



Facultad de Medicina y Enfermería / Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea

Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal / Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila

Tesis doctoral / Doktorego tesia

MiR-Farmakogenetika

Haurtzaroko Leuzemia Linfoblastiko Akutuaren Tratamentuan

Maitane Umerez Igartua

Leioa, 2018

MiR-Farmakogenetika
Haurtzaroko Leuzemia Linfoblastiko Akutuaren
Tratamentuan

Maitane Umerez Igartua

Doktorego Tesia
Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila

2018

“De gente bien nacida es agradecer los beneficios que recibe”
El Quijote (1605)

Quiero aprovechar estas líneas para dar las gracias a todas aquellas personas que han estado a mi lado y han hecho posible este proyecto.

En primer lugar a África, gracias por creer en mí y darme la oportunidad de llevar a cabo esta tesis. Hecho la vista atrás a 2011, asignatura de Genética, cuando conseguiste sembrar en mí la curiosidad por la farmacogenética y pude dibujar las primeras pinceladas con mi proyecto de fin de máster. Opté por la vía FIR sin yo saber que años más tarde me brindarías la ocasión de seguir trazando el camino hacia una tesis doctoral que hoy es una realidad, gracias.

El camino ha sido duro, pero sin ninguna duda ha sido amortiguado por grandes investigadoras y mejores personas que con sus acuarelas han hecho de esta tesis su mejor versión.

¡Muchísimas gracias Ángela! Por tu ayuda incondicional, por guiarme cuando lo necesitaba; probablemente sin tu apoyo no lo hubiera conseguido, eres maravillosa y llegarás hasta dónde te lo propongas, no tengo ninguna duda, te lo mereces.

No puedo olvidarme de: Leire y Carmen, entre tabla y tabla, análisis y coteje, jeje siempre dispuestas a ayudar, sois muy trabajadoras y así me lo habéis demostrado, eskerrik asko. Nerea y Jone, mila-mila esker zuen laguntzogatik, denborak gehien estutzen zuenean hor egon zinetelako. Y agradecer por supuesto a Idoia, Borja y Eli, por formar parte del equipo y colaborar en dar forma a este trabajo.

Empecé a brocha gorda, pero sin duda todo lo que me habéis enseñado me ha permitido llegar a perfilar mis conocimientos y hoy puedo decir que aquel boceto se ha convertido en obra, expuesta al mundo, orgullosa, contenta y con ganas de seguir abriendo las puertas a más páginas que seguir coloreando.

¿Y qué sería de mi vida sin mí paleta de colores? Nere bizona ez litzateke berdina izango ingurukoengatik ez balitza! Abestiak esaten duen bezala, taupada bakoitzaz koloreztatu zuribeltza, taupada bakoitzaz irribarre bat...eta bi, hiru...mila!

Kuadritxangitarrok, Amaia, Maialen, Eneida, Marijo, Leire, Irati eta Sandra, eskerrik asko zuen babesagatik, zuen aldamenian lan orduak alde batera jareta denbora geldittuko nekelako. Zapatu Sakratu gehixau dakulako aurretik, topa!

Garazi eta Jaione, betirako deiketan dian horreittako bi lagun! Ikasketak elkartu ginttuen baina adiskidetasunak irmo mantendu gaittu urteiek aurrera egin ahala. Garazi, urtebete pasatxo da zure tesian niri dedikatutako hitzak irakurri nittunetik, zuk ez dozu gutxiago merezi (inork baino hobeto ulerketan dozulako momentu honen garrantzia). Jaione zer esanik ez, orain urrinago bizi arren elkarketan garen bakoitzian ondiok Gasteizko pisuko garai zoro hareittan bagina modura dalako. Neskak, ea noizko hurrengo patxaran homeopatikua! Jajajaja.

Eskerrik asko farmaziako lagun danori (Aitziber, Mikel, Pili, Arantza, Pablo, Josu, David, June, Garbiñe, Josune, Asun, Belén, Miren, Larraitz, Araceli, Nekane, Maritxu, Laura, Berta, Koro, Gonzalo, Carmen y Maripi), aún recuerdo cuando en 2014 os pedía consejo llena de dudas antes de tomar la decisión sobre este camino. Gracias por interesaros en todo momento sobre mis avances. Mila esker Josean por entender mi situación y darme la oportunidad de adaptar mis horarios y compaginar Donostia con Leioa. Y gracias a Marta, Shandra, Lurdes, Mertxe y a todos aquellos que han estado de alguna forma presentes durante estos años.

Eta bukatu aurretik, ikasteko nork erakutsi izan bihar dalako eta horretan onenak izan dittutelako txikittatik aldamenian, nere eskerrik kuttunena nere familixiari. Tia Lurdes, zuk erakutsi dostazu pereza ez dala existitzen (nere kasuan “umereza” pittin bat bai seguru!). Tio Jabi, porque sé que soy tu “*farmaféutica*” favorita, gracias por sacarme una sonrisa cada vez que me llamas así. Tia Marian, hainbeste aldiz zure bizkotxo paregabiakin goxatu dostazulako mila mila esker. Amaiur, ahizpa eta laguna, txikittatik jolasian, ni oinaztu eta zu trumoi, ekaitz perfektua! Gaur egun be elkarren eskutik ibilbidian, holaxe jarraitu dagila urte askuan! Eta nola ez, Ama, Aitta, iparrorratz, bidelagun, eskerrik asko beti nere albuan izatiagatik eta naizena izatera heltzen lagunketiagatik.

Argitalpenak

Tesi honetako lana ondorengo argitalpenetan jaso da:

Iparraguirre L, Gutierrez-Camino A, **Umerez M**, Martin-Guerrero I, Astigarraga I, Navajas A, Sastre A, Garcia de Andoin N, García-Orad A. MiR-pharmacogenetics of methotrexate in childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics*. 2016 Nov;26(11):517-525. (*Genetics & Heredity* Q3, *JCR*: 2,250; *Genetics* Q2, *SJR*: 0.993)

Umerez M, Gutierrez-Camino A, Martin-Guerrero I, Garcia de Andoin N, Santos B, Sastre A, Echebarria-Barona A, Astigarraga I, Navajas A, Garcia-Orad A. Mir-pharmacogenetics of Vincristine and peripheral neurotoxicity in childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2017 Dec 27. doi: 10.1038/s41397-017-0003-3. [Epub ahead of print]. (*Genetics & Heredity* Q2, *JCR*: 3,812; *Pharmacology* Q1, *SJR*: 1.352)

Umerez M, Gutierrez-Camino A, Santos B, Martin-Guerrero I, Garcia de Andoin N, Sastre A, Navajas A, Astigarraga I, Garcia-Orad A. Pharmacoepigenetics in childhood acute lymphoblastic leukemia: Involvement of miRNA polymorphisms in hepatotoxicity. *Epigenomics*. 2018 Apr 1; 10(4):409-417. doi: 10.2217/epi-2017-0138. (*Genetics & Heredity* Q1, *JCR*: 4.979; *Genetics* Q1, *SJR*: 1.679)

Umerez M, Gutierrez-Camino A, Lopez-Lopez E, Santos B, Martin-Guerrero I, García de Andoin N, Sastre A, Navajas A, Astigarraga I, García-Orad A. Pharmacoepigenetics in childhood acute lymphoblastic leukemia: Involvement of miRNA polymorphisms in mucositis. (*Pharmacogenomics-en aztertze prozesuan*). (*Pharmacology & Pharmacy* Q3, *JCR*: 2,302; *Pharmacology* Q2, *SJR*: 0.877)

Gainera, tesi honen garapenean zehar beste artikulua hauek ere argitaratu ditut:

Umerez M, Gutierrez-Camino A, Muñoz-Maldonado C, Martin-Guerrero I, Garcia-Orad A. MTHFR polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia: Influence on methotrexate therapy. *Pharmgenomics Pers Med*. 2017 Mar 27;10:69-78. (*Pharmacology* Q1, *SJR*: 1.165)

Umerez M, García-Obregón S, Martín-Guerrero I, Astigarraga I, Gutierrez-Camino A, García-Orad A. Role of miRNAs in treatment response and toxicity of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics*. 2018 Mar; 19(4):361-373. (*Pharmacology & Pharmacy* Q3, *JCR*: 2,302; *Pharmacology* Q2, *SJR*: 0.877)

Laburdurak

Laburdura	Azalpena
3'UTR	3'UTR erregulazioa
6-MP	6-merkaptopurina
AA	Arrisku altua
ABCB1	ATP binding cassette B azpifamiliako 1 kidea
ABCC1	ATP binding cassette C azpifamiliako 1 kidea
ABCC10	ATP binding cassette C azpifamiliako 10 kidea
ABCC2	ATP binding cassette C azpifamiliako 2 kidea
ABCC3	ATP binding cassette C azpifamiliako 3 kidea
ABCC4	ATP binding cassette C azpifamiliako 4 kidea
ABCG2	ATP binding cassette G azpifamiliako 2 kidea
ADME	Xurgapen, distribuzio, metabolismo, irazpen
ADN	Azido desoxirribonukleikoa
AE	Arrisku estandarra
AKR1A1	Aldo-keto erreduktasa 1 familiako A1 kidea
AKR1C3	Aldo-keto erreduktasa 1 familiako C3 kidea
ALDH1	Aldehido dehidrogenasa, 1-like zitosolikoa
ALDH1A1	Aldehido dehidrogenasa 1 familiako A1 kidea
ALDH3A1	Aldehido dehidrogenasa 3 familiako A1 kidea
ALDH5A1	Aldehido dehidrogenasa 5 familiako A1 kidea
ALT	Alanina aminotransferasa
AOA	Arrisku oso altua
AraC	Zitarabina
ASO	Oligo alelo-espezifikoak
ASP	L-asparaginasa
AST	Aspartato aminotransferasa
AUM	Alelo urrienaren maiztasuna
B-ALL	B-zelula leinuaren leuzemia limfoblastiko akutua
BAX	Bcl-2-like 4 proteina
BCLW	Bcl-2-like proteina
bp	Base parea
CAT	Katalasa
CBR1	Karbonil erreduktasa 1
CBR3	Karbonil erreduktasa 3
CeGen	Espainiako genotipazio zentro nazionala
CIPN	Kimioterapiak induzitutako neuropatia periferikoa
CPA	Ziklofosfamida
CPdB	Consensuspath datu-basea
CPK	Kreatina fosfokinasa
CYP2A6	P450 zitokromo 2 familia A azpifamiliako 6 kidea
CYP2B6	P450 zitokromo 2 familia A azpifamiliako 6 kidea
CYP2C19	P450 zitokromo 2 familia C azpifamiliako 19 kidea
CYP2C8	P450 zitokromo 2 familia C azpifamiliako 8 kidea
CYP2C9	P450 zitokromo 2 familia C azpifamiliako 9 kidea

Laburdurak

CYP3A4	P450 zitokromo 3 familia A azpifamiliako 4 kidea
CYP3A5	P450 zitokromo 3 familia A azpifamiliako 5 kidea
DE	Desbideraketa estandarra
DEXA	Dexametasona
DFL	D fosfolipasa
DHFR	Dihidrofolato erreduktasa
DICER	III motako ribonukleasa
DLK	Leuzina zipper kinasa duala
DNR	Daunorrubizina
DROSHA	Harizpi bikoitzeko RNA endorribonukleasa espezifikoa
EFS	Gertaerarik gabeko biziraupena
EIF2C1	Eukarioten itzulpen hasiera 2C faktorea, 1
EIF2C2	Eukarioten itzulpen hasiera 2C faktorea, 2
epiADR	Epiadriamizina
ER	Erretikulu endoplasmikoa
ERCC1	ERCC eszisio konponketa 1, endonukleasa ez-katalitiko azpiunitatea
ERCC2	ERCC eszisio konponketa 2, TFIIH core helikasa konplexu azpiunitatea
ERCC4	ERCC eszisio konponketa 4, endonukleasa katalitiko azpiunitatea
ETV6	Ets aldaera 6
FDR	False discovery rate
GEA	Gutxieneko energia askea
GEM	Gaixotasun erresidual minimoa
GPX1	Glutation peroxidasa 1
GWAS	Genoma osoko asoziazio ikerketa
hbaRNA	Harizpi bakarreko RNA
hbiRNA	Harizpi bikoiteko RNA
HM	Hezur muina
IP3R	Inositol 1,4,5-trifosfato hartzailea
ISCIII	Carlos III osasun institutua
Kr	Kromosoma
KT	Konfiantza tartea
LAPM	Lesioari-asoziatutako patroi molekulak
LSO	Oligo lokus-espezifikoak
LLA	Leuzemia linfoblastiko akutua
MAPK	Mitogenoek aktibatutako proteina kinasa
MGMT	O-6-metilguanina-ADN metiltransferasa
miRNA	MikroRNA
MLH1	MutL homologoa 1
MOE	Munduko osasun erakundea
mRNA	RNA mezularia
MSH2	MutS homologoa 2
MTHFD1	Metilentetrahidrofolato deshidrogenasa, ziklohidrolasa eta formiltetrahidrofolato sintetasa 1
MTHFR	5,10-metilentetrahidrofolato erreduktasa
MTR	Metionina sintasa
MTRR	Metionina sintasa erreduktasa

MTX	Metotrexato
NA	Ez eskuragarri
NFKB1	Kappa B nukleo faktorea 1 azpiunitatea
NFKBIE	NFKB epsilon inhibitzailea
NMN	Nikotinamida mononukleotidoa
NMNAT	Nikotinamida mononukleotido adenililtransferasa
NOS1	Oxido nitriko sintasa 1
NOS2	Oxido nitriko sintasa 2
NOS3	Oxido nitriko sintasa 3
NQO1	NAD(P)H kinona deshidrogenasa 1
NSZ	Nerbio sistema zentrala
OR	Odds ratio
OS	Biziraupen orokorra
PCR	Polimerasa kate erreakzioa
PD	Farmakodinamika
PDN	Prednisona
PK	Farmakozinetika
POR	P450 zitokromo oxidoerreduktasa
pre-miRNA	miRNA prekurtsorea
pri-miRNA	miRNA primarioa
Puma	Apoptosiaren p53 modulatzaile gorantz erregulatua
RALBP1	RalA lotura proteina 1
RFC1	Folato eramaile erreduzitua
RISC	RNA-induzitze konplexu isiltzailea
RNA	Azido erribonukleikoa
ROS	Oxigeno espezie erreaktiboak
SARM1	Sterile α -motif eta armadillo-motif dituen proteina
SHMT1	Serina hidrometiltransferasa
SLC19A1	Solutu eramaile 19 familia 1 kidea
SLC22A16	Solutu eramaile 22 familia 16 kidea
SLC22A6	Solutu eramaile 22 familia 6 kidea
SLC22A8	Solutu garraiatzaile 22 familia 8 kidea
SLC46A1	Solutu eramaile 46 familia 1 kidea
SLCO1A2	Solutu eramaile anioi organiko garraiatzail familia 1A2 kidea
SLCO1B1	Solutu eramaile anioi organiko garraiatzail familia 1B1 kidea
SLCO1B3	Solutu eramaile anioi organiko garraiatzail familia 1B3 kidea
SNP	Solutu eramaile anioi organiko garraiatzail familia 1B3 kidea
SNS	Nerbio sistema sinpatikoa
SOD1	Superoxido dismutasa 1
STS	Ehun bigunen sarkoma
TdT	Desoxittransferasa terminala
TIT	Intratekal hirukoitza
TLR	Toll like hartzailea
TOP2A	ADN topoisomerasa II alfa
TP53	P53 tumore proteina
TS	Timidilato sintetasa

Laburdurak

TSE	Tendoi sakonen erreflexua
TUBB*	Tubulina
ULN	Normaltasunaren goi muga
VCR	Vinkristina
Wlds	Wallerian degenerazio motela
XDH	Xantina deshidrogenasa

