



Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal

Tesis doctoral

**Implicación de los polimorfismos genéticos en la
neurotoxicidad por Vincristina en pacientes pediátricos
diagnosticados de Leucemia Linfoblástica Aguda**

Aizpea Beatriz Echebarria Barona

Leioa, 2016

A mis padres y mi hermano

A Cata y Begoña

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna forma me han ayudado en la elaboración de esta tesis:

A la Dra Aurora Navajas, por sus incansables ánimos para la realización de este trabajo, que sin su estímulo no hubiera podido llevar a cabo. Le agradezco todo lo que nos ha enseñado durante todos estos años, su cariño, paciencia, preocupación e inagotable dedicación al cuidado de los pacientes y a la investigación.

A la Dra África García-Orad, por su dedicación y ánimos en el desarrollo de este trabajo. Gracias por todo el tiempo y recursos utilizados, por todo lo que me ha enseñado y por la oportunidad de integrarme en su equipo y conocer el laboratorio.

Al increíble equipo del Departamento de Genética, en especial a las Dras Idoia Martin, Angela Gutiérrez, Elixabet López y Nerea Bilbao, sin vuestra inestimable ayuda este trabajo no hubiera salido adelante. Habéis sido mis ojos y mis manos en la realización de los análisis genéticos. Gracias por vuestros ánimos y por todos los momentos vividos. Muchas gracias también por todo lo que me habéis enseñado, tanto en lo profesional como en lo personal.

A las Dras Purificación García-Miguel del Hospital La Paz y Nagore García de Andoin del Hospital Donostia y al Dr José Sánchez de Toledo del Hospital Vall d'Hebron, por su inestimable ayuda y contribución en la recogida de datos de los pacientes.

Al Dr Luis Sierrasésúmag, por descubrirme el mundo de la Oncología Pediátrica. Agradezco a todo el Departamento de Pediatría de la Clínica Universidad de Navarra, por todo su apoyo y cariño, en especial a mis compañeros de residencia: Mirella, Azucena, Patricia, Ana, Elena, Sergio, David, Marta S, Marta M, Moira, Veva, Ainhoa e Isabel.

Al Dr Luis Madero, por contribuir de forma decisiva a mi dedicación a la Oncología Pediátrica. Muchas gracias a su equipo del Hospital Niño Jesús de Madrid, por lo bien que me cuidaron y lo mucho que me enseñaron durante mi rotación.

A las Dras Itziar Astigarraga y Ana Fernández-Teijeiro, por su cariño e inestimable ayuda y apoyo, tanto en mis inicios como a lo largo de estos años en la Unidad de Oncología Pediátrica del Hospital de Cruces. Les agradezco lo mucho que me han enseñado tanto en lo profesional como en lo personal.

A la Dra Rosa Adán y los Dres Miguel García-Ariza y Ricardo López-Almaraz, agradezco ser parte de este equipo y poder trabajar con vosotros. Muchas gracias por vuestro cariño, ayuda y apoyo, especialmente durante los últimos meses y también por enseñarme que las cosas pueden cambiar.

A Leire Collazos, por su cariño, su comprensión y por la gran labor que desempeña con los niños, sus familias y el equipo.

A todo el personal de enfermería y auxiliares de la planta y Hospital de Día de la Unidad de Oncología Infantil del Hospital de Cruces, por su apoyo, por su cariño y su admirable dedicación al cuidado de los niños y sus familias.

A todos los especialistas del equipo multidisciplinar que colaboran con la Unidad de Oncología Pediátrica y a mis compañeros del Servicio de Pediatría, de los que aprendo cada día.

A la Dra Mari Angel Gil, por la inestimable ayuda que nos brinda todos los días con los tratamientos de quimioterapia y sus ánimos en la realización de este trabajo.

A mis padres, Pilar y Javier, por su cariño infinito, su apoyo, su generosidad y su comprensión, nunca podré compensarles todo lo que han hecho por mí. Agradezco de todo corazón que siempre estéis tan cerca.

A mi hermano Lander Mateo, imprescindible en mi vida, agradezco su cariño y sus ánimos en los momentos duros de este trabajo.

A Begoña y Catalina, junto con sus familias, por vuestro cariño, apoyo y los ánimos que me habéis dado en los momentos más difíciles. Sin vosotras este trabajo no hubiera salido adelante. A Sofía y María, gracias por vuestro cariño y por vuestra amistad sincera y verdadera que no entiende de distancias.

A todos mis amigos y a todas las personas que quiero y me quieren, gracias a todos por vuestro cariño, por los ánimos que me habéis dado, por los momentos compartidos y por recordarme cada día que lo bueno está siempre por vivir.

Por último me gustaría expresar mi gratitud y cariño a todos los niños y sus familias que he conocido durante los años que llevo trabajando en esta especialidad, a los que han salido adelante y a los que se han ido, por su admirable fortaleza y valentía y sobre todo por enseñarnos a apreciar las cosas importantes de la vida.

PUBLICACIONES

El trabajo de esta tesis ha sido reflejado en las siguientes publicaciones:

Gutierrez-Camino A, Martin-Guerrero I, Lopez-Lopez E, **Echebarria-Barona A**, Zabalza I, Ruiz I, Guerra-Merino I, Garcia-Orad A. Lack of association of the CEP72 rs924607 TT genotype with vincristine-related peripheral neuropathy during the early phase of pediatric acute lymphoblastic leukemia treatment in a Spanish population. *Pharmacogenetics and Genomics* 2015.

Lopez-Lopez E, Gutierrez-Camino A, Astigarraga I, Navajas A, **Echebarria-Barona A**, Garcia-Miguel P, Garcia de Andoin N, Lobo C, Guerra-Merino I, Martin-Guerrero I, Garcia-Orad A. Vincristine pharmacokinetics pathway and neurotoxicity during early phases of treatment in pediatric acute lymphoblastic leucemia. *Pharmacogenetics* 2016.

ABREVIATURAS

3UTR	Región 3' no traducida del gen
5UTR	Región 5' no traducida del gen
IC 95%	Intervalo de confianza del 95%
ABCB1	<i>ATP binding cassette subfamily B member 1</i>
ABCC1	<i>ATP binding cassette subfamily C member 1</i>
ABCC2	<i>ATP binding cassette subfamily C member 2</i>
ABCC3	<i>ATP binding cassette subfamily C member 3</i>
ABCC10	<i>ATP binding cassette subfamily C member 10</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARA-C	Citarabina
ARID5B	<i>AT rich interactive domain 5B</i>
ARMS-PCR	PCR alelo específica
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASO	Oligonucleótido alelo específico
ATP	Adenosín trifosfato
BAX	<i>BCL2 associated X protein</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
BMI 1	<i>BMI 1 proto-oncogene, polycomb ring finger</i>
CALLA	Antígeno común de LLA
CFM	Ciclofosfamida
CEBPE	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), epsilon</i>
CeGen-ISCIII	Centro Nacional de Genotipado
CEP72	<i>Centrosomal protein 72</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
COG	<i>Children Oncology Group</i>
COMMD3	<i>COMM domain containing 3</i>
CYP3A4	<i>Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4</i>
CYP3A5	<i>Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 5</i>
Dexa	dexametasona
DNR	Daunorrubicina
dNTs	Deoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diaminotetraacético
EMR	Enfermedad mínima residual
EpiADR	Epiadriamicina
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
GATA3	<i>GATA binding protein 3</i>
GJB1	<i>Gap junction protein beta 1</i>
GWAS	Estudio de asociación de genoma completo
H2O	Agua
IGF-I	<i>Insuline-like growth factor 1 (somatomedin C)</i>
IKZF1	<i>IKAROS family zinc finger 1</i>
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LSN	Límite superior normal
LSO	Oligonucleótido locus específico

MAF	Frecuencia del alelo menor
MAPT	<i>Microtubule associated protein</i>
6MP	Mercaptopurina
MDR1	<i>Multidrug resistance gene</i>
MgCl ₂	Cloruro magnésico
MO	Médula ósea
MTX	Metotrexato
NaCl	Cloruro sódico
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds ratio
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PharmaGKB	<i>Pharmacogenomic knowledge database</i>
PIP4K2A	<i>Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type 2 alpha</i>
PNET	Tumor neuroectodérmico primitivo
RALBP1	<i>RalA binding protein 1</i>
RETI	Registro Español de Tumores infantiles
RNTI	Registro Nacional de Tumores Infantiles
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEHOP	Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica
SIADH	Secreción inadecuada de hormona antidiurética
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismos de un solo nucleotido
SP	Sangre periférica
TIT	Triple intratecal
TPMT	Tiopurina S-metiltransferasa
Tris	Solución Tris(hidroximetil)aminometano
TUBB1	<i>Tubulin beta 1 class VI</i>
TUBB2A	<i>Tubulin beta 2A class IIa</i>
TUBB2B	<i>Tubulin beta 2B class IIb</i>
TUBB3	<i>Tubulin beta 3 class III</i>
TUBB4	<i>Tubulin beta 4 class IV</i>
UGT1A1	<i>UDP glucuronosyltransferase family 1 member A1</i>
VCR	Vincristina
VKORC1	<i>Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1</i>
VP-16	Etoposido

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN ***25***

1. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.....	27
1.1 Definición.....	27
1.2 Epidemiología.....	28
1.3 Etiología.....	30
1.4 Características clínicas.....	32
1.5 Diagnóstico.....	32
1.6 Factores pronóstico.....	33
1.7 Tratamiento.....	35
1.7.1 El tratamiento de la LLA en la Infancia: LAL/SHOP.....	35
1.7.2 Toxicidades derivadas del tratamiento de la LLA.....	38
2. VINCRISTINA.....	40
2.1 Farmacocinética y Farmacodinámia.....	42
2.2 Mecanismos de resistencia.....	44
2.3 Interacciones farmacológicas.....	44
2.4 Toxicidad.....	44
2.5 Factores que afectan a la toxicidad de la vincristina.....	46
3. FARMACOGENÉTICA.....	47
3.1 Farmacogenética en la LLA.....	50
3.1.1 Estudios de genes candidato.....	50
3.1.2 Estudios de genoma completo.....	52

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ***55***

HIPÓTESIS..... 57

OBJETIVOS..... 59

MATERIAL Y MÉTODOS ***61***

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO 63

2. TRATAMIENTO Y VALORACIÓN DE LA NEUROTOXICIDAD..... 64

3. SELECCIÓN DE GENES Y SNPS..... 65

4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS 66

 4.1 Extracción de ADN..... 66

 4.2 Cuantificación ADN y valoración calidad..... 67

5. GENOTIPADO DE SNPs 67

 5.1 Genotipado Goldengate® utilizando tecnología Veracode® 68

 5.2 Genotipado mediante ARMS-PCR 69

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS 71

7. ANEXO MATERIAL Y MÉTODOS 73

RESULTADOS ***81***

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO 83

2. ÉXITO DE GENOTIPADO..... 83

3. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN FARMACOCINÉTICA 85

 3.1 Polimorfismos asociados a neurotoxicidad en inducción 85

 Frecuencias genotípicas 85

 Frecuencias alélicas..... 89

 Frecuencias haplotípicas 91

 3.2 Polimorfismos asociados a neurotoxicidad durante el tratamiento 94

Frecuencias genotípicas	94
Frecuencias alélicas.....	98
Frecuencias haplotípicas	100
4. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN FARMACODINAMIA.....	102
4.1 Polimorfismos asociados a neurotoxicidad en inducción	103
Frecuencias genotípicas	103
Frecuencias alélicas.....	104
Frecuencias haplotípicas	105
4.2 Polimorfismos asociados a neurotoxicidad durante el tratamiento	106
Frecuencias genotípicas	106
Frecuencias alélicas.....	107
Frecuencias haplotípicas	107
4.3 Resultados del estudio de CEP72 y neurotoxicidad asociada a la vincristina.....	108
Éxito del genotipado	108
Asociación entre rs924607 y toxicidad por vincristina	108
5. ANEXO RESULTADOS.....	111

DISCUSIÓN ***133***

CONCLUSIONES ***147***

BIBLIOGRAFÍA ***151***

INTRODUCCIÓN

1. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

1.1. DEFINICIÓN

La **Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)** es la neoplasia más frecuente en la infancia. Se caracteriza por la transformación maligna de una célula progenitora linfoide inmadura que da lugar a una proliferación clonal incontrolada de células bloqueadas en un punto de su diferenciación (1). La adquisición por parte de estos precursores linfoides de una serie de anomalías genéticas, hace que se altere su proceso de maduración normal, produciendo una parada madurativa en su proceso de diferenciación y favoreciendo la proliferación de las células transformadas. En consecuencia, se produce una proliferación clonal de estas células inmaduras o blastos que invaden la médula ósea y la sangre periférica, produciendo un fracaso de la función medular e infiltración blástica de órganos y tejidos, principalmente nódulos linfáticos, hígado, bazo, sistema nervioso central y testes. Las LLAs pueden ser de estirpe B o T (Figura 1).

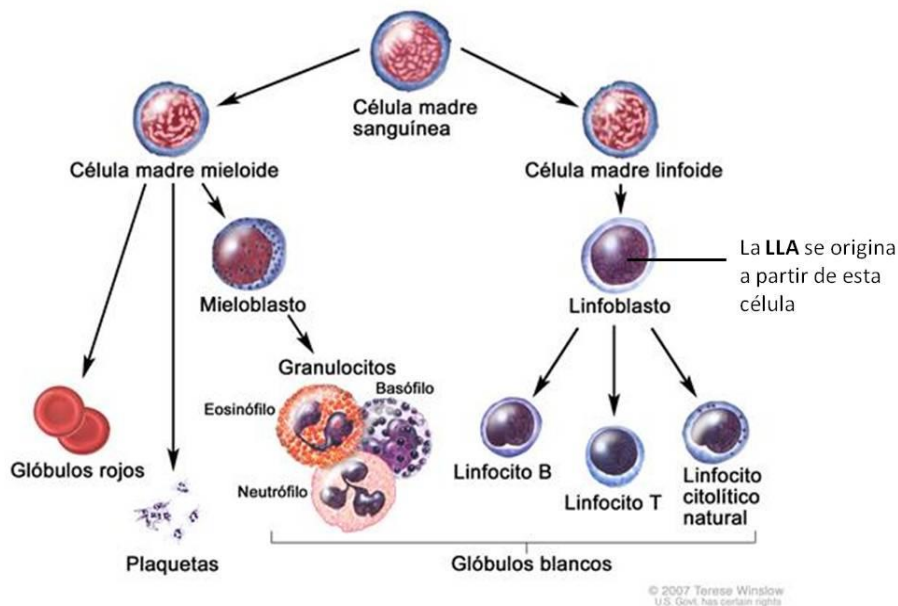


Figura 1. Evolución de una célula sanguínea. Adaptada de <http://www.cancer.gov>

INTRODUCCIÓN

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

La Leucemia representa la tercera parte de todos los casos de cáncer infantil (Figura 2). Aproximadamente un 75-80% de todas las leucemias agudas de la infancia son LLA. El 75% de los casos sucede en niños menores de 6 años y la máxima incidencia tiene lugar entre los 2 y 5 años de edad (2). Se estima que la incidencia mundial se encuentra en 1- 4,75/100.000/año (3, 4). Hay un ligero predominio en varones, sobre todo en la pubertad. También se han descrito diferencias geográficas y raciales. La LLA de estirpe B es más frecuente en países industrializados, representando el 85% de los casos en pacientes pediátricos (5). En poblaciones heterogéneas, se ha observado mayor incidencia de LLA en la raza caucásica respecto a la afroamericana. Los niños de origen hispano presentan mayor incidencia de LLA respecto a otros grupos, así como peores tasas de supervivencia (6).

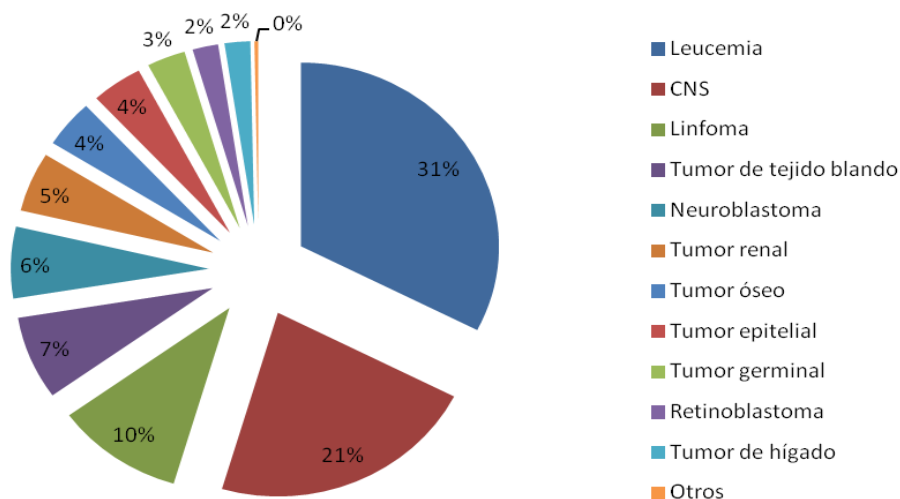


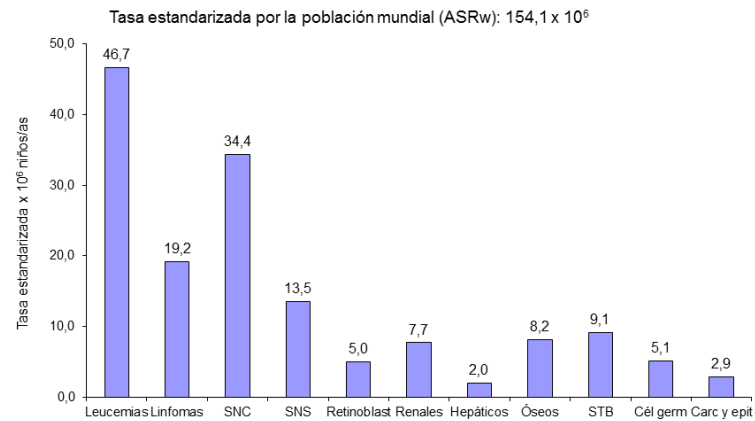
Figura 2. Incidencia del cáncer infantil (0-14 años) según el Registro Nacional de Cáncer SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) de 2009-2012.

Adaptado de <http://seer.cancer.gov/archive/publications/childhood/>

En España, según los datos del Registro Nacional de Tumores Infantiles (RNTI), se estima que la incidencia de leucemias en niños menores de 14 años es de un 46,7% (Figura 3) y la incidencia de la LLA es de un 36,6% (IC 95%: 34,7-38,6) (Informe RETI-SEHOP 1980-2015).

INCIDENCIA DEL CÁNCER INFANTIL EN ESPAÑA

2000-2014, 0-14 años, ambos sexos, excluidos no clasificables en la ICC-3



Fuente:
España RETI-SEHOP: área de alta cobertura: Aragón, Catalunya, Euskadi, Madrid y Navarra

Figura 3. Gráfica de la incidencia del cáncer infantil en España. Gráfica cedida por RETI-SEHOP.

Gracias a la intensificación de los tratamientos, fundamentalmente la combinación de diferentes agentes quimioterápicos y a la mejora de las medidas de soporte, la supervivencia global de esta enfermedad ha mejorado de forma importante en las últimas décadas, siendo en la actualidad mayor del 80%. En España, según datos del RNTI, se estima que la supervivencia a 5 años del diagnóstico ha aumentado notablemente de un 56% en los años 80 a un 83% en los últimos años (Informe RETI-SEHOP 1980-2015) (Figura 4).

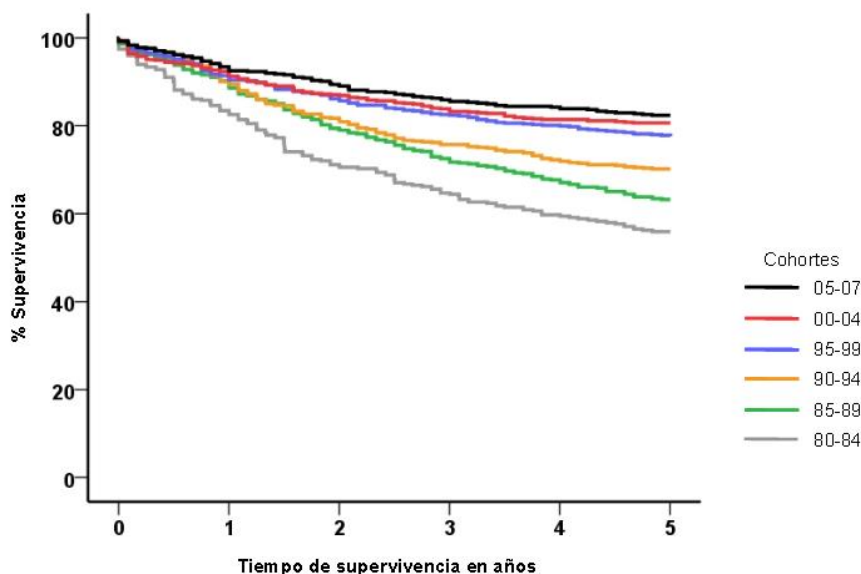


Figura 4. Supervivencia a 5 años del diagnóstico de pacientes diagnosticados de Leucemia Linfoblástica Aguda por cohorte de año de incidencia. Gráfica cedida por RETI-SEHOP.

1.3. ETIOLOGÍA

La LLA es una enfermedad heterogénea y su etiología es desconocida. Sin embargo, se han relacionado varios factores (a) genéticos, (b) virales y (c) ambientales.

- (a) **Los factores genéticos** tienen un papel cada vez más importante en la etiología de las leucemias agudas. Esta afirmación está basada en la alta frecuencia de LLA en niños con alteraciones genéticas constitucionales, como el síndrome de Down, la Anemia de Fanconi, el síndrome de Bloom o el de Klinefelter (7, 8). También se ha observado una cierta predisposición familiar para la leucemia. De hecho, la frecuencia de la leucemia aguda es mayor en los familiares de estos pacientes (2). Asimismo, se han descrito una serie de alteraciones genéticas estrechamente relacionadas con la LLA, como las translocaciones cromosómicas *E2A-PBX1*, *BCR-ABL*, *MLL-AF4* y *TEL-AML1* (9-12) (Tabla 1).

Tabla 1. Translocaciones cromosómicas más frecuentes en LLA

Translocación	Genes afectados	Frecuencia	Características clínicas
t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A/PBX1</i>	5-6%	Mal pronóstico, hiperleucocitosis, afección del SNC, fenotipo pre-B.
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL</i>	3-5%	Cromosoma Philadelphia. Muy mal pronóstico, hiperleucocitosis, mayor edad, fenotipo pre-B.
t(4;11)(q21;p23)	<i>MLL/AF4</i>	2%	Muy mal pronóstico, hiperleucocitosis, predominio en lactante y niño pequeño, fenotipo pre-pre-B.
t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL/AML1</i>	25% de las LLA pre-B	Pronóstico favorable.

Algunas de estas translocaciones han sido detectadas en el momento del nacimiento, sugiriendo el origen prenatal de algunos tipos de leucemias (13, 14). Finalmente, gracias a las nuevas técnicas utilizadas en la actualidad para el estudio del genoma completo (*genome wide association study* o GWAS) se han detectado una serie de polimorfismos genéticos (hereditarios) de la línea germinal relacionados con la patogénesis de la LLA infantil, como los descritos en los genes *ARID5B*, *IKZF1*, *CEBPE*, *CDKN2A*, *COMMD3/BMI 1*, *PIP4K2A* y *GATA3* (15-17). En los últimos años, los mecanismos epigenéticos están cobrando cada vez mayor importancia, como la metilación de promotores de ADN y la modificación de histonas. Estos mecanismos pueden alterar la transcripción con la consiguiente alteración de la expresión del gen implicado (18, 19).

b) En relación a **los factores virales**, actualmente no está muy claro el papel oncogénico de estas infecciones en el desarrollo de la LLA. La única asociación clara encontrada en pacientes pediátricos, se da entre el virus de Epstein-Barr y los casos endémicos de linfoma de Burkitt (LLA de células B o subtipo morfológico L3) (20). Existen dos hipótesis sobre el papel que tienen este tipo de infecciones en la etiología de la enfermedad: (1) Por un lado, se postula que el retraso en la exposición a infecciones comunes del sistema inmune inmaduro podría desencadenar una respuesta inmune descontrolada y este hecho, en presencia de células susceptibles, conduciría al desarrollo de LLA (21). (2) Por otro lado, se postula que las poblaciones previamente aisladas, por lo tanto inmunológicamente inmaduras, son más susceptibles de presentar una LLA cuando se exponen a ciertas infecciones específicas (22).

INTRODUCCIÓN

c) Entre **los factores medioambientales** que pueden facilitar el desarrollo de leucemias, destacan la exposición a determinadas quimioterapias, como las nitrosoureas, los alquilantes, o las epipodofilotoxinas y las radiaciones ionizantes (23-25). De hecho, tras la explosión de las bombas atómicas en Hiroshima y Nagasaki se observó una alta incidencia de leucemia entre los supervivientes (26). Aunque se han realizado diferentes estudios prospectivos observacionales, la búsqueda de una asociación entre la exposición a factores medioambientales con procesos oncológicos es complicada, así como obtener resultados consistentes. Entre estos estudios, se ha encontrado una asociación entre la exposición a pesticidas en el embarazo con el desarrollo de la LLA (27).

1.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La mayoría de los pacientes con LLA presentan signos y síntomas derivados de un fallo medular, por infiltración de la médula ósea por parte de los blastos y debido también a su extensión extramedular, dado que a pesar de ser una enfermedad de la médula ósea y sangre periférica, puede afectar cualquier órgano o tejido (1, 2). La duración de los síntomas puede ser de días o incluso meses. Estos signos y síntomas pueden presentarse de forma insidiosa o de forma brusca. La forma de presentación puede ser desde una alteración en la analítica de un paciente asintomático hasta un debut como una urgencia médica. Las manifestaciones más frecuentes al diagnóstico son la anemia, que se traduce en palidez y astenia; la trombopenia, que se manifiesta como petequias, equimosis o hemorragias (sobre todo cutáneas y mucosas); y la neutropenia, que aumenta el riesgo de infecciones, por lo que no es raro que la enfermedad debute como un episodio de fiebre sin causa infecciosa aparente. En ocasiones, estos pacientes presentan dolores óseos o artralgias debido a la infiltración de la médula ósea o incluso el hueso o la articulación, que retrasa el diagnóstico ya que confunde con procesos osteoarticulares, más comunes en los niños. En la exploración, es frecuente la presencia de hepatomegalia y esplenomegalia, así como adenopatías. El sistema nervioso central es otro lugar por el cual los blastos presentan predilección, así como los testículos en los niños.

1.5. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de sospecha en la LLA se realiza en la mayoría de los pacientes con un hemograma, donde habitualmente se detectará leucocitosis (aunque el número de leucocitos

puede ser normal o disminuido), junto con diferentes grados de anemia y trombopenia. En el frotis de sangre periférica al microscopio, pueden observarse células blásticas. Sin embargo, el diagnóstico definitivo de una LLA debe realizarse mediante el análisis morfológico, molecular y citogenético del aspirado de médula ósea (26). La presencia de al menos un 25% de blastos en la médula ósea confirmará el diagnóstico. En un porcentaje no desdeñable de casos, las células blásticas pueden estar ausentes, lo que obligará a repetir el aspirado con posterioridad (28). A continuación, el subtipo de LLA se definirá con los estudios morfológicos, inmunológicos, de biología molecular y citogenética de dicho aspirado (29). Esta clasificación tiene importantes implicaciones en el tratamiento y en el pronóstico de la enfermedad. Por ello, antes de aplicar el tratamiento más adecuado a cada paciente es obligatorio un estudio exhaustivo de todos los factores (10, 30, 31).

1.6. FACTORES PRONÓSTICO

Una de las principales características de esta enfermedad es su gran heterogeneidad, con grandes diferencias entre los pacientes al diagnóstico, en la evolución y en la respuesta a la quimioterapia. La estratificación del tratamiento por factores de riesgo y los avances en los tratamientos en cuidados intensivos, han mejorado el pronóstico de estos pacientes de manera significativa; de hecho, la supervivencia libre de eventos a los 5 años ha alcanzado el 80-90% (5). Esta clasificación al diagnóstico, basada en el riesgo de recaída, ha permitido evitar el exceso de tratamiento en ciertos pacientes, así como la administración de un tratamiento insuficiente en otros (30, 32, 33).

La estratificación del tratamiento según el riesgo ha sido posible gracias al estudio de factores pronóstico. En los últimos cincuenta años han sido muchos los factores analizados, lo que ha permitido incorporar nuevos factores pronóstico y desestimar otros que con el tiempo han perdido su significado estadístico. En la actualidad, los factores pronóstico más importantes a tener en cuenta son: la **edad**, el **número de leucocitos al diagnóstico**, la **afectación extramedular**, el **inmunofenotipo**, la **ploidía**, las **alteraciones citogenéticas** o genómicas, la **respuesta temprana al tratamiento** y la **enfermedad mínima residual (EMR)** (Tabla 2). La remisión completa de la enfermedad, incluye ausencia de clínica, la recuperación de las tres series en el hemograma, junto con la negatividad de blastos en el aspirado medular y EMR negativa (24, 34).

INTRODUCCIÓN

La respuesta precoz al tratamiento (cuantificada por la EMR y la morfología), está considerada como uno de los factores pronóstico más importantes, porque refleja las características genéticas de los linfoblastos, las características farmacodinámicas y farmacogenéticas del paciente y el efecto de la quimioterapia sobre las células (32, 35, 36). Los protocolos del grupo alemán Berlín-Frankfurt-Münster (BFM) observaron que los pacientes que presentaban un número de blastos en sangre periférica menor de 1.000/mm³ tras una semana de tratamiento con prednisona y una dosis de metotrexato intratecal, tenían una supervivencia libre de eventos mayor que los que no alcanzaban dicho objetivo, convirtiéndose así en uno de los factores pronóstico más importantes (37). A su vez, el aspirado de médula ósea para valorar el porcentaje de blastos en médula ósea en el día +14 del tratamiento, continúa siendo uno de los factores pronóstico más relevantes (38, 39), junto con el resultado de la EMR al final de la inducción (40-42).

Además de los anteriores, se consideran datos de buen pronóstico los pacientes que tienen entre 1 y 9 años, junto con un recuento de leucocitos bajo al diagnóstico (< 50.000) (24). La afectación de SNC, sin embargo, está asociada a mal pronóstico y precisa tratamiento específico. Respecto al inmunofenotipo, los pacientes con LLA de precursores de células B con el marcador CD10 positivo (CALLA) tienen un pronóstico más favorable, al contrario que las LLA de estirpe T, las cuales se consideran de alto riesgo (43).

Con respecto a las alteraciones genéticas, se ha relacionado la hiperdiploidía con una mejor respuesta al tratamiento. Dentro de las más frecuentes, las trisomías de los cromosomas 4, 10 y 17 han sido asociadas con un bajo riesgo de fracaso terapéutico (31). Por el contrario, la disminución en el número de cromosomas está relacionada con un mal pronóstico (44).

La presencia de determinadas translocaciones cromosómicas también tiene importancia pronóstica. Por ejemplo, el cromosoma *Philadelphia* producto de la t(9;22) (q34;q11), que produce el reordenamiento *BCR-ABL1*, tiene muy mal pronóstico y son las leucemias infantiles más difíciles de tratar (45). Sin embargo, en los últimos años el pronóstico de estos niños ha mejorado notablemente tras la incorporación del imatinib a la quimioterapia intensiva que reciben estos pacientes (46). El reordenamiento *MLL/AF4* o t(4;11) (q21;q23) o cualquier cambio 11q23 está asociado a un mal pronóstico. La translocación t(1;19) (q23;p13,3), que da lugar al reordenamiento *E2A/PBX1*, se había asociado a un peor pronóstico, pero con los nuevos tratamientos más intensivos, se ha observado que esta translocación ya no tiene un factor pronóstico desfavorable. La translocación t(12;21) (p13;q22) o reordenamiento

TEL/AML1 confiere un buen pronóstico y se ha observado que la recaída en este grupo de pacientes aparece más tarde que en otros tipos de LLA (30).

Tabla 2. Factores pronóstico más utilizados en LLA

FAVORABLES	DESFAVORABLES
Edad 1 - 9 años	Edad < 1 año ó > 10 años
Leucocitos al diagnóstico <20 x 10 ⁹ /L	Leucocitos al diagnóstico > 20 x 10 ⁹ /L
Inmunofenotipo común	T > pre-pre B > pre-B > B
Ausencia de afección del SNC	Afección del SNC
Hiperdiploidia, fusión <i>TEL/AML1</i>	t(1 ;19), t(9 ;22), t(4 ;11)
Blastos MO < 5% en día + 14 de tratamiento	Blastos en MO > 5% en día + 14 de tratamiento

Abreviaturas: SNC, sistema nervioso central; MO, médula ósea

1.7. TRATAMIENTO

1.7.1. El tratamiento de la LLA en la infancia: LAL/SHOP

El primer hito en el camino hacia la curación de la LLA se produjo en 1948, con los estudios del Dr Sydney Farber, que describían que la aminopterina, un antagonista del ácido fólico podía inducir remisiones parciales en pacientes con LLA (47). Este descubrimiento supuso la introducción de la quimioterapia en el tratamiento de esta enfermedad. En los años sesenta la introducción del tratamiento dirigido al SNC con radioterapia craneal y metotrexato intratecal junto con el desarrollo de la quimioterapia combinada, con distintas fases de tratamiento (inducción, intensificación (consolidación) y mantenimiento) estableció las bases para el desarrollo de posteriores protocolos que han ido introduciendo nuevos avances en el tratamiento y han conseguido aumentar la supervivencia de una enfermedad incurable a más del 80-90% actuales (32).

Por otro lado, el conocimiento que se ha adquirido a lo largo de estos años sobre los aspectos clínicos, biológicos y factores pronósticos de esta enfermedad, ha conseguido estratificar a los pacientes por riesgos en estándar, alto y muy alto riesgo. Esto ha supuesto que algunos pacientes no sean infratratados, manteniendo la tasa de supervivencia, pero al mismo tiempo

INTRODUCCIÓN

ha permitido que otros pacientes no sean sobretratados, reduciendo de ese modo los efectos secundarios derivados de dichos tratamientos (31).

A lo largo de estos años, gracias a los ensayos clínicos llevados a cabo por diferentes grupos cooperativos multicéntricos como el BFM, San Jude o el COG, se han elaborado protocolos complejos y bien estructurados, que han mejorando el tratamiento de la LLA y han permitido mejorar los datos de supervivencia (48). En España, el protocolo LAL/SHOP aprobado por la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica (SEHOP) ha sido uno de los protocolos más utilizados para el tratamiento de la LLA desde el año 1989. A lo largo de los años, ha tenido diferentes versiones (LAL/SHOP-89, LAL/SHOP-94, LAL/SHOP-99, LAL/SHOP-2005) que han servido para añadir pequeños cambios con objeto de mejorar la supervivencia y disminuir los efectos secundarios derivados de dicho tratamiento. Con el protocolo LAL/SHOP-2005, se alcanzó la remisión medular en el 97,6% de los pacientes, con una mortalidad precoz del 1,34% y con una mejoría significativa de la supervivencia libre de evento en torno al $0,85 \pm 0,02$ a 6 años (Figura 5).

