas durante las primeras etapas del tratamiento. Por tanto, desde un punto de vista genético, las diferencias pueden estar presentes en los genes implicados en los procesos de absorción, distribución, transporte y metabolismo del fármaco.

3. CONCLUSIONES

3.1. CONCLUSIÓN

En base a los resultados obtenidos, no podemos usar el genotipo TT del SNP rs924607 del gen *CEP72* como biomarcador de la neurotoxicidad relacionada con la vincristina durante la fase de inducción.

3.2. HIPÓTESIS PARA FUTUROS TRABAJOS

El 25,4% de pacientes tratados según el protocolo LAL/SHOP sufren neurotoxicidad debida a la VCR durante la inducción. Considerando que esta se produce a las pocas horas del inicio del tratamiento, puede ser causada por genes implicados en la ruta farmacocinética de la vincristina. Por tanto, sería de gran interés buscar biomarcadores que puedan servirnos para predecir el riesgo o severidad de la toxicidad entre los genes implicados en esta ruta.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Ceppi, F., Langlois-Pelletier, C., Gagné, V., Rousseau, J., Ciolino, C., De Lorenzo, S., Kevin, K.M., Cijov, D., Sallan, S.E., Silverman, L.B., Neuberg, D., Kutok, J.L., Sinnett, D., Lavardièrre, C., Krajinovic, M. 2014. *Pharmacogenomics* 15 (8): 1105-1116.
- Dennison, J.B., Kulanthaivel, P., Barbuch, R.J., Renbarger, J.L., Ehlhardt, W.J., Hall, S.D. 2006. Selective metabolism of vincristine in vitro by CYP3A5. *Drug Metab Dispos.* 34(8):1317-27.
- Diouf, B., Crews, K.R., Lew, G., Pei, D., Cheng, C., Bao, J., Zheng, J.J., Yang, W., Fan, Y., Wheeler, H.E., Wing, C., Delaney, S.M., Komatsu, M., Paugh, S.W., McCorkle, J.R., Lu, X., Winick, N.J., Carroll, W.L., Loh, M.L., Hunger, S.P., Devidas, M., Pui, C., Dolan, M.E., Relling, M.V., Evans, W.E. 2015. Association of an inherited genetic variant with vincristine-related peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia. *JAMA.* 313(8):815-823.
- Egbelakin, A., Ferguson, M.J., MacGill, E.A., Leheman, A.S., Topletz, A.R., Quinney, S.R., Li, L., McCammack, K.C., Hall, S.D., Renbarger, J.L. 2011. Increased risk of

vincristine neurotoxicity associated with low CYP3A5 expression genotype in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 56(3): 361-367.

Hartman, A., van Schaik, R.H.N., van der Heiden, I.P., Broekhuis, M.j.C., Meier, M., den Boer, M.L., Pieters, R. 2009. Polymorphisms in genes involved in vincristine pharmacokinetics or pharmacodynamics are not related to impaired motor performance in children with leukemia. *Leukemia Research* 34: 154-159.

Hunger, S.P., Loh, M.L., Whitlock, J.A., Winick, N.J., Carroll, W.L., Devidas, M., Raetz, E.A. 2013. COG Acute Lymphoblastic Leukemia Committee. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 60(6):957-63.

Johnston, W.T., Lightfoot, T.J., Simpson, J., Roman, E. 2010 Childhood cancer survival: a report from the United Kingdom Childhood Cancer Study. *Cancer Epidemiol*. 34(6):659-666.

Kishi, S., Cheng, C., French, D., Pei, D., Das, S., Cook, E.H., Hijjiya, N., Rizzari, C., Rosner, G.L., Frudakis, T., Pui, C.H., Evans, W.E., Relling, M.V. 2007 Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood*. 109(10):4151-4157.

Koppen, I.J., Hermans, F.J., Kaspers, G.J. 2010 Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 148(1):3-14.

Moore, A.S., Norris, R., Price, G., Nguyen, T., Ni, M., George, R., van Breda, K., Duley, J., Charles, B., Pinkerton, R. 2011. Vincristine pharmacodynamics and pharmacogenetics in children with cancer: A limited-sampling, population modeling approach. *Journal of Pediatrics and Child Health*. 47: 875-882.