Aurkibidea

SARRERA.....	3
1. LEUZEMIA LINFOBLASTIKO AKUTUA	5
1.1. Sarrera	5
1.2. Definizioa.....	5
1.3. Haurtzaroko LLA-ren epidemiologia.....	6
1.4. Ezaugarri kliniko eta patologikoak	7
1.5. Faktore pronostikoak eta arrisku estratifikazioa.....	9
2. HAURTZAROKO LLA-REN TRATAMENDUA: LAL/SHOP PROTOKOLOA	10
3. HAURTZAROKO LEUZEMIA LINFOBLASTIKO AKUTU TERAPIAREN TOXIZITATEAK	13
3.1. VCR-k induzitutako neurotoxizitatea	16
3.2. Gibel toxizitatea	18
3.3. Toxizitate gastrointestinala.....	21
3.4. MTX-ren maila plasmaticoak.....	26
4. FARMAKOGENETIKA LLA-n.....	27
4.1. LLA-ren farmakogenetika	28
4.2. MikroRNAk	29
4.3. MiR Farmakogenetika	32
HIPOTESIA ETA HELBURUAK.....	35
5. HIPOTESIA.....	37
6. HELBURUAK.....	38

MATERIALAK ETA METODOAK	39
7. IKERKETA POPULAZIOA	41
7.1. Pazientek	41
7.2. Toxizitatearen ebaluazioa	43
8. LAGINEN PROZESAMENDUA	45
8.1. ADN erauzketa.....	45
8.2. ADN kuantifikazioa eta kalitate ikuskatzea	45
9. MIKRORNA GENEETAKO POLIMORFISMOEN AUKERAKETA	45
10. SNP-EN GENOTIPAZIOA.....	50
11. ANALISI ESTADISTIKOAK	53
12. ANALISI BIOINFORMATIKOAK	53
12.1. MiRNA-en egitura sekundarioen iragarpena	53
12.2. Geneen itu aukeraketa.....	53
12.3. Bidezidorren analisisa	54
EMAITZAK.....	55
13. VINKRISTINAK INDUZITUTAKO NEUROTOXIZITATEA	57
14. HEPATOTOXIZITATEA	79
15. TOXIZITATE GASTROINTESTINALA.....	101
16. METOTREXATOAREN MAILA PLASMATIKOAK.....	123
EZTABAIDA	143
ONDORIOAK	151
REFERENCES - ERREFERENTZIAK	155

SARRERA

1. LEUZEMIA LINFOBLASTIKO AKUTUA

1.1. Sarrera

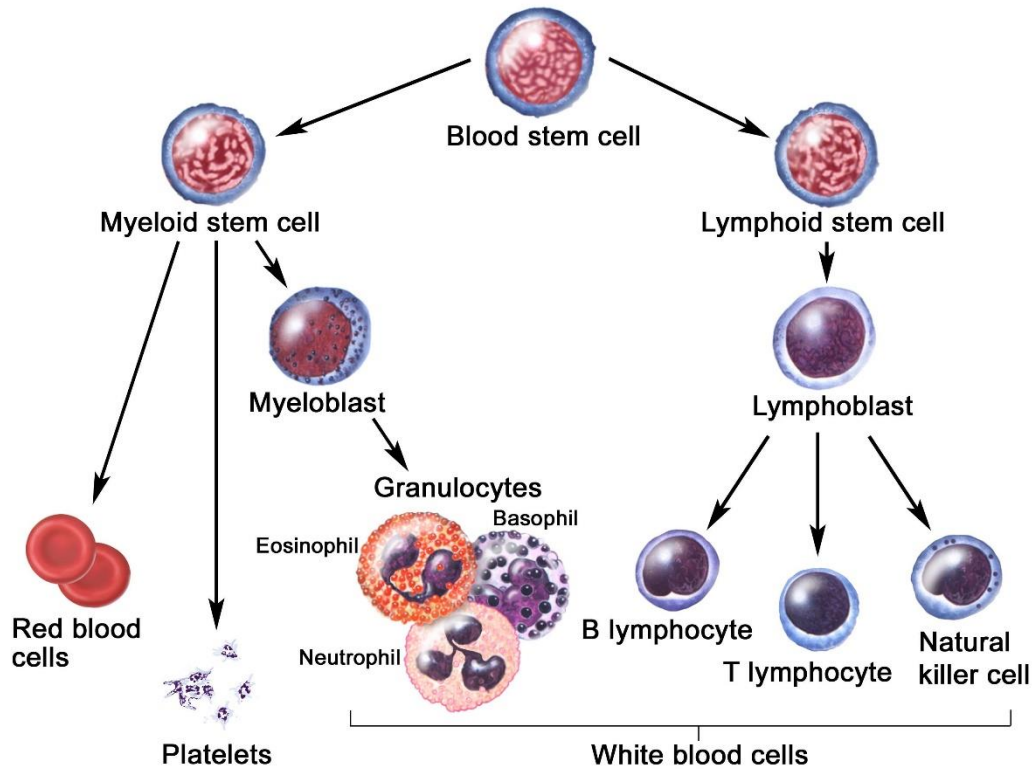
Leuzemia linfoblastiko akutua (LLA) haurtzaroan zeharreko minbizirik arruntena da, herrialde garatuetan adin talde honentzat gaixotasunagatiko heriotza kausa nagusia delarik. Azken hiru hamarkadetan, LLA-ren biziraupen tasek nabarmen egin dute gora % 90-era iritsi arte (Tasian and Hunger, 2017). Emaitzen hobekuntza hau, neurri batean behintzat tratamendu protokolo intentsiboei esker lortu da, zeintzuk pazienteen arrisku estratifikazioan eta fase ezberdinetan zehar administratutako farmako konbinazioetan oinarritzen diren. Dena den, biziraupen hobekuntza honen trukean, paziente batzuek, sarri, toxizitate larriak jasaten dituzte, dosi jaitsierak edota tratamendu eteteak beharrezko egiten dituztenak, biziraupenean negatiboki eraginez (Ceppi et al., 2014; Salazar et al., 2012). Horrela, gaur egun haurtzaroko LLA-ren erronka alorretako bat toxizitate markatzaile fidagarrien ikerketa da, farmakogenetika helburu hau lortzeko etorkizun handiko tresna delarik.

1.2. Definizioa

LLA, zelula linfoideen leinuaren aurrekaria den linfoblastoen minbizia da, B- zein T-zelulen leinuei eragin diezaiekeena. Linfoblastoak zenbait anomalia pilatzen dituenean, heltze prozesu naturala eragozten da (1.go irudia) ezberdintze prozesua geldiaraziz eta eraldatutako zelularen proliferazioa bultzatuz. Eraldatutako zelula hau, bere ohiko tamaina txiki-ertainagatik, zitoplasma eskasagatik, egoera erdi-kondentsatutik sakabanatuago batera doan kromatinagatik eta nabarmentzen ez den nukleo bategatik bereizten da.

Heldu gabeko klon honen proliferazioa dela eta, hezur-muinaren (HM) eta odol periferikoaren inbasioa gertatzen da. Inbasio honek hezur-muin funtzioaren huts egitea eragiten du eta blastoek organo zein ehunak infiltratzen dituzte, bereziki gongoil linfatikoak, gibela, barea, nerbio sistema zentralarena (NSZ) eta testikuluak.

LLA kasuek adin pediatrikoan diagnostikatzen diren minbizien herena suposatzen dute eta haurtzaroko leuzemia akutu guztien % 75-80 dira.



© 2007 Terese Winslow
U.S. Govt. has certain rights

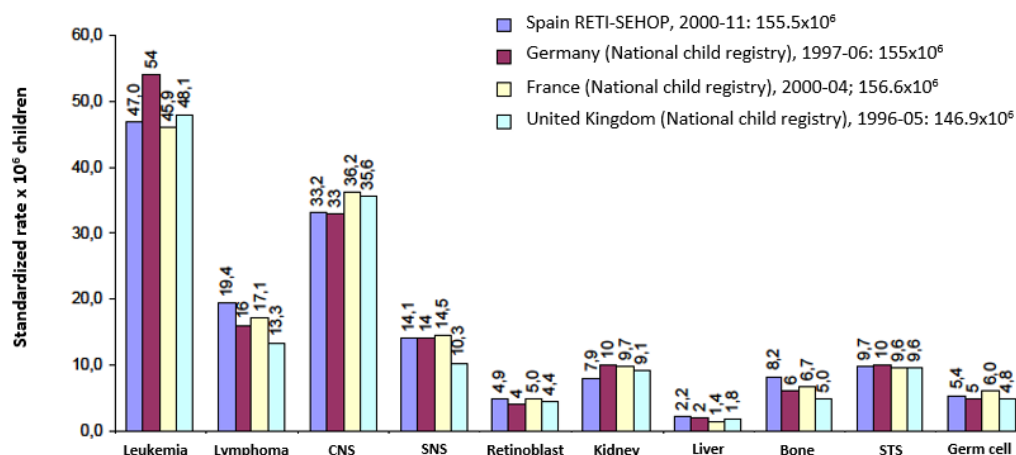
1. go irudia. Odol-zelulen garapen normala.

Iturria: (<https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq>)

1.3. Haurtzaroko LLA-ren epidemiologia

Kasuen % 75 gutxi gorabehera 6 urtetik beherako haurretan gertatzen dira eta 2-5 urte bitartean maiztasun gailur bat ematen da (Swerdlow et al., 2008). Mundu-mailako intzidentzia urteko 100 000 biztanletik 1-4,75 kasu bitartekoa dela estimatzen da. LLA pixka bat ohikoagoa da gizonezkoetan emakumezkoetan baino. Gainera, arraza/etnia ezberdintasunak deskribatu dira. Hispaniarrak kaukasiarrak baino emanagoak dira leuzemia akutua garatzera eta kaukasiarrek Afrikar-Amerikarrek baino intzidentzia altuagoak erakutsi dituzte (Lim et al., 2014).

Espanian, Haur Tumoreen Erregistro Nazionalaren arabera (RETI-SEHOP, 1980-2016), LLA-ren intzidentzia 14 urtetik beherako haurretan ematen diren minbizi guztien % 37,1-ekoa (% 95 KT: 35,2-39,0) da (2. Irudia).

Standardized rate by world population (ASRw)

Laburdurak: CNS, nerbio sistema zentrala; SNS, nerbio sistema sinpatikoa; STS, ehun bigunen sarkoma; Epit, epiteliola.

2. irudia. Haur minbizien intzidentzia Espainian (RETI-SEHOP) eta beste herrialde Europarretan.

Iturria: RNTI-SEHOP-tik egokituia (<https://www.uv.es/rnti/cifrasCancer.html>)

LLA-en % 80-85-ek B-zelulen leinuan dute jatorria (Silverman et al., 2000). Hemendik aurrerantzean, LLA-ren azpimota honetara mugatuko gara, B-zelula aitzindarien leuzemia linfoblastiko akutura (B-LLA).

1.4. Ezaugarri kliniko eta patologikoak

B-LLA-dun paziente gehienek hezur-muinaren huts egitearen ondorio diren zeinu eta sintomak aurkezten dituzte: trombozitopenia (petekia, ekimosi edo odoljarioen presentzia), anemia (zurbiltasun eta neke gisa azaltzen dena) edota neutropenia (infekzio arrisku areagotua, arrazoi honegatik ez da arraroa LLA-k ageriko infekzio foku gabeko sukarrarekin debutatzea). Leukozitoen zenbaketa murriztua, normala edo nabarmen areagotua egon daiteke. Hezurretako mina eta artralgia biziagotua egon daitezke, hezur-muinaren edota ehun zein giltzaduretako egituren infiltrazioagatik. Miaketa klinikoan, linfadenopatia, hepatomegalia eta esplenomegalia maiz ageri dira. Batzuetan, gaitzak nerbio sistema zentrala eta gizezko pazienteetan testikuluak kaltetu litzake, blastoek ehun hauekiko duten joeragatik (Swerdlow et al., 2008). Sintomen iraupena egun gutxi batzuetakoa edo hilabeteetakoa izan liteke eta gaixotasunaren aurkezpena analitikako asaldura asintomatiko batetik larrialdi mediko bat izateraino joan liteke.

Odol frofis eta hezur-muin aspiratuetan ikusi bezala, B-LLA-ren minbizi linfoblastoek morfologia aldakorra erakusten dute, zenbaitetan zitoplasma eskas, kromatina nukleiko kondentsatu eta nabari ez den nukleodun zelula txikiak ageri dira, beste batzuetan aldiz, urdin argi eta urdin-gris bitarteko zitoplasma kantitate moderatua duten zelula handiagoak izaten dira, noizbehinka bakuolatuak, kromatina nukleiko sakabanatu eta nabarmentze maila aldakorreko nukleo

Sarrera

anizdunak (Swerdlow et al., 2008). Hezur-muineko biopsietan, minbizi linfoblastoak tamaina txiki-ertainekoak dira, modu finean sakabanatutako kromatinarekin, zitoplasma eskasarekin eta esfera edo obalo formako nukleo txiki, lauso eta koska-gabe edo bihurgunetsuarekin (Swerdlow et al., 2008).

Immunonfenotipoari dagokionez, B-LLA-n linfoblastoak ia beti positiboak dira B-zelulen CD19 eta zitoplasmako CD79 eta CD22 markatzaileentzat; hauetako bat bera ere bere kabuz espezifiko ez den arren, markatzaile hauen positibotasunak konbinazioan edo intentsitate altuan nabarmen babesten du B leinua. B-leinuko linfoblastoen ezberdintze mailak korrelazio kliniko eta genetikoak ditu. Fase goiztiarrenetan, aitzindari goiztiarren B-LLA edo pro-B-LLA deitua, blastoek CD19, zitoplasmako CD79a, zitoplasmako CD22 eta nukleoko TdT adierazten dituzte. Erdibideko fasean, LLA arrunta deitua, blastoek CD10 adierazten dute. B zelula aitzindarien ezberdintze fase helduenean, pre-B-LLA deitua, blastoek zitoplasmako μ kateak adierazten dituzte. B-LLA aitzindarien immunofenotipoa, ia kasu guztietan B-zelula aitzindari normaletan ikusten denarekiko desberdina da. Ezberdintasun hauek oso baliagarriak izan daitezke gaixotasunaren jarraipenean egiten den hezur-muin laginetako gaixotasun erresidual minimoaren (GEM) ebaluaziorako (Hashimoto et al., 2002; Swerdlow et al., 2008).

Egitura kromosomikoa oinarritzat hartuz, LLA-rekin irmoki erlazionatutako zenbait aldaketa genetiko deskribatu dira (1.go taula).

1.go taula. Translokazio kromosomikoak eta kromosoma kopuru aldaketak, baita haien maiztasunak ere B-zelulen LLA-n (Malouf and Ottersbach, 2017).

Anomalia zitogenetikoak	Maiztasuna (%) Haurrak (2-18 urte)
<i>TEL/AML1</i> edo <i>ETV6-RUNX1</i> t(12;21)(p13;q22)	12-15
ETV6-RUNX1-like	6
<i>E2A/PBX1</i> t(1;19)(q23;p13.3)	2-6
<i>DUX4</i> -berrantolaketa	8
Hiperdiploidia	20-30
4 eta 10 trisomiak	20-25
<i>MLL/AF4</i> t(4;11)(q21;q23) ^A	2-20
<i>BCR/ABL</i> t(9;22)(q34;q11)	1-3
<i>BCR/ABL1</i> -like	15-20
Hipodiploidia	1-2
21 kromosomaren anplifikazio intrakromosomikoa (iAMP21)	2-3

Oharrak: A, 50 fusio bikote gene baino gehiago identifikatu dira *MLL*-rentzat. Bikote gene ohikoena *AF4* transkripzio faktorea da, baita 19p13 kromosomako *ENL* eta 9p22 kromosomako *AF9*.

Alterazio genetiko hauetako batzuk pronostikoarekin asoziatu izan dira, adibidez, kariotipo normala edo TEL/AML positibotasuna aldeko pronostikoarekin asoziatu dira, aldiz BCR/ABL edo MLL-ren presentzia pronostiko desegoki batekin.

1.5. Faktore pronostikoak eta arrisku estratifikazioa

Gaur egun, kontuan hartu behar diren faktore pronostiko garrantzitsuenak honakoak dira: adina, leukozitoen zenbaketa diagnostikoan, immunofenotipoa, hezur-muinaz kanpoko ehunen kaltea, ploidia, aldaketa zitogenetiko edo genomikoak, erantzun goiztiarra tratamenduari eta GEM; aldeko pronostikoa edo pronostiko desegokia dakarten faktoreak (2. taula).

2. taula. Aldeko pronostikoa edo pronostiko desegokia dakarten faktoreak haurtzaroko LLA-n.