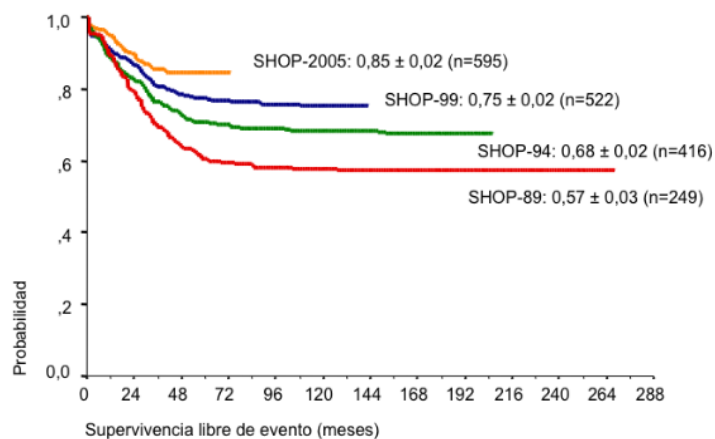


Figura 5. Supervivencia libre de eventos en los sucesivos protocolos LAL/SHOP.

A continuación, describiremos el esquema de tratamiento del Protocolo LAL/SHOP 2005, que ha estado vigente en España desde 2005 a 2013 (Figura 6).

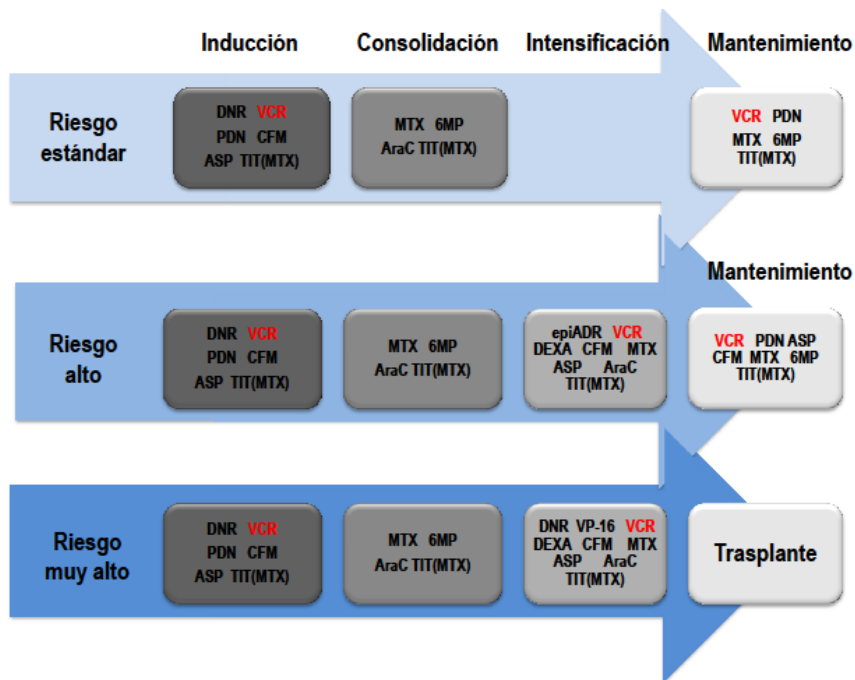


Figura 6. Esquema de tratamiento LAL/SHOP 2005.

El objetivo principal de la primera fase del tratamiento o **fase de inducción** es conseguir la remisión de la enfermedad, es decir, que la médula ósea deje de fabricar células leucémicas o blastos y se instaure la hematopoyesis normal. La duración de esta fase es de 5-6 semanas y los fármacos utilizados son la prednisona (glucocorticoide), vincristina (alcaloide de la vinca), asparraginasa, daunorrubicina (antraciclina) y ciclofosfamida (alquilante). Del mismo modo, se inicia el tratamiento o profilaxis del SNC con la administración de triple terapia intratecal (metotrexato, hidrocortisona y citarabina).

La siguiente **fase** denominada de **consolidación** dura aproximadamente 8 semanas y su objetivo es erradicar blastos residuales resistentes al tratamiento recibido (24). La fase de consolidación es igual en todos los grupos de riesgo y se basa en la administración de altas dosis de metotrexato (análogo del ácido fólico) en infusión de 24 horas junto con rescate con ácido folínico y mercaptopurina oral. El tratamiento se completa con citarabina y triple intratecal.

Posteriormente se continúa con la **fase de mantenimiento** que prolonga el tratamiento hasta los dos años. Se basa en la administración diaria de mercaptopurina junto con metotrexato semanal. En los primeros meses del mantenimiento, los pacientes reciben reinducciones

INTRODUCCIÓN

mensuales con prednisona y vincristina junto con asparraginasa alternando con ciclofosfamida en los pacientes de alto riesgo.

En los pacientes de alto y muy alto riesgo, hay una **fase** denominada de **intensificación**, previo al tratamiento de mantenimiento, que ha conseguido mejorar la supervivencia en estos pacientes (49). En esta fase se vuelve a utilizar una combinación de fármacos como la dexametasona, vincristina, metotrexato, citarabina, antraciclina (epiadriamicina o daunorrubicina), asparraginasa y en los pacientes de muy alto riesgo también se incluye el etopósido en los bloques de quimioterapia que reciben. En todas las fases mencionadas del tratamiento reciben triple terapia intratecal, cuyo uso en la mayoría de los casos, ha sustituido a la radioterapia que asociaba mayor morbilidad a largo plazo (50-52).

Las mejoras en los tratamientos han disminuido o incluso eliminado el impacto de algunos factores pronóstico clásicos, como el sexo o la raza (53). Los ensayos de LLA que se desarrollan en la actualidad tienen como objetivo por un lado, mejorar el pronóstico de ciertos subgrupos con factores pronóstico desfavorable, como los lactantes, adolescentes o los pacientes con fracaso de la inducción (54-56), así como reducir los efectos secundarios derivados de los tratamientos recibidos, para mejorar la calidad de vida de estos pacientes (25, 50, 57).

1.7.2. Toxicidades derivadas del tratamiento de la LLA

En las últimas décadas, los avances terapéuticos han sido espectaculares, alcanzando tasas de supervivencia del 80-90%. Estos avances son debidos, en parte, a la aplicación de protocolos de tratamiento estandarizados (58). Sin embargo, uno de los principales problemas que presentan estos protocolos son las diferencias en la respuesta a la quimioterapia entre pacientes. Mientras que algunos individuos presentan resistencia, otros experimentan toxicidad, que puede llegar a ser muy grave (siendo necesario parar el tratamiento) o mortal. Se estima que aproximadamente tres cuartos de los supervivientes de cáncer sufren una reacción adversa relacionada con el tratamiento recibido y estas reacciones adversas son más frecuentes y más graves en niños (59).

Cada quimioterapia tiene su toxicidad específica (Tabla 3), que hay que controlar durante el tratamiento. Los efectos adversos más frecuentes son las reacciones alérgicas a la asparraginasa, la osteonecrosis derivada de las altas dosis de corticoides que reciben estos pacientes, la trombosis y las infecciones diseminadas derivadas de la inmunosupresión que

padecen. Estas toxicidades, obligan a reducir la dosis o incluso a omitirlas según el grado de severidad, con el consiguiente impacto que suponen en el pronóstico de estos pacientes. Algunos de estos fármacos tienen una dosis acumulativa, que sabemos que no es recomendable traspasar, como las antraciclinas, por el aumento del riesgo a desarrollar cardiotoxicidad; sin embargo, hay pacientes que desarrollan cardiotoxicidad sin alcanzar las dosis máximas recomendadas (60). También se conocen las bases genéticas que influyen en la tolerancia de fármacos como el metrotexato y la mercaptopurina (61). Este hecho sugiere que hay una base genética que también influye en el grado de toxicidad que desarrolla cada paciente. Para resolver este problema, los estudios farmacogenéticos proporcionan una herramienta importante para reducir complicaciones sin afectar a la efectividad del tratamiento, mediante la identificación de las bases genéticas de pacientes con riesgo de sufrir toxicidad por ciertos fármacos y con el consiguiente ajuste de dosis según el genotipo del paciente (62).

Tabla 3. Toxicidades principales derivadas del tratamiento de la LLA

Fármaco	Efectos secundarios
Asparaginasa	Reacciones de hipersensibilidad, pancreatitis, trastornos de la coagulación, hemorragia y/o trombosis, alteraciones metabólicas (hiperglucemia, hipercolesterolemia, hiperuricemia), elevación de transaminasas, hiperbilirrubinemia, convulsión, dolor abdominal, diarrea
Ciclofosfamida	Cistitis hemorrágica, nefrotoxicidad, SIADH, mucositis
Citarabina	Conjuntivitis, síndrome pseudogripal, mucositis, colitis necrosante, disfunción hepática, distres respiratorio agudo
Daunorrubicina/epirrubicina	Cardiotoxicidad, coloración anaranjada de la orina, mucositis
Etoposido	Nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, reacciones de hipersensibilidad, hipotensión
Mercaptopurina	Hepatotoxicidad, toxicidad renal
Metotrexato	Mucositis, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, encefalopatía
Vincristina	Neuropatía, SIADH
Corticoides	Hipertensión, Hiperglucemia, osteonecrosis, retención hídrica, psicosis

*Tabla adaptada de Cooper y cols. 2015 (43)

Una vez obtenidas las supervivencias que manejamos en la actualidad, la calidad de vida de los supervivientes del cáncer se ha convertido en una de las principales preocupaciones (63). Los niños son personas que no han completado su desarrollo físico ni psíquico; por lo tanto, cualquier quimioterapia, con su potencial tóxico, podría producir consecuencias irreversibles. No se trata de curar a toda costa, sino de aumentar la supervivencia intentando controlar o

INTRODUCCIÓN

minimizar los efectos secundarios que puedan surgir por el tratamiento recibido, con objeto de alcanzar una calidad de vida equiparable a la población general (26, 64).

De hecho, la mejora en el pronóstico de la LLA en las últimas décadas se debe a la optimización de los tratamientos utilizados, en lugar de al descubrimiento de nuevos fármacos (65). Por ejemplo, en un estudio realizado con supervivientes de LLA, se observó que el grupo de pacientes que habían recibido radioterapia en SNC, tenían mayor riesgo de desarrollar segundos tumores, un ligero aumento de la mortalidad y un aumento de la tasa de desempleo, si se comparaba con el grupo no radiado. En definitiva, el grupo irradiado tenía mayor riesgo de presentar efectos adversos a largo plazo, presentando mayor vulnerabilidad las niñas (66). Estudios posteriores demostraron que la administración de quimioterapia, correctamente ajustada a los factores de riesgo, permite omitir la radioterapia craneal profiláctica (50), disminuyendo la toxicidad sin comprometer la supervivencia. Es decir, un adecuado conocimiento de los factores de riesgo para la recaída en SNC (afectación del SNC al diagnóstico, punción lumbar traumática al diagnóstico, inmunofenotipo T o presencia de la traslocación t(1;19)(TCF3/PBX1), junto con la monitorización de la EMR) permite realizar una correcta estratificación del riesgo y en consecuencia, administrar la quimioterapia necesaria, aumentando según el riesgo el número de dosis de quimioterapia intratecal.

La neurotoxicidad derivada de la vincristina es otro efecto secundario clásico, muy bien caracterizado, que pueden presentar los pacientes con LLA (aunque hay otros fármacos que también la producen, como el cisplatino, el oxaliplatino, los taxanos o el bortezomib) (67).

2. VINCRISTINA

El nombre vincristina viene de vincire, “atar” en latín y se trata de un agente antimicrotúbulo derivado de un alcaloide procedente del arbusto vincapervinca, también denominado *Catharantus roseus* (*Vinca rosae*). Los alcaloides de la vinca se descubrieron en 1958, gracias a un programa de estudio de sustancias de origen vegetal (68). Tienen una estructura dimérica asimétrica formada por dos núcleos, el indol (porción catarantina) y el dihidroindol (porción vindolina), en la que radican las diferencias entre los distintos alcaloides. De los alcaloides naturales extraídos de la planta, los más eficaces en la clínica son la vincristina y la vinblastina. Posteriormente, se descubrieron dos alcaloides semisintéticos, la vindesina y la vinorelbina.

La primera aplicación en la clínica de la vincristina fue como antidiabético, por su efecto hipoglucemiante. Posteriormente, en estudios realizados con ratones se comprobó que tenía efecto antileucemiante, por lo que se incorporó al tratamiento de la LLA en los años sesenta (69), inicialmente como agente único en pacientes con LLA en recaída tras recibir metotrexato y mercaptopurina, y posteriormente, incorporándolo a combinaciones de fármacos como la prednisona, asparraginas y daunorrubicina (70, 71). Actualmente, la vincristina es un componente básico en el tratamiento de la LLA y su administración se produce principalmente en la inducción, intensificación y mantenimiento. Además, dada la amplia actividad antineoplásica que presenta la vincristina, también se emplea en el tratamiento de numerosos procesos oncológicos; entre ellos, cabe destacar la enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, histiocitosis y los tumores sólidos, como neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Ewing/PNET, tumores del SNC, retinoblastoma y el tumor de Wilms (72).

La vincristina ejerce sus efectos citotóxicos interfiriendo con los microtúbulos que forman los haces mitóticos durante la metafase, interrumpiendo el ciclo celular (73). Como resultado, se rompe el huso mitótico y los cromosomas se dispersan por el citoplasma, produciendo la muerte de la célula (74). Los microtúbulos están compuestos por una proteína dimérica denominada tubulina, formada por 2 subunidades (alfa y beta) presentes en la fracción soluble del citoplasma de todas las células. Los heterodímeros de la tubulina se unen formando microtúbulos en un proceso de polimerización a partir de un centro organizador que generalmente es el centrosoma. El crecimiento de los microtúbulos se acelera en la mitosis, durante la cual el cromosoma atrae a los microtúbulos en crecimiento formando el huso mitótico necesario para la división celular (75). Los alcaloides de la vinca tienen dos lugares de unión a la tubulina, uno de alta afinidad en los extremos de los microtúbulos, que son los que provocan su desestructuración y otros sitios de baja afinidad localizados a lo largo de los microtúbulos, que causan la disrupción de la arquitectura microtubular, evitando así la polimerización de los dímeros solubles a microtúbulos (76). Los microtúbulos, además de en la mitosis, están implicados en otras funciones celulares como el mantenimiento de la estructura celular, el transporte intracelular de moléculas, en la motilidad y distribución de organelas (77). De ese modo, la vincristina, de forma indirecta, también interrumpe el transporte intracelular y puede disminuir el aporte sanguíneo al tumor, con el consiguiente efecto antiangiogénico, motivo por el que se ha empleado también en el tratamiento de hemangiomas, sobre todo en el síndrome de Kasabach-Merritt (78). La vincristina también puede inhibir la síntesis de ARN, interfiriendo con la ARN polimerasa ADN dependiente (79).

INTRODUCCIÓN

2.1. Farmacocinética y Farmacodinamia

La vincristina se administra generalmente por vía endovenosa en infusión corta o bolus, aunque en algunos protocolos también se ha utilizado en infusión continua (80). Se une intensamente a los elementos sanguíneos, especialmente a las plaquetas, que contienen alta concentración de tubulina y componentes tisulares (81). Sin embargo, su paso a través de la barrera hematoencefálica es limitado. Tras la administración de vincristina a dosis convencionales (1,5 mg/m²) se alcanzan niveles pico, que en menos de 5 minutos descienden hasta la mitad, seguido de una eliminación terminal más prolongada, lo cual refleja una rápida captación celular y el extenso volumen de distribución (82, 83). Esta larga semi-vida de eliminación parece ser la responsable de que las dosis repetidas de vincristina induzcan neurotoxicidad, por producirse acumulación del fármaco. Ello justifica que la administración de la vincristina se haga a intervalos semanales.

La vincristina es metabolizada en el hígado y excretada principalmente por el sistema hepatobiliar (70-75%). A las 72 horas de la administración de la vincristina, el 70% es excretado por heces y el 12% por la orina (84). Por ello se aconseja una reducción de dosis en pacientes con hepatopatías obstructivas. La vincristina se metaboliza en el hígado mediante el sistema enzimático del citocromo P450 (CYP), concretamente mediante las enzimas CYP3A4 y CYP3A5 (85). CYP3A5 metaboliza la vincristina en un ratio 9-14 veces más eficazmente que CYP3A4 (86). Se ha demostrado que polimorfismos genéticos en CYP3A5 (CYP3A5*1, CYP3A5*3, CYP3A5*6 y CYP3A5*7) juegan un papel importante en el metabolismo de la vincristina (87, 88). De hecho, la producción de CYP3A5 dependerá de la presencia de al menos un alelo CYP3A5*1 funcional; sin su presencia, se produce muy poca cantidad de CYP3A5 y el metabolismo de la vincristina pasa a depender de CYP3A4. Los pacientes que no expresan CYP3A5 tienen 5 veces más reducido el aclaramiento de la vincristina, lo cual podría aumentar significativamente la toxicidad de la misma (89). Por el contrario, la presencia de uno o dos alelos activos CYP3A5*1 produce una alta expresión de CYP3A5, constituyendo un 40% de toda la actividad de la proteína CYP3A, con un metabolismo significativo de la vincristina (87).

En general, la farmacocinética de la vincristina se caracteriza por amplias variaciones entre pacientes y dentro de un mismo paciente, en función de diversas circunstancias (90). Por ejemplo, se ha observado que el aclaramiento plasmático de la vincristina es más rápido en niños que en adultos. Además, existe una gran variabilidad en las concentraciones pico alcanzadas en plasma entre niños, así como grandes diferencias interraciales en la toxicidad de la vincristina y la tasa de respuesta (91-93).

Se ha descrito, por ejemplo, que los afroamericanos tienen una tasa 7 veces menor de neuropatía que los caucásicos (94). Este hecho puede explicarse porque los afroamericanos presentan una alta expresión de CYP3A5 (motivo por el cual presentan un aclaramiento de la vincristina aumentado), en comparación con los caucásicos (75% *versus* 19%), donde el alelo más frecuente es CYP3A5*3 (89-94%). Esta variante en caucásicos codifica un ensamblaje anormal, dando como resultado la ausencia de la enzima (95). Estos datos sugieren que los factores genéticos tienen un papel importante en la susceptibilidad individual de la neuropatía inducida por vincristina (96, 97).

La excreción biliar de la vincristina está mediada por los genes transportadores *ABCB1* y *ABCC2*, mientras que la vincristina es transportada a las células sanguíneas mediante *ABCC1*. *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC10*, *ABCB1* y *RALBP1* son transportadores de la vincristina al exterior celular. La apoptosis está mediada por la fosforilación de BCL2 y la subsecuente inactivación de BCL2 en un heterodímero con BAX. Además de por la inactivación de BCL2, la apoptosis está causada por un aumento de los niveles de p53 y p21 (Figura 7). *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC10* y *RALBP1* han sido asociados con la resistencia a la vincristina (98-100).

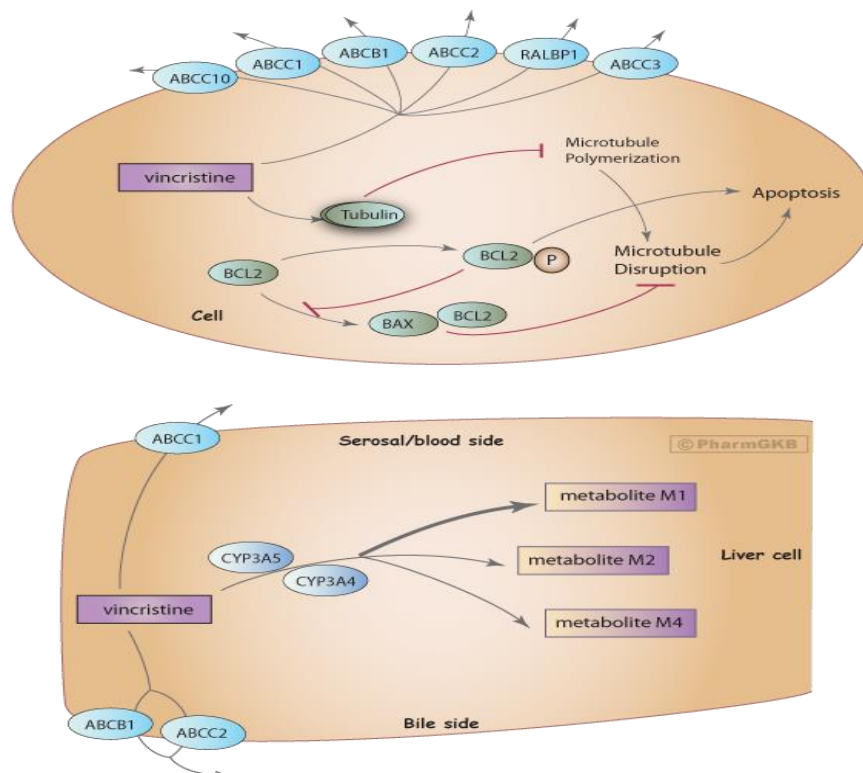


Figura 7. Representación de los genes implicados en el metabolismo, transporte, y efectos de la vincristina (figura tomada con permiso de PharmaGKB y la Universidad de Stanford <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA150981002>).

INTRODUCCIÓN

2.2. Mecanismos de resistencia

Se han descrito dos mecanismos de resistencia adquirida: (1) el gen **MDR1** (también conocido como *ABCB1*) que codifica la permeabilidad de una proteína transportadora de membrana denominada glicoproteína P, está asociado con la resistencia multifármaco (2) otro mecanismo de resistencia adquirida podría estar en alteraciones estructurales y funcionales en las subunidades alfa y beta de la tubulina (101).

2.3. Interacciones farmacológicas

Se han descrito varias interacciones de los alcaloides de la vinca con fármacos que inhiben el CYP3A o la glicoproteína P, como algunos antibióticos, anticonvulsivantes y con otros citotóxicos. Además los corticoides también pueden aumentar el aclaramiento de la vincristina porque pueden inducir a CYP3A4 (72).

2.4. Toxicidad

La vincristina, a diferencia de otros quimioterápicos, rara vez produce mielotoxicidad y mucositis y además, su uso presenta mínima emesis. En el 20-50% de los pacientes se observa alopecia reversible. A su vez, los alcaloides de la vinca son potentes agentes vesicantes, por lo que pueden originar daño tisular en caso de extravasación (102). Sin embargo, el principal efecto tóxico es la neurotoxicidad, que es el factor que limita su actividad clínica, siendo la vincristina el alcaloide más neurotóxico de la familia. El mecanismo por el que la vincristina produce neuropatía periférica no está del todo aclarado (91), pero parece que está relacionado con las concentraciones pico de la vincristina alcanzadas en plasma (103, 104).

La forma más típica es la neuropatía periférica que ocurre entre un 4 y 28% de los niños (105) y se presenta fundamentalmente como una polineuropatía sensitivo-motor distal (73). Los primeros signos suelen ser cambios sensitivos que se manifiestan como parestesias en las zonas distales de las extremidades, que pueden evolucionar a dolores de tipo neurítico y pérdida de los reflejos osteotendinosos profundos, especialmente el reflejo aquileo y patelar, junto con calambres musculares. Las formas más severas de toxicidad presentan aparición de disfunciones motoras que se manifiestan como debilidad muscular, dolor mandibular, alteraciones de la marcha, ataxia junto con pie y muñeca débiles por afectación de los músculos extensores de las manos y los dorsiflexores del pie. El déficit neurológico es habitualmente simétrico pero más severo en extremidades inferiores. En menor frecuencia, se ha descrito neuropatía autonómica, fundamentalmente como disminución de la motilidad

intestinal y la consiguiente tendencia al estreñimiento (106). En sus formas más severas puede producir íleo paralítico. Algunos pacientes presentan dolor abdominal tipo cólico, siendo más evidentes a los 3-10 días tras la administración del quimioterápico y con su desaparición tras varios días. Otras manifestaciones de neuropatía autonómica son la retención vesical y la hipotensión ortostática. De forma muy rara y previa exclusión de otras causas, también pueden verse afectados los pares craneales, siendo la manifestación más frecuente la ptosis bilateral sin alteraciones pupilares ni otros signos de alteración óculomotora (107, 108). También se han descrito formas de disfonía por afectación del nervio laríngeo recurrente, diplopia por afectación de los músculos extraoculares, neuropatía óptica y parálisis facial (109-111). La afectación del sistema nervioso central (confusión, depresión, alucinaciones, agitación, convulsiones, trastornos visuales e incluso coma o muerte) de la vincristina es muy infrecuente y raro (112, 113), dada la baja penetrancia del fármaco por la barrera hematoencefálica, salvo sobredosificación o administración intratecal accidental, que produce una neurotoxicidad severa que lleva a la muerte. Una manifestación del sistema nervioso central descrita de la vincristina es la secreción inadecuada de la hormona antidiurética (SIADH), que sucede fundamentalmente con la interacción con otros fármacos, sobre todo los azoles (114). También está descrito que la población asiática tiene mayor riesgo de presentar dicha complicación respecto a otras razas (115).

Todos estos efectos pueden ser reversibles total o parcialmente tras la suspensión del fármaco, pero en ocasiones son permanentes (116).

La principal lesión anatomopatológica es la degeneración axonal. Estudios ultraestructurales realizados en cultivos de neuronas expuestas a vincristina han observado degeneración neurofibrilar con pérdida de microtúbulos y acumulación de neurofilamentos (117). Por lo tanto, se cree que la vincristina produce daño axonal, que se traduce en neuropatía periférica mediante la ruptura de los microtúbulos y en consecuencia impide el transporte axonal (67, 118, 119).

Actualmente, no existe ningún tratamiento efectivo para la prevención de la neurotoxicidad. El único tratamiento para estos efectos neurotóxicos es la interrupción de su administración hasta la recuperación y en caso de continuar la administración, la reducción de dosis o incremento de intervalos (119). Otras estrategias empleadas para disminuir la neurotoxicidad han sido el uso de tratamientos sintomáticos con gabapentina, amitriptilina, tramadol, carbamacepina y fentanilo (67, 120, 121). También se han estudiado agentes neuroprotectores, como factores de crecimiento de nervios como las neurotrofinas, la

INTRODUCCIÓN

citoquina gp130, factor neurotrófico ciliar, factor inhibidor de la leucemia (LIF) y el IGF-I, con resultados prometedores en ensayos con animales pero sin éxito en ensayos clínicos (67).

2.4.1. Factores que afectan a la toxicidad de la vincristina

a) Intensidad de la dosis, frecuencia y acumulación de dosis:

La gravedad de los efectos neurotóxicos de la vincristina está en relación con las dosis y frecuencia de administración del fármaco, así como la duración del tratamiento (122, 123). De hecho, los síntomas precoces de neurotoxicidad suelen aparecer a las 4-6 semanas del inicio del tratamiento (79). La aparición de íleo paralítico no es dosis acumulativa, por lo tanto suele ser aguda y una única dosis puede provocarla. En cambio, se considera que la neuropatía periférica es dosis acumulativa. Sin embargo, un estudio realizado por Hartman y cols no encontró relación entre la toxicidad motora tardía con las dosis acumuladas ni con la frecuencia de la administración de la vincristina. Este hallazgo les hizo pensar que podría haber polimorfismos implicados en genes metabolizadores de fármacos que podrían explicar la susceptibilidad de padecer neurotoxicidad (124).

b) Edad:

Los niños toleran mejor el tratamiento y son menos susceptibles que los adultos, salvo los lactantes con menor superficie corporal, por lo que precisan reducción de dosis. Todavía no está claro si la alta frecuencia de neurotoxicidad observada en pequeños lactantes es debida al bajo aclaramiento del fármaco o por aumento de la sensibilidad tisular (93). Un estudio realizado en la India observó una incidencia de neurotoxicidad asociada a la vincristina mayor de lo esperado en niños con malnutrición y peso menor al percentil 3 correspondiente a su edad (125).

c) Alteraciones neurológicas/hepáticas previas:

Los pacientes con antecedentes de enfermedades neurológicas como el síndrome Charcot-Marie-Tooth (126-128) y los afectos de alteraciones hepáticas, están especialmente predispuestos a desarrollar neurotoxicidad (93, 129). Por lo tanto, los casos de aumento de bilirrubina sérica, precisan reducción de dosis (93). Por otro lado, algunas variantes genéticas en el gen que codifica para la proteína de unión gap beta 1 (*GJB1*), podrían mejorar la tolerancia de la vincristina sin efectos adversos (105, 130).

d) Variaciones genéticas en los genes implicados en el metabolismo y transporte de la vincristina:

La observación clínica ha encontrado correlación entre el aumento de neurotoxicidad con la disminución del metabolismo de la vincristina. Sin embargo, dada la gran variabilidad entre pacientes, los parámetros farmacocinéticos no han tenido un gran impacto en los estudios realizados (131). Se han descrito varios SNPs en genes implicados en el metabolismo y transporte de la vincristina que podrían estar afectando a la neurotoxicidad. La mayoría de estos estudios se han centrado en el análisis de polimorfismos en CYP3A (132-135). En la actualidad los resultados obtenidos en este campo son dispares.

3. FARMACOGENÉTICA

La Farmacogenética tiene como objetivo predecir qué fármacos y dosis serán los más efectivos y seguros para el paciente sobre la base de sus propias características genéticas, permitiendo así establecer estrategias de terapia personalizada. Por ello puede entenderse como el análisis y uso de la información genética, individual o poblacional, para predecir la seguridad, toxicidad o eficacia de los medicamentos, en el contexto de la investigación y desarrollo de éstos o en la práctica clínica con el fin de mejorar su efectividad.

Los objetivos que se plantean en los estudios farmacogenéticos son generalmente tres: (1) identificación y caracterización de polimorfismos en genes implicados en la absorción, distribución, metabolismo o excreción de los fármacos (**farmacocinética**) o en su mecanismo de acción (**farmacodinamia**) (93), (2) correlación de los mismos con los resultados del tratamiento, y (3) desarrollo de tests genéticos que permitan predecir la respuesta, el fármaco o la dosis más adecuados para un paciente concreto, en definitiva, un tratamiento ajustado a cada perfil genético individual.

A diferencia de las variables clínicas, que pueden sufrir modificaciones y variar a lo largo del tiempo, el código genético es estático y por lo tanto estas variables genéticas podrían proporcionar a los clínicos marcadores reales para identificar pacientes con variantes específicas antes de usar un fármaco. El objetivo último es optimizar las distintas opciones de tratamiento según el perfil genético del paciente para obtener la máxima eficacia y la mínima toxicidad secundaria a los medicamentos. Debido a la gravedad de las reacciones adversas,

INTRODUCCIÓN

estos estudios son particularmente importantes en el tratamiento del cáncer. Si además de la gravedad de los efectos secundarios, se considera el alto coste de los agentes quimioterápicos, existe una gran necesidad en ser más preciso en la selección del régimen de tratamiento administrado que consiga el máximo beneficio posible para cada paciente.

Hasta la fecha, la mayor parte de la investigación en farmacogenética se ha centrado en el papel de los polimorfismos de un único nucleótido (*single nucleotide polymorphism* o SNP) (Figura 8). Se estima que en el genoma hay 10 millones de SNPs distribuidos con una frecuencia media de 1 cada 300pb, constituyendo el 90 % de la variación del genoma humano.

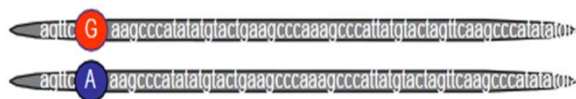
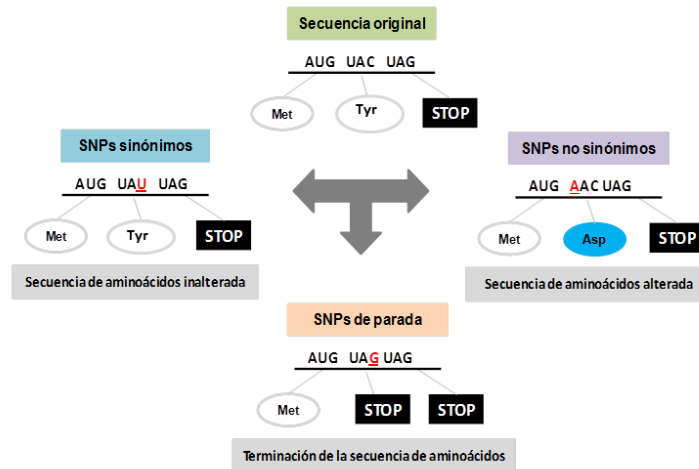


Figura 8. Ejemplo de un SNP. Dos cromosomas de un individuo con el genotipo G/A para el SNP.

Los SNPs están distribuidos a lo largo de todo nuestro genoma, tanto en regiones génicas como en regiones extragénicas. En el caso de SNPs localizados en genes que codifican proteínas, el cambio de alelo puede afectar a la secuencia de la proteína (cambio de aminoácido, cambio en la pauta de lectura, proteína truncada) o a su regulación (si están localizados en el promotor, sitios CpG, región UTR) (Figura 9).

La utilidad clínica de la Farmacogenética queda reflejada en la aprobación por parte de la Agencia Americana de Alimentos y Medicamentos (FDA) de varios test diagnósticos basados en este tipo de estudios. Por ejemplo, el test UGT1A1 de respuesta al irinotecan (136, 137), el test CYP2D6 de respuesta al tamoxifeno (138) o el test CYP2C9 y VKORC1 para la dosificación de la warfarina (139). Uno de los ejemplos más significativos en niños, también aprobado por la FDA en 2004, es el test de la enzima tiopurina S-metiltransferasa (TPMT) (140). La TPMT es una enzima que transforma las tiopurinas (mercaptopurina, tioguanina), fármacos utilizados en el tratamiento de la LLA, en metabolitos metilados que son inactivos (141). Variantes genéticas en *TPMT* están asociadas con una reducción de la actividad de TPMT, lo que conlleva un aumento de la toxicidad. Se han identificado más de 20 variantes de alelos de la *TPMT* con actividad disminuida (142), aunque el 95% de las mutaciones clínicamente relevantes corresponden a 3 SNPs no sinónimos: TPMT*2, TPMT*3A-D (91).

a)



b)

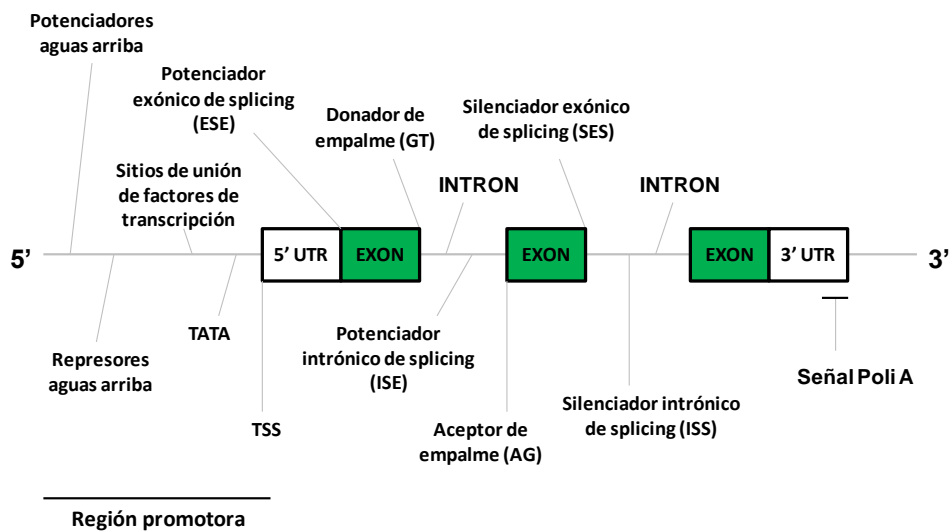


Figura 9. a) SNPs en regiones codificantes b) SNPs en regiones reguladoras

Estos ejemplos proporcionan evidencias claras de cómo las estrategias de tratamiento individualizadas, basadas en conocimientos de Farmacogenética, permiten disminuir la toxicidad sin comprometer la eficacia del fármaco.