Mullighan, C.G. 2011. Genomic profiling of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 24(4):489-503.

Oshimori, N., Li, X., Ohsugi, M., Yamamoto, T. 2009. Cep72 regulates the localization of key centrosomal proteins and proper bipolar spindle formation. *EMBO J*.; 28(14):2066-76.

Paugh, S.W., Stocco, G., Evans, W.E. 2010. Pharmacogenomics in pediatric leukemia. *Curr Opin Pediatr*. 22(6): 703–710.

Pui, C.H., Sandlund, J.T., Pei, D., Campana, D., Rivera, G.K., Ribeiro, R.C., Rubnitz, J.E., Razzouk, B.I., Howard, S.C., Hudson, M.M., Cheng, C., Kun, L.E., Raimondi, S.C., Behm, F.G., Downing, J.R., Relling, M.V., Evans, W.E. 2004. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIIIB at St Jude Children's Research Hospital. *Blood* 104(9) 2690-2696.

Renbarger, J.L., McCammack, K.C., Rouse, C.E., Hall, S.D. 2008. Effect of Race on Vincristine-Associated Neurotoxicity in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *Pediatr Blood Cancer* 50: 769-771.

Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 ed. CSHL Press: Cold Spring Harbor, USA.

Swerdlov, S.H., Campo, E., Harris, N.L., 2008. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC.

Referencias de internet, bases de datos y herramientas informáticas:

U.S. National Institutes of Health. ClinicalTrials.gov:

<https://clinicaltrials.gov/show/NCT00381680>. Accedido en Junio 2015.

DrugBank 4.0.: <http://www.drugbank.ca/> Accedido en Junio 2015.

- Law, V., Knox, C., Djoumbou, Y., Jewison, T., Guo, A.C., Liu, Y., Maciejewski, A., Arndt, D., Wilson, M., Neveu, V., Tang, A., Gabriel, G. LyC., Adamjee, S., Dame, Z.T., Han, B., Zhou, Y., Wishart, D.S. 2014. Shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Res.*1;42(1):D1091-7.
- Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, Chang Z, Woolsey J. 2006. A comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 1;34(Database issue):D668-72.
- Wishart, D.S., Knox, C., Guo, A.C., Cheng, D., Shrivastava, S., Tzur, D., Gautam, B., Hassanali, M. 2008. A knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res.* 36(Database issue):D901-6.

Primer3 (v. 0.4.0): <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> Accedido en Abril 2015.

- Koressaar, T., Remm, M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3 *Bioinformatics* 23(10):1289-91
- Untergrasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15): e115

PharmaGKB: <https://www.pharmgkb.org/> Accedido en Junio 2015.

- Whirl-Carrillo, M., McDonagh, E.M., Hebert, J.M., Gong, L., Sangkuhl, K., Thorn, C.F., Altman R.B., Klein. T.E. 2012. Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 92(4): 414-417.

Small Molecule Pathway Database v2.0: <http://smpdb.ca/> Accedido en Junio 2015

- Frolikis, A., Knox, C., Lim, E., Jewison, T., Law V, Hau, D.D., Liu, P., Gautam, B., Ly, S., Guo, A.C., Xia, J., Liang, Y., Shrivastava, S., Wishart, D.S. 2010. SMPDB: The Small Molecule Pathway Database. *Nucleic Acids Res.* 38(Database issue):D480-7.
- Jewison, T., Su, Y., Disfany, F.M., Disfany, F.M., Liang, Y., Knox, C., Maciejewski, A., Poelzer, J., Huynh, J., Zhou, Y., Arndt, D., Djoumbou, Y., Liu, Y., Deng, L., Guo, A.C., Han, B., Pon, A., Wilson, M., Rafatnia, S., Liu, P., Wishart, D.S. 2014. SMPDB 2.0: Big Improvements to the Small Molecule Pathway Database *Nucleic Acids Res.* 42(Database issue):D478-84.