Aldekoa	Desegokia
1-9 urte bitarteko adina	<1 edo >10 urteko adina
Leukozito zenbaketa diagnostikoan: <20 x 10 ⁹ /L	Leukozito zenbaketa diagnostikoan: > 20 x 10 ⁹ /L
Immunofenotipo arrunta	T-LLA > pre-pre B-LLA > pre-B-LLA > B-LLA
NSZ-ren kalte eza	NSZ kaltetua
Kariotipo arrunta, hiperdiploidia (51-81 kromosoma), TEL/AML +.	Ia tetraploidia (82-94 kromosoma), hipodiploidia (30-45 kromosoma), ia haploidia (24-29 kromosoma), BCR/ABL +, MLL +
HM-eko blasto % +14 tratamendu egunean: < 5	HM-eko blasto % +14 tratamendu egunean: > 5

Laburdurak: T-LLA, T-zelulen leuzemia linfoblastiko akutua; B-LLA, B-zelulen leuzemia linfoblastiko akutua; NSZ, nerbio sistema zentrala; HM, hezur-muina.

Sarrera

Diagnostikoaren unean faktore hauek ebaluatzeari esker, pazienteak beren gaixotasun arrisku arabera estratifikatzea ahalbidetzen da (3. taula).

3. taula. Arrisku talde estratifikaziorako irizpideak haurtzaroko LLA-ren terapian.

ARRISKU ESTANDARRA (AE)

Paziente batek ondorengo irizpide guztiak bete behar ditu talde honetan sartzeko

1-9 urte bitarteko adina

LLA arruntaren immunofenotipoa (CD19+, CD10+, μ kate zitoplasmatikoak -)

Diagnostikoko odol zelula zurien zenbaketa: $<20 \times 10^9/l$

Hezur-muinaz kanpoko kalterik eza (NSZ, testikuluak)

Zitogenetika desegoki bat ez izatea

HM-eko blasto % +14 tratamendu egunean: < 5

Tratamenduaren indukzio fasearen amaieran GEM % $<0,1$

ARRISKU ALTUA (AA)

Gutxienez irizpide hauetako bat izateak paziente bat arrisku altuan sartzea zehazten du:

≥ 10 urtetako adina

AE-erako adierazitako immunofenotipoak ez beste edozein izatea

Diagnostikoko odol zelula zurien zenbaketa: 20 eta $200 \times 10^9/l$ bitartekoa

Hezur-muinaz kanpoko ehun kaltetua (NSZ, testikuluak)

Zitogenetika desegokia

HM-eko blasto % +14 tratamendu egunean: ≥ 5

Tratamenduaren indukzio fasearen amaieran GEM % $\geq 0,1$

ARRISKU OSO ALTUA (AOA)

Gutxienez irizpide hauetako bat izateak paziente bat arrisku oso altuan sartzea zehazten du:

Odoleko zelula zurien zenbaketa $>200 \times 10^9/l$

Zitogenetika oso desegokia

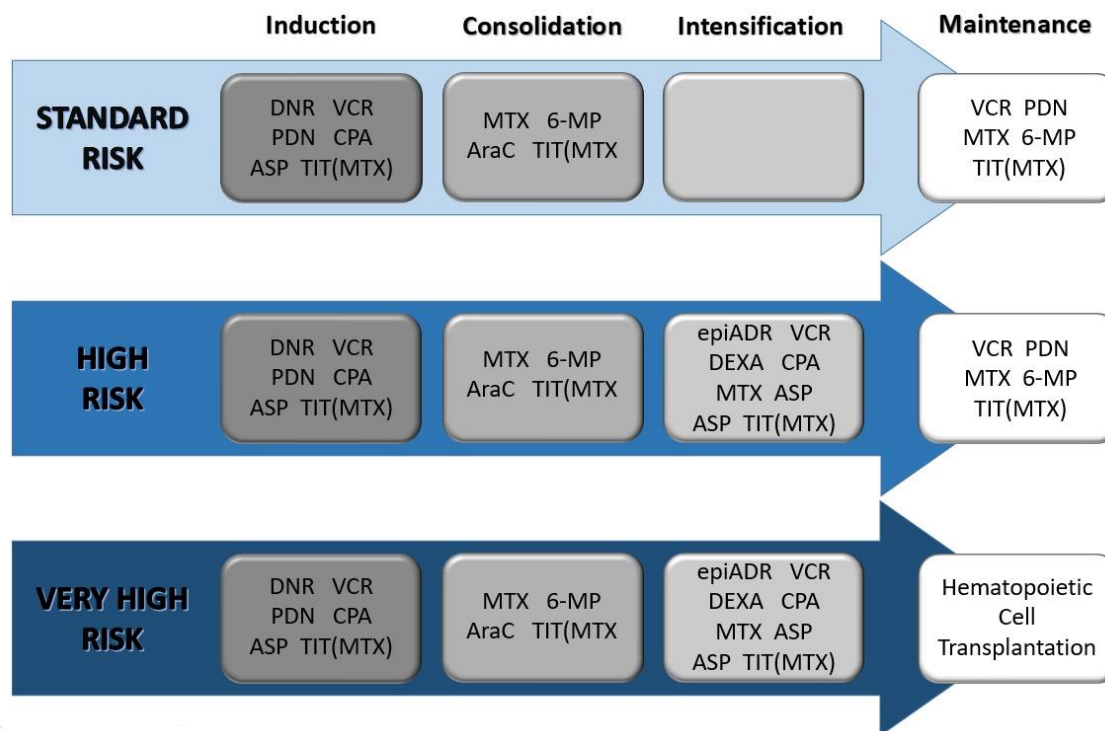
AA taldekoa HM-eko blasto % +14/+21 tratamendu egunean: ≥ 5

AA taldekoa kontsolidazio fasearen amaieran GEM % $\geq 0,1$

Gaur egun, pazienteak estratifikatzeko estrategia hau tratamendua egokitzeko erabili izan da.

2. HAURTZAROKO LLA-REN TRATAMENDUA: LAL/SHOP PROTOKOLOA

LLA-ren terapia, konplexuak diren eta ondo ezarriak eta arriskuari egokituak dauden tratamendu protokoloetan oinarritzen da, non sekuentzialki fase ezberdinetan zehar farmako anitzen konbinaketak administratzen diren. Duela urte gutxi arte, Espainian LLA tratamenduarentzat erabili izan zen protokoloa Hematologia eta Onkologia Pediatriko Erakunde Espainiarrak (SEHOP) onetsitako protokoloa zen, LAL/SHOP deitua. Honek zenbait bertsio ditu (94, 99, 2005), beraien arteko ezberdintasun xeheekin. 3. irudian LAL/SHOP 2005 protokoloa deskribatzen da. 2013. urtean, LAL/SHOP 2005 protokoloa eguneratua izan zen antzekoa den LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 prokolora.



Laburdurak: DNR, daunorribizina; VCR, vinkristina; PDN, prednisona; CPA, ziklofosfamida; ASP, L-asparaginasa; TIT, intratekal hirukoitza; MTX, metotrexatoa; 6-MP, 6-merkaptopurina; AraC, zitarabina; epiADR, epiadriamizina; DEXA: dexametasona.

3. irudia: LAL/SHOP 2005 tratamendu protokoloaren diagrama.

Lehendabizi, arrisku talde guztietan indukzio fase bat abiarazten da 5 astez gutxi gorabehera. Fase honen helburua hasieran hezur-muinean zegoen zelula leuzemikoen kargaren % 99 baino gehiago deuseztatzea da, hematopoiesi prozesu normala berrezartzeko asmoz. LAL/SHOP 2005 protokoloaren baitan honako farmakoak daude: **prednisona** (PDN) (glukokortikoidea, efektu immunosupresorea; 60 mg/m²/eguneko, zain barnetik edo ahoz 28 egunez; 30 mg/m²/eguneko hurrengo 4 egunetan eta 15 mg/m²/eguneko 4 egun gehiagoz), **daunorribizina** (DNR) (topoisomerasa blokeatzeko eta ADN-ari lotzeko gaitasuna duen antraziklina bat; 120 mg/m² 48 h-tako infusio jarrai bat), **vinkristina** (VCR) (vinka alkaloidea, mikrotubuluekin elkarrekintzatzen du mitosisa metafasean blokeatuz; astean behineko 1,5 mg/m²-ko bolusa, gehienez 2 mg, 4 astez), **L-asparaginasa** (ASP) (asparagina hidrolizatu eta proteinen sintesia oztopatzen duen entzima; 5000 U/m²-ko 10 dosi muskulu barnetik egun txandakatuetan), eta **ziklofosfamida** (CPA) (ADN-aren farmako alkilatzailea, transkripzioa eta erreplikazioa blokeatzen dituena; 1000 mg/m²-ko dosi bakarra). Gainera, **terapia intratekal hirukoitza** (TIT) (metotrexato (MTX), zitarabina (AraC) eta hidrokortisona konbinaketa; adin taldearen arabera egokitutako bi dosi) hasten da NSZ-ren inbasioa ekiditeko.

Ondoren, hematopoiesi normala berrezarrita, kontsolidazio fasea hasten da, zein gutxi gorabehera 8 astez mantentzen den. Bigarren fase honetan, tratamendua areagotzen da

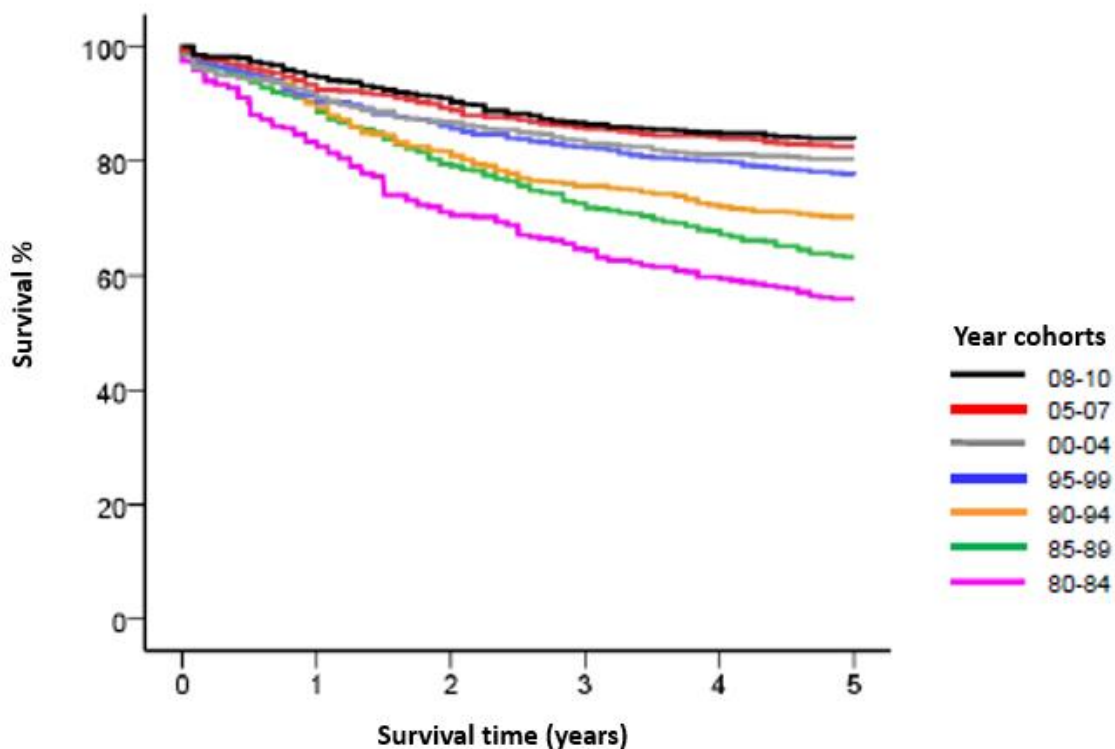
Sarrera

terapiarekiko erresistenteak diren klonen abiatzea saihesteko. Arrisku talde guztiek kontsolidazio terapia bera jasotzen dute. Fase honetan, **metotrexatoa** (efektu antitumoral purina, pirimidina eta proteinen sintesia inhibituz lortzen duen folatoen analogoa; 5 g/m² edo 3 g/m², 3 dosi guztira 24 h-tako infusioan emanak eta dosi osteko azido folinikoaren erreskateekin) eta **6-merkaptopurina** (6-MP) (bere efektua ADN-an tartekatuz gauzatzen duen purinen analogoa; ahoz 30 mg/m²/eguneko 6 astez) erabiltzen dira. MTX-aren kontzentrazio plasmaticoak egunero monitorizatzen dira kontzentrazioak 0,2 µM azpitik egon arte. Gainera, kontsolidazio fasea **zitarabinarekin** (AraC) (ADN polimerasa inhibitzen duen zitosinaren analogoa; 1 g/m²-tako lau dosi) eta TIT-ekin (lau dosi) osatzen da.

Azkenik, mantenimendu fase bat aplikatzen da birindukzioekin erremisioa gordetzea helburutzat duena eta bi urtez edo luza daitekeena. Birindukzioak hilabetean behin aplikaten dira lehen 6 hilabeteetan eta PDN (40 mg/m²/eguneko 7 egunez), VCR (1,5 mg/m², gehienez 2 mg) eta TIT (soilik mantenimenduaren lehen 4 hilabeteetan) administratzen dira bertan. Honez gain, aho bidez edo muskulu barnetik MTX (20 mg/m²/astero) eta aho bidetik 6-MP (60 mg/m²/egun) ere erabiltzen dira.

AA-ko eta AOA-ko taldeetan tratamendua modu ezberdinetan indartzen da. Lehendabizi, kontsolidazio eta mantenimendu faseen arteko intentsifikazioa fase gehigarri bat aplikatzen da. Intentsifikazio fase honetan zehar, epirrubizina, VCR, dexametasona, CPA, MTX, ASP eta AraC bezalako zenbait farmako eta TIT administratzen dira. Fase gehigarri honetaz gain, AA-ko pazienteen taldean, indukzioan zehar, ASP 10 000 U/m²-ko dosira doa eta bi CPA infusio eta hiru TIT administratzen dira. Gainera, mantenimendu fasean zehar birindukzioak lehenengo 8 asteetan aplikatzen dira eta ASP eta CPA ere erabiltzen dira. AOA-ko taldean, tratamendua are gehiago intentsifikatzen da hainbat kontsolidazio faserekin eta tratamendua zelula hematopoietikoen transplantearekin amaitzen da.

Pazienteak gaixotasunaren arriskuaren arabera estratifikatzeko estrategia honek biziraupen tasak hobetu ditu, egun, 5 urteko gertaera gabeko biziraupen tasak % 80-90 izateraino hazi direlarik (Bhojwani et al., 2015; Liang et al., 2010; Mitchell et al., 2010; Möricke et al., 2010). Espainian, RETI datuen arabera, diagnostikotik 5 urterako biziraupena, 80-ko hamarkadan % 56-koa izatetik azken urteotan % 83-koa izatera pasa dela estimatzen da (4. irudia, RETI-SEHOP 1980-2016).



4. irudia. Haurtzaroko LLA-ren diagnostikotik 5 urterako biziraupen tasa intzidentzia urte kohorte bakoitzeko. 0-14 urte, 1980-2010, N=3989 kasu.

Iturria: RETI-SEHOP-etik egokitua (<https://www.uv.es/rnti/informes.html>).

Arrakasta klinikoa gorabehera, tratamendu protokolo hauen arazo garrantzitsuenetako bat, paziente batzuek jasaten dituzten toxizitate larriak dira. Toxizitateak dosi murrizketak edota tratamenduaren eteteak ekar ditzake, honek biziraupenean duen eragin negatiboarekin (Ceppi et al., 2014; Salazar et al., 2012). Tratamendua arrisku estratifikazioaren arabera egokitzeak talde batzuetan gehiegizko kimioterapia administratzea sahiestu du (Geng and Wang, 2015; Hunger et al., 2005; Pui and Evans, 2013). Hala ere, oraindik hiru arrisku taldeetan toxizitateak agertzen dira.

3. HAURTZAROKO LEUZEMIA LINFOBLASTIKO AKUTU TERAPIAREN TOXIZITATEAK

Farmakoak definitutako posologiei (dosia eta maiztasuna) jarraiki administratzen dira, itu ehunean kontzentrazio zehatzetara iritsi eta bilatutako efektua lortzeko helburu bakarrarekin. Alabaina, farmako hauek beste ehun, zelula edo bidezidor intrazelularretan izan ditzaketen eraginek desiratzen ez diren efektuen garapena ekar dezakete, toxizitatea azken finean.