INTRODUCCIÓN

3.1. Farmacogenética en LLA

En el contexto de la LLA infantil, los estudios farmacogenéticos son muy útiles por varias razones:

- a) Es el cáncer más frecuente en la infancia.
- b) La heterogeneidad de la LLA está bien descrita con respecto a la epidemiología, características clínicas y perfil biológico, lo que permite analizar el impacto clínico de los polimorfismos desde el punto de vista farmacogenético (143).
- c) Los fármacos utilizados en el tratamiento tienen un rango terapéutico muy estrecho. Es decir, hay poca diferencia entre la dosis efectiva y la dosis que produce toxicidad. En consecuencia, pequeños cambios en la función de los genes implicados en sus vías pueden tener un gran impacto en la respuesta al tratamiento (144).
- d) Los protocolos de tratamiento están estandarizados y adaptados a los factores de riesgo (morfológicos, moleculares, inmunofenotipo y citogenética), administrando terapia más intensiva a los pacientes que tiene mayor riesgo de recaída. Esto permite estudiar si la variación interindividual observada en la respuesta al tratamiento (o la toxicidad) puede ser explicada por polimorfismos genéticos que determinan la disposición al fármaco (65).

Hasta la fecha, los estudios farmacogenéticos en LLA se han abordado siguiendo dos estrategias: búsqueda en genes candidatos o mediante el estudio del genoma completo.

3.1.1. Estudios de genes candidatos

Los estudios de genes candidatos se basan en la selección *a priori* de genes potencialmente implicados en la farmacocinética y la farmacodinamia de la LLA. Por esta razón, la interpretación de los resultados en este tipo de estudios resulta relativamente sencilla, dado que se parte de una hipótesis previa.

Hasta la fecha, son 5 los trabajos que han analizado la asociación entre polimorfismos genéticos presentes en genes implicados en la farmacocinética y la farmacodinamia de la vincristina y la toxicidad de la misma en LLA infantil (Tabla 4).

Tabla 4. Trabajos que han estudiado la asociación entre polimorfismos genéticos y toxicidad en LLA infantil

Referencia	Pacientes (n)	Gen	SNP	Asociación con Toxicidad
Plasschaert et al., <i>Clin Pharmacol Ther</i> 2004	52	<i>ABCB1</i>	rs2032582	No
			rs1045642	No
			rs17650901	No
			rs1800547	No
			rs17651549	No
Hartman et al., <i>Leuk Res</i> 2010	34	<i>MAPT</i>	rs17651754	No
			rs10445337	No
			rs17652121	No
			rs2032582	No
			rs1128503	No
		<i>ABCB1</i>	rs1045642	No
			rs776746	No
			<i>CYP3A5</i>	rs776746
Moore et al., <i>Paediatric Child Health</i> 2011	50	<i>CYP3A5</i>	rs776746	No
Egbelakin et al., <i>Pediat Blood Cancer</i> 2011	107	<i>CYP3A5</i>	rs776746	Sí
Ceppi et al., <i>Pharmacogenomics</i> 2014	339	<i>ABCB1</i>	rs1045642	No
			rs1128503	No
			rs2032582	No
			rs4728709	Sí
			rs6070697	No
			rs10485828	No
			<i>CYP3A5</i>	rs776746

En total, se han analizado 5 SNPs en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina (4 SNPs en *ABCB1* y 1 SNP en *CYP3A5*) y 8 SNPs en genes implicados en la farmacodinamia (6 SNPs en *MAPT* y 2 SNPs en *TUBB1*). Del total de 13 SNPs analizados, dos mostraron asociación con la neurotoxicidad: rs776746 en *CYP3A5* y rs4728709 in *ABCB1*. Sin embargo, estas asociaciones o no fueron confirmadas en otros estudios (en el caso de *CYP3A5*) o necesitan ser validadas (en el caso de *ABCB1*).

El escaso número de trabajos realizados y los resultados contradictorios obtenidos no han permitido definir marcadores de toxicidad de la vincristina. Esto podría ser debido a diferentes causas, como al tamaño relativamente pequeño de las muestras (sin poder suficiente para detectar efectos pequeños), a que estos estudios se basan en pocos genes candidatos y pocos

INTRODUCCIÓN

SNPs dentro de cada gen, y/o a que en algunos de los trabajos los pacientes no seguían las mismas pautas terapéuticas, por lo que es difícil de llegar a conclusiones fiables.

3.1.2. Estudio de genoma completo

La segunda estrategia de búsqueda de variantes genéticas comunes se basa en el estudio del genoma completo o GWAS (*Genome Wide Association Study*). Por el momento, sólo existe un único GWAS en LLA y vincristina, donde se analiza el genoma de 321 pacientes de LLA en tratamiento con este fármaco. Los autores de este estudio encontraron 5 SNPs asociados significativamente con la neurotoxicidad por la vincristina (145). El resultado más significativo fue la asociación entre el polimorfismo rs924607, localizado en la región promotora de la proteína centrosomal de 72kDa (*CEP72*), y la severidad de la neurotoxicidad relacionada con la vincristina durante la fase de mantenimiento ($p=6,33 \times 10^{-9}$).

CEP72 codifica una proteína centrosomal implicada en la formación de microtúbulos (diana de la vincristina). La proteína *cep72* interacciona con la γ -tubulina y es esencial en el proceso de nucleación y polimerización del microtúbulo (146). Como ya se ha comentado anteriormente, la vincristina 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 vincristina podría deberse a un efecto aditivo que resultase en una disminución de polimerización de microtúbulos (Figura 10).

Diouf y cols encontraron que los pacientes homocigotos 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 vincristina. 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 podría promover la unión de NKX-6.3, disminuyendo así la expresión del ARNm de *CEP72*. Los autores de este trabajo concluyeron que el genotipo TT de *CEP72* podría ser un potencial marcador de la neurotoxicidad asociada a la vincristina.

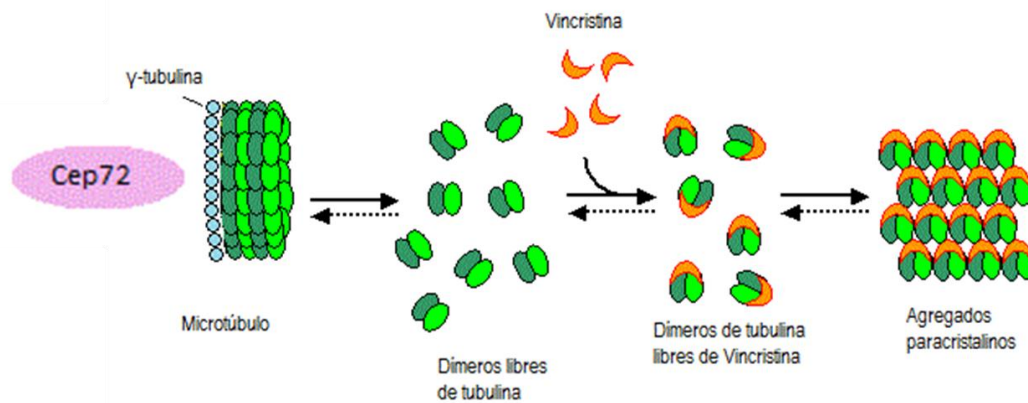


Figura 10. Esquema del mecanismo de acción de la vincristina y de cep72. Imagen adaptada de *Newcastle University Staff Publishing* (<https://www.staff.ncl.ac.uk/i.r.hardcastle/antibiotics.html>).

Sin embargo, hay que tener en consideración que existen diferencias en el número y concentración de las dosis administradas de vincristina entre los distintos protocolos existentes. En consecuencia, la posible aplicabilidad debe ser confirmada en otras cohortes y para diferentes tratamientos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La Leucemia Linfoblástica Aguda es una enfermedad muy heterogénea con un importante componente genético que condiciona tanto el pronóstico como la toxicidad derivada del tratamiento. Por lo tanto, la farmacogenética podría ser una herramienta importante para encontrar polimorfismos asociados a la toxicidad derivada de quimioterápicos como la vincristina.

La vincristina es un fármaco de uso obligado en el tratamiento de la LLA pero su principal efecto secundario es la neurotoxicidad. Este hecho puede hacer que un paciente no tolere el tratamiento y su suspensión repercuta en el pronóstico.

Es importante encontrar marcadores genéticos que nos permitan ajustar la dosis de vincristina a la susceptibilidad biológica de cada paciente y que ayuden a predecir el riesgo de desarrollar neurotoxicidad.

Por lo tanto, en esta tesis nos planteamos que la variabilidad en la respuesta a la vincristina puede ser debida a polimorfismos en los genes clave involucrados tanto en su farmacocinética como en su farmacodinamia.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio fue la identificación de nuevos marcadores genéticos predictores de la eficacia y seguridad de la vincristina en el tratamiento de la LLA infantil.

Para ello nos marcamos los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar variantes genéticas en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina asociados a neurotoxicidad, en un grupo de pacientes pediátricos diagnosticados de LLA-B homogéneamente tratados con el protocolo LAL/SHOP.
2. Identificar variantes genéticas en genes implicados en la farmacodinamia de la vincristina asociados a neurotoxicidad, en un grupo de pacientes pediátricos diagnosticados de LLA-B homogéneamente tratados con el protocolo LAL/SHOP.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio incluyó un total de 152 pacientes pediátricos diagnosticados de Leucemia Linfoblástica Aguda B entre el periodo 1995-2011, en cuatro unidades de Oncología Infantil de España (Hospital Universitario Cruces, Hospital Universitario Donostia, Hospital Universitario La Paz y Hospital Universitario Vall d'Hebron). Los pacientes fueron en su mayoría caucásicos (>98%). Todos los pacientes fueron tratados según los protocolos LAL-SHOP 94, 99 y 2005.

Los datos clínicos de los pacientes se recogieron mediante revisión de las historias clínicas. Los datos recogidos fueron: edad, sexo, grupo de riesgo, protocolo de tratamiento, alteraciones genéticas, número de vincristinas recibidas, neurotoxicidad observada, supervivencia y recaída.

Las características demográficas de la población se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5. Características demográficas de la población de estudio en cuanto a edad, sexo, procedencia, grupo de riesgo, supervivencia y recaída

Nº pacientes, n	152
Edad media al diagnóstico, años	5,49 (rango 1-14)
Sexo, n (%)	
Niños	86 (56,6)
Niñas	66 (43,4)
Procedencia	
Hospital Universitario Cruces	70 (46,05)
Hospital Universitario La Paz	70 (46,05)
Hospital Universitario Donostia	10 (6,6)
Hospital Universitario Vall d'Hebron	2 (1,3)
Grupo de riesgo,* n (%)	
Estándar	57 (39,0)
Alto	61 (41,8)
Muy alto	28 (19,2)
Protocolo de tratamiento, n (%)	
LLA-SHOP 94	6 (4,0)
LLA-SHOP 99	56 (36,8)
LLA-SHOP 2005	90 (59,2)
Supervivencia,* n (%)	
Vivos	138 (92,6)
Fallecidos	11 (7,4)
Recaída,* n (%)	
No	125 (83,9)
Sí	25 (16,1)

* No se pudo obtener el dato en todas las muestras

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio fue aprobado por el comité de ética local de la Universidad del País Vasco, (UPV/EHU) (CEISH/102R/2011). Todos los pacientes o sus progenitores/tutores firmaron el correspondiente consentimiento, previa extracción de la muestra. Las muestras fueron codificadas y tratadas de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

2. TRATAMIENTO Y VALORACIÓN DE LA NEUROTOXICIDAD

El estudio incluyó todos los pacientes diagnosticados y tratados con protocolos LLA-SHOP 94, 99 y 2005 para los que la historia clínica estuvo disponible.

Los pacientes recibieron 4 dosis de vincristina ($1,5 \text{ mg/m}^2$) en la fase de inducción de forma semanal. Posteriormente, en las siguientes fases de intensificación y mantenimiento recibieron entre 6 y 16 dosis ($1,5 \text{ mg/m}^2$) en función del riesgo, con una frecuencia semanal o mensual dependiendo de la fase de tratamiento.

En la fase de inducción, además de vincristina, estos protocolos de tratamiento incluyen daunorrubicina (120 mg/m^2 en infusión continua de 48 horas), prednisona ($60 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ durante 28 días, con posterior pauta descendente a $30 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ durante 4 días y $15 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ los últimos 4 días), ciclofosfamida (1 o 2 dosis de $1000 \text{ mg/m}^2/\text{dosis}$ dependiendo del grupo de riesgo), asparraginasa (10 dosis de $5000\text{-}10.000 \text{ u/m}^2$ dependiendo de la rama de tratamiento) y terapia intratecal con metotrexato-citarabina-hidroocortisona (2 ó 3 dosis ajustadas por edad dependiendo del grupo de riesgo). Los pacientes de alto riesgo del protocolo LLA-SHOP 99 también recibieron una única dosis de 3 g/m^2 de metotrexato en el día +15. Las fases posteriores fueron más heterogéneas dependiendo del grupo de riesgo.

La valoración de la neurotoxicidad fue realizada en cada hospital por expertos oncólogos, siguiendo los mismos criterios y la misma frecuencia de evaluación entre los diferentes centros. La extracción de los datos de neurotoxicidad fue realizada en todos los casos por dos investigadores independientes (AEB y AGC), sin conocer el genotipo, mediante revisión de las historias clínicas y se codificó utilizando la escala de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en una escala de grados 1-4 (Tabla 6).

A la hora de valorar los resultados de toxicidad, se consideraron 3 fenotipos: (1) neurotoxicidad total 2) neurotoxicidad leve (grados 1-2) y (3) neurotoxicidad severa (grados 3-4). En el presente trabajo, la presencia de neurotoxicidad se estudió en todas las fases del

tratamiento (excluyendo consolidación, la única fase en la que no se administra vincristina). Sin embargo, dado que tan solo un 5% de la cohorte (9/152) mostró toxicidad en fases tardías (tamaño muestral insuficiente para detectar diferencias estadísticamente significativas entre grupos), centramos el estudio en la neurotoxicidad durante la inducción y de forma global (en cualquiera de las fases).

Tabla 6. Escala de neurotoxicidad según la Organización Mundial de la Salud

SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO				
Parámetro	GRADO 1	GRADO 2	GRADO 3	GRADO 4
Neuropatía/ Neuropatía motora periférica	-	Parestesia leve transitoria	Parestesias persistentes o progresivas, sensación de quemazón en pies, o leve disestesia; no debilidad; alteraciones leves-moderadas de reflejos osteotendinosos; pérdida sensitiva	Aparición de debilidad significativa, disminución o pérdida de reflejos osteotendinosos, pérdida sensitiva con distribución “en guante o calcetín”, pérdida de sensibilidad radicular, afectación de múltiples pares craneales; disfunción de vejiga o intestinal, fasciculaciones, compromiso respiratorio por debilidad de pared torácica.
Miopatía o deterioro de la unión neuromuscular	Normal o leve (<2 x LSN) elevación CPK	Debilidad leve proximal y/o atrofia que no afecta función motora grosera. Mialgias leves +/- elevación leve CPK (<2 x LSN)	Debilidad muscular proximal y/o atrofia que afecta a función motora +/- elevación CPK; o mialgias severas con CPK >2 x LSN	Aparición de síntomas tipo miastenia (debilidad, oftalmoplegia variable y/o ptosis), o síntomas de bloqueo de la unión neuromuscular (parálisis aguda)

3. SELECCIÓN DE GENES Y SNPS

Se seleccionaron 15 genes relacionados con la farmacocinética (n=8) y farmacodinamia (n=7) de la vincristina, basándonos en la información obtenida en *Pharmacogenomic Knowledge database* (PharmaGKB) (www.pharmgkb.com) (Stanford University, Stanford, CA) y mediante revisión bibliográfica. Los genes implicados en la farmacocinética de la vincristina fueron *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC10* y *RALBP1* (genes transportadores de la vincristina),

MATERIAL Y MÉTODOS

CYP3A4 y *CYP3A5* (enzimas metabolizadoras). Los genes responsables de la farmacodinamia de la vincristina fueron *MAPT*, *TUBB1*, *TUBB3*, *TUBB4*, *TUBB2A*, *TUBB2B* y *CEP72*.

En estos 15 genes, se seleccionaron un total de 175 SNPs, 153 en genes implicados en la farmacocinética y 22 en la farmacodinamia de la vincristina. La selección de SNPs se basó en los siguientes criterios:

- (i) tagSNPs con $r^2 > 0,8$, con el objeto de captar toda la variabilidad genética de los genes seleccionados. Para ello se utilizó la base de datos del proyecto Internacional HapMap (versión #24; <http://www.hapmap.org>) y el software Haploview v4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) (Broad Institute, Cambridge, USA).
- (ii) SNPs con posible efecto funcional (cambios de aminoácidos, *splicing* alternativo, localizados en la región promotora, localizados en lugares de unión de factores de transcripción, sitios CpG, etc.). Para ello se utilizaron las bases de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) (Wellcome Trust Genome Campus, Cambridge, UK), F-SNP (<http://compbio.csqueensu.ca/F-SNP/>) (Queen's University, Kingston, Canada) y Fast-SNP (<http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw>) (Academia Sinica, Taipei, Taiwan).
- (iii) SNPs previamente asociados con la farmacogenética de la vincristina descritos en la literatura.

Todos los SNPs seleccionados tuvieron una frecuencia del alelo menor (MAF) mayor del 5% ($MAF \geq 0,05$) en población europea/caucásica con el fin de obtener SNPs informativos.

El listado de SNPs seleccionados y los criterios de selección se especifican en el anexo (Tablas S1 (farmacocinética) y S2 (farmacodinamia)).

4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El ADN genómico se extrajo a partir de 2-4 ml de sangre periférica (SP) o médula ósea (MO) de pacientes en remisión, utilizando el método de fenol cloroformo (ver protocolo a continuación).

4.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Se siguió el método de fenol-cloroformo estándar (147):

1. Añadir 250µl de SP/MO en un tubo *ependorf* de 1,5ml.
2. Añadir 500µl de buffer de Lisis (Tris 10mM, EDTA 10mM, NaCl 0,1M, SDS 2%, DTT 40mM y Proteinasa K 0,2mg/ml) e incubar en baño termostático con agitación a 37°C toda la noche ó a 56°C durante 2-3 horas.
3. Añadir 200µl de fenol-cloroformo-isoamiloalcohol en proporción 25:24:1. Homogeneizar invirtiendo suavemente los tubos.
4. Centrifugar durante 10 minutos a 13000 rpm. Con ayuda de una pipeta, recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo.
5. Precipitar el ADN añadiendo acetato sódico 2M en proporción 1/10, 1 µl de glucógeno (20 mg/ml) y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Homogeneizar invirtiendo suavemente los tubos.
6. Centrifugar durante 20 minutos a 13000 rpm. Eliminar el sobrenadante.
7. Lavar el pellet de ADN con 1 ml de etanol al 80% frío.
8. Centrifugar de nuevo durante 5 minutos a 13000 rpm.
9. Secar el pellet de ADN al aire y resuspender en 40 µl de H₂O bidestilada estéril.
10. Almacenar a – 20°C.

4.2. CUANTIFICACIÓN ADN Y VALORACIÓN CALIDAD

La cuantificación de la concentración del ADN se determinó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. La relación obtenida entre las lecturas a 260 nm y 280 nm (OD₂₆₀/OD₂₈₀) proporcionó una estimación de la pureza del ADN (valores comprendidos entre 1,8 y 2 indican que la pureza del ADN es alta). El ADN se conservó a una concentración de 50ng/µl.

Antes del genotipado, el ADN de la muestras se cuantificó de nuevo mediante tecnología Picogreen (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

5. GENOTIPADO DE SNPs

El genotipado de los SNPs seleccionados se llevó a cabo en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen-ISCIII) utilizando la tecnología *GoldenGate* de Veracode de la plataforma Illumina Bead Array System (Illumina Inc., San Diego; USA), excepto el SNP rs924607 en *CEP72*, que se

MATERIAL Y MÉTODOS

genotipó mediante ARMS-PCR en el laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina y Enfermería de la UPV/EHU.

5.1. GENOTIPADO *GOLDENGATE*[®] UTILIZANDO TECNOLOGÍA *VERACODE*[®]

El ensayo *GoldenGate* contiene varios pasos. En primer lugar, la muestra de ADN (400ng) se marca con biotina o Estreptavidina, para que se puedan unir los *primers* específicos diseñados para cada SNP. Se diseñan 3 *primers*: dos de ellos son específicos para cada alelo del SNP y se denominan ASOs (*Allele Specific Oligos*). El tercero, denominado LSO (*Locus Specific Oligo*) o *reverse*, consiste en la secuencia complementaria al segmento de DNA y contiene un código para unirse al *array* y de ese modo identificar cada SNP. Durante la fase líquida, se hibridan el ADN genómico con los 3 *primers*. A continuación, se realiza la extensión para cada SNP y después se amplifican estas regiones mediante PCR con *primers* universales. Estos *primers* están marcados con diferentes colorantes para cada ASO y esto nos permite identificar cada alelo del SNP. Estos productos se hibridan en una matriz universal y nos permite la detección y el análisis de cada SNP mediante señal fluorescente (Figura 11).

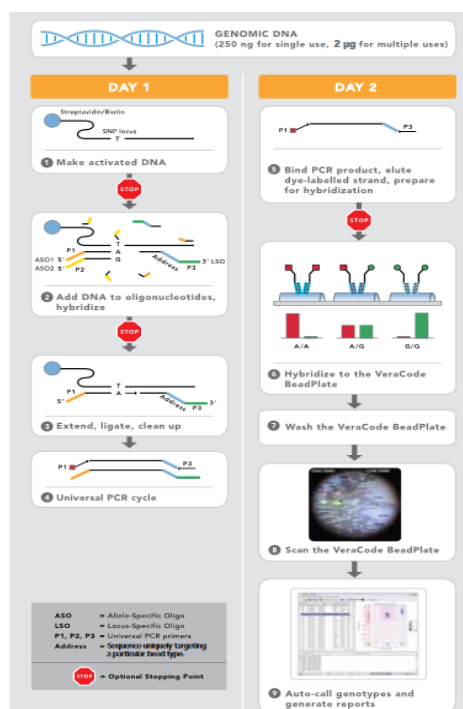


Figura 11. Esquema de la tecnología Veracode de Illumina (imagen tomada de la página de Illumina[®])

Este método permite procesar un gran número de SNPs de manera simultánea, mediante la realización de un ensayo múltiple de PCR, por lo que facilita el procedimiento tanto en tiempo como en recursos materiales.

Los datos se analizaron con el software *Genome Studio* para nombrar y agrupar genotipos. Como control de genotipado, se incluyeron duplicados y tríos de origen caucásico (Coriell Cell Repository, Camden, NJ) entre las placas. Los SNPs que mostraron errores de transmisión alélica mendeliana o que mostraron genotipos discordantes se excluyeron del análisis.

5.2. GENOTIPADO MEDIANTE ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System-Polymerase chain reaction*)

El genotipado del SNP rs924607 en el gen *CEP72* 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 *primers*, que permiten diferenciar cada uno de los alelos. La técnica se esquematiza en la Figura 12.

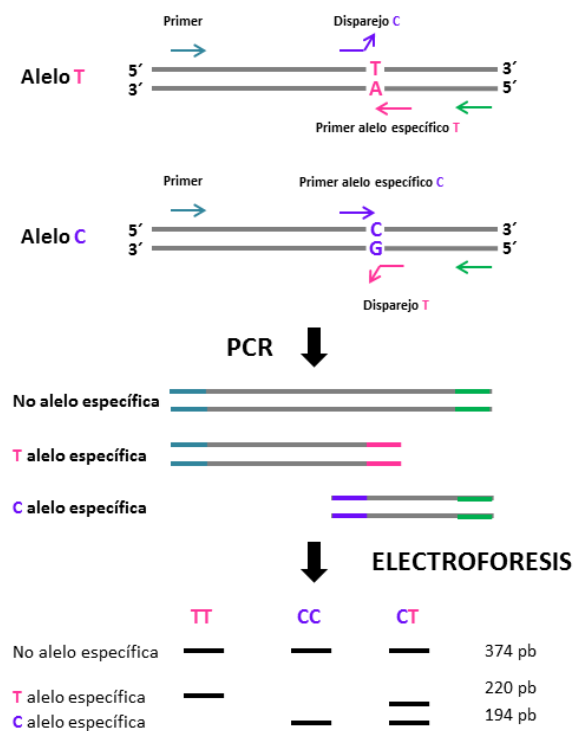


Figura 12. Esquema de ARMS-PCR para el polimorfismo rs924607 (elaboración propia).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los *primers* 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 *primer* en sentido 5'-3' (*forward*) y otro en sentido 3'-5' (*reverse*). 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.

Los *primers* empleados se diseñaron mediante la herramienta bioinformática Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Las características de los *primers* están recogidas en la Tabla 7. La mezcla de reacción consistió en dNTPs (0,2mM), MgCl₂ (2mM), ImmoBuffer (1X), cebadores (10pmol/*primer*), polimerasa (IMMOLASE™) (0,5U) en un volumen final de 25µL.

Tabla 7. Características de los *primers* empleados para el genotipado de rs924607

Alelo	Primer	Secuencia	Tm	%GC	Tamaño producto (pb)
C	<i>Forward</i>	5'-GTTACGTGACGATCTGCACTC-3'	58	52	194
	<i>Reverse</i>	5'-TGGCTGTCTCCACTGACAAC-3	60	55	
T	<i>Forward</i>	5'-TGCTTCTGAAGAGCCAGGAT-3'	60	55	220
	<i>Reverse</i>	5'-CCGAACACTCAGCATTCTA-3'.	59	50	

Abreviaturas: %GC: Porcentaje de bases C+G. pb: Pares de bases. Tm: Temperatura de *Melting*

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). Se añadió un paso final de 10 minutos a 72°C.

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 homocigotos para el alelo C se obtuvieron dos bandas de 194 y 374 pares de bases (pb) (calle 4), los individuos homocigotos para el alelo T generaron dos bandas de 220 y

374 pb (calle 5) y los heterocigotos 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 13.

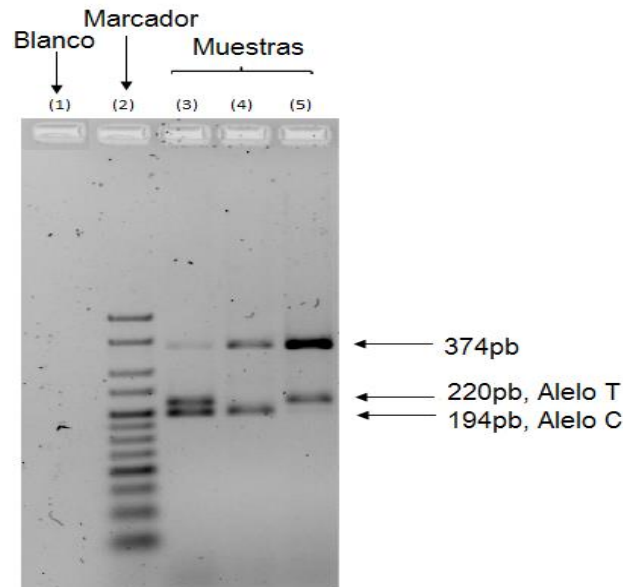


Figura 13. Gel de agarosa (2%) mostrando los resultados del genotipado de *CEP72* rs924607.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El éxito de genotipado para cada SNP se calculó con el software Haploview (v 4.2).

El análisis de asociación entre neurotoxicidad y polimorfismos genéticos se evaluó mediante el test de Fisher o X^2 . La magnitud de dicha asociación se calculó mediante el valor de *odds ratio* (OR) y el correspondiente Intervalo de Confianza (IC) 95% de cada genotipo/alelo respecto de la referencia, con regresión logística univariante.

La comparación de frecuencias genotípicas entre pacientes con y sin neurotoxicidad se llevó a cabo mediante el modelo de regresión logística utilizando 2 modelos de herencia genéticos (dominante y recesivo). El modelo dominante postula que una única copia del alelo de riesgo es suficiente para modificar el riesgo, mientras que el modelo recesivo supone que son 2 copias del alelo para modificar el riesgo (148). Para determinar la significancia estadística de cada SNP, se tomó el modelo más significativo de los dos. Los datos genotípicos se procesaron utilizando la librería SNPAssoc para el software R (Versión de R 3.0.3, “the R Foundation for

MATERIAL Y MÉTODOS

Statistical Computing”). Asimismo, se compararon frecuencias alélicas (uno de los alelos provoca el riesgo) y frecuencias haplotípicas (es el conjunto de SNPs que se heredan en bloque los que determinan el riesgo). Tanto la determinación de los bloques haplotípicos (determinados con el método de Gabriel y cols (149), como las comparaciones, se realizaron con el *software* Haploview v4.2.

Los posibles factores de confusión como edad, sexo y número de vincristinas recibidas se ajustaron mediante regresión logística univariante y multivariante.

Debido al gran número de SNPs en estudio y por tanto, al gran número de comparaciones, es frecuente la aparición de falsos positivos. En consecuencia, los valores de significancia se corrigieron mediante dos métodos (1) en el caso de análisis de frecuencias genotípicas, se utilizó el False Discovery Rate (FDR): se calcula teniendo en cuenta el número de SNPs significativos obtenidos (2) en el caso de frecuencias alélicas y haplotípicas, se usó el método de permutaciones (Haploview v.4.2): se mezclan al azar pacientes con y sin neurotoxicidad y el software calcula el número de veces que se obtiene un valor significativo por azar, dando como resultado un valor de p corregido.

En todos los casos, se consideraron significativos valores con $p \leq 0,05$.

ANEXO MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla S1. SNPs seleccionados en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina y criterios de selección .

N	SNP	Gen	Alelos	Cromosoma	Localización	Posición	Función	Motivo de selección
1	rs10246878	ABCB1	G>A	7	87275641	intrón 1	intrónico	tagSNP
2	rs13233308	ABCB1	C>T	7	87244960	intrón 1	intrónico	tagSNP
3	rs2214102	ABCB1	G>A	7	87229501	intrón 2	intrónico	tagSNP
4	rs3789243	ABCB1	T>C	7	87220886	intrón 4	intrónico	tagSNP
5	rs12535512	ABCB1	C>T	7	87220334	intrón 4	intrónico	Sitio CpG
6	rs13229143	ABCB1	G>C	7	87219481	intrón 4	intrónico	tagSNP
7	rs17327624	ABCB1	G>T	7	87216817	intrón 4	intrónico	tagSNP
8	rs4148733	ABCB1	T>C	7	87213232	intrón 5	intrónico	tagSNP
9	rs1202172	ABCB1	T>G	7	87210974	intrón 5	intrónico	Sitio CpG
10	rs13226726	ABCB1	C>T	7	87206615	intrón 5	intrónico	tagSNP
11	rs1202179	ABCB1	A>G	7	87204279	intrón 5	intrónico	sitio CpG
12	rs10264990	ABCB1	T>C	7	87202615	intrón 5	intrónico	tagSNP
13	rs10260862	ABCB1	G>C	7	87201482	intrón 5	intrónico	tagSNP
14	rs2520464	ABCB1	A>G	7	87201086	intrón 5	intrónico	sitio CpG
15	rs4148734	ABCB1	C>T	7	87193597	intrón 8	intrónico	sitio CpG
16	rs10244266	ABCB1	T>G	7	87188467	intrón 9	intrónico	sitio CpG
17	rs1922240	ABCB1	T>C	7	87183354	intrón 9	intrónico	sitio CpG
18	rs2235013	ABCB1	A>G	7	87178626	intrón 15	intrónico	tagSNP
19	rs2235046	ABCB1	G>A	7	87174066	intrón 17	intrónico	sitio CpG
20	rs6961419	ABCB1	T>C	7	87172136	intrón 18	intrónico	sitio CpG
21	rs10268314	ABCB1	T>C	7	87169669	intrón 19	intrónico	sitio CpG
22	rs10274587	ABCB1	G>A	7	87164483	intrón 20	intrónico	sitio CpG
23	rs4148738	ABCB1	A>G	7	87163049	intrón 20	intrónico	sitio CpG
24	rs4148743	ABCB1	G>A	7	87151090	intrón 22	intrónico	sitio CpG
25	rs2235048	ABCB1	C>T	7	87138511	intrón 27	intrónico	tagSNP
26	rs6979885	ABCB1	G>A	7	87137461	intrón 27	intrónico	tagSNP
27	rs3842	ABCB1	A>G	7	87133366	3'UTR	3'UTR	regulación 3'UTR, sitio CpG
28	rs1055302	ABCB1	G>A	7	87132916	downstream	downstream	regulación downstream, Sitio CpG
29	rs6946119	ABCB1	T>C	7	87128865	downstream	downstream	tagSNP

ANEXO MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla S1. SNPs seleccionados en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina. Continuación.

N	SNP	Gen	Alelos	Cromosoma	Localización	Posición	Función	Motivo de selección
30	rs7789645	ABCB1	G>C	7	87122603	downstream	downstream	sitio CpG
31	rs8050881	ABCC1	G>A	16	16037261	upstream	upstream	sitio CpG
32	rs4148330	ABCC1	A>G	16	16041768	upstream	upstream	regulación Upstream, sitio CpG
33	rs504348	ABCC1	C>G	16	16043174	upstream	upstream	regulación upstream
34	rs215101	ABCC1	G>C	16	16052973	intrón 1	intrónico	sitio CpG
35	rs215099	ABCC1	G>T	16	16054694	intrón 1	intrónico	sitio CpG
36	rs12923345	ABCC1	T>C	16	16055082	intrón 1	intrónico	regulación transcripcional, sitio CpG
37	rs215094	ABCC1	A>G	16	16060915	intrón 1	intrónico	sitio CpG
38	rs215049	ABCC1	G>C	16	16070768	intrón 1	intrónico	sitio CpG
39	rs6498594	ABCC1	A>C	16	16073437	intrón 1	intrónico	regulación transcripcional, sitio CpG
40	rs152023	ABCC1	A>G	16	16085236	intrón 1	intrónico	regulación transcripcional
41	rs152022	ABCC1	C>G	16	16086666	intrón 1	intrónico	regulación transcripcional
42	rs246218	ABCC1	C>T	16	16087565	intrón 1	intrónico	Sitio CpG
43	rs17501331	ABCC1	A>G	16	16089441	intrón 1	intrónico	regulación transcripcional
44	rs12934692	ABCC1	T>C	16	16100513	intrón 1	intrónico	regulación transcripcional, sitio CpG
45	rs16967145	ABCC1	G>A	16	16106970	intrón 3	intrónico	tagSNP
46	rs1967120	ABCC1	T>C	16	16108894	intrón 4	intrónico	sitio CpG
47	rs3784862	ABCC1	A>G	16	16110891	intrón 5	intrónico	bibliográfico
48	rs246240	ABCC1	A>G	16	16119024	intrón 5	intrónico	bibliográfico
49	rs875740	ABCC1	T>G	16	16123048	intrón 5	intrónico	tagSNP
50	rs11642957	ABCC1	T>C	16	16124008	intrón 5	intrónico	sitio CpG
51	rs3784864	ABCC1	A>G	16	16125325	intrón 5	intrónico	tagSNP
52	rs193538	ABCC1	T>G	16	16127916	intrón 6	intrónico	sitio CpG
53	rs11075293	ABCC1	G>A	16	16129996	intrón 6	intrónico	tagSNP
54	rs903880	ABCC1	C>A	16	16130514	intrón 7	intrónico	tagSNP

ANEXO MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla S1. SNPs seleccionados en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina. Continuación.

N	SNP	Gen	Alelos	Cromosoma	Localización	Posición	Función	Motivo de selección
55	rs8054670	ABCC1	T>C	16	16132134	intrón 7	intrónico	tagSNP
56	rs246230	ABCC1	C>T	16	16132880	intrón 7	intrónico	sitio CpG
57	rs246221	ABCC1	T>C	16	16138322	exón 8	sinónimo	sitio CpG
58	rs35592	ABCC1	T>C	16	16141823	intrón 9	intrónico	sitio CpG
59	rs3765129	ABCC1	C>T	16	16149901	intrón 11	intrónico	bibliográfico
60	rs17287570	ABCC1	A>C	16	16155103	intrón 12	intrónico	tagSNP
61	rs35597	ABCC1	G>A	16	16158034	intrón 12	intrónico	sitio CpG
62	rs35600	ABCC1	C>G	16	16159628	intrón 12	intrónico	tagSNP
63	rs35605	ABCC1	C>T	16	16162019	exón 13	sinónimo	regulación ensamblamiento, bibliográfico
64	rs35621	ABCC1	C>G	16	16168608	intrón 14	intrónico	bibliográfico, sitio CpG
65	rs35625	ABCC1	T>C	16	16169566	intrón 14	intrónico	reg trans
66	rs4148350	ABCC1	G>T	16	16170477	intrón 15	intrónico	tagSNP
67	rs4148355	ABCC1	A>G	16	16174667	intrón 16	intrónico	sitio CpG
68	rs10852377	ABCC1	C>T	16	16176824	intrón 16	intrónico	sitio CpG
69	rs2074086	ABCC1	T>C	16	16181142	intrón 18	intrónico	tagSNP
70	rs2889517	ABCC1	C>T	16	16181956	intrón 18	intrónico	tagSNP
71	rs3888565	ABCC1	G>A	16	16183045	intrón 18	intrónico	tagSNP
72	rs4148359	ABCC1	C>G	16	16187234	intrón 19	intrónico	sitio CpG
73	rs2269800	ABCC1	A>G	16	16196839	intrón 20	intrónico	sitio CpG
74	rs16967755	ABCC1	A>G	16	16199255	intrón 20	intrónico	sitio CpG
75	rs11864374	ABCC1	G>A	16	16201885	intrón 21	intrónico	sitio CpG
76	rs3784867	ABCC1	C>T	16	16203345	intrón 21	intrónico	tagSNP
77	rs4780591	ABCC1	G>C	16	16204979	intrón 21	intrónico	tagSNP
78	rs3887893	ABCC1	A>G	16	16205501	intrón 22	intrónico	tagSNP
79	rs2299670	ABCC1	A>G	16	16220858	intrón 26	intrónico	sitio CpG
80	rs212081	ABCC1	C>T	16	16225971	intrón 27	intrónico	tagSNP
81	rs2230671	ABCC1	C>T	16	16228242	exón 28	sinónimo	Regulación ensamblamiento, sitio CpG , bibliográfico
82	rs212086	ABCC1	G>A	16	16229735	intrón 28	intrónico	sitio CpG

ANEXO MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla S1. SNPs seleccionados en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina. Continuación.

N	SNP	Gen	Alelos	Cromosoma	Localización	Posición	Función	Motivo de selección
83	rs3743527	ABCC1	C>T	16	16235681	3'UTR	3'UTR	3'UTR regulation
84	rs129081	ABCC1	G>C	16	16235939	3'UTR	3'UTR	sitio diana miRNA
85	rs212090	ABCC1	T>A	16	16236004	3'UTR	3'UTR	miRNA, regulación 3'UTR, bibliográfico
86	rs212093	ABCC1	A>G	16	16237754	<i>downstream</i>	<i>downstream</i>	bibliográfico, sitio CpG
87	rs12448760	ABCC1	G>A	16	16239539	<i>downstream</i>	<i>downstream</i>	sitio CpG
88	rs1885301	ABCC2	A/G	10	101541053	<i>upstream</i>	<i>upstream</i>	regulación upstream, bibliográfico
89	rs717620	ABCC2	G>A	10	101542578	5'UTR	5'UTR	regulación 5'UTR, sitio CpG, bibliográfico
90	rs2756105	ABCC2	C>T	10	101547042	intrón 2	intrónico	sitio CpG
91	rs7906080	ABCC2	A>G	10	101547647	intrón 2	intrónico	sitio CpG
92	rs4148385	ABCC2	A>C	10	101548177	intrón 2	intrónico	sitio CpG
93	rs4148386	ABCC2	G>A	10	101548468	intrón 2	intrónico	sitio CpG
94	rs2145853	ABCC2	G>A	10	101548795	intrón 2	intrónico	sitio CpG
95	rs2756109	ABCC2	T>G	10	101558746	intrón 7	intrónico	tagSNP
96	rs2273697	ABCC2	G>A	10	101563815	exón 10	No-sinónimo	no-sinónimo, regulación ensamblamiento, sitio CpG, bibliográfico
97	rs2073337	ABCC2	A>G	10	101567426	intrón 12	intrónico	sitio CpG
98	rs4148394	ABCC2	A>C	10	101572343	intrón 15	intrónico	tagSNP
99	rs9794323	ABCC2	T>C	10	101587002	intrón 19	intrónico	sitio CpG
100	rs4148396	ABCC2	C>T	10	101591944	intrón 23	intrónico	bibliográfico
101	rs3740066	ABCC2	A>G	10	101604207	exón 28	sinónimo	regulación ensamblamiento, sitio CpG, bibliográfico
102	rs3740065	ABCC2	T>C	10	101605693	intrón 29	intrónico	bibliográfico, sitio CpG
103	rs12826	ABCC2	A>G	10	101612320	<i>downstream</i>	<i>downstream</i>	sitio CpG
104	rs11190297	ABCC2	G>T	10	101618103	<i>downstream</i>	<i>downstream</i>	tagSNP
105	rs12762549	ABCC2	C>G	10	101620771	<i>downstream</i>	<i>downstream</i>	Bibliográfico
106	rs11190298	ABCC2	A>G	10	101620948	<i>downstream</i>	<i>downstream</i>	sitio CpG
107	rs7212045	ABCC3	G>C	17	48706024	<i>upstream</i>	<i>upstream</i>	tagSNP

ANEXO MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla S1. SNPs seleccionados en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina. Continuación.

N	SNP	Gen	Alelos	Cromosoma	Localización	Posición	Función	Motivo de selección
108	rs2412332	ABCC3	C>G	17	48707522	upstream	upstream	sitio CpG
109	rs757421	ABCC3	G>A	17	48707768	upstream	upstream	tagSNP
110	rs2189595	ABCC3	A>G	17	48708949	upstream	upstream	tagSNP
111	rs8073706	ABCC3	G>A	17	48709941	upstream	upstream	Regulación upstream
112	rs12604031	ABCC3	A>G	17	48712705	intrón 1	intrónico	regulación transcripcional , sitio CpG
113	rs10153257	ABCC3	A>G	17	48713223	intrón 1	intrónico	regulación transcripcional , sitio CpG
114	rs2412333	ABCC3	G>A	17	48715271	intrón 1	intrónico	regulación transcripcional
115	rs739921	ABCC3	C>G	17	48719590	intrón 1	intrónico	regulación transcripcional , sitio CpG
116	rs1541392	ABCC3	T>G	17	48719889	intrón 1	intrónico	regulación transcripcional
117	rs12051822	ABCC3	G>A	17	48723585	intrón 1	intrónico	regulación transcripcional
118	rs17562467	ABCC3	C>T	17	48724830	intrón 1	intrónico	regulación transcripcional , sitio CpG
119	rs4793666	ABCC3	C>G	17	48727253	intrón 1	Intrónico	regulación transcripcional
120	rs17562516	ABCC3	T>A	17	48729781	intrón 1	intrónico	regulación transcripcional
121	rs4148411	ABCC3	G>C	17	48733745	intrón 2	Intrónico	tagSNP
122	rs4148412	ABCC3	C>T	17	48733815	intrón 2	intrónico	tagSNP
123	rs739923	ABCC3	G>A	17	48735774	intrón 5	Intrónico	sitio CpG
124	rs733392	ABCC3	G>A	17	48736403	intrón 6	intrónico	tagSNP
125	rs1978153	ABCC3	C>G	17	48737861	intrón 7	Intrónico	sitio CpG
126	rs4148413	ABCC3	C>G	17	48740798	intrón 8	intrónico	tagSNP
127	rs879459	ABCC3	A>G	17	48746135	intrón 14	Intrónico	tagSNP
128	rs8075406	ABCC3	T>A	17	48749522	intrón 17	intrónico	tagSNP
129	rs2072365	ABCC3	C>T	17	48752866	intrón 20	intrónico	sitio CpG
130	rs3785912	ABCC3	G>A	17	48756937	intrón 26	intrónico	sitio CpG

ANEXO MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla S1. SNPs seleccionados en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina. Continuación.

N	SNP	Gen	Alelos	Cromosoma	Localización	Posición	Función	Motivo de selección
131	rs2277624	ABCC3	G>A	17	48761105	exón 27	sinónimo	Regulación ensamblamiento, sitio CpG
132	rs1558288	ABCC3	G>A	17	48763715	intrón 29	Intrónico	sitio CpG
133	rs3785911	ABCC3	T>G	17	48767431	intrón 30	intrónico	sitio CpG
134	rs1051640	ABCC3	A>G	17	48768486	exón 31	sinónimo	regulación ensamblamiento, sitio diana miRNA
135	rs17563146	ABCC3	C>T	17	48769329	<i>downstream</i>	<i>downstream</i>	tagSNP
136	rs12602161	ABCC3	A>G	17	48769881	<i>downstream</i>	<i>downstream</i>	sitio CpG
137	rs4148418	ABCC3	A>G	17	48770517	<i>downstream</i>	<i>downstream</i>	tagSNP
138	rs8196	ABCC3	T>C	17	48770959	<i>downstream</i>	<i>downstream</i>	sitio CpG
139	rs9394952	ABCC10	G>A	6	43401105	intrón 3	intrónico	sitio CpG
140	rs831312	ABCC10	A>G	6	43405525	intrón 6	intrónico	sitio CpG
141	rs9357412	ABCC10	C>G	6	43416342	intrón 18	Intrónico	tagSNP
142	rs1049553	RALBP1	C>T	18	9475146	5'UTR	5'UTR	sitio CpG
143	rs7227801	RALBP1	G>A	18	9482933	intrón 1	Intrónico	regulación transcripcional
144	rs8092935	RALBP1	C>A	18	9515856	intrón 2	intrónico	regulación transcripcional
145	rs12454987	RALBP1	A>G	18	9518126	intrón 3	intrónico	sitio CpG, tagSNP
146	rs9946939	RALBP1	A>G	18	9531484	intrón 7	Intrónico	sitio CpG
147	rs420905	RALBP1	G>A	18	9539802	<i>downstream</i>	<i>downstream</i>	sitio CpG
148	rs776746	CYP3A5	A>G	7	99270539	intrón 3	Intrónico	bibliográfico
149	rs4646450	CYP3A5	T>C	7	99266318	intrón 6	intrónico	bibliográfico
150	rs4646437	CYP3A4	T>C	7	99365083	intrón 7	Intrónico	bibliográfico, sitio CpG
151	rs2246709	CYP3A4	G>A	7	99365719	intrón 7	intrónico	bibliográfico
152	rs6956344	CYP3A4	C>T	7	99359151	intrón 11	intrónico	bibliográfico
153	rs12333983	CYP3A4	T>A	7	99354114	<i>downstream</i>	<i>downstream</i>	bibliográfico

ANEXO MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla S2. SNPs seleccionados en genes implicados en la farmacodinamia de la vincristina y criterios de selección

N	SNP	Gen	Alelos	Cromosoma	Localización	Posición	Función	Motivo de selección
1	rs7210728	MAPT	A>G	17	43968415	<i>upstream</i>	<i>upstream</i>	bibliográfico
2	rs1001945	MAPT	C>G	17	44005821	intrón 1	Intrónico	bibliográfico
3	rs11867549	MAPT	A>G	17	44013235	intrón 1	intrónico	bibliográfico
4	rs1078997	MAPT	A>G	17	44109843	<i>downstream</i>	<i>downstream</i>	bibliográfico
5	rs1467967	MAPT	A>G	17	43986179	intrón 1	Intrónico	bibliográfico
6	rs1800547	MAPT	G>A	17	44051846	intrón 4	intrónico	bibliográfico
7	rs242557	MAPT	G>A	17	44019712	intrón 1	Intrónico	bibliográfico
8	rs2435207	MAPT	G>A	17	44058928	intrón 5	intrónico	bibliográfico
9	rs3785883	MAPT	G>A	17	44054433	intrón 4	Intrónico	bibliográfico
10	rs8079215	MAPT	T>C	17	44064851	intrón 7	intrónico	bibliográfico
11	rs919463	MAPT	G>A	17	44065741	intrón 6	intrónico	sitio CpG
12	rs7521	MAPT	G>A	17	44105395	3'UTR	3'UTR	bibliográfico sitio CpG
13	rs9405612	TUBB2A	T>C	6	3144113	<i>downstream</i>	<i>downstream</i>	sitio CpG
14	rs17145779	TUBB2B	C>T	6	3225075	exón 4	sinónimo	regulación ensamblamiento, sitio CpG
15	rs151337	TUBB1	C>T	20	rs151337	<i>downstream</i>	<i>downstream</i>	sitio CpG
16	rs151349	TUBB1	T>C	20	57589766	<i>upstream</i>	<i>upstream</i>	sitio CpG
17	rs6070697	TUBB1	G>A	20	57599402	exón 4	No-sinónimo	no-sinónimo, regulación ensamblamiento, sitio CpG
18	rs3865466	TUBB4	C>T	19	6510003	<i>upstream</i>	<i>upstream</i>	sitio CpG
19	rs4558416	TUBB3	G>A	16	90002767	<i>downstream</i>	<i>downstream</i>	sitio CpG
20	rs4395073	TUBB3	T>C	16	90002682	<i>downstream</i>	<i>downstream</i>	sitio CpG
21	rs2302898	TUBB3	C>T	16	89998794	intrón 2	intrónico	regulación transcripcional /intensificador intrónico
22	rs924607	CEP72	C>T	5	610093	<i>upstream</i>	promotor	bibliográfico

RESULTADOS

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio incluyó un total de 152 pacientes pediátricos diagnosticados de Leucemia Linfoblástica Aguda de tipo B, procedentes de 4 hospitales nacionales: Hospital Universitario Cruces (46,05%), Hospital Universitario La Paz (46,05%), Hospital Universitario Donostia (6,6%) y Hospital Universitario Vall d'Hebron (1,3%).

La edad media de los pacientes fue de 5,49 años (rango 1-14) y el 56,6% fueron varones. Todos los pacientes fueron tratados según los Protocolos SHOP (94/99/2005), la mayoría con el protocolo SHOP 2005 (59,2% de los casos). El 41,8% de los pacientes se clasificaron como alto riesgo, seguido de un 39% como riesgo estándar y un 19,2% de muy alto riesgo. Respecto a las alteraciones genéticas, un 40,8% no presentaron ninguna. La translocación más frecuente fue *TEL/AML1* en un 19,2% de los casos. Un 31,5% de pacientes presentaron hiperdiploidía. Los pacientes recibieron una media de 12,93 (rango 4-20) dosis de vincristina durante el tratamiento.

El estudio de neurotoxicidad asociada a la vincristina se llevó a cabo durante la fase de inducción y de forma global (en cualquiera de las fases). El grado de toxicidad de los pacientes se codificó utilizando la escala de la OMS en: (a) toxicidad total (grados 1-4) (b) toxicidad leve (grados 1-2) y (c) toxicidad severa (grados 3-4). En resumen, un 33,6% de los pacientes presentaron neurotoxicidad durante el tratamiento (19,5% leve y 14,1% severa). La fase donde más neurotoxicidad se registró fue la inducción con un 30,9% (18,8% leve y 12,1% severa), mientras que en el mantenimiento sólo un 6,1% mostró toxicidad (3,4% leve y 2,7% severa).

La supervivencia de la muestra fue de un 92,6% y un 16,1% de los pacientes presentaron recaída (Tabla 8).

2. ÉXITO DE GENOTIPADO

El presente estudio incluyó un total de 175 SNPs en 15 genes relacionados con la farmacocinética (n=153) y farmacodinamia (n=22) de la vincristina. El 90,1% (137/152) de las muestras (Tabla anexa 1) y el 89,7% (157/175) de los SNPs (Tabla anexa 2) fueron genotipados con éxito e incluidos en el estudio. El porcentaje medio de éxito en el genotipado de los SNPs se situó en torno al 95,3%. Los SNPs fallidos se debieron a la no amplificación por PCR, o a una intensidad insuficiente o poca definición para la separación por clusters (n=14). Asimismo, se eliminaron aquellos SNPs monomórficos (n=1) o con un porcentaje de genotipado <75% (n=3).

RESULTADOS

Tabla 8. Características de la población de estudio

Nº pacientes, n	152
Edad media al diagnóstico, años	5,49 (rango 1-14)
Sexo, n (%)	
Niñas	66 (43,4)
Niños	86 (56,6)
Grupo de riesgo,* n (%)	
Estándar	57 (39,0)
Alto	61 (41,8)
Muy alto	28 (19,2)
Alteraciones genéticas,* n (%)	
No alteración	53 (40,8)
BCR/ABL	3 (2,3)
MLL/AF4	7 (5,4)
E2A/PBX1	1 (0,8)
Tel/AML1	25 (19,2)
Hiperdiploidía	41 (31,5)
Protocolo de tratamiento, n (%)	
LAL-SHOP 94/99	62 (40,8)
LAL-SHOP 2005	90 (59,2)
Nº dosis vincristinas	12,93 (rango 4-20)
Toxicidad Neurológica en inducción,* n (%)	
No toxicidad [#]	103 (69,1)
Leve (1-2)	28 (18,8)
Severa (3-4)	18 (12,1)
Toxicidad Neurológica en cualquier fase,* n (%)	
No toxicidad [#]	99 (66,4)
Leve (1-2)	29 (19,5)
Severa (3-4)	21 (14,1)
Toxicidad Neurológica en mantenimiento,* n (%)	
No toxicidad [#]	140 (94,0)
Leve (1-2)	5 (3,4)
Severa (3-4)	4 (2,7)
Supervivencia,* n (%)	
Vivos	138 (92,6)
Fallecidos	11 (7,4)
Recaída,* n (%)	
No	125 (83,9)
Sí	25 (16,1)

* No se pudo obtener el dato en todas las muestras [#]No datos de neurotoxicidad en el historial clínico

3. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DE GENES IMPLICADOS EN LA FARMACOCINÉTICA DE LA VINCRISTINA Y LA NEUROTOXICIDAD

Para estudiar la asociación entre los polimorfismos genéticos seleccionados y la presencia/ausencia de toxicidad neurológica asociada a la vincristina, se compararon las frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas entre los grupos de pacientes, en las diferentes fases del tratamiento (inducción y de forma global). A la hora de valorar los resultados de toxicidad, se consideraron 3 fenotipos: (1) neurotoxicidad total (grados 1-4) (2) neurotoxicidad leve (grados 1-2) y (3) neurotoxicidad severa (grados 3-4).

El estudio de asociación incluyó un total de 136 SNPs en 8 genes implicados en la farmacocinética de la vincristina (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *RALPB1*, *ABCC10*, *CYP3A4* y *CYP3A5*).

En primer lugar, se comprobó que la neurotoxicidad no estaba asociada significativamente con las covariables edad, sexo y número de vincristinas recibidas, por lo que no se incluyeron estas covariantes en los análisis de asociación.

3.1. POLIMORFISMOS ASOCIADOS A NEUROTOXICIDAD EN INDUCCIÓN

3.1.1. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

El análisis de asociación por frecuencias genotípicas se realizó comparando grupos de pacientes con diferentes grados de toxicidad.

a) Pacientes con neurotoxicidad grados 1-4 (total) versus no toxicidad:

El análisis de asociación por frecuencias genotípicas mostró que 12 SNPs en 3 genes estaban asociados con la neurotoxicidad asociada a la vincristina: 5 SNPs en *ABCC2*, 6 SNPs en *ABCC1* y 1 SNP en *ABCB1* (Tabla 9).

Los SNPs rs3740066 y rs12826, localizados en el exón 28 y aguas abajo (*downstream*) del gen *ABCC2*, respectivamente, mostraron los dos resultados más significativos. Bajo el modelo dominante (GG vs AG+AA), el genotipo AG+AA en ambos casos, mostró un efecto protector; en el caso de rs3740066 con un OR=0,23 (IC 95%: 0,1-0,53; p=0,0004), y en el caso de rs12826 con un OR=0,24 (IC 95%: 0,1-0,54; p=0,0004). Tras la corrección mediante FDR, ambos SNPs continuaron teniendo una asociación significativa con la neurotoxicidad. Otros 3 SNPs en *ABCC2* resultaron significativos,

RESULTADOS

dos localizados en regiones intrónicas (rs2073337 y rs4148396) y uno aguas abajo del gen (rs11190298).

En el gen *ABCC1*, los SNPs más significativos fueron rs11864374 y rs3743527, localizados en el intrón 21 y en la región 3'UTR del gen. En ambos casos, bajo el modelo dominante, los genotipos AG+AA rs11864374 y CT+TT rs3743527 mostraron un efecto protector (OR=0,35; IC 95%: 0,15-0,79 y OR=0,32; IC 95%: 0,13-0,79; P=0,008, respectivamente).

En el gen *ABCB1*, el único SNP significativo fue rs10244266, localizado en el intrón 9. Bajo el modelo dominante, el genotipo GT+GG incrementó el riesgo de desarrollar neurotoxicidad (OR=2,60; IC 95%: 1,16-5,83; P=0,021).

b) Pacientes con neurotoxicidad grados 1-2 (leve) versus no toxicidad:

Los análisis de asociación mostraron que 10 SNPs en 3 genes tenían asociación con neurotoxicidad leve en inducción: 5 SNPs en *ABCC2*, 2 en *ABCC1* y 3 en *ABCB1* (Tabla 10).

Los SNPs rs3740066 y rs12826 en *ABCC2* mostraron los resultados más significativos, en ambos casos bajo el modelo dominante (GG vs AG+AA). En el caso de rs3740066, el genotipo AG+AA mostró un efecto protector con valor de OR de 0,15 (IC 95%: 0,06-0,43; p=0,0002); en el caso de rs12826, el OR fue de 0,15 (IC 95%: 0,05-0,41; p=0,0001). Tras la corrección por FDR, ambos SNPs continuaron teniendo una asociación significativa con neurotoxicidad leve.

En el gen *ABCC1*, el SNP más significativo fue rs11864374. Bajo el modelo dominante, el genotipo AG+AA mostró un efecto protector (OR=0,30; IC 95%: 0,11-0,84).

En el gen *ABCB1*, rs10244266 mostró el valor de asociación más significativo (OR=3,89; IC 95%: 1,51-10,03).

c) Pacientes con neurotoxicidad grados 3-4 (severa) versus no toxicidad:

Los resultados de asociación mostraron un único SNP, situado en el intrón 4 del gen *ABCC1*, asociado con neurotoxicidad severa (Tabla 11).

El genotipo CT+CC rs1967120 mostró un efecto protector (OR=0,29; IC 95%: 0,09-0,99; p=0,035). Tras el factor de corrección FDR, la asociación no se mantuvo significativa.

RESULTADOS

Tabla 9. SNPs en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina significativamente asociados con neurotoxicidad total en inducción.

Gen	SNP (posición)	Genotipo	No neurotoxicidad	Neurotoxicidad	OR (IC 95%)	P
			n (%) (n=94)	1-4 n (%) (n=40)		
ABCC2	rs3740066 (exón 28)	GG	22 (23,7)	20 (57,1)	Dominante 0,23 (0,10- 0,53)	0,0004* (0,036)
		AG	56 (60,2)	8 (22,9)		
		AA	15 (16,1)	7 (20)		
	rs12826 (aguas abajo)	GG	21 (22,8)	20 (55,6)	Dominante 0,24 (0,10- 0,54)	0,0004* (0,036)
		AG	56 (60,9)	9 (25)		
		AA	15 (16,3)	7 (19,4)		
	rs2073337 (intrón 12)	AA	17 (20)	17 (50)	Dominante 0,25 (0,11- 0,59)	0,001
		AG	51 (60)	10 (29,4)		
		GG	17 (20)	7 (20,6)		
	rs4148396 (intrón 23)	CC	24 (26,7)	18 (50)	Dominante 0,36 (0,16- 0,81)	0,013
		CT	51 (56,7)	11 (30,6)		
		TT	15 (16,7)	7 (19,4)		
rs11190298 (aguas abajo)	GG	29 (30,9)	12 (33,3)	Recesivo 2,44 (1,01- 5,86)	0,049	
	AG	49 (52,1)	12 (33,3)			
	AA	16 (17)	12 (33,3)			
ABCC1	rs11864374 (intrón 21)	GG	42 (46,2)	27 (71,1)	Dominante 0,35 (0,15- 0,79)	0,008
		AG	47 (51,6)	7 (18,4)		
		AA	2 (2,20)	4 (10,5)		
	rs3743527 (3'UTR)	CC	55 (59,8)	33 (82,5)	Dominante 0,32 (0,13- 0,79)	0,008
		CT	31 (33,7)	5 (12,5)		
		TT	6 (6,5)	2 (5)		
	rs1967120 (intrón 4)	TT	41 (44,6)	26 (68,4)	Dominante 0,37 (0,17- 0,82)	0,012
		CT	47 (51,1)	8 (21,1)		
		CC	4 (4,3)	4 (10,5)		
	rs17501331 (intrón 1)	AA	75 (80,6)	25 (62,5)	Dominante 2,50 (1,10- 5,68)	0,029
		AG	17 (18,30)	14 (35)		
		GG	1 (1,10)	1 (2,5)		
	rs12923345 (intrón 1)	TT	71 (75,5)	22 (56,4)	Dominante 2,39 (1,08- 5,25)	0,031
		CT	22 (23,4)	17 (43,6)		
		CC	1 (1,10)	0 (0)		
rs11642957 (intrón 5)	TT	19 (20,7)	14 (37,8)	Dominante 0,43 (0,19- 0,98)	0,047	
	CT	56 (60,9)	12 (32,4)			
	CC	17 (18,5)	11 (29,7)			
ABCB1	rs10244266 (intrón 9)	TT	74 (79,6)	24 (60)	Dominante 2,60 (1,16- 5,83)	0,021
		GT	17 (18,3)	15 (37,5)		
		GG	2 (2,2)	1 (2,5)		

* P<0,05 tras corrección por FDR; el valor de P corregido aparece entre paréntesis

RESULTADOS

Tabla 10. SNPs en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina significativamente asociados con neurotoxicidad leve en inducción

Gen	SNP (posición)	Genotipo	No neurotoxicidad n (%) (n=94)	Neurotoxicidad grados 1-2 n (%) (n=24)	OR (IC 95%)	P
ABCC2	rs12826 (aguas abajo)	GG	21 (22,8)	14 (66,7)	Dominante	0,0001*
		AG	56 (60,9)	5 (23,8)	0,15 (0,05-0,41)	(0,016)
		AA	15 (16,3)	2 (9,5)		
	rs3740066 (exón 28)	GG	22 (23,7)	14 (66,7)	Dominante	0,0002*
		AG	56 (60,2)	5 (23,8)	0,15 (0,06-0,43)	(0,016)
		AA	15 (16,1)	2 (9,5)		
	rs2073337 (intrón 12)	AA	17 (20)	12 (54,5)	Dominante	0,001
		AG	51 (60)	7 (31,8)	0,21(0,08-0,56)	
		GG	17 (20)	3 (13,6)		
	rs4148396 (intrón 23)	CC	24 (26,7)	12 (57,1)	Dominante	0,009
		CT	51 (56,7)	6 (28,6)	0,27 (0,10-0,73)	
		TT	15 (16,7)	3 (14,3)		
rs11190298 (aguas abajo)	GG	29 (30,9)	4 (20)	Recesivo	0,031	
	AG	49 (52,1)	8 (40)	3,25 (1,14-9,23)		
	AA	16 (17)	8 (40)			
ABCC1	rs11864374 (intrón 21)	GG	42 (46,2)	17 (73,9)	Dominante	0,015
		AG	47 (51,6)	4 (17,4)	0,30 (0,11-0,84)	
		AA	2 (2,2)	2 (8,7)		
	rs3743527 (3'UTR)	CC	55 (59,8)	20 (83,3)	Dominante	0,024
		CT	31 (33,7)	3 (12,5)	0,30 (0,09-0,94)	
		TT	6 (6,5)	1 (4,2)		
ABCB1	rs10244266 (intrón 9)	TT	74 (79,6)	12 (50)	Dominante	0,005
		GT	17 (18,3)	12 (50)	3,89 (1,51-10,03)	
		GG	2 (2,2)	0 (0)		
	rs10274587 (intrón 20)	GG	73 (77,7)	12 (50)	Dominante	0,009
		AG	19 (20,2)	12 (50)	3,48 (1,36-8,86)	
		AA	2 (2,12)	0 (0)		
	rs10268314 (intrón 19)	TT	73 (77,7)	12 (52,2)	Dominante	0,018
		CT	19 (20,2)	11 (47,8)	3,19 (1,23-8,25)	
		CC	2 (2,12)	0 (0)		

* P<0,05 tras corrección por FDR; el valor de P corregido aparece entre paréntesis

Tabla 11. SNPs en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina significativamente asociados con neurotoxicidad severa en inducción

Gen	SNP (Posición)	Genotipo	No neurotoxicidad	Neurotoxicidad grados 3-4	OR (IC 95%)	P
			n (%) (n=94)	n (%) (n=16)		
	rs1967120	TT	41 (44,6)	11 (73,3)	Dominante	
ABCC1	(intrón 4)	CT	47 (51,1)	2 (13,3)	0,29 (0,09-0,99)	0,035
		CC	4 (4,3)	2 (13,3)		

3.1.2. FRECUENCIAS ALÉLICAS

El análisis de asociación por frecuencias alélicas se realizó comparando grupos de pacientes con diferentes grados de toxicidad:

a) Pacientes con neurotoxicidad grados 1-4 (total) versus no toxicidad:

El estudio por frecuencias alélicas mostró que 7 SNPs en 3 genes estaban asociados con la neurotoxicidad total inducida por la vincristina: 3 SNPs en el gen *ABCC2*, 3 SNPs en el gen *ABCC1* y uno en el gen *ABCB1* (Tabla 12).

El SNP rs2756109 localizado en el intrón 7 del gen *ABCC2* mostró el valor de asociación más significativo ($p=0,02$). El alelo G incrementó el riesgo con un valor de $OR=1,89$ (IC 95%: 1,09-3,28). Tras corregir la tasa de error por el método de permutaciones, la asociación no se mantuvo significativa.

RESULTADOS

Tabla 12. SNPs en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina significativamente asociados con neurotoxicidad total en inducción. Análisis por frecuencias alélicas.

Gen	SNP	Alelo de riesgo	Frec control	Frec casos	OR (IC 95%)	P
	rs2756109	G	0,41	0,57	1,89 (1,09-3,28)	0,02
<i>ABCC2</i>	rs3740066	G	0,54	0,68	1,88 (1,05-3,36)	0,03
	rs12826	G	0,53	0,68	1,87 (1,05-3,32)	0,03
<i>ABCC1</i>	rs3743527	C	0,77	0,89	2,34 (1,08-5,07)	0,03
	rs17501331	G	0,1	0,2	2,27 (1,10-4,70)	0,03
	rs12448760	G	0,73	0,85	2,07 (1,01-4,25)	0,04
<i>ABCB1</i>	rs10244266	G	0,11	0,21	2,12 (1,05-4,30)	0,03

b) Pacientes con neurotoxicidad grados 1-2 (leve) versus no toxicidad:

El estudio de asociación por frecuencias alélicas mostró que 6 SNPs en 3 genes estaban asociados con la neurotoxicidad leve asociada a la vincristina: 4 SNPs en el gen *ABCC2*, 1 SNP en el gen *ABCB1* y 1 SNP en el gen *ABCC1* (Tabla 13).

Los SNPs rs3740066 y rs12826, localizados en el exón 28 y aguas abajo del gen *ABCC2*, respectivamente, mostraron los resultados más significativos ($p=0,003$). El alelo G en ambos casos incrementó el riesgo con valores de $OR=3,15$ (IC 95%: 1,43-6,96) y $OR=3,22$ (IC 95%: 1,46-7,10), respectivamente. Tras corregir la tasa de error por el método de permutaciones, la asociación se mantuvo significativa en estos dos SNPs.

Tabla 13. SNPs en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina significativamente asociados con neurotoxicidad leve en inducción. Análisis por frecuencias alélicas.

Gen	SNP	Alelo de riesgo	Frec control	Frec casos	OR (IC 95%)	P
ABCC2	rs3740066	G	0,54	0,79	3,15 (1,43-6,96)	0,003*
	rs12826	G	0,53	0,79	3,22 (1,46-7,10)	0,003*
	rs2756109	G	0,41	0,62	2,32 (1,16-4,62)	0,010
	rs2073337	A	0,51	0,7	2,33 (1,14-4,76)	0,020
ABCB1	rs10244266	G	0,11	0,25	2,62 (1,18-5,80)	0,015
ABCC1	rs8054670	C	0,26	0,44	2,33 (1,11-4,88)	0,023

*P<0,05 después de corregir por permutaciones (n=1000)

c) Pacientes con neurotoxicidad grados 3-4 (severa) versus no toxicidad:

El estudio de asociación por frecuencias alélicas mostró un único SNP situado en el intrón 1 del gen *ABCC1* asociado con la neurotoxicidad severa (p=0,04). El alelo G del SNP rs17501331 incrementó el riesgo con un valor de OR de 2,68 (IC 95%: 1,01-7,06) (Tabla 14). Tras corregir por permutaciones, la asociación no se mantuvo significativa.

Tabla 14. SNPs en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina significativamente asociados con neurotoxicidad severa en inducción. Análisis por frecuencias alélicas.

Gen	SNP	Alelo de riesgo	Frec control	Frec casos	OR (IC 95%)	P
ABCC1	rs17501331	G	0,10	0,23	2,68 (1,01-7,06)	0,04

3.1.3 FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS

Para estudiar la asociación entre las frecuencias haplotípicas y la neurotoxicidad por vincristina, en primer lugar se valoró el desequilibrio de ligamiento de los bloques de cada gen. La definición de los bloques se basó en el estudio de Gabriel y cols (149). El gen *ABCB1* estuvo definido por 5 bloques con 21 haplotipos; *ABCC1* por 7 bloques con 27 haplotipos; *ABCC2* por 3 bloques con 11 haplotipos; *ABCC3* por 6 bloques con 19 haplotipos; *CYP3A4* y *CYP3A5* por 1

RESULTADOS

bloque con 3 haplotipos cada uno y *RALPB1* por 1 bloque y 3 haplotipos. *ABCC10* no mostró bloque haplotípico (Figura 14).