Farmako bat administratzen denean, ondoz-ondoko xurgapen, distribuzio, metabolismo eta irazpen pausuetatik pasatzen da, ADME izendapenarekin ezagutzen diren prozesuak.

Sarrera

Zain barnetiko bidea ez den bide batetik administratutako farmakoek, hala nola, aho bidea edo muskulu barneko bidea, odol-zirkulazio arteko xurgatze prozesu bat jasango dute. Behin odolean, farmakoak beren efektua burutuko duten xede ehunetara banatuak izango dira. Hurrena, molekulak metabolizatu egingo dira, gehien bat gibelean, azkenik organismotik kanporatuak izateko (giltzurrun iragazpen bidez eta neurri txikiagoan iragazpen biliar bidez, farmakoaren arabera). Lau ADME pausu hauek farmakozinetika (PK) bezala definitzen dira, hots farmakoa nola mugitzen den gizabanakoaren gorputzean zehar eta ekintza lekuan iritsitako farmako kontzentrazioen eraldaketa bidez nola eragiten duen efektuan (Preskorn and Hatt, 2013). Bestalde, erantzun terapeutikoarekin zerikusia duen oro, orokorrean farmakoaren afinitate eta ekintza lekuan duen aktibitateak finkatua, farmakodinamika (PD) gisa definitzen da (Preskorn and Hatt, 2013).

Farmako bakoitzaren PK/PD prozesuak bidezidor baten baitan jasotzen dira, zeinetan gaur egun, gene partehartzaile gehienak ezagunak diren. PK/PD prozesuetako geneen aldaketek farmakoaren erantzun optimoa eragotzi eta eragin desiragaitzen garapena bultzatuko luketen faktore hartaratzaille gisa joka dezakete (Turner et al., 2015), izan ere, farmakoen kontzentrazio aldaketak eragin ditzakete, baita toxizitate zein farmakoen efektu etetea dakarten bitartekarien produkzioa ere. Farmako zehatzen PK/PD geneetako aldaketen aurkikuntzak indultzatzen dituzten toxizitateak are gehiago murrizteko aukera zabaltzen du.

LAL/SHOP tratamendu protokoloak toxizitateen ebaluaketa ezartzen du tratamendu fase bakoitzerako, uneoro dagozkion sostengu neurriak hartzeko, dosiak murrizteko edo farmakoen administrazioa eteteke helburuarekin. LAL/SHOP 2005 tratamendu protokoloaren eragin desiragaitz batzuk farmako antileuzemiko zehatzen administrazioarekin lot daitezke, hala nola antraziklinek induzitutako kardiotoxizitatea, ASP-k eragindako hipersentikortasuna edo VCR-k induzitutako neuropatia periferikoa (Moriyama et al., 2015). Modu kontrajarrian, beste toxizitate batzuk farmako bat baino gehiagoren andimistrazioarekin erlazionatu daitezke. Adibidez, gibel toxizitatea ASP espozizioarekin asoziatu da indukzio fasean zehar eta kontsolidazio fasean aldiz MTX-rekin (Liu et al., 2017). Beste adibide bat mukositisia izan liteke, MTX, DNR edo CPA kimioterapikoekin erlazionatu dena. 4. taulak haurtzaroko LLA-ren tratamenduan erabiltzen diren farmakoen toxizitaterik ohikoenak jasotzen ditu.

4. taula. LLA tratamenduaren toxizitateak eta hauek indultzatzen dituzten farmakoak.

Toxizitatea	Farmakoa
Neurotoxizitatea	
Neuropatia periferikoa	Vinkristina ⁺⁺ , Ziklofosfamida*.
Ileo paralitikoa	Vinkristina ⁺ .
Gibel toxizitatea	
Hipertransaminasemia	L-Asparraginas ⁺⁺ , Metotrexato ⁺⁺ , Daunorribizina ⁺⁺ , 6-Merkaptopurina ⁺ , Zitarabina ⁺ .
Hiperbilirubinemia	Daunorribizina ⁺⁺ , L-Asparraginas ⁺⁺ , Metotrexato ⁺⁺ , 6-Merkaptopurina ⁺ .
Toxizitate gastrointestinala	
Mukositisa	Metotrexato ⁺⁺ , Daunorribizina ⁺⁺ , Ziklofosfamida ⁺ , 6-Merkaptopurina ⁺ , Zitarabina ⁺⁺ .
Goragale/gonbitoak	Daunorribizina ⁺⁺ , Ziklofosfamida ⁺⁺ , Metotrexato ⁺⁺ , Vinkristina ⁺⁺ , L-Asparraginas ⁺⁺ , 6-Merkaptopurina ⁺ , Zitarabina ⁺⁺ .
Beherakoa	Daunorribizina ⁺⁺ , Metotrexato ⁺ , Vinkristina ⁺ , L-Asparraginas ⁺⁺ , Zitarabina ⁺⁺ .
Nefrotoxizitatea	
Zistitisa	Ziklofosfamida ⁺⁺ .
Giltzurrun disfuntzioa	Zitarabina*.
Toxizitate hematologikoa	
Anemia	Daunorribizina ⁺⁺ , Vinkristina ⁺⁺ , L-Asparraginas ⁺ , Ziklofosfamida*, Metotrexato ⁺ , 6-Merkaptopurina ⁺ , Zitarabina ⁺ .
Neutropenia	Daunorribizina ⁺⁺ , L-Asparraginas ⁺ , Ziklofosfamida ⁺⁺ .
Tronbozopenia	Daunorribizina ⁺⁺ , Vinkristina ⁺⁺ , L-Asparraginas ⁺ , Ziklofosfamida*, Metotrexato ⁺ , 6-Merkaptopurina ⁺⁺ , Zitarabina ⁺ .
Beste batzuk	
Hipergluzemia	Prednisona ⁺ , L-Asparraginas ⁺⁺ .
Hipersentikortasuna	L-Asparraginas ⁺⁺ , Metotrexato*, 6-Merkaptopurina*, Zitarabina*.
Exantema	Metotrexato ⁺ .
Kardiotoxizitatea	Daunorribizina ⁺⁺ , Ziklofosfamida*.
Odoljario gastrointestinala	Daunorribizina ⁺⁺ , Metotrexato*.
Infekzioa	Daunorribizina ⁺⁺ , Ziklofosfamida ⁺ , Zitarabina ⁺⁺ .

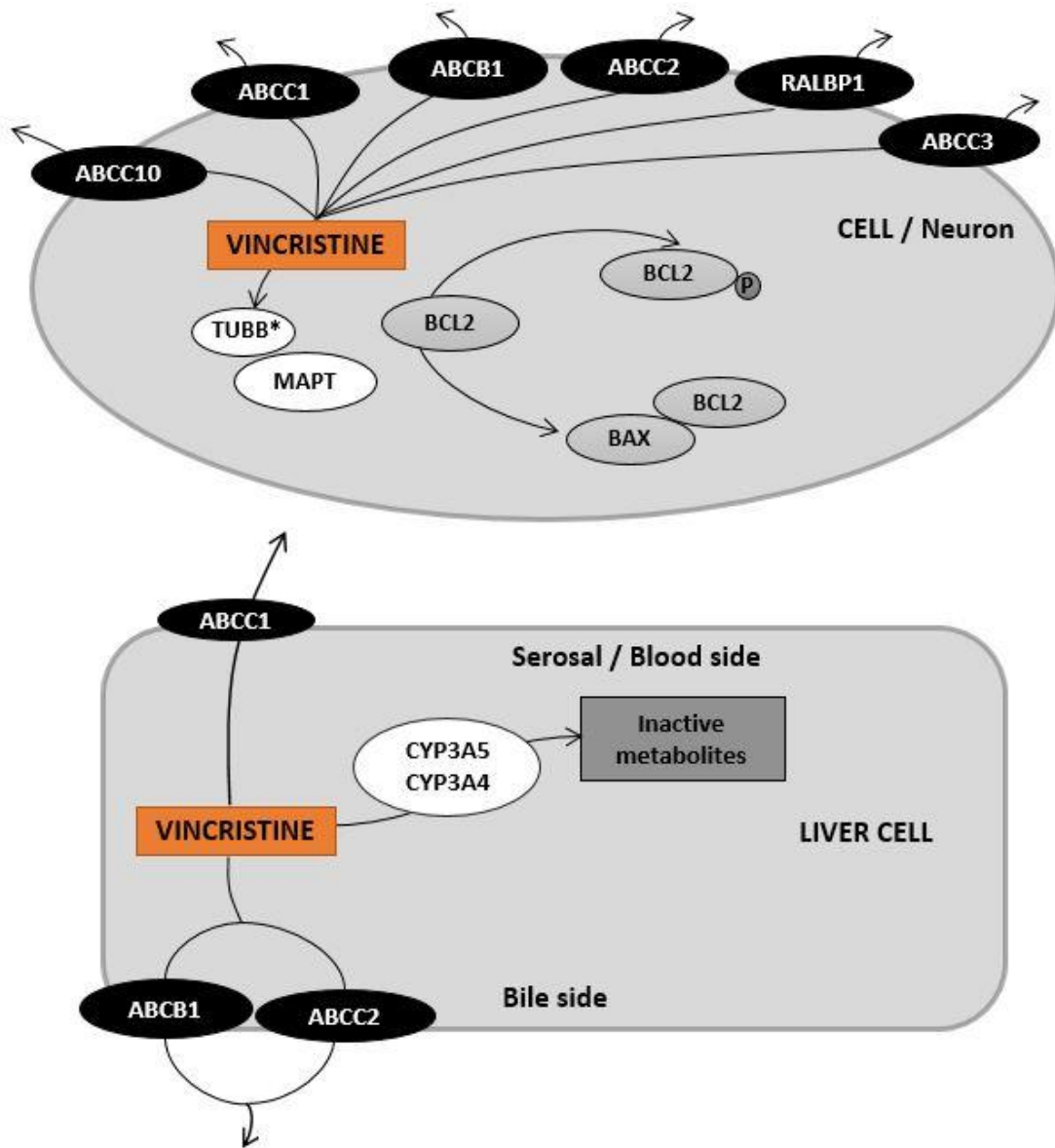
Oharrak: Farmakoen informazio ofizialak adierazitakoaren arabera oso arruntak ($\geq 1/10$) (++) gisa adierazia); arruntak ($< 1/10$ -tik $\geq 1/100$ -ra) (+ gisa asierazia) edo ezohikoak ($< 1/100$ -tik $\geq 1/1000$ -ra) (* gisa adierazia) diren LLA tratamenduaren toxizitateak (Accord Healthcare S.L.U., 2017a, 2017b; Baxter Oncology GmbH, 2017; Pfizer, 2017a, 2017b; Silver pharma S.L., 2017; Spezialpräparate, 2017).

Gure ikerketa ondorengoetara zuzendu dugu: VCR-k indultzatutako neurotoxizitatea, toxizitate/farmako bikote argiena; gibel toxizitatea eta toxizitate gantroitestinala, biak LLA-ren terapiako zenbait farmakok eragindakoak eta plasmako MTX maila altuak.

3.1. VCR-k induzitutako neurotoxizitatea

VCR osagai garrantzitsua da hartzaroko LLA-ren terapian, hala ere, eraginkortasun klinikoa gorabehera, VCR-k neurotoxizitate sentoriala eta motorea sor ditzake (Carozzi et al., 2015), VCR-ren eragin desiragaitz nagusia eta bere erabilerarako faktore mugatzailea.

Neurotoxizitate mota ohikoena neuropatia periferikoa da, zein batik bat zentzumen polineuropatia edo polineuropatia motore distal baten gisan aurkezten den (Legha, 1986). Badirudi toxizitate hau VCR-ren kontzentrazio maila gorenekin erlazionatua dagoela (Dougherty et al., 2007; Groninger et al., 2005). Kontzentrazio plasmatico hauek VCR-ren administrazio maiztasunaren eta dosiaren araberakoak izango dira, baita VCR-ren PK-ren araberakoak ere (5. irudia).



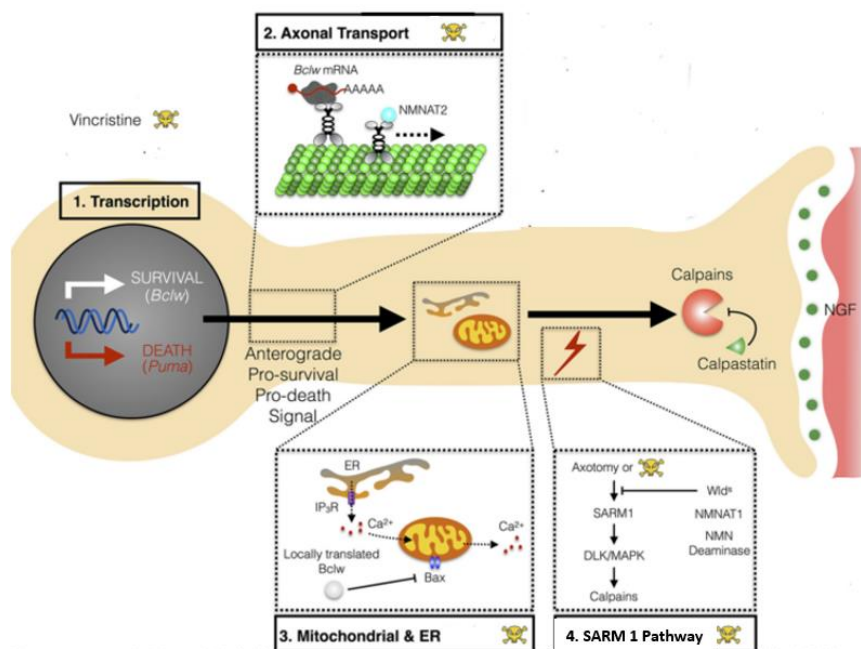
5. irudia. VCR-ren bidezidor PK/PD.

VCR nagusiki CYP3A entzimen azpifamiliak metabolizatzen du, vinkristinaren argitzean eginkizun garrantzitsu bat betez (Dennison et al., 2006). ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC10 eta RALBP1 bezalako mintz garraiatzaileek ere betekizun nabarmena dute vinkristinaren garraio eta kanporaketan. VCR-ren behazun irazketa ABCB1 eta ABCC2 bidez gertatzen da eta VCR-ren odolerantzko garraioa aldiz ABCC1 bidez (5. irudia) (Leveque and Jehl, 2007).

Ikuspegi PD batetik, VCR-k zelulen proliferazioa inhibitzen du tubulinari atxikiz eta mikrotubuluaren polimerizazioa blokeatuz (Islam and Iskander, 2004), honek mitosiaren blokeoa eta zelula apoptosia dakar (Jordan and Wilson, 2004), neurodegenerazioaren azalpen posible bat izanik. Ondorioz, beta-tubulina proteinak edota mikrotubuluekin erlazionaturako proteinak kodetzen dituzten geneek hala nola, *TUBB*, *MAPT* edo *CEP72*, mikrotubuluaren egonkortasuna alda dezakete, zelulen VCR-rekiko sentikortasuna asaldaturaz eta pazienteen artean farmako honek duen efektuan ezberdintasunak eraginez.

Bestalde, paziente eta animalia modeloetan aurrera eramandako ikerketek axoien degenerazioa proposatu dute neurotoxizitate prozesuaren atzean dagoen lesio anatomopatologiko nagusitzat. Bertan iradokitzen da VCR-k zuzenki edo zeharka, modu distal batean hasi eta eremu proximalagoetarantzko axoien degenerazioa sustatu dezakeela. Axoien degenerazioari hasiera emango lioketen mekanismo potentzialen artean axoian zeharreko garraio akatsak (Argyriou et al., 2012; van den Bent, 2005; Rosenthal and Kaufman, 1974), mitokondrien funtzio aldaketak edo Ca^{+2} homeostiaren aldaketak daude.