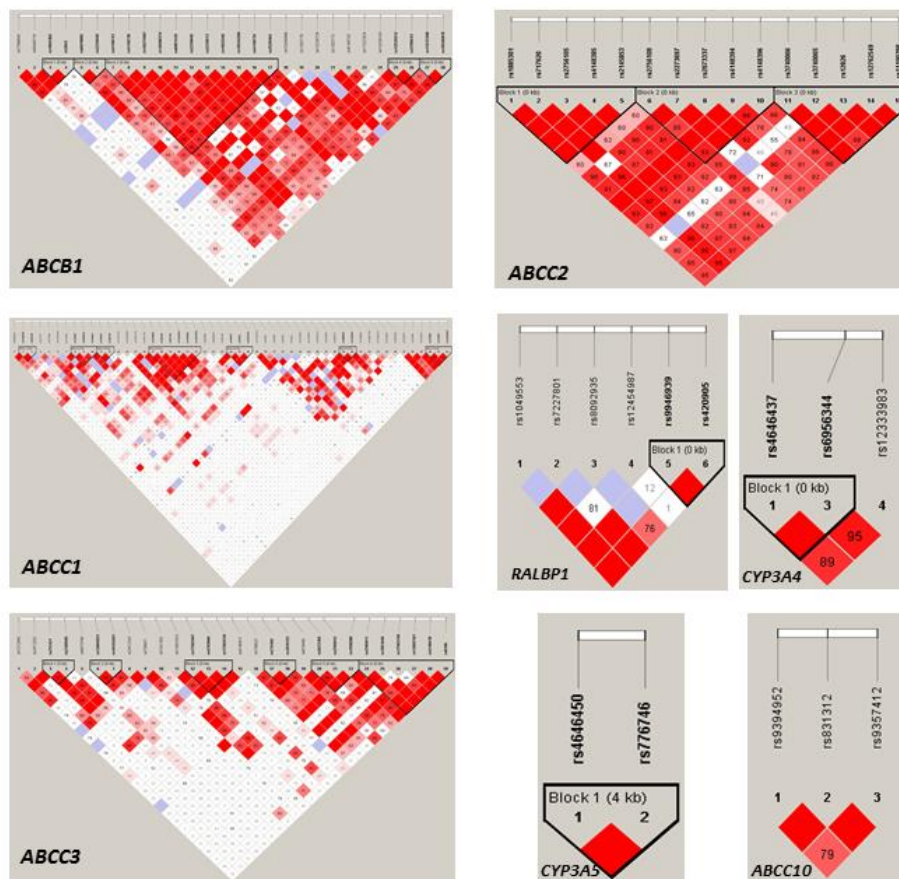


Figura 14. Bloques de desequilibrio de ligamiento de los genes implicados en la farmacocinética de la vincristina basados en el método de Gabriel y cols. Imágenes extraídas con el software Haploview v.4.2.

El análisis de asociación por frecuencias haplotípicas se realizó comparando grupos de pacientes con diferentes grados de toxicidad (Tabla 15).

a) Pacientes con neurotoxicidad grado 1-4 (total) versus no toxicidad

Tras realizar el análisis de asociación, 3 haplotipos en 2 genes resultaron significativos: en el gen *ABCC2*, el haplotipo formado por los SNPs rs2756109, rs2273697, rs2073337, rs4148394 y rs4148396 (Bloque 2: GGAAC); en el gen *ABCC1*, el haplotipo formado por los SNPs rs3784862, rs246240, rs875740, rs11642957, rs3784864 y rs11075293

(Bloque 4: AATCGG) y el formado por los SNPs rs212090, rs212093 y rs12448760 (Bloque 7: AAG).

b) Pacientes con neurotoxicidad grados 1-2 (leve) versus no toxicidad:

Tras realizar el análisis de asociación, 3 haplotipos en 2 genes resultaron significativos: en *ABCC2*, los haplotipos formados por los SNPs rs2756109, rs2273697, rs2073337, rs4148394 y rs4148396 (Bloque 2: GGAAC) y el formado por los SNPs rs3740066, rs3740065, rs12826, rs12762549 y rs11190298 (Bloque 3: ATAGG); en *ABCC1*, el haplotipo formado por los SNPs rs246221, rs35592 y rs3765129 (Bloque 5: CCC).

c) Pacientes con neurotoxicidad grados 3-4 (severa) versus no toxicidad:

Tras realizar el análisis de asociación, un único haplotipo en el gen *RALBP1* resultó significativo: el haplotipo formado por los SNPs rs9946939 y rs420905 (Bloque 1: AG).

Tras aplicar el método de permutaciones para corregir la tasa de error, ninguno de los resultados haplotípicos obtenidos fueron estadísticamente significativos.

Tabla 15. Haplotipos asociados con neurotoxicidad por vincristina en inducción

Neurotoxicidad grados 1-4 (total)					
Gen	SNPs	Haplotipo	Frec No neurotoxicidad	Frec neurotoxicidad	P
<i>ABCC2</i>	rs2756109 ; rs2273697 ; rs2073337 ; rs4148394 ; rs4148396	GGAAC	0,13	0,30	0,004
<i>ABCC1</i>	rs3784862 ; rs246240 ; rs875740 ; rs11642957 ; rs3784864 ; rs11075293	AATCGG	0,09	0,02	0,04
	rs212090 ; rs212093 ; rs12448760	AAG	0,13	0,23	0,04
Neurotoxicidad grados 1-2 (leve)					
<i>ABCC2</i>	rs2756109 ; rs2273697 ; rs2073337 ; rs4148394 ; rs4148396	GGAAC	0,13	0,30	0,004
	rs3740066 ; rs3740065 ; rs12826 ; rs12762549 ; rs11190298	ATAGG	0,50	0,22	0,01
<i>ABCC1</i>	rs246221 ; rs35592 ; rs3765129	CCC	0,13	0,02	0,03
Neurotoxicidad grados 3-4 (severa)					
<i>RALBP1</i>	rs9946939 ; rs420905	AG	0,20	0,03	0,04

RESULTADOS

3.2. POLIMORFISMOS ASOCIADOS A NEUROTOXICIDAD DURANTE EL TRATAMIENTO (NEUROTOXICIDAD EN CUALQUIER FASE)

3.2.1. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

El análisis de asociación por frecuencias genotípicas se realizó comparando grupos de pacientes con diferentes grados de toxicidad.

a) Pacientes con neurotoxicidad grados 1-4 (total) versus no toxicidad:

El análisis de asociación por frecuencias genotípicas mostró una asociación significativa en 12 polimorfismos de 4 genes: 5 SNPs en *ABCC2*, 3 SNPs en *ABCC1*, 3 SNPs en *ABCB1* y 1 SNP en *ABCC3* (Tabla 16).

El SNP rs2073337 localizado en el intrón 12 del gen *ABCC2* mostró el resultado más significativo bajo el modelo dominante (AA vs AG+GG) (OR=0,23; IC 95%: 0,1-0,5). Otros dos SNPs mostraron valores muy significativos con $P < 0,001$: rs3740066, situado en el exón 28 de *ABCC2* (OR=0,26; IC 95%: 0,1-0,5) y rs12826, situado aguas abajo del mismo gen (OR=0,27; IC 95%: 0,1-0,5). Aparte de estos 3 SNPs, otros dos SNPs de *ABCC2* mostraron valores significativos.

En *ABCC1*, rs11864374 en el intrón 21 mostró el valor más significativo. Bajo el modelo dominante, el genotipo AG+AA disminuyó el riesgo con un OR=0,38 (IC 95%: 0,1-0,8).

En *ABCB1*, rs10244266 en el intrón 9, resultó el SNP más significativo. Bajo el modelo dominante, el genotipo GT+GG incrementó el riesgo de neurotoxicidad con un OR=2,48 (IC 95%: 1,12-5,5).

En *ABCC3*, rs4793666 en el intrón 1 fue el único SNP significativo. Bajo el modelo dominante, CG+GG mostró un efecto protector con un valor de OR= 0,46 (IC 95%: 0,2-0,9).

Tras la corrección por FDR, los SNPs rs2073337, rs3740066 y rs12826 de *ABCC2* continuaron teniendo una asociación significativa con neurotoxicidad total.

Tabla 16. SNPs en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina significativamente asociados con neurotoxicidad total durante el tratamiento

Gen	SNP (posición)	Genotipo	No	Neurotoxicidad	OR (IC 95%)	P
			neurotoxicidad n (%) (n=90)	grados 1-4 n (%) (n=44)		
ABCC2	rs2073337 (intrón 12)	AA	15 (18,5)	19 (50)	Dominante 0,23 (0,1-0,5)	0,0005* (0,046)
		AG	50 (61,7)	11 (28,9)		
		GG	16 (19,8)	8 (21,1)		
	rs3740066 (exón 28)	GG	21 (23,6)	21 (53,8)	Dominante 0,26 (0,1-0,5)	0,0009* (0,046)
		AG	54 (60,7)	10 (25,6)		
		AA	14 (15,7)	8 (20,5)		
	rs12826 (aguas abajo)	GG	20 (22,7)	21 (52,5)	Dominante 0,27 (0,1-0,5)	0,0009* (0,046)
		AG	54 (61,4)	11 (27,5)		
		AA	14 (15,9)	8 (20)		
	rs4148396 (intrón 23)	CC	22 (25,6)	20 (50)	Dominante 0,34 (0,1-0,7)	0,007
		CT	50 (58,1)	12 (30)		
		TT	14 (16,3)	8 (20)		
	rs11190298 (aguas abajo)	GG	28 (31,1)	13 (32,5)	Recesivo 2,41 (1,02-5,71)	0,047
		AG	47 (52,2)	14 (35)		
AA		15 (16,7)	13 (32,5)			
ABCC1	rs11864374 (intrón 21)	GG	40 (46)	29 (69)	Dominante 0,38 (0,1-0,8)	0,012
		AG	45 (51,7)	9 (21,4)		
		AA	2 (2,3)	4 (9,5)		
	rs12923345 (intrón 1)	TT	69 (76,7)	24 (55,8)	Dominante 2,60 (1,2-5,6)	0,015
		CT	20 (22,2)	19 (44,2)		
		CC	1 (1,1)	0 (0)		
rs1967120 (intrón 4)	TT	40 (45,5)	27 (64,3)	Dominante 0,46 (0,2-0,9)	0,043	
	CT	45 (51,1)	10 (23,8)			
	CC	3 (3,4)	5 (11,9)			
ABCB1	rs10244266 (intrón 9)	TT	71 (79,8)	27 (61,4)	Dominante 2,48 (1,12-5,5)	0,025
		GT	16 (18)	16 (36,4)		
		GG	2 (2,2)	1 (2,3)		
	rs7789645 (aguas abajo)	GG	68 (75,6)	25 (56,8)	Dominante 2,35 (1,09-5,05)	0,03
		CG	21 (23,3)	18 (40,9)		
		CC	1 (1,1)	1 (2,3)		
rs17327624 (intrón 4)	GG	59 (65,6)	26 (59,1)	Recesivo 5,64 (1,05-30,3)	0,031	
	GT	29 (32,2)	13 (29,5)			
ABCC3	rs4793666 (intrón 1)	TT	2 (2,2)	5 (11,4)	Dominante 0,46 (0,2-0,9)	0,042
		CC	39 (44,3)	26 (63,4)		
		CG	43 (48,9)	12 (29,3)		
		GG	6 (6,8)	3 (7,3)		

* P<0,05 tras corrección por FDR; el valor de P corregido aparece entre paréntesis

RESULTADOS

b) Pacientes con neurotoxicidad grados 1-2 (leve) versus no toxicidad:

Los resultados de asociación mostraron 15 SNPs significativamente asociados con neurotoxicidad leve: 5 SNPs en *ABCC2*, 7 en *ABCC1* y 3 en *ABCB1* (Tabla 17).

Los SNPs del gen *ABCC2* rs12826 (aguas abajo), rs2073337 (intrón 12) y rs3740066 (exón 28) mostraron los resultados de asociación más significativos bajo el modelo dominante. Los genotipos AG+AA rs12826, AG+GG rs2073337 y AG+AA rs3740066 mostraron un efecto protector con valores de OR= 0,20 (IC 95%: 0,08-0,5), 0,19 (IC 95%: 0,08-0,51) y 0,21 (IC 95%: 0,08-0,53), respectivamente. Otros 2 SNPs del mismo gen mostraron valores significativos.

En *ABCC1*, rs11075293 en el intrón 6 mostró el valor más significativo bajo el modelo recesivo. El genotipo AA incrementó el riesgo de neurotoxicidad con un valor de OR=3,61 (IC 95%: 1,29-10,07). Otros 6 SNPs localizados en regiones intrónicas del mismo gen resultaron significativos.

En *ABCB1*, rs10244266 en el intrón 9 mostró el resultado más significativo bajo el modelo dominante. El genotipo GT+GG incrementó el riesgo de toxicidad con un valor de OR=3,94 (IC 95%: 1,6-9,74).

Tras la corrección de FDR, los SNPs rs12826, rs2073337 y rs3740066 en *ABCC2* continuaron teniendo una asociación significativa con neurotoxicidad.

c) Pacientes con neurotoxicidad grados 3-4 (severa) versus no toxicidad:

Cuando analizamos los pacientes con neurotoxicidad severa (grados 3-4) durante el tratamiento, encontramos 5 SNPs asociados significativamente con neurotoxicidad severa: 1 en *ABCC1*, 1 en *ABCB1* y 3 en *ABCC3* (Tabla 18).

Los SNPs rs1293345 en *ABCC1* y rs17327624 en *ABCB1* mostraron los resultados más significativos bajo el modelo dominante (OR=3,29; IC 95%: 1,16-9,34) y recesivo (OR=8,25; IC 95%: 1,28-53,36), respectivamente.

Tras el factor de corrección FDR, ningún SNP fue estadísticamente significativo.

Tabla 17. SNPs en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina significativamente asociados con neurotoxicidad leve durante el tratamiento

Gen	SNP (posición)	Genotipo	No neurotoxicidad n (%) (n=90)	Neurotoxicidad grados 1-2 n (%)(n=26)	OR (IC 95%)	P
ABCC2	rs12826 (aguas abajo)	GG	20 (22,7)	15 (60)	Dominante 0,20 (0,08-0,5)	0,0005* (0,041)
		AG	54 (61,4)	7 (28)		
		AA	14 (15,9)	3 (12)		
	rs2073337 (intrón 12)	AA	15 (18,5)	14 (53,8)	Dominante	0,0006*
		AG	50 (61,7)	8 (30,8)	0,19 (0,08-0,51)	(0,041)
		GG	16 (19,8)	4 (15,4)		
	rs3740066 (exón 28)	GG	21 (23,6)	15 (60)	Dominante	0,0007*
		AG	54 (60,7)	7 (28)	0,21 (0,08-0,53)	(0,041)
		AA	14 (15,7)	3 (12)		
	rs4148396 (intrón 23)	CC	22 (25,6)	14 (56)	Dominante	
		CT	50 (58,1)	7 (28)	0,27 (0,11-0,68)	0,005
		TT	14 (16,3)	4 (16)		
rs11190298 (aguas abajo)	GG	28 (31,1)	5 (20,8)	Recesivo		
	AG	47 (52,2)	10 (41,7)	3,00 (1,11-8,12)	0,034	
	AA	15 (16,7)	9 (37,5)			
ABCC1	rs11075293 (intrón 6)	GG	33 (38,4)	8 (30,8)	Recesivo	
		AG	42 (48,8)	9 (34,6)	3,61 (1,29-10,07)	0,016
		AA	11 (12,8)	9 (34,6)		
	rs11864374 (intrón 21)	GG	40 (46)	19 (70,4)	Dominante	
		AG	45 (51,7)	5 (18,5)	0,36 (0,14-0,91)	0,024
		AA	2 (2,3)	3 (11,1)		
	rs3765129 (intrón 11)	CC	68 (78,2)	14 (56)	Dominante	
		CT	15 (17,2)	11 (44)	2,81 (1,1-7,19)	0,032
		TT	4 (4,6)	0 (0)		
	rs3784864 (intrón 5)	AA	20 (23,3)	9 (32,1)	Recesivo	
		AG	52 (60,5)	9 (32,1)	2,86 (1,09-7,48)	0,035
		GG	14 (16,3)	10 (35,7)		
rs11642957 (intrón 5)	TT	19 (21,6)	8 (30,8)	Recesivo		
	CT	53 (60,2)	8 (30,8)	2,81 (1,08-7,33)	0,037	
	CC	16 (18,2)	10 (38,5)			
rs8054670 (intrón 7)	TT	49 (58,3)	7 (33,3)	Dominante		
	CT	27 (32,1)	10 (47,6)	2,8 (1,02-7,65)	0,039	
	CC	8 (9,5)	4 (19)			
rs1967120 (intrón 4)	TT	40 (45,5)	16 (59,3)	Recesivo		
	CT	45 (51,1)	7 (25,9)	4,93 (1,03-23,6)	0,047	
	CC	3 (3,4)	4 (14,8)			
ABCB1	rs10244266 (intrón 9)	TT	71 (79,8)	14 (50)	Dominante	
		GT	16 (18)	14 (50)	3,94 (1,6-9,74)	0,002
		GG	2 (2,2)	0 (0)		
	rs10274587 (intrón 20)	GG	70 (77,8)	15 (53,6)	Dominante	
		AG	18 (20)	13 (46,4)	3,03 (1,24-7,41)	0,015
		AA	2 (2,2)	0 (0)		
rs7789645 (aguas abajo)	GG	68 (75,6)	15 (53,6)	Dominante		
	CG	21 (23,3)	13 (46,4)	2,68 (1,11-6,49)	0,029	
		CC	1 (1,1)	0 (0)		

* P<0,05 tras corrección por FDR; el valor de P corregido aparece entre paréntesis

RESULTADOS

Tabla 18. SNPs en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina significativamente asociados con neurotoxicidad severa durante el tratamiento

Gen	SNP (posición)	Genotipo	No neurotoxicidad n (%) (n=99)	Neurotoxicidad grados 3-4 n (%) (n=19)	OR (IC 95%)	P
ABCC1	rs12923345 (intrón 1)	TT	69 (76,7)	9 (50)	Dominante	0,027
		CT	20 (22,2)	9 (50)	3,29 (1,16-9,34)	
		CC	1 (1,1)	0 (0)		
ABCB1	rs17327624 (intrón 4)	GG	59 (65,6)	11 (57,9)	Recesivo	0,027
		GT	29 (32,2)	5 (26,3)	8,25 (1,28-53,36)	
		TT	2 (2,2)	3 (15,8)		
ABCC3	rs4793666 (intrón 1)	CC	39 (44,3)	13 (72,2)	Dominante	0,028
		CG	43 (48,9)	5 (27,8)	0,31 (0,1-0,93)	
		GG	6 (6,8)	0 (0)		
	rs739921 (intrón 1)	CC	47 (52,2)	5 (26,3)	Dominante	0,036
		CG	39 (43,3)	13 (68,4)	3,06 (1,02-9,21)	
		GG	4 (4,4)	1 (5,3)		
	rs2189595 (aguas arriba)	AA	27 (32,5)	3 (17,6)	Recesivo	0,041
		AG	51 (61,4)	10 (58,8)	4,8 (1,14-20,26)	
		GG	5 (6)	4 (23,5)		

3.2.2. FRECUENCIAS ALÉLICAS

El análisis de asociación por frecuencias alélicas se realizó comparando grupos de pacientes con diferentes grados de toxicidad.

a) Pacientes con neurotoxicidad grados 1-4 (total) versus no toxicidad:

El estudio de asociación por frecuencias alélicas mostró que 5 SNPs en 3 genes estaban asociados con la neurotoxicidad total asociada a la vincristina: 2 SNPs en *ABCC2*, 1 SNP en *ABCC1* y 2 en el *ABCB1* (Tabla 19).

El resultado más significativo fue el encontrado en rs2756109 situado en el intrón 7 del gen *ABCC2* ($p=0,02$). El alelo G incrementó el riesgo con un valor de $OR=1,87$ (IC 95%: 1,09-3,2).

Tras corregir la tasa de error por el método de permutaciones, la asociación no se mantuvo significativa en ningún caso.

Tabla 19. SNPs en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina significativamente asociados con neurotoxicidad total durante el tratamiento. Análisis por frecuencias alélicas.

Gen	SNP	Alelo de riesgo	Frec control	Frec casos	OR (IC 95%)	P
<i>ABCC2</i>	rs2756109	G	0,41	0,60	1,87 (1,09-3,20)	0,02
	rs2073337	A	0,50	0,65	1,81 (1,03-3,20)	0,04
<i>ABCC1</i>	rs12923345	C	0,12	0,22	2,04 (1,04-4,01)	0,04
<i>ABCB1</i>	rs7789645	C	0,13	0,23	2,01 (1,03-3,90)	0,04
	rs10244266	G	0,11	0,20	2,03 (1,01-4,08)	0,04

b) Pacientes con neurotoxicidad grados 1-2 (leve) versus no toxicidad:

El estudio de asociación por frecuencias alélicas mostró que 7 SNPs en 3 genes estaban asociados con neurotoxicidad leve: 4 SNPs en *ABCC2*, 1 SNP en *ABCC1* y 2 en *ABCB1* (Tabla 20).

Los SNPs rs2073337, rs3740066, rs12826 en *ABCC2* y rs10244266 en *ABCB1* mostraron los resultados más significativos ($p=0,01$). En rs2073337, el alelo A incrementó el riesgo de toxicidad con un valor de $OR=2,25$ (IC 95%: 1,16-4,38). En los SNPs rs3740066, rs12826 y rs10244266, el alelo G incrementó el riesgo con unos valores de $OR=2,43$ (IC 95%: 1,21-4,88), $OR=2,48$ (IC 95%: 1,24-4,99) y $OR=2,63$ (IC 95%: 1,23-5,65), respectivamente.

Tras corregir la tasa de error por el método de permutaciones, la asociación no se mantuvo significativa en ningún caso.

RESULTADOS

Tabla 20. SNPs en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina significativamente asociados con neurotoxicidad leve durante el tratamiento. Análisis por frecuencias alélicas.

Gen	SNP	Alelo de riesgo	Frec control	Frec casos	OR (IC 95%)	P
ABCC2	rs2073337	A	0,5	0,7	2,25 (1,16-4,38)	0,01
	rs3740066	G	0,5	0,7	2,43 (1,21-4,88)	0,01
	rs12826	G	0,5	0,7	2,48 (1,24-4,99)	0,01
	rs2756109	G	0,41	0,6	2,18 (1,15-4,13)	0,02
ABCC1	rs8054670	C	0,25	0,4	2,18 (1,08-4,40)	0,03
ABCB1	rs10244266	G	0,11	0,25	2,63 (1,23-5,65)	0,01
	rs10274587	A	0,12	0,23	2,17 (1,01-4,66)	0,04

c) Pacientes con neurotoxicidad grados 3-4 (severa) versus no toxicidad:

El estudio de asociación por frecuencias alélicas mostró que 2 SNPs en *ABCC3* estaban asociados con neurotoxicidad severa (Tabla 21). En ambos SNPs, el alelo C incrementó el riesgo con un valor de OR=2,40 (IC 95%: 1,09-5,32) y OR=2,82 (IC 95%: 1,04-7,64), respectivamente.

Tras corregir la tasa de error por el método de permutaciones, la asociación no se mantuvo significativa en ningún caso.

Tabla 21. SNPs en genes implicados en la farmacocinética de la vincristina significativamente asociados con neurotoxicidad severa durante el tratamiento. Análisis por frecuencias alélicas.

Gen	SNP	Alelo de riesgo	Frec control	Frec casos	OR (IC 95%)	P
ABCC3	rs4793666	C	0,69	0,86	2,40 (1,09-5,32)	0,03
	rs4148411	C	0,20	0,33	2,82 (1,04-7,64)	0,03

3.2.3. FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS

El análisis de asociación por frecuencias haplotípicas se realizó comparando grupos de pacientes con diferentes grados de toxicidad (Tabla 22).

a) Pacientes con neurotoxicidad grado 1-4 (total) versus no toxicidad

Tras realizar el análisis de asociación, 4 haplotipos en 2 genes resultaron significativos.

En el gen *ABCC1*, los haplotipos formados por los SNPs rs3784862, rs246240, rs875740, rs11642957, rs3784864 y rs11075293 (Bloque 4: AATCGG), los SNPs rs215049, rs6498594 y rs152023 (Bloque 2: GAG), y los SNPs rs246221, rs35592 y rs3765129 (Bloque 5: CCC). En *ABCC2*, el haplotipo formado por los SNPs rs2756109, rs2273697, rs2073337, rs4148394 y rs4148396 (Bloque 2: GGAAC).

b) Pacientes con neurotoxicidad grados 1-2 (leve) versus no toxicidad:

Tras realizar el análisis de asociación, 4 haplotipos en 3 genes resultaron significativos.

En el gen *ABCC2*, los haplotipos formados por los SNPs rs2756109, rs2273697, rs2073337, rs4148394 y rs4148396 (Bloque 2: GGAAC) y rs3740066, rs3740065, rs12826, rs12762549 y rs11190298 (Bloque 3: ATAGG). En *ABCB1*, el haplotipo formado por los SNPs rs4148743, rs4148738, rs10274587, rs10268314, rs6961419, rs2235046, rs2235013, rs1922240, rs10244266, rs4148734 y rs2520464 (Bloque 3: GAACTGATGCG). Finalmente, en *ABCC1*, el haplotipo formado por los SNPs rs246221, rs35592 y rs3765129 (Bloque 5: CCC).

c) Pacientes con neurotoxicidad grados 3-4 (severa) versus no toxicidad:

Tras realizar el análisis de asociación, 2 haplotipos en el gen *ABCC3* mostraron resultados significativos: los haplotipos formados por los SNPs rs17562467, rs4793666 y rs17562516 (Bloque 3: CCT/CGT).

Tras aplicar el método de permutaciones para corregir la tasa de error, ninguno de los resultados haplotípicos obtenidos fueron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Tabla 22. Haplotipos asociados con neurotoxicidad por vincristina durante el tratamiento

Neurotoxicidad total					
Gen	SNPs	Haplotipo	Frec. No neurotoxicidad	Frec. Neurotoxicidad	P
ABCC1	rs3784862 ; rs246240 ; rs875740 ; rs11642957 ; rs3784864 ; rs11075293	AATCGG	0,09	0,02	0,02
	rs215049; rs6498594; rs152023	GAG	0,07	0,01	0,03
	rs246221; rs35592; rs3765129	CCC	0,13	0,05	0,03
ABCC2	rs2756109 ; rs2273697 ; rs2073337 ; rs4148394 ; rs4148396	GGAAC	0,13	0,25	0,02
Neurotoxicidad leve					
ABCC2	rs3740066 ; rs3740065 ; rs12826 ; rs12762549 ; rs11190298	ATAGG	0,46	0,27	0,02
	rs2756109 ; rs2273697 ; rs2073337 ; rs4148394 ; rs4148396	GGAAC	0,13	0,26	0,03
ABCB1	rs4148743 ; rs4148738 ; rs10274587 ; rs10268314 ; rs6961419 ; rs2235046 ; rs2235013 ; rs1922240 ; rs10244266 ; rs4148734 ; rs2520464	GAACTGATGCG	0,12	0,23	0,03
ABCC1	rs246221; rs35592; rs3765129	CCC	0,13	0,035	0,04
Neurotoxicidad severa					
ABCC3	rs17562467; rs4793666; rs17562516	CCT	0,4	0,55	0,04
		CGT	0,31	0,15	0,04

4. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DE GENES IMPLICADOS EN LA FARMACODINAMIA DE LA VINCRISTINA Y LA NEUROTOXICIDAD

Para estudiar la asociación entre los polimorfismos genéticos seleccionados y la presencia/ausencia de toxicidad neurológica asociada a la vincristina, se compararon las frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas entre los grupos de pacientes, en las diferentes fases del tratamiento (inducción y de forma global). A la hora de valorar los resultados de toxicidad, se consideraron 3 fenotipos: (1) neurotoxicidad total (grados 1-4) (2) neurotoxicidad leve (grados 1-2) y (3) neurotoxicidad severa (grados 3-4).

El estudio de asociación incluyó un total de 21 SNPs en 6 genes implicados en la farmacodinamia de la vincristina (*MAPT*, *TUBB1*, *TUBB2A*, *TUBB3*, *TUBB4*, y *CEP72*). El SNP rs17145779 en el gen *TUBB2B* no fue incluido en los análisis porque resultó monomórfico en nuestra población.

En primer lugar, se comprobó que la neurotoxicidad no estaba asociada significativamente con las covariables edad, sexo y número de vincristinas recibidas, por lo que no se incluyeron estas covariantes en los análisis de asociación.

A continuación, se presentan los resultados de los genes *MAPT*, *TUBB1*, *TUBB2A*, *TUBB3* y *TUBB4*.

4.1. POLIMORFISMOS ASOCIADOS A NEUROTOXICIDAD EN INDUCCIÓN

4.1.1. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

El análisis de asociación por frecuencias genotípicas se realizó comparando grupos de pacientes con diferentes grados de toxicidad.

a) Pacientes con neurotoxicidad grados 1-4 (total) versus no toxicidad:

No se encontró ninguna asociación entre SNPs situados en genes implicados en la farmacodinamia de la vincristina y neurotoxicidad total.

b) Pacientes con neurotoxicidad grados 1-2 (leve) versus no toxicidad:

No se encontró ninguna asociación entre SNPs situados en genes implicados en la farmacodinamia de la vincristina y neurotoxicidad leve.

c) Pacientes con neurotoxicidad grados 3-4 (severa) versus no toxicidad:

Los resultados de asociación mostraron un SNP en el gen *MAPT* asociado con neurotoxicidad severa: rs11867549, localizado en el intrón 1 del gen. Bajo el modelo dominante, el genotipo AG+GG mostró un efecto protector (OR=0,21; IC 95%: 0,04-0,96) (Tabla 23).

Tras el factor de corrección FDR, la asociación no se mantuvo significativa.

RESULTADOS

Tabla 23. SNPs en genes implicados en la farmacodinamia de la vincristina significativamente asociados con neurotoxicidad severa en inducción

Gen	SNP (Posición)	Genotipo	No neurotoxicidad n (%) (n=94)	Neurotoxicidad grados 3-4 n (%) (n=16)	OR (IC 95%)	P
MAPT	rs11867549 (intrón 1)	AA	52 (57,1)	13 (86,7)	Dominante	0,21 (0,04-0,96)
		AG	36 (39,6)	2 (13,3)		
		GG	3 (3,3)	0 (0)		

4.1.2. FRECUENCIAS ALÉLICAS

El estudio de asociación por frecuencias alélicas se realizó comparando grupos de pacientes con diferentes grados de toxicidad.

a) Pacientes con neurotoxicidad grados 1-4 (total) versus no toxicidad:

No se encontró ninguna asociación con neurotoxicidad total.

b) Pacientes con neurotoxicidad grados 1-2 (leve) versus no toxicidad:

El estudio de asociación mostró que un SNP en el gen *TUBB3* estaba asociado con neurotoxicidad leve (Tabla 24): rs4558416, situado aguas abajo del gen. El alelo A incrementó el riesgo con valor de OR=2,17 (IC 95%: 1,06-4,47).

Tras corregir la tasa de error por el método de permutaciones, la asociación no se mantuvo significativa.

c) Pacientes con neurotoxicidad grados 3-4 (severa) versus no toxicidad:

No se encontró ninguna asociación con neurotoxicidad severa.

Tabla 24. SNPs en genes implicados en la farmacodinamia de la vincristina significativamente asociados con neurotoxicidad leve en inducción. Análisis por frecuencias alélicas

Gen	SNP	Alelo de riesgo	Frec control	Frec casos	OR (IC 95%)	P
<i>TUBB3</i>	rs4558416	A	0,56	0,73	2,17 (1,06-4,47)	0,03

4.1.3. FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS

Para estudiar la asociación entre las frecuencias haplotípicas y la neurotoxicidad por vincristina, en primer lugar, se valoró el desequilibrio de ligamiento de los bloques de cada gen. Los genes *TUBB2A* y *TUBB4* quedaron excluidos de estos análisis porque sólo se estudió 1 SNP de cada. La definición de los bloques se basó en el estudio de Gabriel y cols (149). El gen *TUBB3* se definió por 1 bloque con 3 haplotipos. Los genes *MAPT* y *TUBB1* no mostraron ningún bloque haplotípico (Figura 15)

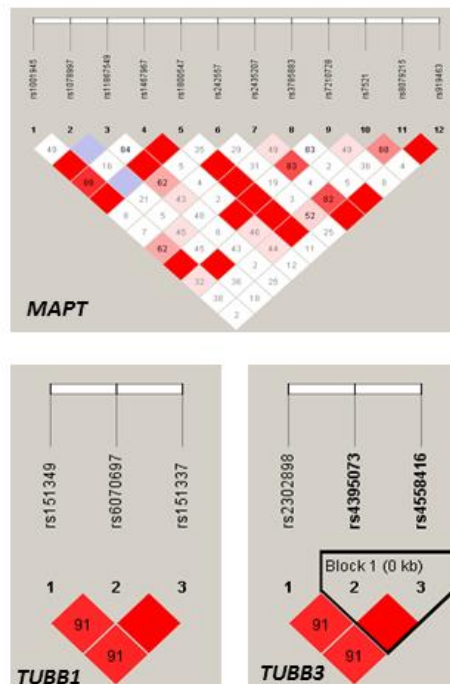


Figura 15. Bloques de desequilibrio de ligamiento de los genes implicados en la farmacodinamia de la vincristina basados en el método de Gabriel y cols. Imágenes extraídas con el software Haploview v.4.2.

El análisis de asociación por frecuencias haplotípicas se realizó comparando grupos de pacientes con diferentes grados de toxicidad.

- a) Pacientes con neurotoxicidad grado 1-4 (total) versus no toxicidad:

No se encontró ninguna asociación con neurotoxicidad total.

RESULTADOS

b) Pacientes con neurotoxicidad grado 1-2 (leve) versus no toxicidad:

Tras realizar el análisis de asociación, dos haplotipos formados por los SNPs rs4395073 y rs4558416 (bloque 1: CA/TG) del gen *TUBB3* resultaron significativos (Tabla 25). Tras aplicar el método de permutaciones para corregir la tasa de error, ninguno de los resultados haplotípicos obtenidos fueron estadísticamente significativos.

Tabla 25. Haplotipos significativos asociados con neurotoxicidad leve en inducción

Gen	SNPs	Haplotipo	Frec. No neurotoxicidad	Frec. Neurotoxicidad	P
<i>TUBB3</i>	rs4395073; rs4558416	CA	0,6	0,7	0,03
		TG	0,3	0,15	0,04

c) Pacientes con neurotoxicidad grado 3-4 versus no toxicidad:

No se encontró ninguna asociación con neurotoxicidad severa.

4.2. POLIMORFISMOS ASOCIADOS A NEUROTOXICIDAD DURANTE EL TRATAMIENTO (NEUROTOXICIDAD EN CUALQUIER FASE)

4.2.1. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

El análisis de asociación por frecuencias genotípicas se realizó comparando grupos de pacientes con diferentes grados de toxicidad:

a) Pacientes con neurotoxicidad grados 1-4 (total) versus no toxicidad:

No se encontró ninguna asociación con neurotoxicidad total.

b) Pacientes con neurotoxicidad grados 1-2 (leve) versus no toxicidad:

No se encontró ninguna asociación con la neurotoxicidad leve.

c) Pacientes con neurotoxicidad grados 3-4 (severa) versus no toxicidad:

El análisis de asociación por frecuencias genotípicas mostró una asociación significativa entre dos SNPs y neurotoxicidad severa: rs11867549, localizado en el intrón 1 del gen *MAPT* y rs151337, localizado aguas abajo del gen *TUBB1* (Tabla 26).

El SNP rs11867549 mostró el resultado más significativo bajo el modelo dominante. Los genotipos AG+GG mostraron un efecto protector con valor de OR=0,26 (IC 95%: 0,07-0,96).

El SNP rs151337 fue significativo bajo el modelo recesivo. El genotipo TT incrementó el riesgo de neurotoxicidad con un valor de OR=3,85 (IC 95%: 1,09-13,58).

Tras el factor de corrección FDR, estos resultados no fueron estadísticamente significativos.

Tabla 26. SNPs en genes implicados en la farmacodinamia de la vincristina significativamente asociados con neurotoxicidad severa durante el tratamiento

Gen	SNP (posición)	Genotipo	No neurotoxicidad (n,%) (n=90)	Neurotoxicidad 3-4 (n,%) (n=19)	OR (IC 95%)	P
<i>MAPT</i>	rs11867549 (intrón 1)	AA	49 (76,6)	15 (23,4)	Dominante	0,26 (0,07-0,96)
		AG	35 (94,6)	2 (5,4)		
		GG	3 (75)	1 (25)		
<i>TUBB1</i>	rs151337 (aguas abajo)	CC	36 (85,7)	6 (14,3)	Recesivo	3,85 (1,09-13,58)
		CT	44 (86,3)	7 (13,7)		
		TT	8 (61,5)	5 (38,5)		

4.2.2. FRECUENCIAS ALÉLICAS

El análisis de asociación por frecuencias alélicas no mostró ninguna asociación significativa entre los genes implicados en la farmacodinamia de la vincristina y la neurotoxicidad.

4.2.3. FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS

Previo al estudio de asociación entre la neurotoxicidad por vincristina y las frecuencias haplotípicas, se valoró el desequilibrio de ligamiento de los bloques de cada gen. La definición

RESULTADOS

de los bloques se basó en el estudio de Gabriel y cols, tal y como se describe en el apartado 4.1.3. No se encontró ninguna asociación con neurotoxicidad total, leve o severa.

4.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE CEP72 Y NEUROTOXICIDAD ASOCIADA A LA VINCRISTINA

Dado que durante el transcurso de esta tesis se publicaron los resultados de un GWAS, que asociaba un SNP del gen *CEP72* con neurotoxicidad por vincristina, se decidió incluir el SNP rs924607 en el presente estudio. En este caso, para poder comparar los resultados derivados del estudio de neurotoxicidad con el GWAS publicado, la neurotoxicidad se evaluó de acuerdo a la versión 1.0 del Criterio de Terminología Común para los Efectos Adversos (CTCAE). Los pacientes con grado 2, 3 y 4 se consideraron como casos de neuropatía.

Bajo estas condiciones, el 25,4% de los pacientes (36/142) desarrollaron neurotoxicidad durante la inducción, mientras que sólo el 4,2% (6/142) desarrollaron neurotoxicidad en otras fases del tratamiento.

4.3.1. ÉXITO DEL GENOTIPADO

Se incluyeron un total de 142 muestras de LLA-B. El éxito en la determinación del genotipo fue del 100%.

4.3.2. ASOCIACIÓN ENTRE RS924607 Y TOXICIDAD POR VINCRISTINA

En primer lugar, se comprobó que la neurotoxicidad no estaba asociada significativamente con las covariables edad, sexo y número de vincristinas recibidas, por lo que no se incluyeron estas covariantes en los análisis de asociación.

En inducción, los resultados de asociación mostraron que el genotipo TT del SNP rs924607 no estaba asociado con neurotoxicidad total por vincristina ($p=0,5$). Tampoco se encontró asociación entre dicho genotipo y neurotoxicidad severa ($p=0,76$). El estudio por frecuencias alélicas tampoco mostró resultados significativos ($p=1$) (Tabla 27).

Tabla 27. Estudio de asociación de *CEP72* rs924607 y la neurotoxicidad relacionada con la vincristina en la inducción

Genotipo	Total	G 0-1	G 2-4	P	OR (95% IC)	G 3-4	P	OR (IC 95%)
	n (%)	n (%)	n (%)	(G 0-1 vs 2-4)		n (%)	(G 0-1 vs 3-4)	
CC	46 (32,4)	35 (33)	11 (30,6)		Recesivo	1 (16,7)		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)
TT	16 (11,3)	13 (12,3)	3 (8,3)			1 (16,7)		
C	172 (60,6)	128 (60,4)	44 (61,1)	1	0,96 (0,53-1,73)	6 (50)	0,55	1,52 (0,39-5,89)
T	112 (39,4)	84 (39,6)	28 (38,9)			6 (50)		

En otras fases del tratamiento, no se encontró asociación entre el genotipo TT de rs924607 y neurotoxicidad ($p=0,68$). Sin embargo, este hecho puede ser debido al escaso número de pacientes que presentaron neurotoxicidad en las fases posteriores a la inducción (Tabla 28).

Tabla 28. Estudio de asociación de *CEP72* rs924607 y la neurotoxicidad relacionada con la vincristina en otras fases del tratamiento

Genotipo	Total	G 0-1	G 2-4	P (G 0-1 vs 2-4)	OR (IC 95%)
	n (%)	n (%)	n (%)		
CC	46 (32,4)	43 (31,6)	3 (50)		Recesivo
CT	80 (56,3)	78 (57,4)	2 (33,3)	0,68	1,61 (0,18-14,7)
TT	16 (11,3)	15 (11)	1 (16,7)		
C	172 (60,6)	164 (77,4)	8 (66,7)	0,76	0,75 (0,16-2,92)
T	112 (39,4)	108 (22,6)	4 (33,3)		

Tabla anexa 1. Muestras fallidas

Toxicidad neurológica inducción/total	n
No toxicidad	9
Toxicidad leve	4
Toxicidad grave	2

ANEXO RESULTADOS

Tabla anexa 2. SNPs eliminados del estudio

Gen	SNP	Cromosoma	Localización	Razón de exclusión
TUBB2B	rs17145779	6	3225075	Monomórfico
ABCB1	rs10260862	7	87201482	Fallo en el genotipado
	rs2214102	7	87229501	Fallo en el genotipado
CYP3A4	rs2246709	7	99365719	Genotipado <75%
ABCC2	rs7906080	10	101547647	Fallo en el genotipado
	rs4148386	10	101548468	Fallo en el genotipado
	rs9794323	10	101587002	Fallo en el genotipado
	rs11190297	10	101618103	Fallo en el genotipado
ABCC1	rs193538	16	16127916	Fallo en el genotipado
	rs35625	16	16169566	Fallo en el genotipado
	rs4780591	16	16204979	Fallo en el genotipado
	rs2299670	16	16220858	Fallo en el genotipado
	rs212081	16	16225971	Genotipado <75%
	rs129081	16	16235939	Fallo en el genotipado
ABCC3	rs4148412	17	48733815	Fallo en el genotipado
	rs4148413	17	48740798	Fallo en el genotipado
	rs8075406	17	48749522	Fallo en el genotipado
	rs2277624	17	48761105	Genotipado <75%

Tabla anexa 3. Resultados brutos de asociación en inducción bajo el modelo dominante.

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
1	MAPT	rs1001945	CC	30 (32,6)	11 (28,9)		0,68
			CG	46 (50,0)	21 (55,3)	Dominante	
			GG	16 (17,4)	6 (15,8)	1,19 (0,52-2,71)	
2	RALBP1	rs1049553	CC	58 (63,7)	24 (64,9)		0,90
			CT	29 (31,9)	10 (27,0)	Dominante	
			TT	4 (4,4)	3 (8,1)	0,95 (0,43-2,12)	
3	MAPT	rs1078997	AA	72 (78,3)	29 (76,3)		0,81
			AG	17 (18,5)	8 (21,1)	Dominante	
			GG	3 (3,3)	1 (2,6)	1,12 (0,46-2,74)	
4	MAPT	rs11867549	AA	52 (57,1)	25 (65,8)		0,36
			AG	36 (39,6)	10 (26,3)	Dominante	
			GG	3 (3,3)	3 (7,9)	0,69 (0,32-1,53)	
5	CYP3A4	rs12333983	TT	71 (77,2)	29 (76,3)		0,92
			AT	18 (19,6)	9 (23,7)	Dominante	
			AA	3 (3,3)	0 (0,0)	1,05 (0,43-2,56)	
6	RALBP1	rs12454987	GG	34 (47,9)	17 (44,7)		0,75
			AG	32 (45,1)	18 (47,4)	Dominante	
			AA	5 (7,0)	3 (7,9)	1,14 (0,51-2,50)	
7	MAPT	rs1467967	AA	44 (47,8)	17 (45,9)		0,85
			AG	41 (44,6)	18 (48,6)	Dominante	
			GG	7 (7,6)	2 (5,4)	1,08 (0,50-2,32)	
8	TUBB1	rs151337	CC	37 (40,2)	15 (39,5)		0,94
			CT	45 (48,9)	18 (47,4)	Dominante	
			TT	10 (10,9)	5 (3,2)	1,03 (0,48-2,23)	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
9	<i>TUBB1</i>	rs151349	TT	27 (29,3)	12 (32,4)		0,73
			CT	45 (48,9)	17 (45,9)	Dominante	
			CC	20 (21,7)	8 (21,6)	0,87 (0,38-1,97)	
10	<i>MAPT</i>	rs1800547	AA	58 (63,7)	19 (50,0)		0,15
			AG	26 (28,6)	17 (44,7)	Dominante	
			GG	7 (7,7)	2 (5,3)	1,76 (0,82-3,78)	
11	<i>TUBB3</i>	rs2302898	CC	54 (58,7)	24 (63,2)		0,64
			CT	26 (28,3)	14 (36,8)	Dominante	
			TT	12 (13,0)	0 (0,0)	0,83 (0,38-1,81)	
12	<i>MAPT</i>	rs242557	GG	36 (42,9)	17 (48,6)		0,57
			AG	29 (34,5)	8 (22,9)	Dominante	
			AA	19 (22,6)	10 (28,6)	0,79 (0,36-1,75)	
13	<i>MAPT</i>	rs2435207	GG	49 (53,3)	22 (57,9)		0,63
			AG	32 (34,8)	13 (34,2)	Dominante	
			AA	11 (12,0)	3 (7,9)	0,83 (0,39-1,78)	
14	<i>MAPT</i>	rs3785883	GG	59 (64,1)	28 (73,7)		0,29
			AG	31 (33,7)	9 (23,7)	Dominante	
			AA	2 (2,2)	1 (2,6)	0,64 (0,28-1,48)	
15	<i>TUBB4</i>	rs3865466	TT	24 (26,1)	11 (29,7)		0,68
			CT	43 (46,7)	19 (51,4)	Dominante	
			CC	25 (27,2)	7 (18,9)	0,83 (0,36-1,94)	
16	<i>RALBP1</i>	rs420905	AA	40 (44,0)	19 (51,4)		0,45
			AG	39 (42,9)	15 (40,5)	Dominante	
			GG	12 (13,2)	3 (8,1)	0,74 (0,35-1,60)	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
17	TUBB3	rs4395073	CC	49 (53,3)	23 (60,5)		0,45
			CT	31 (33,7)	14 (36,8)	Dominante	
			TT	12 (13,0)	1 (2,6)	0,74 (0,34-1,60)	
18	TUBB3	rs4558416	AA	38 (41,8)	17 (44,7)		0,76
			AG	27 (29,7)	16 (42,1)	Dominante	
			GG	26 (28,6)	5 (13,2)	0,89 (0,41-1,90)	
19	CYP3A4	rs4646437	CC	73 (79,3)	28 (73,7)		0,49
			CT	16 (17,4)	10 (26,3)	Dominante	
			TT	3 (3,3)	0 (0,0)	1,37 (0,57-3,31)	
20	CYP3A5	rs4646450	CC	67 (72,8)	29 (76,3)		0,68
			CT	19 (20,7)	8 (21,1)	Dominante	
			TT	6 (6,5)	1 (2,6)	0,83 (0,35-2,00)	
21	TUBB1	rs6070697	GG	66 (71,7)	22 (57,9)		0,13
			AG	24 (26,1)	16 (42,1)	Dominante	
			AA	2 (2,2)	0 (0,0)	1,85 (0,84-4,06)	
22	CYP3A4	rs6956344	CC	76 (83,5)	30 (78,9)		0,54
			CT	14 (15,4)	8 (21,1)	Dominante	
			TT	1 (1,1)	0 (0,0)	1,35 (0,52-3,52)	
23	MAPT	rs7210728	GG	40 (43,5)	14 (37,8)		0,56
			AG	39 (42,4)	19 (51,4)	Dominante	
			AA	13 (14,1)	4 (10,8)	1,26 (0,58-2,76)	
24	RALBP1	rs7227801	GG	83 (90,2)	32 (84,2)		0,34
			AG	9 (9,8)	5 (13,2)	Dominante	
			AA	0 (0,0)	1 (2,6)	1,73 (0,57-5,25)	
25	MAPT	rs7521	GG	25 (27,2)	10 (26,3)		0,92
			AG	48 (52,2)	20 (52,6)	Dominante	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
			AA	19 (20,7)	8 (21,1)	1,04 (0,44-2,46)	
26	<i>CYP3A5</i>	rs776746	GG	77 (83,7)	33 (86,8)		0,65
			AG	13 (14,1)	5 (13,2)	Dominante	
			AA	2 (2,2)	0 (0,0)	0,78 (0,26-2,32)	
27	<i>MAPT</i>	rs8079215	TT	51 (55,4)	20 (52,6)		0,77
			CT	37 (40,2)	15 (39,5)	Dominante	
			CC	4 (4,3)	3 (7,9)	1,12 (0,52-2,39)	
28	<i>RALBP1</i>	rs8092935	CC	60 (66,7)	28 (73,7)		0,43
			AC	29 (32,2)	10 (26,3)	Dominante	
			AA	1 (1,1)	0 (0,0)	0,71 (0,31-1,66)	
29	<i>ABCC10</i>	rs831312	AA	67 (73,6)	22 (57,9)		0,08
			AG	20 (22,0)	14 (36,8)	Dominante	
			GG	4 (4,4)	2 (5,3)	2,03 (0,92-4,50)	
30	<i>MAPT</i>	rs919463	GG	52 (61,2)	22 (62,9)		0,86
			AG	20 (23,5)	9 (25,7)	Dominante	
			AA	13 (15,3)	4 (11,4)	0,93 (0,41-2,10)	
31	<i>ABCC10</i>	rs9357412	GG	52 (57,1)	19 (51,4)		0,55
			CG	30 (33,0)	16 (43,2)	Dominante	
			CC	9 (9,9)	2 (5,4)	1,26 (0,59-2,72)	
32	<i>ABCC10</i>	rs9394952	GG	26 (28,3)	14 (37,8)		0,29
			AG	50 (54,3)	16 (43,2)	Dominante	
			AA	16 (17,4)	7 (18,9)	0,65 (0,29-1,45)	
33	<i>TUBB2A</i>	rs9405612	TT	39 (43,3)	17 (48,6)		0,60
			CT	40 (44,4)	14 (40,0)	Dominante	
			CC	11 (12,2)	4 (11,4)	0,81 (0,37-1,77)	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
34	<i>RALBP1</i>	rs9946939	AA	64 (70,3)	26 (68,4)		0,83
			AG	23 (25,3)	10 (26,3)	Dominante	
			GG	4 (4,4)	2 (5,3)	1,09 (0,48-2,48)	
35	<i>ABCC2</i>	rs1885301	AA	22 (25,0)	12 (31,6)		0,45
			AG	47 (53,4)	14 (36,8)	Dominante	
			GG	19 (21,6)	12 (31,6)	0,72 (0,31-1,67)	
36	<i>ABCC2</i>	rs717620	GG	45 (48,9)	25 (64,1)		0,11
			AG	43 (46,7)	10 (25,6)	Dominante	
			AA	4 (4,3)	4 (10,3)	0,54 (0,25-1,16)	
37	<i>ABCC2</i>	rs2756105	TT	22 (23,9)	12 (33,3)		0,28
			CT	50 (54,3)	13 (36,1)	Dominante	
			CC	20 (21,7)	11 (30,6)	0,63 (0,27-1,46)	
38	<i>ABCC2</i>	rs4148385	AA	20 (22,5)	12 (31,6)		0,29
			AC	50 (56,2)	14 (36,8)	Dominante	
			CC	19 (21,3)	12 (31,6)	0,63 (0,27-1,46)	
39	<i>ABCC2</i>	rs2145853	AA	22 (23,9)	12 (32,4)		0,33
			AG	51 (55,4)	14 (37,8)	Dominante	
			GG	19 (20,7)	11 (29,7)	0,65 (0,28-1,51)	
40	<i>ABCC2</i>	rs2756109	TT	32 (35,2)	8 (21,6)		0,13
			GT	43 (47,3)	17 (45,9)	Dominante	
			GG	16 (17,6)	12 (32,4)	1,97 (0,80-4,80)	
41	<i>ABCC2</i>	rs2273697	GG	69 (73,4)	32 (86,5)		0,10
			AG	22 (23,4)	5 (13,5)	Dominante	
			AA	3 (3,2)	0 (0,0)	0,43 (0,15-1,23)	
42	<i>ABCC2</i>	rs2073337	AA	17 (20,0)	17 (50,0)		0,001
			AG	51 (60,0)	10 (29,4)	Dominante	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
			GG	17 (20,0)	7 (20,6)	0,25 (0,11-0,59)	
43	ABCC2	rs4148394	AA	54 (58,1)	21 (56,8)		0,89
			AC	34 (36,6)	12 (32,4)	Dominante	
			CC	5 (5,4)	4 (10,8)	1,05 (0,49-2,28)	
44	ABCC2	rs4148396	CC	24 (26,7)	18 (50,0)		0,01
			CT	51 (56,7)	11 (30,6)	Dominante	
			TT	15 (16,7)	7 (19,4)	0,36 (0,16-0,81)	
45	ABCC2	rs3740066	GG	22 (23,7)	20 (57,1)		0,0004
			AG	56 (60,2)	8 (22,9)	Dominante	
			AA	15 (16,1)	7 (20,0)	0,23 (0,10-0,53)	
46	ABCC2	rs3740065	TT	77 (81,9)	26 (68,4)		
			CT	17 (18,1)	12 (31,6)		
			CC	0 (0,0)	0 (0,0)		
47	ABCC2	rs12826	GG	21 (22,8)	20 (55,6)		0,0005
			AG	56 (60,9)	9 (25,0)	Dominante	
			AA	15 (16,3)	7 (19,4)	0,24 (0,10-0,54)	
48	ABCC2	rs12762549	GG	26 (28,9)	12 (34,3)		0,56
			CG	48 (53,3)	13 (37,1)	Dominante	
			CC	16 (17,8)	10 (28,6)	0,78 (0,34-1,79)	
49	ABCC2	rs11190298	GG	29 (30,9)	12 (33,3)		0,79
			AG	49 (52,1)	12 (33,3)	Dominante	
			AA	16 (17,0)	12 (33,3)	0,89 (0,39-2,03)	
50	ABCC1	rs8050881	GG	48 (51,1)	17 (42,5)		0,36
			AG	36 (38,3)	17 (42,5)	Dominante	
			AA	10 (10,6)	6 (15,0)	1,41 (0,67-2,98)	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
51	ABCC1	rs4148330	AA	39 (41,5)	17 (42,5)		0,91
			AG	41 (43,6)	14 (35,0)	Dominante	
			GG	14 (14,9)	9 (22,5)	0,96 (0,45-2,03)	
52	ABCC1	rs504348	CC	58 (62,4)	23 (59,0)		0,72
			CG	32 (34,4)	12 (30,8)	Dominante	
			GG	3 (3,2)	4 (10,3)	1,15 (0,54-2,47)	
53	ABCC1	rs215101	GG	67 (71,3)	30 (75,0)		0,66
			CG	24 (25,5)	10 (25,0)	Dominante	
			CC	3 (3,2)	0 (0,0)	0,83 (0,36-1,92)	
54	ABCC1	rs215099	GG	38 (41,3)	19 (51,4)		0,30
			GT	46 (50,0)	13 (35,1)	Dominante	
			TT	8 (8,7)	5 (13,5)	0,67 (0,31-1,44)	
55	ABCC1	rs12923345	TT	71 (75,5)	22 (56,4)		0,03
			CT	22 (23,4)	17 (43,6)	Dominante	
			CC	1 (1,1)	0 (0,0)	2,39 (1,08-5,25)	
56	ABCC1	rs215094	AA	58 (63,7)	25 (62,5)		0,89
			AG	29 (31,9)	13 (32,5)	Dominante	
			GG	4 (4,4)	2 (5,0)	1,05 (0,49-2,28)	
57	ABCC1	rs215049	GG	41 (43,6)	18 (46,2)		0,79
			CG	46 (48,9)	15 (38,5)	Dominante	
			CC	7 (7,4)	6 (15,4)	0,90 (0,43-1,91)	
58	ABCC1	rs6498594	AA	76 (80,9)	29 (74,4)		-
			AC	18 (19,1)	10 (25,6)		
			CC	0 (0,0)	0 (0,0)		
59	ABCC1	rs152023	AA	34 (37,4)	17 (43,6)		0,51
			AG	45 (49,5)	17 (43,6)	Dominante	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
			GG	12 (13,2)	5 (12,8)	0,77 (0,36-1,65)	
60	<i>ABCC1</i>	rs152022	CC	48 (51,1)	27 (67,5)		0,08
			CG	41 (43,6)	11 (27,5)	Dominante	
			GG	5 (5,3)	2 (5,0)	0,50 (0,23-1,09)	
61	<i>ABCC1</i>	rs246218	CC	70 (76,1)	34 (85,0)		0,24
			CT	21 (22,8)	6 (15,0)	Dominante	
			TT	1 (1,1)	0 (0,0)	0,56 (0,21-1,51)	
62	<i>ABCC1</i>	rs17501331	AA	75 (80,6)	25 (62,5)		0,03
			AG	17 (18,3)	14 (35,0)	Dominante	
			GG	1 (1,1)	1 (2,5)	2,50 (1,10-5,68)	
63	<i>ABCC1</i>	rs12934692	TT	27 (29,3)	16 (42,1)		0,16
			CT	52 (56,5)	13 (34,2)	Dominante	
			CC	13 (14,1)	9 (23,7)	0,57 (0,26-1,25)	
64	<i>ABCC1</i>	rs16967145	GG	64 (71,1)	23 (62,2)		0,33
			AG	26 (28,9)	12 (32,4)	Dominante	
			AA	0 (0,0)	2 (5,4)	1,50 (0,67-3,35)	
65	<i>ABCC1</i>	rs1967120	TT	41 (44,6)	26 (68,4)		0,01
			CT	47 (51,1)	8 (21,1)	Dominante	
			CC	4 (4,3)	4 (10,5)	0,37 (0,17-0,82)	
66	<i>ABCC1</i>	rs3784862	AA	53 (56,4)	26 (68,4)		0,20
			AG	36 (38,3)	9 (23,7)	Dominante	
			GG	5 (5,3)	3 (7,9)	0,60 (0,27-1,32)	
67	<i>ABCC1</i>	rs246240	AA	64 (68,1)	30 (76,9)		0,30
			AG	27 (28,7)	7 (17,9)	Dominante	
			GG	3 (3,2)	2 (5,1)	0,64 (0,27-1,52)	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
68	ABCC1	rs875740	TT	43 (48,3)	20 (55,6)		0,46
			GT	38 (42,7)	12 (33,3)	Dominante	
			GG	8 (9,0)	4 (11,1)	0,75 (0,34-1,63)	
69	ABCC1	rs11642957	TT	19 (20,7)	14 (37,8)		0,05
			CT	56 (60,9)	12 (32,4)	Dominante	
			CC	17 (18,5)	11 (29,7)	0,43 (0,19-0,98)	
70	ABCC1	rs3784864	AA	20 (22,2)	15 (38,5)		0,06
			AG	55 (61,1)	13 (33,3)	Dominante	
			GG	15 (16,7)	11 (28,2)	0,46 (0,20-1,03)	
71	ABCC1	rs11075293	GG	33 (36,7)	14 (37,8)		0,90
			AG	45 (50,0)	13 (35,1)	Dominante	
			AA	12 (13,3)	10 (27,0)	0,95 (0,43-2,10)	
72	ABCC1	rs903880	CC	52 (55,9)	22 (56,4)		0,96
			AC	38 (40,9)	13 (33,3)	Dominante	
			AA	3 (3,2)	4 (10,3)	0,98 (0,46-2,08)	
73	ABCC1	rs8054670	TT	50 (58,1)	15 (45,5)		0,21
			CT	28 (32,6)	14 (42,4)	Dominante	
			CC	8 (9,3)	4 (12,1)	1,67 (0,74-3,74)	
74	ABCC1	rs246230	CC	63 (67,0)	31 (77,5)		0,22
			CT	28 (29,8)	8 (20,0)	Dominante	
			TT	3 (3,2)	1 (2,5)	0,59 (0,25-1,39)	
75	ABCC1	rs246221	TT	40 (42,6)	17 (43,6)		0,91
			CT	41 (43,6)	16 (41,0)	Dominante	
			CC	13 (13,8)	6 (15,4)	0,96 (0,45-2,04)	
76	ABCC1	rs35592	TT	49 (52,7)	23 (59,0)		0,51
			CT	39 (41,9)	16 (41,0)	Dominante	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
			CC	5 (5,4)	0 (0,0)	0,77 (0,36-1,65)	
77	ABCC1	rs3765129	CC	69 (77,5)	25 (65,8)		0,17
			CT	16 (18,0)	13 (34,2)	Dominante	
			TT	4 (4,5)	0 (0,0)	1,79 (0,78-4,13)	
78	ABCC1	rs17287570	AA	64 (68,8)	28 (71,8)		0,73
			AC	25 (26,9)	10 (25,6)	Dominante	
			CC	4 (4,3)	1 (2,6)	0,87 (0,38-1,98)	
79	ABCC1	rs35597	GG	31 (33,7)	13 (34,2)		0,96
			AG	50 (54,3)	15 (39,5)	Dominante	
			AA	11 (12,0)	10 (26,3)	0,98 (0,44-2,17)	
80	ABCC1	rs35600	CC	52 (55,9)	22 (61,1)		0,59
			CG	37 (39,8)	13 (36,1)	Dominante	
			GG	4 (4,3)	1 (2,8)	0,81 (0,37-1,77)	
81	ABCC1	rs35605	CC	61 (66,3)	27 (71,1)		0,60
			CT	28 (30,4)	9 (23,7)	Dominante	
			TT	3 (3,3)	2 (5,3)	0,80 (0,35-1,83)	
82	ABCC1	rs35621	CC	67 (71,3)	28 (71,8)		0,95
			CT	25 (26,6)	11 (28,2)	Dominante	
			TT	2 (2,1)	0 (0,0)	0,97 (0,43 -2,23)	
83	ABCC1	rs4148350	GG	90 (95,7)	36 (92,3)		
			GT	4 (4,3)	3 (7,7)		-
			TT	0 (0,0)	0 (0,0)		
84	ABCC1	rs4148355	AA	69 (74,2)	33 (86,8)		0,10
			AG	23 (24,7)	4 (10,5)	Dominante	
			GG	1 (1,1)	1 (2,6)	0,44 (0,15-1,24)	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
85	ABCC1	rs10852377	CC	58 (64,4)	23 (59,0)		0,56
			CT	25 (27,8)	10 (25,6)	Dominante	
			TT	7 (7,8)	6 (15,4)	1,26 (0,58-2,72)	
86	ABCC1	rs2074086	TT	40 (45,5)	17 (44,7)		0,94
			CT	39 (44,3)	18 (47,4)	Dominante	
			CC	9 (10,2)	3 (7,9)	1,03 (0,48-2,21)	
87	ABCC1	rs2889517	CC	41 (45,6)	21 (58,3)		0,19
			CT	42 (46,7)	14 (38,9)	Dominante	
			TT	7 (7,8)	1 (2,8)	0,60 (0,27-1,31)	
88	ABCC1	rs3888565	GG	65 (69,1)	22 (56,4)		0,16
			AG	26 (27,7)	17 (43,6)	Dominante	
			AA	3 (3,2)	0 (0,0)	1,73 (0,80-3,74)	
89	ABCC1	rs4148359	CC	23 (25,8)	14 (36,8)		0,22
			CG	49 (55,1)	12 (31,6)	Dominante	
			GG	17 (19,1)	12 (31,6)	0,60 (0,27-1,35)	
90	ABCC1	rs2269800	AA	63 (70,0)	23 (69,7)		0,97
			AG	26 (28,9)	9 (27,3)	Dominante	
			GG	1 (1,1)	1 (3,0)	1,01 (0,43-2,42)	
91	ABCC1	rs16967755	AA	45 (50,6)	23 (62,2)		0,23
			AG	38 (42,7)	12 (32,4)	Dominante	
			GG	6 (6,7)	2 (5,4)	0,62 (0,28-1,36)	
92	ABCC1	rs11864374	GG	42 (46,2)	27 (71,1)		0,01
			AG	47 (51,6)	7 (18,4)	Dominante	
			AA	2 (2,2)	4 (10,5)	0,35 (0,15-0,79)	
93	ABCC1	rs3784867	CC	59 (63,4)	25 (64,1)		0,94
			CT	31 (33,3)	13 (33,3)	Dominante	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
			TT	3 (3,2)	1 (2,6)	0,97 (0,45-2,12)	
94	<i>ABCC1</i>	rs3887893	AA	36 (39,6)	13 (35,1)		0,64
			AG	38 (41,8)	19 (51,4)	Dominante	
			GG	17 (18,7)	5 (13,5)	1,21 (0,55-2,68)	
95	<i>ABCC1</i>	rs2230671	GG	48 (53,3)	25 (67,6)		0,14
			AG	36 (40,0)	11 (29,7)	Dominante	
			AA	6 (6,7)	1 (2,7)	0,55 (0,25-1,22)	
96	<i>ABCC1</i>	rs212086	GG	50 (54,3)	22 (57,9)		0,71
			AG	39 (42,4)	14 (36,8)	Dominante	
			AA	3 (3,3)	2 (5,3)	0,87 (0,40-1,86)	
97	<i>ABCC1</i>	rs3743527	CC	55 (59,8)	33 (82,5)		0,01
			CT	31 (33,7)	5 (12,5)	Dominante	
			TT	6 (6,5)	2 (5,0)	0,32 (0,13-0,79)	
98	<i>ABCC1</i>	rs212090	TT	33 (36,3)	16 (41,0)		0,61
			AT	41 (45,1)	15 (38,5)	Dominante	
			AA	17 (18,7)	8 (20,5)	0,82 (0,38-1,76)	
99	<i>ABCC1</i>	rs212093	GG	26 (29,2)	10 (25,6)		0,68
			AG	43 (48,3)	20 (51,3)	Dominante	
			AA	20 (22,5)	9 (23,1)	1,20 (0,51-2,80)	
100	<i>ABCC1</i>	rs12448760	GG	52 (55,3)	27 (73,0)		0,06
			AG	34 (36,2)	9 (24,3)	Dominante	
			AA	8 (8,5)	1 (2,7)	0,46 (0,20-1,05)	
101	<i>ABCC3</i>	rs7212045	GG	76 (81,7)	28 (70,0)		0,14
			CG	15 (16,1)	12 (30,0)	Dominante	
			CC	2 (2,2)	0 (0,0)	1,92 (0,81-4,51)	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
102	ABCC3	rs2412332	CC	34 (36,6)	13 (36,1)		0,96
			CG	49 (52,7)	18 (50,0)	Dominante	
			GG	10 (10,8)	5 (13,9)	1,02 (0,46-2,27)	
103	ABCC3	rs757421	GG	41 (43,6)	19 (48,7)		0,59
			AG	49 (52,1)	18 (46,2)	Dominante	
			AA	4 (4,3)	2 (5,1)	0,81 (0,39-1,72)	
104	ABCC3	rs2189595	AA	28 (32,2)	11 (29,7)		0,79
			AG	54 (62,1)	22 (59,5)	Dominante	
			GG	5 (5,7)	4 (10,8)	1,12 (0,49-2,59)	
105	ABCC3	rs8073706	AA	21 (23,3)	10 (25,6)		0,78
			AG	53 (58,9)	22 (56,4)	Dominante	
			GG	16 (17,8)	7 (17,9)	0,88 (0,37-2,10)	
106	ABCC3	rs12604031	AA	25 (31,6)	13 (39,4)		0,43
			AG	38 (48,1)	13 (39,4)	Dominante	
			GG	16 (20,3)	7 (21,2)	0,71 (0,31-1,66)	
107	ABCC3	rs10153257	AA	23 (27,4)	11 (28,2)		0,92
			AG	50 (59,5)	20 (51,3)	Dominante	
			GG	11 (13,1)	8 (20,5)	0,96 (0,41-2,24)	
108	ABCC3	rs2412333	GG	63 (67,0)	25 (64,1)		0,75
			AG	29 (30,9)	12 (30,8)	Dominante	
			AA	2 (2,1)	2 (5,1)	1,14 (0,52-2,49)	
109	ABCC3	rs739921	CC	47 (50,0)	18 (45,0)		0,60
			CG	43 (45,7)	20 (50,0)	Dominante	
			GG	4 (4,3)	2 (5,0)	1,22 (0,58-2,57)	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
110	ABCC3	rs1541392	TT	66 (71,0)	26 (66,7)		0,63
			GT	25 (26,9)	13 (33,3)	Dominante	
			GG	2 (2,2)	0 (0,0)	1,22 (0,55-2,73)	
111	ABCC3	rs12051822	GG	65 (69,9)	20 (52,6)		0,06
			AG	24 (25,8)	17 (44,7)	Dominante	
			AA	4 (4,3)	1 (2,6)	2,09 (0,96-4,54)	
112	ABCC3	rs17562467	CC	43 (46,7)	21 (52,5)		0,54
			CT	42 (45,7)	17 (42,5)	Dominante	
			TT	7 (7,6)	2 (5,0)	0,79 (0,38-1,67)	
113	ABCC3	rs4793666	CC	42 (45,7)	23 (62,2)		0,09
			CG	44 (47,8)	11 (29,7)	Dominante	
			GG	6 (6,5)	3 (8,1)	0,51 (0,23-1,12)	
114	ABCC3	rs17562516	TT	43 (46,2)	21 (53,8)		0,42
			AT	41 (44,1)	16 (41,0)	Dominante	
			AA	9 (9,7)	2 (5,1)	0,74 (0,35-1,56)	
115	ABCC3	rs4148411	GG	64 (68,1)	24 (63,2)		0,59
			CG	26 (27,7)	12 (31,6)	Dominante	
			CC	4 (4,3)	2 (5,3)	1,24 (0,57-2,74)	
116	ABCC3	rs739923	GG	43 (48,9)	14 (45,2)		0,72
			AG	39 (44,3)	14 (45,2)	Dominante	
			AA	6 (6,8)	3 (9,7)	1,16 (0,51-2,64)	
117	ABCC3	rs733392	GG	46 (48,9)	21 (53,8)		0,61
			AG	42 (44,7)	16 (41,0)	Dominante	
			AA	6 (6,4)	2 (5,1)	0,82 (0,39-1,74)	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
118	ABCC3	rs1978153	CC	32 (34,8)	14 (36,8)		0,82
			CG	47 (51,1)	19 (50,0)	Dominante	
			GG	13 (14,1)	5 (13,2)	0,91 (0,42-2,01)	
119	ABCC3	rs879459	AA	64 (68,8)	30 (76,9)		0,34
			AG	25 (26,9)	9 (23,1)	Dominante	
			GG	4 (4,3)	0 (0,0)	0,66 (0,28-1,57)	
120	ABCC3	rs2072365	CC	38 (43,7)	16 (42,1)		0,87
			CT	40 (46,0)	15 (39,5)	Dominante	
			TT	9 (10,3)	7 (18,4)	1,07 (0,49-2,30)	
121	ABCC3	rs3785912	GG	40 (42,6)	18 (46,2)		0,70
			AG	44 (46,8)	15 (38,5)	Dominante	
			AA	10 (10,6)	6 (15,4)	0,86 (0,41-1,83)	
122	ABCC3	rs1558288	GG	66 (71,7)	27 (69,2)		0,77
			AG	22 (23,9)	11 (28,2)	Dominante	
			AA	4 (4,3)	1 (2,6)	1,13 (0,50-2,56)	
123	ABCC3	rs3785911	TT	48 (52,7)	22 (57,9)		0,59
			GT	32 (35,2)	14 (36,8)	Dominante	
			GG	11 (12,1)	2 (5,3)	0,81 (0,38-1,74)	
124	ABCC3	rs1051640	AA	65 (69,9)	25 (67,6)		0,80
			AG	23 (24,7)	12 (32,4)	Dominante	
			GG	5 (5,4)	0 (0,0)	1,11 (0,49-2,53)	
125	ABCC3	rs17563146	CC	72 (76,6)	28 (71,8)		0,56
			CT	20 (21,3)	11 (28,2)	Dominante	
			TT	2 (2,1)	0 (0,0)	1,29 (0,55-2,99)	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
126	ABCC3	rs12602161	AA	65 (70,7)	24 (61,5)		0,31
			AG	23 (25,0)	15 (38,5)	Dominante	
			GG	4 (4,3)	0 (0,0)	1,50 (0,69-3,30)	
127	ABCC3	rs4148418	AA	35 (37,6)	13 (34,2)		0,71
			AG	42 (45,2)	18 (47,4)	Dominante	
			GG	16 (17,2)	7 (18,4)	1,16 (0,53-2,56)	
128	ABCC3	rs8196	TT	49 (54,4)	22 (57,9)		0,72
			CT	32 (35,6)	15 (39,5)	Dominante	
			CC	9 (10,0)	1 (2,6)	0,87 (0,40-1,87)	
129	ABCB1	rs7789645	GG	69 (73,4)	24 (60,0)		0,13
			CG	24 (25,5)	15 (37,5)	Dominante	
			CC	1 (1,1)	1 (2,5)	1,84 (0,84-4,02)	
130	ABCB1	rs6946119	TT	50 (56,8)	22 (56,4)		0,97
			CT	28 (31,8)	14 (35,9)	Dominante	
			CC	10 (11,4)	3 (7,7)	1,02 (0,48-2,18)	
131	ABCB1	rs1055302	GG	72 (76,6)	27 (67,5)		0,28
			AG	21 (22,3)	12 (30,0)	Dominante	
			AA	1 (1,1)	1 (2,5)	1,58 (0,70-3,56)	
132	ABCB1	rs3842	AA	72 (76,6)	27 (67,5)		0,28
			AG	21 (22,3)	12 (30,0)	Dominante	
			GG	1 (1,1)	1 (2,5)	1,58 (0,70-3,56)	
133	ABCB1	rs6979885	GG	46 (50,5)	23 (60,5)		0,30
			AG	34 (37,4)	12 (31,6)	Dominante	
			AA	11 (12,1)	3 (7,9)	0,67 (0,31-1,44)	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
134	<i>ABCB1</i>	rs2235048	TT	26 (28,9)	13 (32,5)		0,68
			CT	41 (45,6)	17 (42,5)	Dominante	
			CC	23 (25,6)	10 (25,0)	0,84 (0,38-1,88)	
135	<i>ABCB1</i>	rs4148743	GG	28 (30,4)	15 (38,5)		0,37
			AG	48 (52,2)	18 (46,2)	Dominante	
			AA	16 (17,4)	6 (15,4)	0,70 (0,32-1,53)	
136	<i>ABCB1</i>	rs4148738	AA	29 (31,2)	13 (32,5)		0,88
			AG	48 (51,6)	21 (52,5)	Dominante	
			GG	16 (17,2)	6 (15,0)	0,94 (0,43-2,08)	
137	<i>ABCB1</i>	rs10274587	GG	73 (77,7)	25 (62,5)		0,08
			AG	19 (20,2)	14 (35,0)	Dominante	
			AA	2 (2,1)	1 (2,5)	2,09 (0,93-4,66)	
138	<i>ABCB1</i>	rs10268314	TT	73 (77,7)	25 (64,1)		0,11
			CT	19 (20,2)	13 (33,3)	Dominante	
			CC	2 (2,1)	1 (2,6)	1,95 (0,86-4,40)	
139	<i>ABCB1</i>	rs6961419	TT	27 (29,3)	14 (35,9)		0,46
			CT	45 (48,9)	19 (48,7)	Dominante	
			CC	20 (21,7)	6 (15,4)	0,74 (0,34-1,64)	
140	<i>ABCB1</i>	rs2235046	GG	21 (25,9)	9 (26,5)		0,95
			AG	45 (55,6)	19 (55,9)	Dominante	
			AA	15 (18,5)	6 (17,6)	0,97 (0,39-2,41)	
141	<i>ABCB1</i>	rs2235013	AA	23 (24,7)	11 (27,5)		0,74
			AG	53 (57,0)	20 (50,0)	Dominante	
			GG	17 (18,3)	9 (22,5)	0,87 (0,37-2,00)	
142	<i>ABCB1</i>	rs1922240	TT	33 (35,1)	20 (50,0)		0,11
			CT	47 (50,0)	17 (42,5)	Dominante	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
			CC	14 (14,9)	3 (7,5)	0,54 (0,26-1,15)	
143	<i>ABCB1</i>	rs10244266	TT	74 (79,6)	24 (60,0)		0,02
			GT	17 (18,3)	15 (37,5)	Dominante	
			GG	2 (2,2)	1 (2,5)	2,60 (1,16-5,83)	
144	<i>ABCB1</i>	rs4148734	CC	37 (40,7)	19 (51,4)		0,27
			CT	44 (48,4)	15 (40,5)	Dominante	
			TT	10 (11,0)	3 (8,1)	0,65 (0,30-1,40)	
145	<i>ABCB1</i>	rs2520464	GG	33 (36,7)	14 (36,8)		0,99
			AG	42 (46,7)	19 (50,0)	Dominante	
			AA	15 (16,7)	5 (13,2)	0,99 (0,45-2,18)	
146	<i>ABCB1</i>	rs10264990	TT	29 (32,6)	18 (46,2)		0,15
			CT	48 (53,9)	14 (35,9)	Dominante	
			CC	12 (13,5)	7 (17,9)	0,56 (0,26-1,22)	
147	<i>ABCB1</i>	rs1202179	AA	37 (40,2)	13 (35,1)		0,59
			AG	43 (46,7)	20 (54,1)	Dominante	
			GG	12 (13,0)	4 (10,8)	1,24 (0,56-2,75)	
148	<i>ABCB1</i>	rs13226726	CC	80 (85,1)	33 (84,6)		0,94
			CT	14 (14,9)	5 (12,8)	Dominante	
			TT	0 (0,0)	1 (2,6)	1,04 (0,37-2,94)	
149	<i>ABCB1</i>	rs1202172	TT	37 (41,1)	13 (34,2)		0,46
			GT	42 (46,7)	21 (55,3)	Dominante	
			GG	11 (12,2)	4 (10,5)	1,34 (0,61-2,96)	
150	<i>ABCB1</i>	rs4148733	TT	61 (67,0)	25 (64,1)		0,75
			CT	27 (29,7)	13 (33,3)	Dominante	
			CC	3 (3,3)	1 (2,6)	1,14 (0,52-2,50)	