VCR-ak eragotziko lituzkeen neuronako puntu erabakigarriak hauek dira (6. irudia): (1) nukleoan, axoien garapenean zehar, itu gunetik datozen neurotrofinek biziraupen/heriotza geneen transkripzio oreka kontrolatzen dute, Bcl-2-like 2 proteina (*BCLW*) eta p53 apoptosiaren modulatuzaile gainadierazia (*Puma*) hurrenez hurren; (2) axoian zeharreko garraioan, *BCLW* transkribatuak eta zelularen somatik datozen nikotinamida mononukleotido adenililtransferasa (*NMNAT2*) faktoreak axoi distalerantz zuzentzen dira; (3) mitokondria eta erretikulu endoplasmatikoa, itzulitako *BCLW*-k mitokondrien funtzioa modulatuzen dute, zeinak kaspasen kaskada inhibitu eta Ca^{+2} homeostasia mantentzen duen Ca^{2+} -ren menpeko kalpainen aktibazioa ekidinez eta azkenik (4) SRAM1 bidezidorra, non VCR-k eta axotomiak SARM1 eta DLK/MAPK seinalizazioa aktibatzen duten, kalpainen aktibazioari bidea emanez, axoien degenerazioa eragiteko azken puntu konbergentea (Fukuda et al., 2017). Horrela, VCR-k eragina izan dezakeen puntu hauetako edozeinetan gertatutako alterazioek VCR-k axoi degenerazioa eta neurotoxizitatea sortzeko duen modua alda dezakete.



Laburdurak: ER, erretikulu endoplasmatikoa; IP3R, inositol 1,4,5-trifosfato hartzailea; BAX, Bcl-2-like 4 proteina; SARM1, *sterile α -motif* eta *armadillo-motif* dituen proteina; DLK, leuzina dual kremailera kinas; MAPK, mitogenoek-aktibatutako proteina kinas; Wlds, Wallerian degenerazio motela; NMN, nikotinamida mononukleotidoa; CIPN, kimioterapiak induzitutako neuropatia periferikoa.

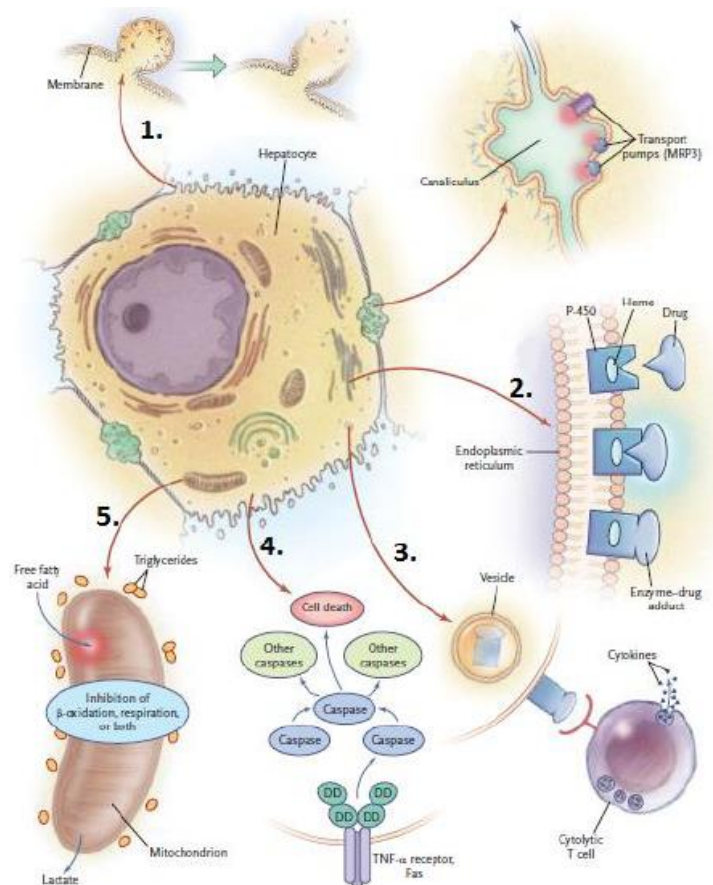
6. irudia. VCR-rentzat proposatutako axoi degenerazio mekanismoak. Axoien degenerazioan erabakiorrak dira heriotza bultzatu edota biziraupen bidezidorrak inhibitu ditzaketen faktoreak. Iturria: Fukuda et al. 2017-tik egokitua (Fukuda et al., 2017).

Gaur egun ez da neurotoxizitatea eragozteko tratamendurik existitzen eta toxizitatea ezarri bada, har daitezkeen neurri bakarrak errekuperatu arteko VCR-ren etetea, dosi murrizketa edo tarte luzatzea dira (Argyriou et al., 2012; Ceppi et al., 2014), neurriok biziraupena kaltetu dezakeelarik (Carozzi et al., 2015; Ceppi et al., 2014; Postma et al., 1993). Hori dela eta, medikuntzaren erronketako bat VCR-rekin erlazionatutako neurotoxizitatea zein pazienteek garatuko duten aurreikustea da, alde aurretik tratamendua egokitu ahal izateko.

3.2. Gibel toxizitatea

Hurtzaroko LLA pazienteetan farmakoekin erlazionaturiko toxizitaterik ohikoenetako bat hepatotoxizitatea da (Liu et al. 2017), zeina neurri batean serumeko animotransferasen (alanina aminotransferasa (ALT) edo aspartato aminotransferasa (AST)) edota bilirrubina (BI) mailen igoera bezala definitzen den. Igoera hau zelula hepatikoen mintzeko asaldurak medio edo zelula heriotzagatik sortzen dira (Navarro and Senior, 2006), mekanismo desberdinek indusitzen dituztelarik (7. irudia): (1) kaltzioaren homeostasi intrazelularren etetea, zeinak zelula gainazaleko aktina zuntzekin desegitea eragiten duen eta ondoren zelularen lisia; (2) entzima-farmako aduktuen sorrera, zeintzuen produktuek entzimen disfuntzioa, gradiente ionikoaren galera, ATP mailen jaitsiera eta ondorioz zelula heriotza dakarten; (3) antigorputzen sorrera eta

zitokinen errekrutatzea, zeintzuek inflamazioa eragingo duten, aduktuen zelula gainazaleranzko migrazioaren ondorioz; (4) erantzun immunearen edo zelula kaltearen ondoriozko apoptosia; eta (5) mitokondria asaldurak, gantz azidoen β -oxidazioaren etetea adibidez (Lee, 2003).



7. irudia. Gibel toxizitatearentzat proposatutako mekanismoak.

Iturria: Lee 2013-tik egokitua (Lee, 2003).

Hautzaroko LLA pazienteen % 66,5-ak gutxi gorabehera gibel toxizitatea erakusten du LLA tratamenduan zeharreko punturen batean (Ladas et al. 2010). Hepatotoxizitatea garatzen den unea administratu den farmakoaren araberakoa izan daiteke (Iorga, Dara, and Kaplowitz 2017). Izatez, indukzio fasean zehar, Liu eta lankideek hepatotoxizitatea ASP esposizioarekin lotu zuten, aldiz kontsolidazio fasean zehar, jakina da MTX dosi altuek gibel toxizitatea eragiten dutela (Liu et al. 2017).

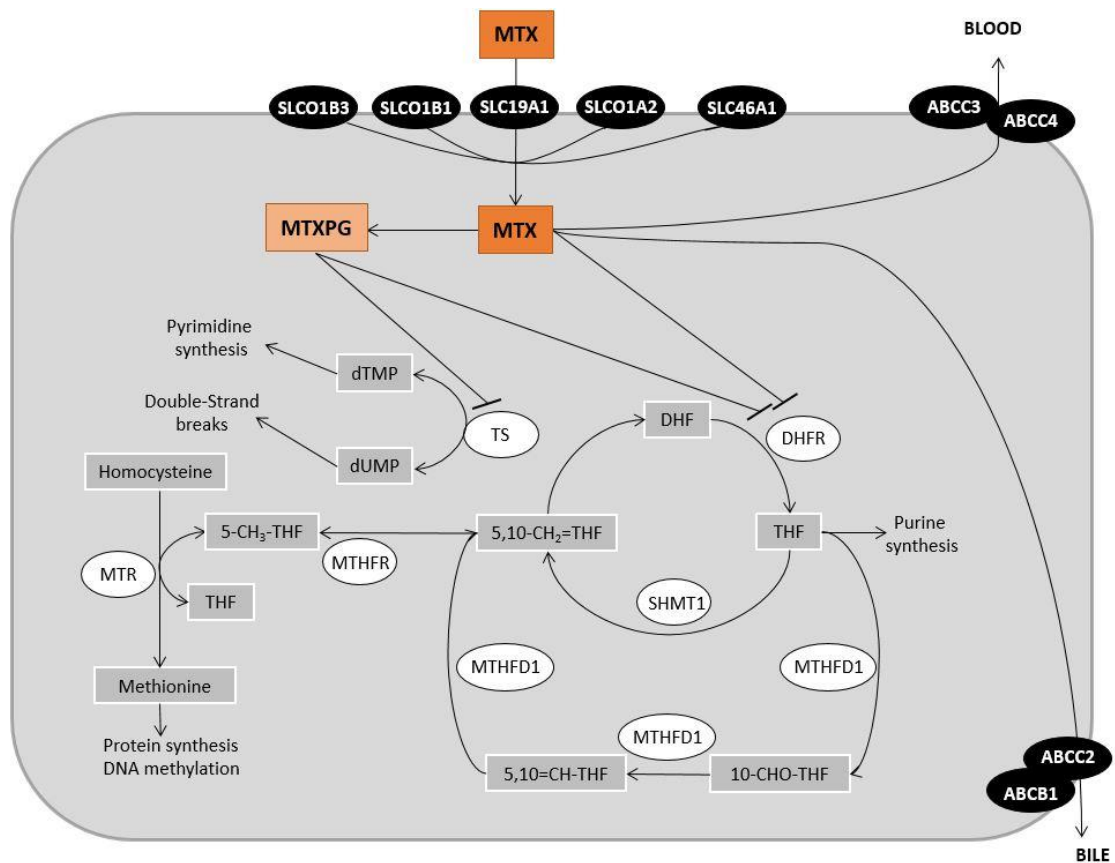
ASP zelulaz kanpoko asparragina azido aspartikora metabolizatzen duen entzima bat da. Bere efektu antileuzemikoa zelula leuzemikoek, zelula normalekin alderatuz, asparragina sintetizatzen duten gaitasun urrian oinarritzen da. Asparragina mailen murrizketak proteinen sintesi gaitasuna gutxitzen du, zelula leuzemikoen heriotza bultzatuz (Ho et al., 1970; Onuma et al., 1971). Kasu honetan, hepatotoxizitate mekanismoa ezezaguna da, hala ere, esteatosi hepaticoa sorrarazten duen mekanismoaren antzekoa litzatekeela proposatu da (Liu et al.,

Sarrera

2017), non mitokondrietako gantz azidoen oxidazio etetea dela eta hauek gibelesko mikrobiosikuletan pilatzen diren. Gainera, honek oxigeno espezie erreaktiboen (ROS) areagotzea dakar. Ondorioz, gibelean mitokondrien asaldurak, ROS-en kontzentrazio handitzeak eta gantz azidoak mikrobiosikuletan pilatzeak zelulen apoptosia bultzatzen dute (Liu et al., 2016), entzima hepaticoen maila plasmaticoak areagotuz eta hepatotoxizitatea eraginez.

MTX-ri dagokionez, LLA tratamendu protokolo gehienetan osagai garrantzitsua, behin zelula barnean MTX poliglutamatoetan (MTXPG) metabolizatzen den folatoen analogo bat da. Biek, MTX-ak eta MTXPG-ek DHFR inhibitzen dute, dihidrofolatoak tetrahidrofolato aktiboetara eraldatzearen entzima erantzulea, horrela tetrahidrofolato intrazelularren maila jaitsiera eraginez. Bestalde, MTXPG-ek TYMS bezalako folatoaren-menpeko beste entzima batzuk ere badituzte ituztat, azido nukleikoen eta proteinen sintesi inhibizioa eta ondorioz zelulen heriotza eraginez bereziki zatiketa azkarreko zeluletan (Krajinovic and Moghrabi, 2004). Azkenik, mintzeko proteina garraiatzaileen eginkizuna ezinbestekoa da MTX-a behazun eta gerru irazketa bidez zeluletatik eta organismoetik kanporatzeko (Mikkelsen et al., 2011). Proteina hauek ATP-lotura cassette garraiatzaileak izan ohi dira, ABCB1 kasu (Swerts et al., 2006), baita garraiatzaile organiko anionikoak ere, adibidez SLCO1B1 (Abe et al., 2001; Trevino et al., 2009) (8. irudia). Kasu honetan, toxizitatea eragiteko modua bere akzio mekanismoarekin zuzenki erlazionatua dagoela dirudi, hau da, zelulen apoptosia eragin dezaketen azido nukleiko eta proteinen sintesi inhibizioarekin eta ADN harizpien hausturarekin (Celticki et al., 2009) (8. irudia). Gainera, MTX-ak induzitutako hepatotoxizitatearentzat beste mekanismo batzuk ere proposatu dira, hala nola gibelesko folatoen berriztatze murrizketa, poliglutamato toxikoen pilaketa (Dávila-Fajardo et al., 2013) edo homozisteina kontzentrazioen areagotzea, non MTHFR eta MTX entzimek eginkizun garrantzitsua beteko luketen (Celticki et al., 2009) (8. irudia).

Toxizitate hepaticoak tratamenduaren eteteak edo dosi murrizketak ekar ditzake, zeintzuek biziraupenean negatiboki eragin dezaketen. Arrazoi honegatik, medikuntzaren erronka dira tratamendu fase bakoitzean gibel toxizitatea garatzeko arriskua zein pazientek duten iragartzea eta toxizitate honen erantzuleak zein farmako diren identifikatzea, farmakoak administratu aurretik tratamendua doitu ahal izateko.

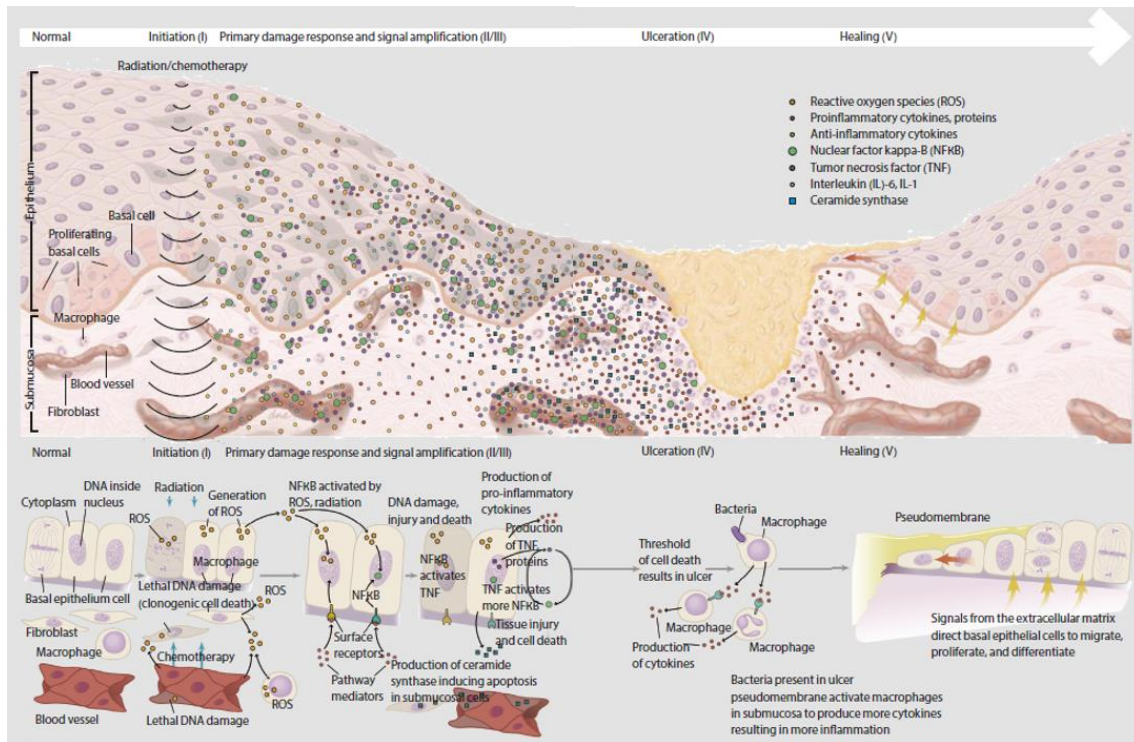


8. irudia. MTX-ren PK/PD bidezidorrak.

3.3. Toxizitate gastrointestinala

Era berean garrantzitsuak dira traktu gastrointestinalarekin erlazioatutako eragin desiragaitzak, hala nola, mukositis, beherakoa eta gonbitoak. Mukositis leuzemiaren kontra erabili ohi diren kimioterapikoen eragin desiragaitz ahulgarri eta ohikoenetako bat da (Sangild et al., 2017; Schmiegelow et al., 2017). Toxizitate hau mukosa hesiaren haustura bategatik ezaugarritzen da, zein modu arinenetan mukosen eritema gisa aurkezten den eta modu aurreratuagoetan aho-barrunbe eta traktu gastrointestinalerako lesio ultzeratzaile sakon eta mingarri gisa (Sonis 2004c, 2004b, 2004a; Van Sebille et al. 2015). Ondorioz, haurrek min abdominala, beherakoa eta gonbitoak jasaten dituzte, zeintzuek aldi berean pisu galera, euskarri nutrizional beharra eta infekzio arrisku areagotua dakarten (Kuiken et al. 2017).

Mukosa lesio honen jatorria azpimukosan hasi eta aho epitelioa xede duten zenbait bidezidor biologikoren efektu pilaketan dago. 9. irudiak proposatutako bost-fasetako prozesua irudikatzen du hasieratik sendakataraino (Sonis, 2007).



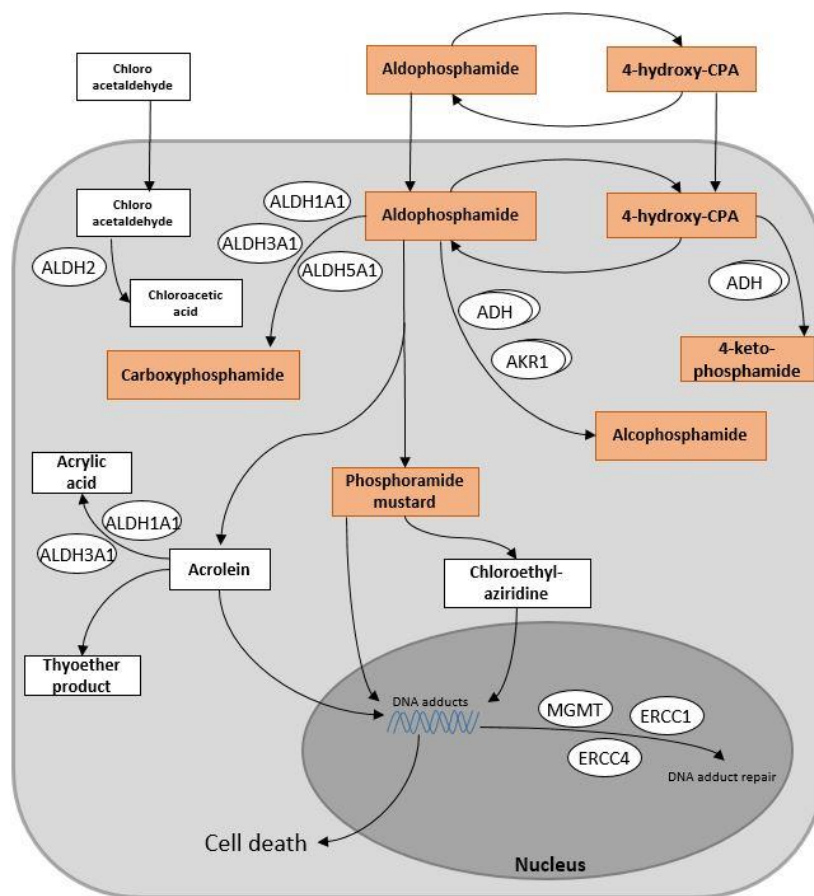
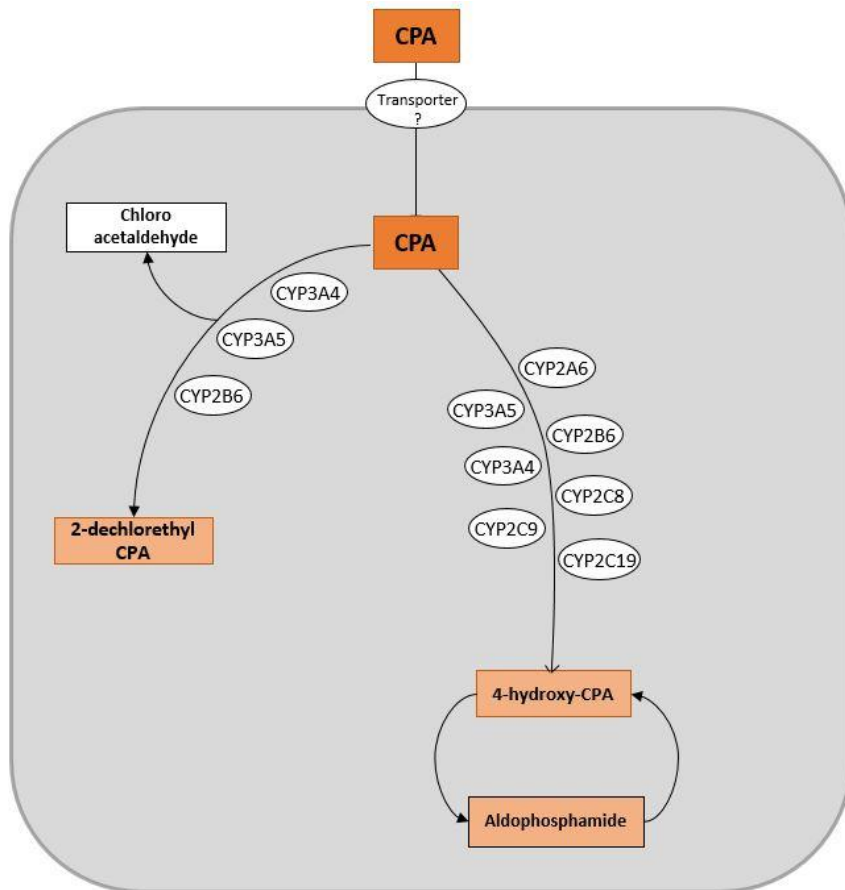
9. irudia. Mukositisaren bost fasetako patogenesi prozesua: hasiera, lehen kalteari erantzuna (mezularitza eta seinalizazioa), amplifikazioa, ultzerazioa eta sendaketa (Sonis, 2007).

Hasiera fasean zehar, kimioterapiak epitelio basaleko zelulen heriotza eragiten du eta kaltetutako ehunak oxigenoaren espezie erreaktiboak (ROS) sortzen ditu eta geroago hartzaile espezifikoek atxikiko diren lesioari asoziatutako patroik molekula endogenoak (LAPM) askatzen ditu. Kimioterapiak bere kabuz edo ROS-ek eta LAPM-ek gertakari biologikoen kaskada batzuei hasiera emango diete, zenbait transkripzio faktoreren aktibazioa barne, adibidez Kappa-B nukleo faktorea (NF-κB), honela lesio primarioaren erantzunari bidea emanez. NF-κB-ren aktibazioaren ondorioz, zenbait generen adierazpena gerta liteke, hala nola zitokina proinflamatorio eta modulatuzaileen geneena, estresaren aurrean erantzuten duten molekulen geneena (adib., COX-2, NO-sintasa induziblea, superoxido dismutasa) eta zelula itsaspenerako molekulen produkzioarekin asoziatutako geneena, guzti hauek mukositisaren patogenesia aktibitatea dutela frogatu delarik. Mukosen lesioan parte hartze esanguratsua duten beste bidezidor batzuk ere identifikatu dira. Esanguratsuenen artean nitrogenoaren metabolismoarekin, Toll-like hartzaileen seinalizazioarekin, B-zelulen hartzaileen seinalizazioarekin, P13K/AKT seinalizazioarekin eta mitogenoek aktibatutako kinasa proteina (MAPK) seinalizazioarekin asoziatutako bidezidorrak aurkitzen ditugu, batzuk aipatzearen. Amplifikazio fasean zehar, bitartekariak ehunen lesioa areagotu eta luzatzeko balio duten zenbait feedback lakio positibo eragiten dituzte, transkripzio faktoreetan duten efektua medio. Ondorioz, geneen gain-adierazpena gertatzen da zitokina kaltegarrien sorrera areagotuz.

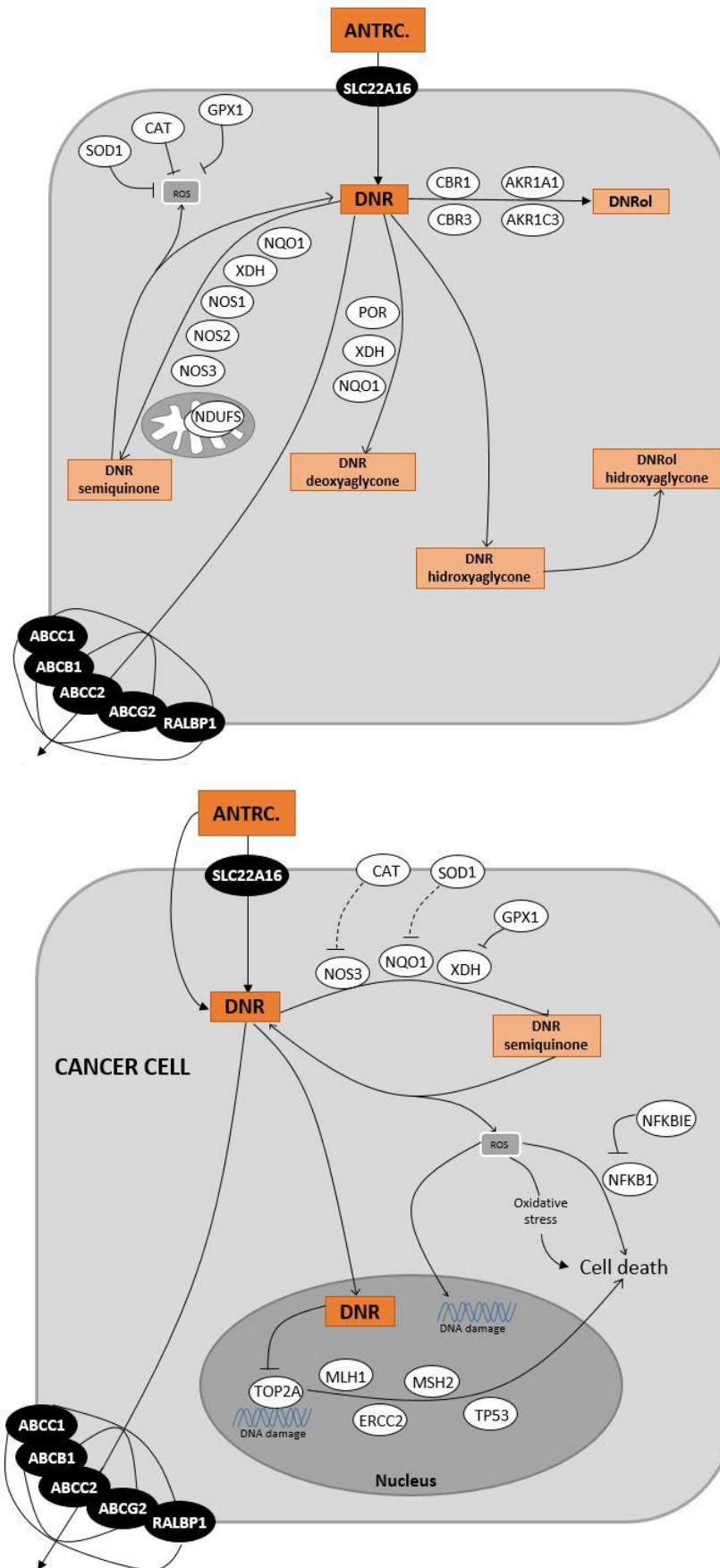
Mukositisa zenbait agente kimioterapikoren erabilerarekin erlazionatu izan da, hala nola, aurrez aipatutako MTX-rekin, CPA-rekin edo DNR-rekin (Cinausero et al. 2017; Schmiegelow et al. 2017). CPA agente alkilatzaileekin sailkatzen den antineoplasiko bat da, zeinek zeluletan ematen diren baldintzetan, talde elektronegatiboei alkil taldeak gehitzeko gaitasuna duen (Baxter Oncology GmbH, 2017). Tumoreen hazkuntza gaitasuna gelditzen dute ADN-aren helize-bikoitzeko guanina baseen arteko lotura-gurutzatuak sortuz. Honek harizpiak deskribildu eta banatzeko ezintasuna dakar eta hau ADN-aren erreplikaziorako ezinbestekoa denez, zelulak ezin izango dira gehiago zatitu. CPA-ren metabolismo eta irazketa gibelean gertatzen da. Farmakoaren % 75 CYP isoformen bidez aktibatzen da eta ondoren nagusiki metabolito eran kanporatzen da (10. irudia).

DNR antraziklinen taldeko antineoplasiko bat da. Talde honetako farmakoen ezaugarriak honakoak dira: ADN-arekin interakzioak modu anitzetan, hala nola, ADN harizpian tartekatzea, ADN harizpi haustura eta topoisomerasa II entzimaren inhibizioa. Litekeena da gainera DNR-k polimerasaren aktibitatea inhibitzea, geneen erregulazioan eragitea eta ADN-a kaltetzen duten erradikal askeen sorreran parte hartzea. Hainbat garraiatzailek erakutsi dute antraziklinen garraioan inplikazioa (11. irudia).

Sintomatologia gastrointestinalak tratamenduaren atzerapenak, espero gabeko eteteak edo terapiaren amaiera goiztiarrak eragin ditzake (Cinausero et al. 2017), zeintzuek biziraupenean kalte zuzena duten. Horregatik, interes handikoa litzateke mukositisa zein pazienteek garatuko duten auresatea, eragin desiragaitz honen agerpena sahiesteko.



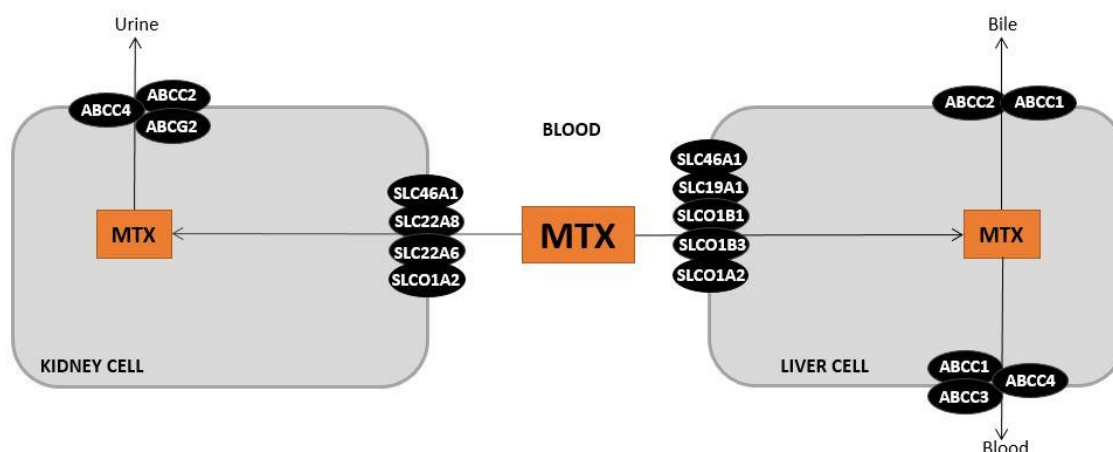
10. irudia. CPA-ren PK/PD bidezidorrak.



11. irudia. Antraziklinen PK/PD bidezidorrak.

3.4. MTX-ren maila plasmaticoak

MTX, LLA terapiaren ardatza da, baina oso tarte terapeutiko estua du, hau da, kontzentrazio terapeutiko eta toxikoen arteko aldea oso txikia da. Horregatik dosi altuetan MTX-ak toxizitatea erraz eragiten du eta ikusi da toxizitate globalaren maiztasuna esanguratsuki altuagoa zela 0,2 μM baino kontzentrazio plasmatico altuagoak zituzten pazienteetan kontzentrazio baxuagoak zituztenekin alderatuz, berdina ikusi zelarik giltzurrun toxizitate eta gonbitoentzat (Lopez-Lopez et al., 2011). MTX-ren toxizitateak lortutako farmako kontzentrazioen arabera dira, baita ekintza denboraren arabera ere, hori dela eta, MTX-ren kanporatzea ziurtatu behar da. Arrazoi honegatik, dosi altuko MTX terapian zehar, maila plasmaticoak modu estuan monitorizatzen dira infusioa amaitu eta 2 ordutara hasi eta mailak 0,2 $\mu\text{mol/l}$ azpitik egon arte. ADME prozesuetako proteinak, eta zehatzago MTX garraiatzaileak (12. irudia) eginkizun garrantzitsua betetzen dute farmakoen kanporaketan eta beraz MTX-ren kontzentrazio plasmaticoetan.