ANEXO RESULTADOS

N	Gene	SNP	Genotipo	Neurotoxicidad n (%)	Neurotoxicidad grados 1-4 n (%)	OR (IC 95%)	P
151	ABCB1	rs17327624	GG	60 (63,8)	25 (62,5)		0,88
			GT	31 (33,0)	11 (27,5)	Dominante	
			TT	3 (3,2)	4 (10,0)	1,06 (0,49-2,28)	
152	ABCB1	rs13229143	GG	24 (26,4)	13 (33,3)		0,42
			CG	52 (57,1)	20 (51,3)	Dominante	
			CC	15 (16,5)	6 (15,4)	0,72 (0,32-1,61)	
153	ABCB1	rs12535512	TT	33 (35,5)	17 (42,5)		0,45
			CT	46 (49,5)	19 (47,5)	Dominante	
			CC	14 (15,1)	4 (10,0)	0,74 (0,35-1,59)	
154	ABCB1	rs3789243	TT	29 (31,9)	13 (33,3)		0,87
			CT	45 (49,5)	22 (56,4)	Dominante	
			CC	17 (18,7)	4 (10,3)	0,94 (0,42-2,08)	
155	ABCB1	rs13233308	CC	26 (27,7)	12 (31,6)		0,65
			CT	51 (54,3)	19 (50,0)	Dominante	
			TT	17 (18,1)	7 (18,4)	0,83 (0,36-1,88)	
156	ABCB1	rs10246878	GG	46 (48,9)	24 (61,5)		0,18
			AG	41 (43,6)	13 (33,3)	Dominante	
			AA	7 (7,4)	2 (5,1)	0,60 (0,28-1,28)	

DISCUSIÓN

En las últimas décadas, el pronóstico de la Leucemia Linfoblástica Aguda en pacientes pediátricos ha mejorado de manera muy significativa. Sin embargo, los efectos secundarios derivados de la quimioterapia continúan siendo un problema pendiente de resolver. Los avances obtenidos en los estudios de farmacogenética de los últimos años, nos han brindado herramientas para poder entender los mecanismos subyacentes a los procesos oncológicos y respuesta a fármacos, focalizando los esfuerzos terapéuticos hacia una medicina más personalizada. De este modo, la búsqueda de marcadores que influyen tanto en el pronóstico como en las toxicidades derivadas de la quimioterapia, se ha convertido en una de las principales ramas de la investigación en Oncología. Ya en los años 70 el profesor D'Angio publicó que "curar el cáncer no es suficiente" (150). El objetivo que buscamos en la actualidad es continuar mejorando la supervivencia pero minimizando al máximo los efectos secundarios.

La vincristina es una quimioterapia necesaria en el tratamiento de la LLA y es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de muchos tumores sólidos y hematológicos, tanto de forma individual como en combinación con otros quimioterápicos. Sin embargo, su función se ve limitada por la neurotoxicidad que produce y este hecho obliga muchas veces a disminuir la dosis, espaciar su frecuencia de administración e incluso en algunas ocasiones suspender su administración, con la consiguiente repercusión en el pronóstico de la enfermedad. Por lo tanto, uno de los retos de la medicina actual es predecir qué pacientes tienen el riesgo potencial de desarrollar toxicidad antes de que se produzca. Por este motivo, es necesario encontrar una explicación farmacogenética a la susceptibilidad de desarrollar neurotoxicidad por la vincristina (151). Si conseguimos entender todos los mecanismos farmacogenéticos implicados en esta susceptibilidad, se podrían ajustar las dosis de la vincristina y optimizar el tratamiento, a la vez que se minimizan los efectos secundarios. Para conseguir este objetivo, es necesario encontrar factores predictores que nos ayuden a optimizar el tratamiento para cada paciente.

Ante esta situación, el objetivo principal de este estudio fue la identificación de nuevos marcadores genéticos predictores de la eficacia y seguridad de la vincristina en el tratamiento de la LLA infantil. Para ello, se evaluó la correlación entre la neurotoxicidad inducida por la vincristina y 175 polimorfismos en 15 genes relacionados con la farmacocinética (n=8) y farmacodinamia (n=7) de la vincristina. El trabajo se llevó a cabo en un grupo de 152 pacientes pediátricos diagnosticados de LLA-B que recibieron tratamiento según el protocolo LAL/SHOP. El 33,6 % de los pacientes desarrollaron neurotoxicidad por vincristina durante el tratamiento, siendo ésta más frecuente en la fase de inducción (30,9%). En esta fase se obtuvo el resultado

DISCUSIÓN

más destacado de la tesis, identificando 2 variantes genéticas en el gen transportador *ABCC2* asociados con la neurotoxicidad inducida por la vincristina, que superaron la corrección por múltiples comparaciones, y que podrían, por lo tanto, ser 2 nuevos marcadores de toxicidad por vincristina en el tratamiento de la LLA infantil.

1. FARMACOCINÉTICA

1.1 Neurotoxicidad en inducción

En la fase de inducción, el estudio de asociación genotípica entre polimorfismos de genes implicados en la farmacocinética de la vincristina y la neurotoxicidad inducida por la vincristina, mostró un total de 14 SNPs significativos en los genes transportadores *ABCC2*, *ABCC1* y *ABCB1*.

La asociación más significativa se encontró en 2 SNPs del gen *ABCC2*, que permanecieron estadísticamente significativos tras la corrección por múltiples comparaciones (FDR). Los genotipos rs3740066 GG y rs12826 GG presentaron un mayor riesgo de neurotoxicidad (en grados 1-2 y 1-4). Además, uno de los haplotipos protectores estadísticamente significativos, formado por los SNPs rs3740066-rs3740065-rs12826-rs12762549-rs11190298 (ATAGG) de *ABCC2*, incluyó los alelos protectores de estos dos SNPs (alelo A), reforzando nuestros resultados. Otros 3 SNPs en *ABCC2* (rs2073337, rs4148396 y rs11190298) resultaron significativos en los análisis genotípicos y uno más por frecuencias alélicas (rs2756109), remarcando la importancia de este gen en el riesgo a desarrollar neurotoxicidad inducida por la vincristina. El gen *ABCC2* es un transportador de membrana dependiente de ATP que juega un papel fundamental en la eliminación biliar de varios fármacos y xenobióticos. Por lo tanto, un exceso de la proteína *ABCC2* podría acelerar el transporte de la vincristina fuera de las células cancerígenas antes de hacer su efecto disminuyendo toxicidad. De hecho, la función de *ABCC2* ya se ha relacionado con la resistencia y/o sensibilidad de la vincristina en varios estudios (152, 153). Además, rs3740066 y rs12826 (los 2 SNPs más significativos) parecen alterar la función del gen (según el software de predicción de efectos funcionales de los SNPs, F-SNP): rs3740066 es un SNP sinónimo con un posible efecto en el control del ensamblaje de la proteína y rs12826 es un SNP localizado *downstream* del gen, que parece afectar a nivel de la regulación transcripcional. Estos resultados sugieren que estos 2 SNPs podrían alterar, o bien la expresión general de *ABCC2*, o la expresión específica de las isoformas de *ABCC2*, lo que en último término conduciría a alteraciones en la eliminación de la vincristina que podrían

explicar la asociación detectada con la neurotoxicidad. Aunque estos 2 SNPs no han sido previamente relacionados con la neurotoxicidad inducida por la vincristina, rs3740066 y rs12826 fueron asociados, previamente por nuestro grupo, con la toxicidad al metotrexato (154), otro fármaco quimioterápico utilizado en el tratamiento de la LLA infantil. Este fármaco, al igual que la vincristina, es transportado al exterior de las células cancerígenas por ABCC2, lo que sugiere que tanto rs3740066 como rs12826 podrían alterar la regulación de la eliminación de fármacos dependientes de ABCC2. Sin embargo, teniendo en cuenta que ésta es la primera vez que se relacionan los efectos de estos dos SNPs con la neurotoxicidad inducida por la vincristina, y dados los resultados dispares encontrados en la literatura para otros SNPs, pensamos que son necesarios más estudios que confirmen el nuestro y nos ayuden a establecer la relevancia de estos dos SNPs como marcadores de neurotoxicidad en los pacientes pediátricos de LLA.

En el gen *ABCC1*, los resultados de asociación genotípica mostraron 6 SNPs significativos, aunque esta asociación no fue lo suficientemente fuerte como para mantenerse tras la corrección por múltiples comparaciones. *ABCC1*, al igual que *ABCC2*, es un transportador de membrana dependiente de ATP, conocido por su habilidad para conferir multi-resistencia a los medicamentos e implicado en proteger ciertos tejidos de agentes xenobióticos (Entrez Gene NCBI). Entre los resultados encontrados en este gen, cabe destacar que uno de los SNPs más significativos, rs3743527, también se encontró asociado con la cardiotoxicidad inducida por las antraciclinas en el tratamiento de la LLA infantil (155), sugiriendo su posible implicación en la eliminación de fármacos vía *ABCC1*.

Finalmente, los análisis de asociación genotípica mostraron 3 SNPs en el gen *ABCB1* (rs10244266, rs10274587, rs10268314) significativamente asociados con la neurotoxicidad por la vincristina (aunque al igual que en el caso anterior, la asociación no se mantuvo significativa tras la corrección por FDR). El gen *ABCB1*, tal y como hemos comentado en la introducción, está relacionado con el desarrollo de resistencia a fármacos. Codifica una proteína transportadora de membrana denominada glicoproteína P. Esta proteína funciona como bomba de flujo de salida de fármacos dependiente de ATP con amplia especificidad de sustrato. Es responsable de la disminución de la acumulación del fármaco en células resistentes a múltiples fármacos. Esta proteína también funciona como un transportador en la barrera hematoencefálica (Entrez Gene NCBI). Ésta es, según nuestros conocimientos, la primera vez que se encuentra una asociación entre estos polimorfismos y la neurotoxicidad, aunque estudios previos ya relacionaron otros SNPs en *ABCB1* con la neurotoxicidad inducida

DISCUSIÓN

por la vincristina (135) y la toxicidad hematológica en LLA (156). Estos resultados nos hacen pensar que las variaciones genéticas en *ABCB1* pueden, de alguna manera, alterar su función.

Respecto al gen *RALBP1*, se observó que el haplotipo formado por rs9946939 y rs420905 (AG) estaba asociado con neurotoxicidad severa, aunque tras la corrección por el método de permutaciones el resultado no fue estadísticamente significativo. *RALBP1* codifica una proteína de membrana multifuncional que tiene su papel en el crecimiento celular, división y apoptosis junto con su papel en el transporte de ciertos quimioterápicos, afectando así a la quimiosensibilidad de ciertas células tumorales (157, 158).

1.2 Neurotoxicidad durante el tratamiento

Los resultados obtenidos cuando se consideró la presencia de neurotoxicidad en **cualquier fase del tratamiento** fueron muy similares a los obtenidos en la fase de inducción. Se detectaron resultados significativos con polimorfismos de los genes *ABCC2*, *ABCC1* y *ABCB1*. La única diferencia se observó en el gen *ABCC3*.

En este gen, los análisis de asociación mostraron que 4 SNPs (3 detectados por frecuencias genotípicas y 1 por alélicas) estaban asociados con la neurotoxicidad inducida por la vincristina (rs4793666, rs4148411, rs739921 y rs2189595). La asociación, en todos los casos, se encontró en las formas severas de neurotoxicidad (grados 3-4). Aunque tras aplicar la corrección FDR, los resultados no fueron significativos, hay que destacar que es el único gen implicado en la farmacocinética de la vincristina en el que se ha detectado asociación únicamente con las formas severas de neurotoxicidad, considerando la misma en cualquier fase y no en la fase de inducción. El gen *ABCC3* es un transportador dependiente de ATP y a su vez está relacionado con la resistencia a múltiples fármacos (159, 160), con lo que podemos especular que variantes genéticas en el mismo modifican la eliminación de los fármacos en general, provocando toxicidades severas. No obstante, dado el tamaño muestral, este resultado debería ser contrastado con mayor número de pacientes.

Con respecto a los genes *ABCC10*, *CYP3A4* y *CYP3A5*, no se encontró asociación entre los polimorfismos analizados y la neurotoxicidad inducida por la vincristina. La falta de asociación detectada entre rs776746 en *CYP3A5* está en línea con estudios previamente publicados en LLA (132, 133, 135), aunque un trabajo sí que encontró asociación en su población (134). Estas discrepancias entre los estudios pueden explicarse por los diferentes protocolos de tratamiento utilizados, así como por la existencia de diferencias genéticas entre las poblaciones analizadas.

2. FARMACODINAMIA

2.1 Neurotoxicidad en inducción y/o durante el tratamiento

En los resultados del estudio de farmacodinamia, se encontraron 3 variantes genéticas en 3 genes implicados en la farmacodinamia de la vincristina (*TUBB3*, *TUBB1* y *MAPT*) que estaban asociados con neurotoxicidad.

El resultado más significativo se obtuvo en el gen *MAPT*. Los genotipos AG+GG rs11867549 disminuyeron el riesgo de neurotoxicidad severa (grados 3-4), mostrando un efecto protector. El gen *MAPT* codifica para la proteína tau asociada a los microtúbulos (161). Su principal función es la estabilización de los microtúbulos axonales a través de la interacción con la tubulina, lo que la convierte en diana de la vincristina. Por lo tanto, variantes genéticas en *MAPT*, tales como rs11867549, podrían modular el efecto de la vincristina en los axones de las neuronas, disminuyendo o aumentando la toxicidad de la misma. Hartmann y cols también analizaron la asociación entre los polimorfismos genéticos de *MAPT* y la neurotoxicidad inducida por vincristina en pacientes pediátricos de LLA-B, no encontrando asociación. Sin embargo, la serie de pacientes utilizada en este caso fue muy pequeña con tan solo 34 pacientes, insuficiente para poder detectar asociaciones significativas (132). Apoyando la importancia de *MAPT* en la estabilización de los microtúbulos, se han descrito mutaciones en este gen asociadas a diversas enfermedades neurodegenerativas (162-165).

El SNP rs4558416 del gen *TUBB3* presentó asociación con neurotoxicidad leve (grados 1-2) durante la inducción. El gen *TUBB3* codifica para una proteína de la familia de la beta tubulina, cuya principal función es el ensamblaje para la formación de los microtúbulos. Se expresa principalmente en las neuronas y podría estar relacionado con la neurogénesis y mantenimiento axonal (166). De hecho, se han descrito ciertas mutaciones en *TUBB3* asociadas con neuropatía axonal periférica (167, 168), alteraciones en el neurodesarrollo y malformaciones cerebrales (169-171). También se ha relacionado a este gen con la patogénesis y agresividad de ciertos tumores (76, 172, 173). Asimismo, ha sido asociado con la resistencia a ciertos fármacos, principalmente de la familia de los taxanos (174-177). De ese modo, la sobreexpresión de la beta III tubulina está asociada con la resistencia de los agentes antimicrotúbulos, como la vincristina (178). El papel de la beta III tubulina en la resistencia a fármacos que se unen a la tubulina, lo relaciona con la respuesta al tratamiento y pronóstico de ciertos tumores como el cáncer de pulmón, mama, ovario o gástrico. Por lo tanto, este

DISCUSIÓN

hecho podría convertirlo tanto en un marcador predictivo, como en un factor pronóstico a tener en cuenta a la hora de tratar a estos pacientes (179-181).

Por último, el SNP rs151337 del gen *TUBB1* también presentó asociación con toxicidad severa (grados 3-4) durante el tratamiento. Este gen, al igual que *TUBB3*, codifica para una proteína de la familia de la beta tubulina. Se expresa en las plaquetas y los megacariocitos, por lo que mutaciones en este gen pueden estar asociadas con trombopatías hereditarias (182, 183). La vincristina se une a la subunidad *TUBB1* e inhibe la polimerización de los microtúbulos (76), por lo que el genotipo TT de rs151337 podría incrementar la desestabilización de los microtúbulos aumentando la neurotoxicidad. Sin embargo, dado que la asociación detectada rozó el valor de significancia, este resultado necesitaría ser validado en una población mayor. En este sentido, otro estudio analizando la implicación del gen *TUBB1* en la toxicidad por vincristina no encontró asociación entre polimorfismos de *TUBB1* y neurotoxicidad (135).

Dado que ninguna de las tres asociaciones encontradas permaneció estadísticamente significativa tras la corrección por múltiples comparaciones, estos resultados hay que tomarlos con cautela.

Con respecto a los genes *TUBB2A* y *TUBB4*, no se encontró asociación entre los polimorfismos analizados y la neurotoxicidad por vincristina.

2.2 *CEP72* y neurotoxicidad por vincristina

En el caso del gen *CEP72*, no se encontró asociación entre rs924607 y la neurotoxicidad inducida por vincristina durante ninguna de las fases del tratamiento. Estos resultados difieren de los obtenidos por Diouf y cols quienes, mediante un análisis del genoma completo (GWAS), encontraron asociación entre el genotipo TT de rs924607 y la neurotoxicidad asociada a la vincristina durante la fase de mantenimiento. El gen *CEP72* codifica una proteína centrosomal que es esencial para la formación de microtúbulos, lugar donde la vincristina realiza su efecto citotóxico (145). Estos autores demostraron que el alelo T de rs924607 producía una zona de unión para un inhibidor transcripcional, lo que provocaba una disminución en la expresión de ARN mensajero, afectando a la estabilidad del microtúbulo y aumentando la sensibilidad de la vincristina. Para este estudio Diouf y cols incluyeron dos cohortes de pacientes tratadas de forma diferente con los protocolos St Jude Total XIIIIB (184, 185) y COG AALL0433 (<https://clinicaltrials.gov/show/NCT00381680>), que administran un número total de 36 y 39 dosis de vincristina (1,5mg/m²), respectivamente. Bajo estas circunstancias, un 26,79% de los pacientes desarrollaron neurotoxicidad en la fase de continuación y un 13% en la fase de

inducción (cohorte St Jude) (186). En contraposición, sólo un 4,2% de nuestra población tratada con el protocolo LAL SHOP 94/99/2005 (10-20 dosis de vincristina; 1,5mg/ m²) desarrolló neurotoxicidad en la fase de mantenimiento, frente a un 25,4% que la desarrolló en la fase de inducción. Estas diferencias en los porcentajes de toxicidad entre los estudios son probablemente un reflejo de las variaciones en la cantidad, número y frecuencia de las dosis de vincristina administradas entre los distintos protocolos de tratamiento. Del mismo modo, tampoco podemos olvidar la posible existencia de diferencias genéticas poblacionales entre nuestra cohorte y la analizada por Diouf y cols, que podrían afectar de distinta forma al modo en el que los pacientes responden al tratamiento.

En nuestro estudio, el escaso número de pacientes que desarrolló toxicidad en la fase de mantenimiento fue insuficiente para detectar asociaciones estadísticamente significativas, por lo que centramos nuestros análisis en la fase de inducción. Por el contrario, Diouf y cols se centraron en las fases tardías, donde obtuvieron un mayor porcentaje de pacientes con neurotoxicidad. No obstante, cuando posteriormente al GWAS, estos autores analizaron la asociación entre la neurotoxicidad y rs924607 en la fase de inducción, no encontraron resultados significativos (cohorte de St Jude) (186), en línea con nuestros resultados. Del mismo modo, un reciente estudio de un caso clínico tampoco encontró asociación entre el genotipo TT de rs924607 en *CEP72* y la neurotoxicidad inducida por la vincristina (187).

Estos resultados parecen sugerir la existencia de diferencias en los mecanismos implicados en el desarrollo de toxicidad en las diversas fases del tratamiento de la LLA. Durante las fases tempranas, la neurotoxicidad parece ser más dependiente de la acumulación de vincristina asociada a variaciones en los genes implicados en la farmacocinética del fármaco. Apoyando esta idea, estudios previos de nuestro grupo también mostraron la existencia de asociación entre el aclaramiento del metotrexato, otro quimioterápico utilizado en el tratamiento de la LLA, y polimorfismos en los genes implicados en la farmacocinética de los fármacos en las fases tempranas del tratamiento (154). En cambio, en las fases tardías, la neurotoxicidad podría estar más relacionada con variaciones en los genes implicados en la farmacodinamia de la vincristina. Por lo tanto, es posible que necesitemos diferentes marcadores para predecir la toxicidad en las diferentes fases del tratamiento y/o en cada población.

DISCUSIÓN

3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Este estudio puede presentar ciertas limitaciones, como la falta de validación de los resultados en otra cohorte independiente de pacientes tratados con el mismo protocolo, o el pequeño tamaño muestral para algunos de los fenotipos analizados (toxicidad severa), que no permitió conseguir el suficiente poder estadístico para detectar asociaciones significativas. Además, aunque de forma poco común, otros fármacos concomitantes podrían causar también neurotoxicidad, lo que podría potencialmente influir sobre los resultados obtenidos. Finalmente, habría que mencionar la variabilidad observada en los porcentajes de neurotoxicidad entre hospitales, a pesar de que los criterios de monitorización fueron los mismos en todos ellos. Esta variabilidad puede ser causada por las limitaciones que presenta obtener los datos de neuropatía mediante la revisión de historias clínicas. Con respecto a otras publicaciones, se observa que los métodos para determinar la neurotoxicidad inducida por la quimioterapia no son homogéneos y no existe una única forma universal para clasificarla. Fundamentalmente están basados en diferentes escalas que están validadas y nos ayudan a objetivar el grado de afectación de la toxicidad (119). El electromiograma y los estudios de conducción nerviosa tienen un uso limitado en la práctica clínica, reservándose para los casos más severos. A pesar de que se hayan planteado diferentes métodos para determinar la neurotoxicidad de forma más objetiva, en la actualidad no se ha llegado a un consenso para validar un método estandarizado para clasificar y cuantificar la neurotoxicidad (116, 188). Por lo tanto y a pesar de sus limitaciones, las diferentes escalas que están aprobadas para evaluar la neurotoxicidad producida por quimioterápicos son la manera más válida que tenemos de cuantificar dicha toxicidad. La evaluación de la neurotoxicidad que se realizó en los 4 hospitales fue llevada a cabo de la manera más homogéneamente posible, se utilizaron los mismos estándares y frecuencias de evaluación y fue realizada por las mismas personas. Asimismo destacar que la neurotoxicidad tras recibir vincristina es uno de los datos que se monitoriza en los protocolos SHOP.

Como puntos fuertes de nuestro estudio, cabe señalar que se incluyó una población homogénea de pacientes diagnosticados de LLA-B, tratados con protocolos estandarizados. Dado que partíamos de la hipótesis previa de que los genes implicados en la farmacocinética y la farmacodinamia de la vincristina están implicados en el desarrollo de neurotoxicidad en el tratamiento de la LLA, optamos por realizar un estudio de genes candidatos. En estos genes, se realizó una amplia cobertura de la variabilidad genética de los mismos y los resultados significativos se sometieron a métodos de corrección por comparaciones múltiples (FDR y

permutaciones). En definitiva, si nuestros resultados se validasen en otras poblaciones, podrían ser utilizados como nuevos marcadores de neurotoxicidad por vincristina en pacientes pediátricos de LLA en fases tempranas del tratamiento.

4. FARMACOGENÉTICA

En resumen, si analizamos los resultados del estudio realizado de forma global (incluyendo análisis por frecuencias alélicas y genotípicas), encontramos 30 SNPs significativos en 4 genes implicados en la farmacocinética y 3 en la farmacodinamia de la vincristina.

Los resultados más destacables se observaron en los SNPs rs3740066 y rs12826 del gen *ABCC2* (asociación significativa tras el factor de corrección FDR). El efecto de estos SNPs se observó a lo largo del tratamiento, tanto cuando se evaluó la neurotoxicidad leve en cualquier fase del tratamiento, como en la inducción, donde los resultados mostraron una significación mayor. No se observó asociación con neurotoxicidad severa. Cabe destacar, que estos 2 SNPs mostraron resultados positivos de asociación en todos los análisis realizados (alélicos, genotípicos y haplotípicos), apoyando la idea de que rs3740066 y rs12826 están implicados en la susceptibilidad a desarrollar neurotoxicidad leve, sobre todo, en las primeras fases del tratamiento. Otros 4 SNPs en *ABCC2* mostraron valores significativos (estudios frecuencias alélicas y/o genotípicas). Entre ellos, destaca el SNP rs2073337, que ejerce su efecto más significativo cuando consideramos la neurotoxicidad leve a lo largo del tratamiento y no sólo en la inducción.

En *ABCC1*, encontramos un total de 12 SNPs significativos en los diferentes análisis. Aunque ninguno de ellos se mantuvo significativo tras el factor de corrección, estos resultados parecen indicar que los polimorfismos de este gen podrían tener un papel relevante en la toxicidad derivada de los quimioterápicos.

En *ABCB1*, 5 SNPs mostraron asociación con neurotoxicidad leve, tanto en la inducción como en cualquier fase del tratamiento. En contraposición, los 4 SNPs significativos del gen *ABCC3* mostraron asociación con neurotoxicidad severa en cualquier fase del tratamiento. Sin embargo, estos resultados hay que tomarlos con cautela, dado que ninguno de los SNPs resultó significativo tras la corrección por FDR y el bajo número de pacientes con neurotoxicidad severa en nuestro estudio.

DISCUSIÓN

En relación a los genes implicados en la farmacodinamia, observamos 3 SNPs significativos en 3 genes en los análisis totales. Destaca la asociación detectada entre los genotipos de los SNPs rs151337 y rs11867549, de los genes *TUBB1* y *MAPT*, respectivamente, con la neurotoxicidad severa durante el tratamiento. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que polimorfismos en genes implicados en la farmacodinamia podrían afectar en las fases tardías del tratamiento. No obstante, al igual que en el caso anterior, estos resultados deben considerarse con cautela dado que el número de pacientes con toxicidad severa en nuestra cohorte fue bajo.

Estos resultados, junto con los publicados previamente por otros autores, ponen de manifiesto la importancia de la farmacogenética en el desarrollo de la neurotoxicidad por vincristina. Sin embargo, no hay que olvidar la existencia de factores externos que pueden contribuir en el desarrollo de esta neurotoxicidad, como son el número de dosis administradas de vincristina, su frecuencia o la duración del tratamiento. Además, también habría que considerar el momento de aparición de la neurotoxicidad. Por lo tanto, es importante a la hora de intentar replicar estudios farmacogenéticos valorar la homogeneidad de los fenotipos (186). En este sentido, el Departamento de Salud y Servicios Humanos de EEUU, ha desarrollado unas guías para potenciar los estudios farmacogenéticos con las consecuentes modificaciones de tratamiento (<http://www.pharmgkb.org>). Este estudio, dado que analiza los datos de más de 100 pacientes y los resultados presentados son estadísticamente significativos ($p < 0,05$) tras aplicar los factores de corrección, cumple criterios de nivel 2 de los estudios de farmacogenética. Este resultado es bueno, si consideramos que llegar a niveles 1 de evidencia en cáncer infantil, es muy complicado, dada la relativa baja incidencia del mismo (189). Además, en el presente estudio se han definido el tratamiento y los criterios de toxicidad con objeto de confirmar estos hallazgos en futuros estudios. A su vez, también sería interesante confirmar los hallazgos obtenidos en *ABCC2* en estudios funcionales.

En cualquier caso, consideramos que sería muy interesante validar los resultados de este estudio en otra cohorte de pacientes, aunque somos conscientes de que obtener pacientes tratados con el mismo protocolo, con datos de toxicidad correctamente recogidos, resulta complicado.

5. IMPORTANCIA DE LOS RESULTADOS PARA LA CLÍNICA

La vincristina es un fármaco ampliamente utilizado en la LLA desde la década de 1960, pero su mayor limitación continúa siendo la neurotoxicidad. Hay muchos factores implicados en la

susceptibilidad a este quimioterápico, tanto extrínsecos, como el número de dosis recibidas y la frecuencia de su administración, como intrínsecos, que se demuestran por la variabilidad genética interindividual.

La presente tesis confirma que la variabilidad genética influye en la respuesta y toxicidad derivada de la administración de la vincristina en pacientes pediátricos diagnosticados de LLA. El conocimiento de esta susceptibilidad podría ofrecer, en el futuro, la individualización de la dosis según el estudio farmacogenético de cada individuo y en consecuencia, mejoraría la respuesta al tratamiento minimizando los efectos secundarios.

A pesar de la controversia que existe actualmente con los resultados dispares publicados, ninguno de ellos es excluyente o contradictorio y nos aproximan al entendimiento de los mecanismos que subyacen en la susceptibilidad a desarrollar toxicidad por vincristina. Sin embargo, es cierto que aún no nos permiten concluir y entender todo el proceso en su totalidad. El hecho de que estudios con diferente diseño, encuentren distintos marcadores genéticos relacionados con la toxicidad de quimioterápicos no debería sorprendernos (151). Este hecho podría deberse a la falta de homogeneidad que hay entre las muestras seleccionadas, así como las diferencias entre los distintos protocolos, pero también es posible que los diferentes marcadores genéticos encontrados en cada estudio actúen en distintos momentos del tratamiento o estén relacionados con diferente grado de toxicidad. De ese modo, se podría explicar que los genes relacionados con la farmacocinética tuvieran relación con toxicidades observadas en fases tempranas del tratamiento, como *CYP3A5* (134) o *ABCC2* y la farmacodinamia tuviese mayor importancia en fases tardías del tratamiento, como *CEP72* (145).