12. irudia. MTX-ren garraiatzaileak giltzurrun eta gibel zeluletan.

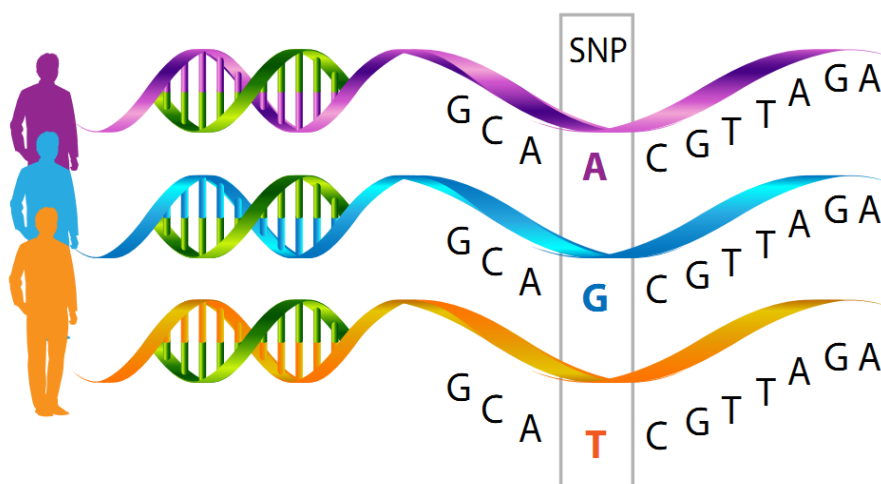
Gainontzeko toxizitateentzat bezala, MTX-aren maila plasmaticoen kasuan ere interes handikoa da irazketa eraginkortasun baxuagoaren ondorioz, farmakoaren maila plasmatico altuak zein pazienteek aurkeztuko dituzten iragartzea, horrela, tratamendua hasieratik egokitu eta kontzentrazio altuek eragiten dituzten toxizitateak ekiditeko.

Laburbilduz, LLA terapia jasotzen duten hurrek forma arinetatik larriagoetara doazen toxizitateak jasango dituzte, kasu gehienetan bere onera itzuliko direnak baina baita zenbaitetan epe luzerako ondorioak utz ditzaketenak ere. Testuinguru honetan, ikerketa farmakogenetikoek haurtzaroko LLA terapia hobeto egokitzeko eta ondorioz eragin desiragaitzak murrizteko tresna bikaina eskaintzen dute (Ansari and Krajcinovic, 2007).

4. FARMAKOGENETIKA LLA-n

Farmakogenetika, norbanakoaren ezaugarri genetikoetan oinarrituz, paziente batentzat farmako eraginkor eta seguruena zein izango diren iragartzeko tresna bat da (Shomron 2010; Rukov and Shomron 2011). LLA terapiaren toxizitatean aldaera genetiko germinalak determinatzaile garrantzitsuak izango dira. Hauen adibide dira txertaketa eta delezioak (sekuentzia zati labur baten irabazte/galera), egitura aldaerak (sekuentzia zati handi baten irabazte/galera, adib. kopia kopuru aldaera) edo nukleotido bakarreko polimorfismoak (SNP).

Farmakogenomikaren ikerkuntzan egindako azterlan gehiena SNP-ek duten eginkizunean errotu da, ADN-ren aldaera forma sinpleena. SNP-ak base bakar bat beste bategatik ordezkatzearen ondorio dira, populazio orokorrean % 1 baino maiztasun altuagoan jazotzen direnak (13. irudia). Genoman zehar SNP-en maiztasuna 200-300 base paretik (bp) behinekoa da. Arestian gauzatutako eskala handiko ikerketek 15 milioi SNP inguru identifikatu dituzte giza genoman zehar (1000 Genomes Project Consortium et al., 2010), geneetan zehar eta eremu ez-genikoetan ere aurkitu direlarik eta posible izanik hauek geneen funtzioari eragitea, farmakoen PK/PD geneak barne. SNP hauen presentziak azalduko luke tratamendu protokolo berdina jaso arren zergatik aurkezten dituzten pazienteek toxizitate perfil edota larritasun gradu ezberdinak.



13. irudia. SNP baten irudi eskematikoa, lokus batentzat A/G/T aleloak erakutsiz hiru gizabanako desberdinetan.

Iturria: <https://www.whatisdna.net/wiki/single-nucleotide-polymorphisms/>

Testuinguru honetan, ahalegin handia inbertitu da ikerkuntzan, bai gene kandidatuen estrategian baita genoma osoko asoziazio ikerketan (GWAS) ere.

Gene kandidatuen estrategiak toxizitatearen bidezidor patofisiologikoan susmatzen diren geneak aztertzen ditu, aurrez farmakoaren garraio, metabolismo edo toxizitate/ekintza-

Sarrera

mekanismoari buruz ezagutzen den informazioan oinarrituta. Azken urteotan, errendimendu altuko genotipazio teknologiak genoma osoan zeharreko aldaera genetikoaren azterketa ahalbidetu du, azterlan hauek GWAS gisa dira ezagunak. GWAS hurbilketak, genoma osoaren ikuskatzea inplikatzeko du populazio afektatu eta ez afektatuen artean prebalentzia ezberdina duten aldaera germinalen identifikaziorako. Horrela, ikerketa hasi aurretik hipotesirik egiten ez denez, hurbilketa honetan mekanismo kausal interesgarri berriak sortzen dira (Maxwell and Cole, 2017; Moriyama et al., 2015).

4.1. LLA-ren farmakogenetika

Hautzaroko LLA-ren terapiaren farmakogenetikaren alorreko ikerketa anitz burutu dira, batez ere farmakoen bidezidoren PK eta PD-etako geneen aldaerak aurkitu direlarik, eragin desiragaitzak garatzeko arriskua azaltzeko balio dutenak neurri batean.

VCR-k eragindako neurotoxizitateari dagokionez, emaitzarik interesgarrienetako bat, Diouf eta lankideek aurkitu zuten LLA-dun paziente pediatriko talde handi batean gauzatutako GWAS batean (Diouf et al., 2015). Ikerketa honek, tratamendu fase berantiarretako neuropatia periferikoaren eta bidezidoren PD-ko *CEP72* genean dagoen rs924607 SNP-aren arteko asoziazioa erakutsi zuen. Bidezidoren PK-koak diren *ABCC2*, *ABCB1* edo *CYP3A5* geneetako beste SNP batzuk, neurotoxizitatearekin asoziatu dira (Ceppi et al., 2014; Egbelakin et al., 2011; Lopez-Lopez et al., 2016; Plasschaert et al., 2004). Hauetako SNP batzuek adierazpenaren erregulazioa aldatzeko gaitasuna dute edo eremu intronikoetan kokatuak daude, beraz farmakoen PK/PD geneetako beste edozein aldaketa ere neurotoxizitatean inplikatu egon liteke.

Hepatotoxizitateari dagokionez, plasmako transaminasen igoerarekin asoziatu zen zenbait polimorfismo identifikatu dira. Adibide aipagarri bat PNPLA3-ko rs738409 SNP-a da, LLA zuten haurretan burututako GWAS batean aurkitu zen indukzio faseko hepatotoxizitatearekin indarrez asoziatua (Liu et al., 2017), berriki gure taldean erreplikatu den emaitza (Gutierrez-Camino et al., 2017a). Kontsolidazio fasean zehar, beste polimorfismo esanguratsu batzuk aurkitu dira MTX-ren PK/PD-ko geneetan, adib. *RFC1* (80G>A) (Gregers et al., 2010), *ABCB1* (3435C>T) (Gregers et al., 2015a) eta *MTHFR* (677C>T and 1298A>C) (Umerez et al., 2017), toxizitate hepatikorako emaitza argirik gabe. Bilirrubinaren igoera gisa neurtutako hepatotoxizitateari dagokionez, guk dakigun arte, ez dira horrelako ikerketarik gauzatu. Orain arte aldaera fidagarri gutxi batzuk besterik ez dira aurkitu gibel toxizitatearekin asoziazioan, horregatik beharrezkoak dira ikerketa gehiago.

Toxizitate gastrointestinala aintzakotzat hartuz, kontsolidazio fasean zeharreko mukositisaren eta MTX-ren bidezidorretako geneetako polimorfismoen arteko asoziazioak aurkitu dituzten zenbait ikerketa identifikatu ditugu. Hauetako polimorfismo gehienak MTX-ren bidezidor PK-ko geneetan kokatuak daude, esate baterako *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* edo *ABCC4* (Bektaş-Kayhan et al., 2012; Liu et al., 2014a; Lopez-Lopez et al., 2013). Alabaina, toxizitate hau oso gutxi analizatu da tratamenduaren beste fase batzuetan zehar, non DNR eta CPA bezalako beste farmako mukotoxiko batzuk ere administratzen diren.

MTX-ren maila plasmatikoei dagokienez, urte gutxitan, ikerketa kopuru handi batek analizatu du polimorfismo genetikoaren eta MTX-ren argitzearen arteko harremana. Eraitza interesgarrietako batzuk MTX-ren garraiatzaileetan aurkitu dira. Eraitza sinesgarriak gaur arte *SLCO1B1* garraiatzailearentzat aurkitu dira. Garraiatzaile honetako bi SNP, rs4149081 eta rs11045879, MTX argitzearekin asoziatu ziren lehen aldiz Treviño eta lankideek LLA-dun haurretan gauzatutako GWAS batean (Trevino et al. 2009). Lehen aurkikuntza honen ondoren, hurrengo ikerketetan aldaera hauek eta *SLCO1B1*-ko beste batzuk konfirmatu dira (Lopez-Lopez et al. 2011; Ramsey et al. 2013; Radtke et al. 2013; Lopez-Lopez et al. 2013; Ramsey et al. 2012). Ikerketa hauen ondorioz, beste lan batzuek ere MTX-ren garraiatzaileetako aldaeren analisira zuzendu dute beren interesa, *SLC19A1*, *ABCC4*, edo *ABCC2* bezalako geneetako zenbait SNP aurkituz MTX mailekin asoziatuak (Lopez-Lopez et al. 2013; Laverdiere et al. 2002). Nabarmenezkoa da, *ABCC4*-ren baitako rs9516519 MTX maila plasmatikoekin asoziatu izana (Lopez-Lopez et al., 2013), mikroRNA (miRNA) baten atxikipen eremuan kokatutako SNP-a izanik miRNA-tako aldaerek ere MTX-ren maila plasmatikoen aldaketak azalduko lituzkeela iradokitzen baitu.

Eraitza guzti hauek, miRNA-k bezalako RNA molekula ez-kodifikatzaileen interferentzia mekanismoek toxizitate garapenean lagun lezaketela iradokitzen dute, farmakoen PK/PD geneen adierazpena erregulatzeko gaitasuna dutelako (Lopomo and Coppè, 2017).

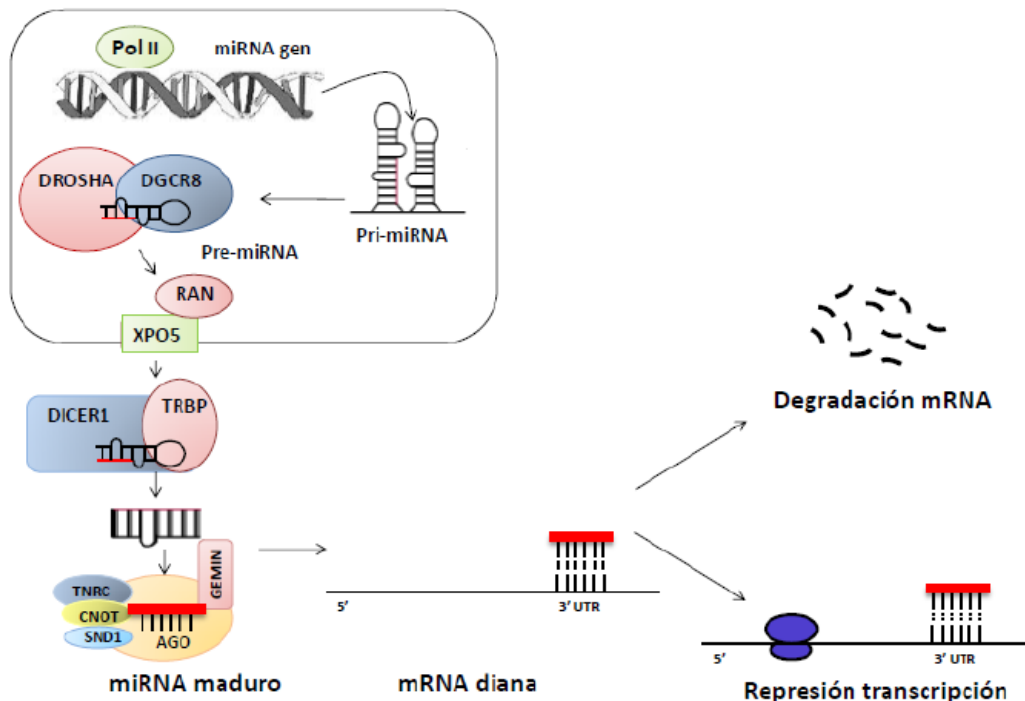
4.2. MikroRNAk

MiRNA-ek 18-22 nukleotido luze diren harizpi bakarreko RNA familia handi bat osatzen dute, maila postranskripzionalean gene adierazpenaren erregulatzaile giltzarri gisa agertu direnak, geneen isiltzea eraginez. MiRNAk II RNA polimerasa bidez genomako kokapen ezberdinetatik transkribatzen dira pri-miRNA izeneko transkribatu primario luze batzuetara (hbiDNA, 300-5000 bp). Ezaugarri moduan, pri-miRNA-k, 30-40 nukleotido luze den harizpi bikoitzeko RNA (hbiRNA) zati zentral bat, lakio terminal bat eta elkarri kontrajarritako harizpi bakarreko bi RNA (hbaRNA)

Sarrera

zati ditu. Pri-miRNA-k nukleoan prozesatzen dira DROSHA RNasa eta hbiRNA lotzeko domeinuak dituen DGCR8-k osatutako konplexuaren bidez. HbiRNA sekuentziak bere egitura sekundarioa eta proteina prozesatzaileei atxikitzeko gaitasuna zehazten du.

Pri-miRNA-en prozesamendu ostean, molekula txikiago hauek (70 nukleotido ingurukoak) pre-miRNA gisa ezagutzen dira. Pre-miRNAk nukleotik zitoplasmara garraiatzen dira Exportine5 (XPO5) eta RAN-GTPasa bidez (Bohnsack et al., 2004; Kim, 2004). Zitoplasman, pre-miRNAk Dicer (Hutvagner et al., 2001; Merritt et al., 2010) eta TARBP2 entzimen bidez prozesatzen dira, zeintzuek lakioa deusezten duten, miRNA duplex izenez ezaguna den hbiRNA molekula sortuz (Song et al., 2003). MiRNA duplex-a harizpi bakarra duen miRNA heldua sortzeko banatzen da. MiRNA duplex-etik aukeratutako harizpia RISC (RNA-induzitze konplexu isiltzailea) izenez ezagutzen den proteina anitzen konplexura txertatzen da, EIF2C1 (AGO1), EIF2C2 (AGO2), SND1, GEMIN3, GEMIN4 eta CCR-NOT geneez osatzen dena (Inada and Makino, 2014). RISC konplexuak miRNA heldua RNA mezularietara (mRNA) garraiatzen du, miRNA-en erregulazioaren azken itauk (Li et al., 2014). MiRNA mRNA-ren 3'UTR eremuetan dauden base osagarriei lotzen zaio (14. irudia).



14. irudia. MiRNA-ren biogenesia eta ekintza mekanismoa.