La variabilidad en la respuesta y toxicidad derivada de los fármacos es un hecho al que nos enfrentamos diariamente. Con los avances realizados en el campo de la farmacogenética, la idea de una única dosis para todos los pacientes se está quedando obsoleta aunque ajustemos la misma por peso o superficie corporal en los pacientes pediátricos. A pesar de encontrarnos sumergidos en la búsqueda de los genes implicados en la susceptibilidad de cada individuo respecto a la quimioterapia, todavía tenemos un largo camino que recorrer en la identificación de los marcadores de estos genes. Los esfuerzos de la medicina actual están enfocados hacia una medicina más personalizada, adaptando las dosis de cada quimioterápico según los resultados del estudio farmacogenético de cada persona, con objeto de conseguir la dosis óptima, minimizando al máximo los efectos secundarios y la toxicidad derivada de cada fármaco. Del mismo modo, los estudios farmacogenéticos también nos pueden ayudar en la

DISCUSIÓN

identificación de pacientes con alto riesgo de desarrollar neurotoxicidad. De ese modo, los protocolos cada vez dan más importancia a los marcadores genéticos a la hora de diseñar los tratamientos. El ejemplo más claro de esta tendencia es la mercaptopurina, en la que la adaptación de su dosis a la susceptibilidad genética de cada individuo ya está en vigor en la práctica clínica diaria. Para que este hecho se haga extensible al resto de quimioterápicos, es necesario investigar y profundizar en los mecanismos genéticos relacionados con la farmacogenética de cada quimioterápico. Por ese motivo, la investigación dirigida a genes implicados en la farmacocinética y farmacodinamia de la vincristina nos ayudarán a descubrir marcadores genéticos para realizar un genotipado previo a la administración del tratamiento, necesario para ajustar la dosis de la misma al perfil de los pacientes para ofrecerles el mejor tratamiento posible y disminuir al máximo la neurotoxicidad.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) Las variantes genéticas rs3740066 y rs12826 del gen *ABCC2* están asociadas a neurotoxicidad inducida por vincristina en el protocolo de tratamiento LAL/SHOP en los pacientes pediátricos diagnosticados de Leucemia Linfoblástica Aguda. Por lo tanto, podrían ser utilizados como marcadores genéticos predictores de neurotoxicidad en estos pacientes.
- 2) Los genes *ABCC1*, *ABCC2* y *ABCB1* implicados en la farmacocinética de la vincristina están asociados a neurotoxicidad en la fase de inducción del protocolo de tratamiento.
- 3) Los genes *MAPT*, *TUBB1* y *TUBB3* implicados en la farmacodinamia de la vincristina podrían estar relacionados con las formas severas de neurotoxicidad, aunque no se hayan alcanzado niveles de significación estadística que precisarían de un tamaño mayor de la muestra.
- 4) Los resultados de este estudio, junto con los publicados por otros autores, sugieren la existencia de diferencias en los mecanismos que causan neurotoxicidad por vincristina en las fases tempranas y tardías del tratamiento. Por lo tanto, se necesitan marcadores predictivos para cada fase del tratamiento.
- 5) La Farmacogenética es una herramienta útil para predecir toxicidades derivadas del tratamiento con vincristina. Se abre un interesante campo de estudio que ayudará a entender los mecanismos de respuesta al tratamiento en esta enfermedad, limitando los efectos secundarios derivados del mismo y mejorando la calidad de vida futura de estos pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Margolin JF, Rabin KR, Steuber CP, Poplack DG. Acute Lymphoblastic Leukemia. Principles and practice of pediatric oncology. In: Pizzo A, Poplack DG, eds. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011; p: 518-65.
2. Lassaletta Atienza A, Ceppi F. Leucemia Linfoblástica Aguda. Hematología y Oncología Pediátricas. En: Madero L, Lassaletta A, Sevilla J. 3^a ed. Madrid: Ergon; 2015; p: 445-63.
3. Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL. A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2005;14(1):53-62.
4. Johnston WT, Lightfoot TJ, Simpson J, Roman E. Childhood cancer survival: a report from the United Kingdom Childhood Cancer Study. *Cancer Epidemiol*. 2010;34(6):659-66.
5. Bhojwani D, Yang JJ, Pui CH. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am*. 2015;62(1):47-60.
6. Lim JY, Bhatia S, Robison LL, Yang JJ. Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2014;120(7):955-62.
7. Buitenkamp TD, Izraeli S, Zimmermann M, Forestier E, Heerema NA, van den Heuvel-Eibrink MM, et al. Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. *Blood*. 2014;123(1):70-7.
8. Spector LG, Pankratz N, Marcotte EL. Genetic and nongenetic risk factors for childhood cancer. *Pediatr Clin North Am*. 2015;62(1):11-25.
9. Ross ME, Zhou X, Song G, Shurtleff SA, Girtman K, Williams WK, et al. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood*. 2003;102(8):2951-9.
10. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood*. 2012;120(6):1165-74.
11. Mullighan CG. Genomic profiling of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24(4):489-503.
12. Mullighan CG. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2013;50(4):314-24.
13. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood*. 2003;102(7):2321-33.
14. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet*. 1999;354(9189):1499-503.
15. Treviño LR, Yang W, French D, Hunger SP, Carroll WL, Devidas M, et al. Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2009;41(9):1001-5.
16. Sherborne AL, Hosking FJ, Prasad RB, Kumar R, Koehler R, Vijayakrishnan J, et al. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nat Genet*. 2010;42(6):492-4.
17. Papaemmanuil E, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, Price A, Olver B, Sheridan E, et al. Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2009;41(9):1006-10.
18. Figueroa ME, Chen SC, Andersson AK, Phillips LA, Li Y, Sotzen J, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2013;123(7):3099-111.
19. Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(11):823-33.
20. Geng L, Wang X. Epstein-Barr Virus-associated lymphoproliferative disorders: experimental and clinical developments. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(9):14656-71.
21. Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet*. 1997;349(9048):344-9.

BIBLIOGRAFÍA

22. Kinlen LJ. An examination, with a meta-analysis, of studies of childhood leukaemia in relation to population mixing. *Br J Cancer*. 2012;107(7):1163-8.
23. Hawkins MM, Wilson LM, Stovall MA, Marsden HB, Potok MH, Kingston JE, et al. Epipodophyllotoxins, alkylating agents, and radiation and risk of secondary leukaemia after childhood cancer. *BMJ*. 1992;304(6832):951-8.
24. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1030-43.
25. Pui CH, Pei D, Campana D, Cheng C, Sandlund JT, Bowman WP, et al. A revised definition for cure of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2014;28(12):2336-43.
26. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013;381(9881):1943-55.
27. Wigle DT, Turner MC, Krewski D. A systematic review and meta-analysis of childhood leukemia and parental occupational pesticide exposure. *Environ Health Perspect*. 2009;117(10):1505-13.
28. Weinzierl EP, Arber DA. Bone marrow evaluation in new-onset pancytopenia. *Hum Pathol*. 2013;44(6):1154-64.
29. Weinzierl EP, Arber DA. The differential diagnosis and bone marrow evaluation of new-onset pancytopenia. *Am J Clin Pathol*. 2013;139(1):9-29.
30. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Raetz E, Relling M, Davies S, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:102-31.
31. Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:118-45.
32. Pui CH, Evans WE. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2013;50(3):185-96.
33. Hunger SP, Winick NJ, Sather HN, Carroll WL. Therapy of low-risk subsets of childhood acute lymphoblastic leukemia: when do we say enough? *Pediatr Blood Cancer*. 2005;45(7):876-80.
34. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*. 2015;373(16):1541-52.
35. Panzer-Grümayer ER, Schneider M, Panzer S, Fasching K, Gadner H. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;95(3):790-4.
36. Zhou J, Goldwasser MA, Li A, Dahlberg SE, Neuberg D, Wang H, et al. Quantitative analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCI ALL Consortium Protocol 95-01. *Blood*. 2007;110(5):1607-11.
37. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD, Henze G, et al. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Münster. *Leukemia*. 2000;14(12):2205-22.
38. Donadieu J, Hill C. Early response to chemotherapy as a prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a methodological review. *Br J Haematol*. 2001;115(1):34-45.
39. Sandlund JT, Harrison PL, Rivera G, Behm FG, Head D, Boyett J, et al. Persistence of lymphoblasts in bone marrow on day 15 and days 22 to 25 of remission induction predicts a dismal treatment outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;100(1):43-7.
40. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2008;111(12):5477-85.
41. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and

- adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood*. 2010;115(16):3206-14.
42. Stow P, Key L, Chen X, Pan Q, Neale GA, Coustan-Smith E, et al. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115(23):4657-63.
43. Cooper SL, Brown PA. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am*. 2015;62(1):61-73.
44. Nachman JB, Heerema NA, Sather H, Camitta B, Forestier E, Harrison CJ, et al. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2007;110(4):1112-5.
45. Aricò M, Valsecchi MG, Camitta B, Schrappe M, Chessells J, Baruchel A, et al. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;342(14):998-1006.
46. Schultz KR, Carroll A, Heerema NA, Bowman WP, Aledo A, Slayton WB, et al. Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study AALL0031. *Leukemia*. 2014;28(7):1467-71.
47. Farber S, Diamond LK. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med*. 1948;238(23):787-93.
48. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A, et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):2938-48.
49. Schrappe M, Möricke A, Reiter A, Henze G, Welte K, Gadner H, et al. Key treatment questions in childhood acute lymphoblastic leukemia: results in 5 consecutive trials performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Klin Padiatr*. 2013;225 Suppl 1:S62-72.
50. Pui CH, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med*. 2009;360(26):2730-41.
51. Sirvent N, Suciú S, Riolland X, Millot F, Benoit Y, Plantaz D, et al. Prognostic significance of the initial cerebro-spinal fluid (CSF) involvement of children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) treated without cranial irradiation: results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Children Leukemia Group study 58881. *Eur J Cancer*. 2011;47(2):239-47.
52. Schrappe M, Reiter A, Henze G, Niemeyer C, Bode U, Kühl J, et al. Prevention of CNS recurrence in childhood ALL: results with reduced radiotherapy combined with CNS-directed chemotherapy in four consecutive ALL-BFM trials. *Klin Padiatr*. 1998;210(4):192-9.
53. Pui CH, Pei D, Pappo AS, Howard SC, Cheng C, Sandlund JT, et al. Treatment outcomes in black and white children with cancer: results from the SEER database and St Jude Children's Research Hospital, 1992 through 2007. *J Clin Oncol*. 2012;30(16):2005-12.
54. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):551-65.
55. Pieters R, Schrappe M, De Lorenzo P, Hann I, De Rossi G, Felice M, et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2007;370(9583):240-50.
56. Lukenbill J, Advani AS. The treatment of adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2013;8(2):91-7.
57. Silverman LB, Stevenson KE, O'Brien JE, Asselin BL, Barr RD, Clavell L, et al. Long-term results of Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1985-2000). *Leukemia*. 2010;24(2):320-34.
58. Hunger SP. Expanding clinical trial networks in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2014;32(3):169-70.
59. Geenen MM, Cardous-Ubbink MC, Kremer LC, van den Bos C, van der Pal HJ, Heinen RC, et al. Medical assessment of adverse health outcomes in long-term survivors of childhood cancer. *JAMA*. 2007;297(24):2705-15.

BIBLIOGRAFÍA

60. Ness KK, Armenian SH, Kadan-Lottick N, Gurney JG. Adverse effects of treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia: general overview and implications for long-term cardiac health. *Expert Rev Hematol*. 2011;4(2):185-97.
61. Evans WE. Pharmacogenetics of thiopurine S-methyltransferase and thiopurine therapy. *Ther Drug Monit*. 2004;26(2):186-91.
62. Ansari M, Krajcinovic M. Pharmacogenomics in cancer treatment defining genetic bases for inter-individual differences in responses to chemotherapy. *Curr Opin Pediatr*. 2007;19(1):15-22.
63. Robison LL. Late effects of acute lymphoblastic leukemia therapy in patients diagnosed at 0-20 years of age. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:238-42.
64. Carroll WL, Raetz EA. Clinical and laboratory biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr*. 2012;160(1):10-8.
65. Cheek MH, Pottier N, Kager L, Evans WE. Pharmacogenetics in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2009;46(1):39-51.
66. Pui CH, Cheng C, Leung W, Rai SN, Rivera GK, Sandlund JT, et al. Extended follow-up of long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2003;349(7):640-9.
67. van den Bent MJ. Prevention of chemotherapy-induced neuropathy: leukemia inhibitory factor. *Clin Cancer Res*. 2005;11(5):1691-3.
68. Mukherjee S. El emperador de todos los males: una biografía del cáncer. Barcelona. Penguin Random House Grupo Editorial; 2014; p: 178-181
69. Gidding CE, Kellie SJ, Kamps WA, de Graaf SS. Vincristine revisited. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1999;29(3):267-87.
70. Karon M, Freireich EJ, Frei E, Taylor R, Wolman IJ, Djerassi I, et al. The role of vincristine in the treatment of childhood acute leukemia. *Clin Pharmacol Ther*. 1966;7(3):332-9.
71. Pinkel D. Five-year follow-up of "total therapy" of childhood lymphocytic leukemia. *JAMA*. 1971;216(4):648-52.
72. Moore A, Pinkerton R. Vincristine: Can its therapeutic index be enhanced? *Pediatr Blood Cancer*. 2009;53(7):1180-7.
73. Legha SS. Vincristine neurotoxicity. Pathophysiology and management. *Med Toxicol*. 1986;1(6):421-7.
74. Aldaz A, Giraldez J, Idoate A, Sierrasesumaga L. Quimioterapia antitumoral (II). Agentes citostáticos más utilizados. Sierrasesumaga L, Antillon F, Patiño A, San Julián M, editors. Madrid; Pearson Education; 2006; p: 137-159.
75. Ortega Aramburu JJ. Agentes antimicrotúbulo. Oncopaidomecum. En: sanchez de Toledo J, editor. Barcelona; Permanyer; 2007; p: 69-79.
76. Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(3):194-204.
77. Hadfield JA, Ducki S, Hirst N, McGown AT. Tubulin and microtubules as targets for anticancer drugs. *Prog Cell Cycle Res*. 2003;5:309-25.
78. Perez J, Pardo J, Gomez C. Vincristine--an effective treatment of corticoid-resistant life-threatening infantile hemangiomas. *Acta Oncol*. 2002;41(2):197-9.
79. Merino Arribas JM. Quimioterapia del cáncer infantil. En: Madero L, Lassaletta A, Sevilla J. 3ª ed. Madrid: Ergon; 2015; p:331-78.
80. Kellie SJ, Koopmans P, Earl J, Nath C, Roebuck D, Uges DR, et al. Increasing the dosage of vincristine: a clinical and pharmacokinetic study of continuous-infusion vincristine in children with central nervous system tumors. *Cancer*. 2004;100(12):2637-43.
81. O'Rafferty C, O'Regan GM, Irvine AD, Smith OP. Recent advances in the pathobiology and management of Kasabach-Merritt phenomenon. *Br J Haematol*. 2015;171(1):38-51.
82. Rahmani R, Zhou XJ. Pharmacokinetics and metabolism of vinca alkaloids. *Cancer Surv*. 1993;17:269-81.

83. Pathak P, Hess R, Weiss MA. Liposomal vincristine for relapsed or refractory Ph-negative acute lymphoblastic leukemia: a review of literature. *Ther Adv Hematol*. 2014;5(1):18-24.
84. Zhou XJ, Rahmani R. Preclinical and clinical pharmacology of vinca alkaloids. *Drugs*. 1992;44 Suppl 4:1-16; discussion 66-9.
85. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92(4):414-7.
86. Dennison JB, Kulanthaivel P, Barbuch RJ, Renbarger JL, Ehlhardt WJ, Hall SD. Selective metabolism of vincristine in vitro by CYP3A5. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(8):1317-27.
87. Dennison JB, Mohutsky MA, Barbuch RJ, Wrighton SA, Hall SD. Apparent high CYP3A5 expression is required for significant metabolism of vincristine by human cryopreserved hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;327(1):248-57.
88. Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics*. 2004;5(3):243-72.
89. Dennison JB, Jones DR, Renbarger JL, Hall SD. Effect of CYP3A5 expression on vincristine metabolism with human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;321(2):553-63.
90. Gidding CE, Meeuwssen-de Boer GJ, Koopmans P, Uges DR, Kamps WA, de Graaf SS. Vincristine pharmacokinetics after repetitive dosing in children. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1999;44(3):203-9.
91. Ross CJ, Visscher H, Rassekh SR, Castro-Pastrana LI, Shereck E, Carleton B, et al. Pharmacogenomics of serious adverse drug reactions in pediatric oncology. *J Popul Ther Clin Pharmacol*. 2011;18:e134-51.
92. Davidsen ML, Dalhoff K, Schmiegelow K. Pharmacogenetics influence treatment efficacy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2008;30(11):831-49.
93. Paugh SW, Stocco G, Evans WE. Pharmacogenomics in pediatric leukemia. *Curr Opin Pediatr*. 2010;22(6):703-10.
94. Renbarger JL, McCammack KC, Rouse CE, Hall SD. Effect of race on vincristine-associated neurotoxicity in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;50(4):769-71.
95. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet*. 2001;27(4):383-91.
96. Lange BJ, Bostrom BC, Cherlow JM, Sensel MG, La MK, Rackoff W, et al. Double-delayed intensification improves event-free survival for children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood*. 2002;99(3):825-33.
97. Pollock BH, DeBaun MR, Camitta BM, Shuster JJ, Ravindranath Y, Pullen DJ, et al. Racial differences in the survival of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 2000;18(4):813-23.
98. Huang R, Murry DJ, Kolwankar D, Hall SD, Foster DR. Vincristine transcriptional regulation of efflux drug transporters in carcinoma cell lines. *Biochem Pharmacol*. 2006;71(12):1695-704.
99. Hopper-Borge E, Xu X, Shen T, Shi Z, Chen ZS, Kruh GD. Human multidrug resistance protein 7 (ABCC10) is a resistance factor for nucleoside analogues and epothilone B. *Cancer Res*. 2009;69(1):178-84.
100. Drake KJ, Singhal J, Yadav S, Nadkar A, Pungaliya C, Singhal SS, et al. RALBP1/RLIP76 mediates multidrug resistance. *Int J Oncol*. 2007;30(1):139-44.
101. Kavallaris M, Tait AS, Walsh BJ, He L, Horwitz SB, Norris MD, et al. Multiple microtubule alterations are associated with Vinca alkaloid resistance in human leukemia cells. *Cancer Res*. 2001;61(15):5803-9.

BIBLIOGRAFÍA

102. Ojeda T, García-Bravo B, Camacho FM. [Extravasation of vincristine]. *Actas Dermosifiliogr.* 2010;101(6):560-1.
103. Dougherty PM, Cata JP, Burton AW, Vu K, Weng HR. Dysfunction in multiple primary afferent fiber subtypes revealed by quantitative sensory testing in patients with chronic vincristine-induced pain. *J Pain Symptom Manage.* 2007;33(2):166-79.
104. Groninger E, Meeuwse-de Boer T, Koopmans P, Uges D, Sluiter W, Veerman A, et al. Vincristine pharmacokinetics and response to vincristine monotherapy in an up-front window study of the Dutch Childhood Leukaemia Study Group (DCLSG). *Eur J Cancer.* 2005;41(1):98-103.
105. Porter CC, Carver AE, Albano EA. Vincristine induced peripheral neuropathy potentiated by voriconazole in a patient with previously undiagnosed CMT1X. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;52(2):298-300.
106. Diezi M, Nydegger A, Di Paolo ER, Kuchler H, Beck-Popovic M. Vincristine and intestinal pseudo-obstruction in children: report of 5 cases, literature review, and suggested management. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010;32(4):e126-30.
107. Hatzipantelis E, Kyriakidis I, Pavlou E, Pavlidou E. Bilateral Eyelid Ptosis, Attributed to Vincristine, Treated Successfully with Pyridoxine and Thiamine in a Child with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Toxicol Int.* 2015;22(1):162-4.
108. Bay A, Yilmaz C, Yilmaz N, Oner AF. Vincristine induced cranial polyneuropathy. *Indian J Pediatr.* 2006;73(6):531-3.
109. Anghelescu DL, De Armendi AJ, Thompson JW, Sillos EM, Pui CH, Sandlund JT. Vincristine-induced vocal cord paralysis in an infant. *Paediatr Anaesth.* 2002;12(2):168-70.
110. Lombardi AJ, Sutton ME, Tiao GM, Geller JI. Vincristine-associated neurological morbidity in the treatment of hepatoblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2015;37(4):e258-63.
111. Palkar AH, Nair AG, Desai RJ, Potdar NA, Shinde CA. Vincristine-Induced Neuropathy Presenting as Ptosis and Ophthalmoplegia in a 2-Year-Old Boy. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 2015;52 Online:e34-7.
112. Tarlaci S. Vincristine-induced fatal neuropathy in non-Hodgkin's lymphoma. *Neurotoxicology.* 2008;29(4):748-9.
113. Toghiani PJ, Burke JD. Death from paralytic ileus following vincristine therapy. *Postgrad Med J.* 1970;46(535):330-1.
114. Moriyama B, Henning SA, Leung J, Falade-Nwulia O, Jarosinski P, Penzak SR, et al. Adverse interactions between antifungal azoles and vincristine: review and analysis of cases. *Mycoses.* 2012;55(4):290-7.
115. Hammond IW, Ferguson JA, Kwong K, Muniz E, Delisle F. Hyponatremia and syndrome of inappropriate anti-diuretic hormone reported with the use of Vincristine: an over-representation of Asians? *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2002;11(3):229-34.
116. Miltenburg NC, Boogerd W. Chemotherapy-induced neuropathy: A comprehensive survey. *Cancer Treat Rev.* 2014;40(7):872-82.
117. Sahenk Z, Brady ST, Mendell JR. Studies on the pathogenesis of vincristine-induced neuropathy. *Muscle Nerve.* 1987;10(1):80-4.
118. Rosenthal S, Kaufman S. Vincristine neurotoxicity. *Ann Intern Med.* 1974;80(6):733-7.
119. Argyriou AA, Bruna J, Marmiroli P, Cavaletti G. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): an update. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012;82(1):51-77.
120. Anghelescu DL, Faughnan LG, Jeha S, Relling MV, Hinds PS, Sandlund JT, et al. Neuropathic pain during treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2011;57(7):1147-53.
121. Wolf S, Barton D, Kottschade L, Grothey A, Loprinzi C. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. *Eur J Cancer.* 2008;44(11):1507-15.

122. Vainionpää L, Kovala T, Tolonen U, Lanning M. Vincristine therapy for children with acute lymphoblastic leukemia impairs conduction in the entire peripheral nerve. *Pediatr Neurol.* 1995;13(4):314-8.
123. Verstappen CC, Koeppen S, Heimans JJ, Huijgens PC, Scheulen ME, Strumberg D, et al. Dose-related vincristine-induced peripheral neuropathy with unexpected off-therapy worsening. *Neurology.* 2005;64(6):1076-7.
124. Hartman A, van den Bos C, Stijnen T, Pieters R. Decrease in motor performance in children with cancer is independent of the cumulative dose of vincristine. *Cancer.* 2006;106(6):1395-401.
125. Gomber S, Dewan P, Chhonker D. Vincristine induced neurotoxicity in cancer patients. *Indian J Pediatr.* 2010;77(1):97-100.
126. Mercuri E, Poulton J, Buck J, Broadbent V, Bamford M, Jungbluth H, et al. Vincristine treatment revealing asymptomatic hereditary motor sensory neuropathy type 1A. *Arch Dis Child.* 1999;81(5):442-3.
127. Chauvenet AR, Shashi V, Selsky C, Morgan E, Kurtzberg J, Bell B, et al. Vincristine-induced neuropathy as the initial presentation of charcot-marie-tooth disease in acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003;25(4):316-20.
128. Nishikawa T, Kawakami K, Kumamoto T, Tonooka S, Abe A, Hayasaka K, et al. Severe neurotoxicities in a case of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 caused by vincristine for acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2008;30(7):519-21.
129. Donelli MG, Zucchetti M, Munzone E, D'Incalci M, Crosignani A. Pharmacokinetics of anticancer agents in patients with impaired liver function. *Eur J Cancer.* 1998;34(1):33-46.
130. Ajitsaria R, Reilly M, Anderson J. Uneventful administration of vincristine in Charcot-Marie-Tooth disease type 1X. *Pediatr Blood Cancer.* 2008;50(4):874-6.
131. Guilhaumou R, Solas C, Bourgarel-Rey V, Quaranta S, Rome A, Simon N, et al. Impact of plasma and intracellular exposure and CYP3A4, CYP3A5, and ABCB1 genetic polymorphisms on vincristine-induced neurotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68(6):1633-8.
132. Hartman A, van Schaik RH, van der Heiden IP, Broekhuis MJ, Meier M, den Boer ML, et al. Polymorphisms in genes involved in vincristine pharmacokinetics or pharmacodynamics are not related to impaired motor performance in children with leukemia. *Leuk Res.* 2010;34(2):154-9.
133. Moore AS, Norris R, Price G, Nguyen T, Ni M, George R, et al. Vincristine pharmacodynamics and pharmacogenetics in children with cancer: a limited-sampling, population modelling approach. *J Paediatr Child Health.* 2011;47(12):875-82.
134. Egbelakin A, Ferguson MJ, MacGill EA, Lehmann AS, Topletz AR, Quinney SK, et al. Increased risk of vincristine neurotoxicity associated with low CYP3A5 expression genotype in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2011;56(3):361-7.
135. Ceppi F, Langlois-Pelletier C, Gagné V, Rousseau J, Ciolino C, De Lorenzo S, et al. Polymorphisms of the vincristine pathway and response to treatment in children with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics.* 2014;15(8):1105-16.
136. Iyer L, Hall D, Das S, Mortell MA, Ramírez J, Kim S, et al. Phenotype-genotype correlation of in vitro SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism. *Clin Pharmacol Ther.* 1999;65(5):576-82.
137. Perera MA, Innocenti F, Ratain MJ. Pharmacogenetic testing for uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 polymorphisms: are we there yet? *Pharmacotherapy.* 2008;28(6):755-68.
138. Dezentjé VO, Guchelaar HJ, Nortier JW, van de Velde CJ, Gelderblom H. Clinical implications of CYP2D6 genotyping in tamoxifen treatment for breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(1):15-21.

BIBLIOGRAFÍA

139. Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, Lee MT, et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med*. 2009;360(8):753-64.
140. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;93(4):324-5.
141. Gervasini G, Vagace JM. Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Front Genet*. 2012;3:249.
142. Schaeffeler E, Eichelbaum M, Reinisch W, Zanger UM, Schwab M. Three novel thiopurine S-methyltransferase allelic variants (TPMT*20, *21, *22) - association with decreased enzyme function. *Hum Mutat*. 2006;27(9):976.
143. Yang YL, Lin DT, Chang SK, Lin SR, Lin SW, Chiou RJ, et al. Pharmacogenomic variations in treatment protocols for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54(2):206-11.
144. Paugh SW, Stocco G, McCorkle JR, Diouf B, Crews KR, Evans WE. Cancer pharmacogenomics. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;90(3):461-6.
145. Diouf B, Crews KR, Lew G, Pei D, Cheng C, Bao J, et al. Association of an inherited genetic variant with vincristine-related peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia. *JAMA*. 2015;313(8):815-23.
146. Oshimori N, Li X, Ohsugi M, Yamamoto T. Cep72 regulates the localization of key centrosomal proteins and proper bipolar spindle formation. *EMBO J*. 2009;28(14):2066-76.
147. Sambrook J RD. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition ed. NY, USA: CSHL Press; 2001.
148. Iniesta R, Guinó E, Moreno V. [Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies]. *Gac Sanit*. 2005;19(4):333-41.
149. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002;296(5576):2225-9.
150. D'Angio GJ. Pediatric cancer in perspective: cure is not enough. *Cancer*. 1975;35(3 suppl):866-70.
151. Berg SL, Parsons DW. The Pharmacogenomics of Vincristine-Induced Neuropathy: On Pins and Needles. *JAMA Oncol*. 2015;1(7):975-6.
152. Folmer Y, Schneider M, Blum HE, Hafkemeyer P. Reversal of drug resistance of hepatocellular carcinoma cells by adenoviral delivery of anti-ABCC2 antisense constructs. *Cancer Gene Ther*. 2007;14(11):875-84.
153. Cui Y, König J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol*. 1999;55(5):929-37.
154. Lopez-Lopez E, Ballesteros J, Piñan MA, Sanchez de Toledo J, Garcia de Andoin N, Garcia-Miguel P, et al. Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(2):53-61.
155. Semsei AF, Erdelyi DJ, Ungvari I, Csagoly E, Hegyi MZ, Kiszal PS, et al. ABCC1 polymorphisms in anthracycline-induced cardiotoxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Biol Int*. 2012;36(1):79-86.
156. Gregers J, Gréen H, Christensen IJ, Dalhoff K, Schroeder H, Carlsen N, et al. Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2015;15(4):372-9.
157. Awasthi S, Singhal SS, Awasthi YC, Martin B, Woo JH, Cunningham CC, et al. RLIP76 and Cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(14):4372-7.
158. Yao K, Xing H, Yang W, Liao A, Wu B, Li Y, et al. Knockdown of RLIP76 expression by RNA interference inhibits proliferation, enhances apoptosis, and increases chemosensitivity to daunorubicin in U937 leukemia cells. *Tumour Biol*. 2014;35(8):8023-31.

159. Ansari M, Sauty G, Labuda M, Gagné V, Rousseau J, Moghrabi A, et al. Polymorphism in multidrug resistance-associated protein gene 3 is associated with outcomes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* 2012;12(5):386-94.
160. Zhao Y, Lu H, Yan A, Yang Y, Meng Q, Sun L, et al. ABCC3 as a marker for multidrug resistance in non-small cell lung cancer. *Sci Rep.* 2013;3:3120.
161. Chung PJ, Choi MC, Miller HP, Feinstein HE, Raviv U, Li Y, et al. Direct force measurements reveal that protein Tau confers short-range attractions and isoform-dependent steric stabilization to microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(47):E6416-25.
162. Tacik P, DeTure M, Hinkle KM, Lin WL, Sanchez-Contreras M, Carlomagno Y, et al. A Novel Tau Mutation in Exon 12, p.Q336H, Causes Hereditary Pick Disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015;74(11):1042-52.
163. Wren MC, Zhao J, Liu CC, Murray ME, Atagi Y, Davis MD, et al. Frontotemporal dementia-associated N279K tau mutant disrupts subcellular vesicle trafficking and induces cellular stress in iPSC-derived neural stem cells. *Mol Neurodegener.* 2015;10:46.
164. Iovino M, Agathou S, González-Rueda A, Del Castillo Velasco-Herrera M, Borroni B, Alberici A, et al. Early maturation and distinct tau pathology in induced pluripotent stem cell-derived neurons from patients with MAPT mutations. *Brain.* 2015;138(Pt 11):3345-59.
165. Caillet-Boudin ML, Buée L, Sergeant N, Lefebvre B. Regulation of human MAPT gene expression. *Mol Neurodegener.* 2015;10:28.
166. Tischfield MA, Baris HN, Wu C, Rudolph G, Van Maldergem L, He W, et al. Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. *Cell.* 2010;140(1):74-87.
167. Hong YB, Lee JH, Park HJ, Choi YR, Hyun YS, Park JH, et al. A family with axonal sensorimotor polyneuropathy with TUBB3 mutation. *Mol Med Rep.* 2015;11(4):2729-34.
168. Tischfield MA, Engle EC. Distinct alpha- and beta-tubulin isotypes are required for the positioning, differentiation and survival of neurons: new support for the 'multi-tubulin' hypothesis. *Biosci Rep.* 2010;30(5):319-30.
169. Bahi-Buisson N, Poirier K, Fourniol F, Saillour Y, Valence S, Lebrun N, et al. The wide spectrum of tubulinopathies: what are the key features for the diagnosis? *Brain.* 2014;137(Pt 6):1676-700.
170. Katsetos CD, Legido A, Perentes E, Mörk SJ. Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *J Child Neurol.* 2003;18(12):851-66; discussion 67.
171. Poirier K, Saillour Y, Bahi-Buisson N, Jaglin XH, Fallet-Bianco C, Nabbout R, et al. Mutations in the neuronal β -tubulin subunit TUBB3 result in malformation of cortical development and neuronal migration defects. *Hum Mol Genet.* 2010;19(22):4462-73.
172. Shibasaki M, Maesawa C, Akasaka K, Kasai S, Yasuhira S, Kanno K, et al. Transcriptional and post-transcriptional regulation of β III-tubulin protein expression in relation with cell cycle-dependent regulation of tumor cells. *Int J Oncol.* 2012;40(3):695-702.
173. Katsetos CD, Herman MM, Mörk SJ. Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2003;55(2):77-96.
174. Mariani M, Shahabi S, Sieber S, Scambia G, Ferlini C. Class III β -tubulin (TUBB3): more than a biomarker in solid tumors? *Curr Mol Med.* 2011;11(9):726-31.
175. Kaira K, Takahashi T, Murakami H, Shukuya T, Kenmotsu H, Ono A, et al. The role of β III-tubulin in non-small cell lung cancer patients treated by taxane-based chemotherapy. *Int J Clin Oncol.* 2013;18(3):371-9.
176. English DP, Roque DM, Santin AD. Class III β -tubulin overexpression in gynecologic tumors: implications for the choice of microtubule targeted agents? *Expert Rev Anticancer Ther.* 2013;13(1):63-74.
177. Cicchillitti L, Penci R, Di Michele M, Filippetti F, Rotilio D, Donati MB, et al. Proteomic characterization of cytoskeletal and mitochondrial class III beta-tubulin. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(7):2070-9.

BIBLIOGRAFÍA

178. Gan PP, McCarroll JA, Po'uha ST, Kamath K, Jordan MA, Kavallaris M. Microtubule dynamics, mitotic arrest, and apoptosis: drug-induced differential effects of betaIII-tubulin. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(5):1339-48.
179. Zhang HL, Ruan L, Zheng LM, Whyte D, Tzeng CM, Zhou XW. Association between class III β -tubulin expression and response to paclitaxel/vinorebine-based chemotherapy for non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer.* 2012;77(1):9-15.
180. Sève P, Dumontet C. Is class III beta-tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents? *Lancet Oncol.* 2008;9(2):168-75.
181. Sève P, Reiman T, Dumontet C. The role of betaIII tubulin in predicting chemoresistance in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2010;67(2):136-43.
182. Basciano PA, Matakas J, Pecci A, Civaschi E, Cagioni C, Bompiani N, et al. β -1 tubulin R307H SNP alters microtubule dynamics and affects severity of a hereditary thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* 2015;13(4):651-9.
183. Kunishima S, Nishimura S, Suzuki H, Imaizumi M, Saito H. TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *Eur J Haematol.* 2014;92(4):276-82.
184. Pui CH, Sandlund JT, Pei D, Campana D, Rivera GK, Ribeiro RC, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. *Blood.* 2004;104(9):2690-6.
185. Kishi S, Cheng C, French D, Pei D, Das S, Cook EH, et al. Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood.* 2007;109(10):4151-7.
186. Diouf B, Crews KR, Evans WE. Vincristine pharmacogenomics: 'winner's curse' or a different phenotype? *Pharmacogenet Genomics.* 2016;26(2):51-2.
187. Bosilkovska M, Ing Lorenzini K, Uppugunduri CR, Desmeules J, Daali Y, Escher M. Severe Vincristine-induced Neuropathic Pain in a CYP3A5 Nonexpressor With Reduced CYP3A4/5 Activity: Case Study. *Clin Ther.* 2016;38(1):216-20.
188. Johnston DL, Sung L, Stark D, Frazier AL, Rosenberg AR. A systematic review of patient-reported outcome measures of neuropathy in children, adolescents and young adults. *Support Care Cancer.* 2016.
189. Pinto N, Cohn SL, Dolan ME. Using germline genomics to individualize pediatric cancer treatments. *Clin Cancer Res.* 2012;18(10):2791-800.