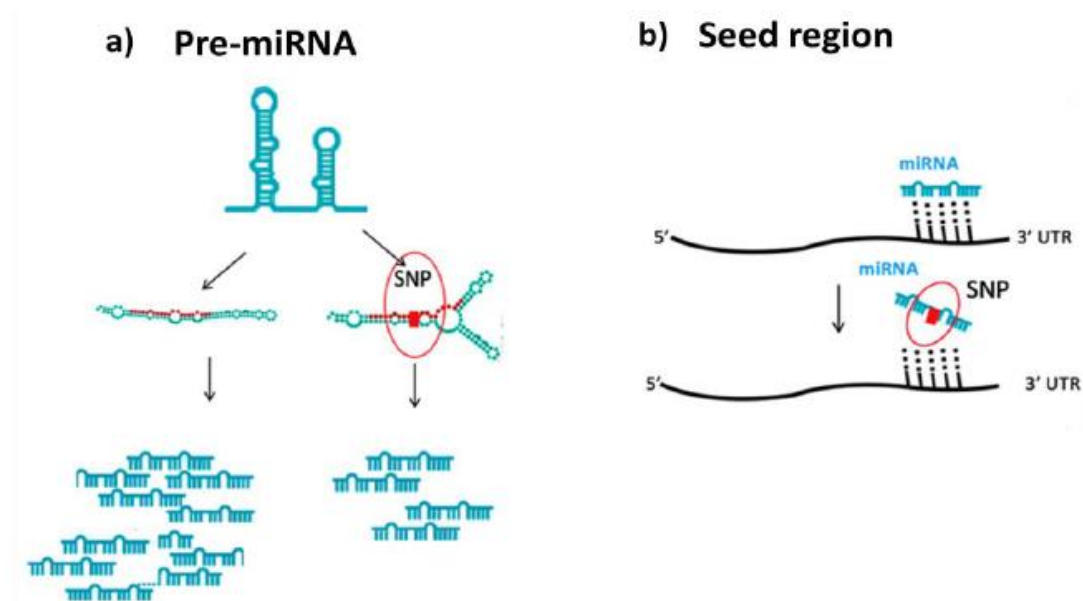
Iturria: Ryan et al 2010-etik egokitua (Ryan, Robles, and Harris 2010).

MiRNA-ek *seed* izeneko 7bp-tako sekuentzia bereizgarri bat dute, ituen ezagutzarako balio duena. MiRNA-k *seed* sekuentzia eta honi osagarria den itu sekuentzia baten arteko lotura

espezifikoki esker jarduten du. Erregulazio mekanismoa miRNA-mRNA arteko osagarritasun graduaren arabera da: mRNA-ren degradazio zuzena, osagarritasuna erabatekoa denean; proteinen itzulpen blokeo/inhibizioa baseen parekatzea inperfektua denean (Gregory et al., 2006).

MiRNA *seed*-ei osagarriak diren sekuentziak motzak direnez, miRNA batek *seed* sekuentziari osagarri diren itu mRNA asko deuseztu ditzake edo itzulpena inhibitu. Nolanahi ere, posible da gene bat miRNA anitzek erregulatzea. *Seed* eremu osoa edo sekuentziaren zati bat partekatzen dituzten miRNAk familietan antolatu daitezke. Familia bateko miRNA-ek potentzialki mRNA talde berdina erregulatzen dute (Friedman et al., 2008; Lewis et al., 2005). MiRNA bakoitzarentzat, ustezko itu ugari daude iragarrita datu base ezberdinetan, alabaina, gaur egun miRNA ituak ez daude guztiz definituak eta interakzio gutxi batzuk baino ez daude esperimentalki balioztatuak.

MiRNA-ek gidatutako geneen erregulazioak eraldaketak jasan ditzake, bai miRNA mailen aldaketagatik (goranzko-erregulazioa edo beheranzko erregulazioa), bai *seed* sekuentzien aldaketagatik (atxikidura gaitasun galera). Hortaz, miRNA-en egitura sekundarioa erabakitzen duten pre-miRNA-tako SNP-ek (miR-SNP) beren egonkortasun edo prozesamendu eraginkortasuna alda lezakete, beraien maileri eraginez eta bestalde, miRNA-ren lotura determinatzen duten *seed* eremuetako SNP-ek bere ituen ezagutze zehatzean eragin lezakete (15. irudia) (Ryan et al., 2010).



15. irudia. miRNA-tako SNP-en efektua: a) Pre-miRNA-tan: egitura sekundarioen aldaketa edo miRNA-ren prozesamendu aldaketagatik miRNA mailen goranzko eta beheranzko erregulazioak; b) *Seed* sekuentzian: miRNA-mRNA osagarritasunaren aldaketa edo galera.

Erregulazio mekanismo honen bitartez miRNA-ek giza geneen % 50 baino gehiago erregula ditzakete, farmakoen bidezidor PK/PD-ko geneak barne (Li et al., 2016; Nakajima and Yokoi, 2011). Ondorioz, miRNA-tako SNP-ek farmakoen PK/PD-ko geneak asaldatu ditzakete eta paziente batzuek toxizitate farmakologikoa garatzeko duten suszeptibilitatea azalduko lukete.

4.3. MiR Farmakogenetika

Farmakoen erantzunean miRNA-en inplikazio printzipioak, miRNA adierazpen areagotuak farmakoen eraginkortasuna sustatzen duten proteinak kodifikatzen dituzten geneak beherantz erregulatzen dituela ematen du aditzera. Era kontrajarrian, miRNA maila murriztuek produktutzat farmakoen funtzio inhibitzaileak dituzten geneen goranzko erregulazioa dakarte (Rukov et al., 2014).

Izatez, miRNA, itu geneen adierazpen eta farmako erantzunaren arteko interakzioak aurkeztu dira dagoeneko. Esate baterako, miR-21 gainadierazpenak *PDCD4* adierazpena inhibititu zuen eta artseniko trioxido tratamenduan zeuden zelulen apoptosia ekidin zuen (Li et al., 2010). Beste adibide batzuk miR-15 eta miR-16 dira, zeintzuen beheranzko erregulazioak *BCL2*-ren gainadierazpena bultzatu zuen eta ondorioz minbizi zelulen farmako askorekiko erresistentzia fenotipo garapena (Xia et al., 2008). Prozesu biek (miRNA adierazpen areagotua eta murriztua) alda lezakete farmakoen funtzioa eta beraz miRNA-k farmako eraginkortasunaren erregulatzaile indartsu bilakatu (Rukov et al., 2014). MiRNA-en eginkizun garrantzitsu hau kontuan izanda, miRNA funtzioaren aldaketak aztertzen dituzten ikerketek farmakogenomikan inportantzia hartzen dihardute.

MiRNA-tako SNP-ei dagokienean, kimioterapikoek erangindako toxizitatearekin lotutako SNP-en zenbait adibide aurki daitezke literaturan. Honen adibide izan liteke hsa-miR-196a2-ko rs11614913 eta platino-kimioterapiaren toxizitate orokor larriaren artean ikusitako asoziazioa biriketako zelula ez txikien minbizi pazienteetan (Zhan et al., 2012). Bigarren adibide bat miR-27a-ko rs895819 da, fluoropirimidinen toxizitate larri arriskuan dauden pazienteen identifikazioarako markatzaile kliniko erabilgarri gisa zehaztu dena dihidropirimidina deshidrogenasa geneko aldaeren determinazioarekin konbinatzen denean (Meulendijks et al., 2016). Rs895819-ren G aldaera aleloa miR-27a-ren maila areagotuekin eta fluoropirimidinak metabolizatzen dituen dihidropirimidina deshidrogenasa adierazpen murriztuarekin asoziatu zen, zeinak ondorioz administratutako fluoropirimidinen erdibizitza luzatuko zukeen eta beraz toxizitate larria jasateko suszeptibilitatea areagotu (Amstutz et al., 2015).

B-LLA-ri dagokionez, gure taldean aurrez gauzatutako ikerketa batean 42 miRNA-tako 46 SNP analizatu ziren tratamenduaren toxizitate markatzaileak aurkitzeko asmoz. Ikerketa honek LLA tratamenduaren toxizitate desberdinekin asoziatuak zenbait SNP identifikatu zituen. Adibidez, miR-453-ko (miR-323b bezala ere ezagutzen dena) rs56103835 MTX-ren plasma argitzearekin esaguratsuki asoziatua zegoela aurkitu zen (Lopez-Lopez et al., 2014a). Interesgarria da zehaztea, miRNA honek ustezko itu gisa *ABCC4* genea duela, zeinak MTX-ren garraioan parte hartzen duen. Gainera, miR-1206-ko rs2114358 kontsolidazio fasean MTX-ak eragindako mukositisarekin asoziatua zegoela ere aurkitu genuen (Gutierrez-Camino et al., 2017b).

Aipatu berri dugun ikerketaz geroztik (soilik 46 miRNA aztertu zituen) zehaztu diren miRNA kopuruak 2500 arte nabarmen gora egin duela kontuan izanda (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014) eta gaur egun miRNA ituak guztiz definituak ez daudela eta farmako erantzunean inplikaturik dauden geneen erregulazioan edozein miRNA inplikaturik egon litekela kontsideratuz, interes handikoa da, egun deskribaturik dauden miRNA-tako aldaerak, haurtzaroko LLA-ren terapian zehar garatzen diren toxizitateekin asoziatuak ote dauden zehaztea.

HIPOTESIA ETA HELBURUAK

5. HIPOTESIA

Hautzaroko LLA-ren biziraupen tasek gora egin dute neurri batean terapia intentsoaren ondorioz, hala ere, tratamendu honek eragiten dituen toxizitateek sarri inpaktu negatibo bat dute biziraupen tasetan.

Ikerketa farmakogenomikoek jada identifikatu dituzte farmakoen PK/PD geneei eragin diezaieketen aldaerak hautzaroko LLA-n garatzen diren toxizitateak iragartzeko markatzaile gisa. Gaur egun ezagutzen da miRNA-ek farmakoen bidezidor PK/PD-etako geneen adierazpenean eragina dutela eta atariko ikerketek iradoki dute jada, miRNA-tako aldaera genetikoek beren maila eta funtzioari eraginez bidezidor PK/PD-etako geneak asaldatu ditzaketela.

Beraz, lan honetan proposatzen dugu itu moduan PK/PD-ko geneak zein toxizitateekin erlazionatutako beste gene batzuk dituzten miRNA-tako aldaerak hautzaroko B-LLA terapian zehar azaltzen diren toxizitateen arriskuan inplikaturata egon litezkeela eta toxizitate markatzaile gisa erabil daitezkeela

6. HELBURUAK

Ikerketa honen jomuga nagusia miRNA-tako aldaera genetikoak hautzaroko B-LLA terapian zehar azaltzen diren toxizitate ohikoenekin asoziatuak egon zitezkeen zehaztea izan zen.

Jomuga hau lortzeko, miRNA-tako 213 SNP-en eta B-LLA-ren terapiak eragiten dituen toxizitate ohikoenen arteko asoziazioa analizatu genuen modu homogeneoan tratatutako hautzaroko LLA-dun 179 pazientez osatutako kohorte batean. Hurrengo helburu zehatz hauek finkatu genituen:

1. VCR-k eragindako neurotoxizitate periferikoarekin asoziatutako miRNA-tako aldaera genetikoak zehaztea indukzio fasean.
2. ASP-k eta MTX-k eragindako gibel toxizitatearekin asoziatutako miRNA-tako aldaera genetikoak zehaztea indukzio eta kontsolidazio faseetan.
3. DNR, CPA eta MTX-ari lotutako toxizitate gastrointestinalarekin asoziatutako miRNA-tako aldaera genetikoak zehaztea indukzio fasean.
4. MTX-aren maila plasmatico altuekin asoziatutako miRNA-tako aldaera genetikoak zehaztea kontsolidazio fasean.

MATERIALAK ETA METODOAK

7. IKERKETA POPULAZIOA

7.1. Pazienteak

Ikerketa honek guztira B-LLA-z diagnostikatutako 179 haur espainiar hartu zituen barne. B-LLA pazienteen laginak 2000 eta 2013 urteen bitartean jaso ziren erreferentziazko hiru ospitale espainiarretako Onkologia Pediatriko Unitateetan (Gurutzeta Unibertsitate Ospitalea, Donostia Unibertsitate Ospitalea, La Paz Unibertsitate Ospitalea). Paziente guztiak homogeneouski LAL-SHOP 94/99/2005 espainiar protokolo estandarren baitan tratatu ziren. Ikerketa populazioaren ezaugarriak 5. taulan jasota daude.

5. taula. Ikerketan sartu ziren B-LLA-dun pazienteen ezaugarri demografikoak.

Paziente kopura, n	179
Sexua	
Emakumezkoak, n (%)	74 (41,34)
Gizonezkoak, n (%)	105 (58,66)
Diagnostikoko batezbesteko adina \pm DE, urteak	5,12 \pm 3,23
Tratamendu protokolo bakoitzeko paziente kopurua, n (%)	
LAL/SKOP 94, n (%)	9 (5,02)
LAL/SKOP 99, n (%)	60 (33,52)
LAL/SKOP 2005, n (%)	108 (60,34)
Datarik ez, n (%)	2 (1,12)

Laburdurak: DE, desbideraketa estandarra.

Ikerketa honek Euskal Herriko Unibertsitatearen (UPV/EHU) onespina (CEISH/102R/2011) jaso zuen eta lagin bilketa aurretik paziente guztien edo beraien gurasoen (12 urte baino gutxiago zituzten pazienteen kasuan) idatzizko baimen informatua eskuratu zen, Helsinki Aitorpenak ezarri bezala.

Datu demografiko zein klinikoak modu objektiboan eta genotipoei itsu jaso ziren pazienteen historia klinikoetatik, kasu guztietan bi ikertzaile aditu berberen eskutik. Paziente bakoitzarentzat, jasotako datuak honakoak izan ziren: sexua eta adina diagnostikoaren unean; neurotoxizitate zeinu eta sintomak tratamendu fase guztietan; gibel funtzio datuak, plasmako transaminasa (aspartato aminotransferasa (AST) eta alanina aminotransferasa (ALT)) eta bilirrubina maila gorenek definituak fase guztietarako; traktu gastrointestinalerako toxizitateen presentzia (mukositis, beherakoa eta goragale/gonbitoak) tratamendu fase guztietarako; giltzurrun funtzioari buruzko datuak, plasmako kreatinina maila gorenek definitua tratamendu fase guztietan eta MTX dosia (3 g/m² edo 5 g/m²) eta maila plasmaticoak 48 h, 72 h eta 96 h-tara kontsolidazio fasean zehar (6. taula).

6. taula. Aztertutako toxizitateak eta fase bakoitzean detektatutako frekuentziak aztertutako LLA populazioan.

	Indukzio Fasea	Kontsolidazio Fasea	Intentsifikazio Fasea	Mantenimendu Fasea
Neurotoxizitatea, n (%)				
1-4 gradukoa	47 (26,26)	11 (6,15)	9 (5,03)	1 (0,56)
1-2 gradukoa	28 (15,64)	–	–	–
3-4 gradukoa	19 (10,61)	–	–	–
Hipertransaminasemia, n (%)				
2-4 gradukoa	55 (30,73)	49 (27,37)	15 (8,38)	19 (10,61)
2 gradukoa	25 (13,97)	28 (15,64)	–	–
3-4 gradukoa	29 (16,20)	19 (10,61)	–	–
Daturik ez	1 (0,56)	2 (1,12)	9 (5,03)	9 (5,03)
Hiperbilirubinemia, n (%)				
1-4 gradukoa	29 (16,20)	14 (7,82)	7 (3,91)	7 (3,91)
Daturik ez	9 (5,03)	11 (6,15)	9 (5,03)	9 (5,03)
Mukositisa, n (%)				
2-4 gradukoa	36 (20,11)	16 (8,94)	15 (8,38)	0 (0,00)
Daturik ez	9 (5,03)	11 (6,15)	9 (5,03)	9 (5,03)
Beherakoa, n (%)				
2-4 gradukoa	22 (12,29)	10 (5,59)	12 (6,70)	0 (0,00)
Daturik ez	9 (5,03)	11 (6,15)	9 (5,03)	9 (5,03)
Goragaleak/gonbitoak, n (%)				
2-4 gradukoa	45 (25,14)	40 (22,35)	21 (11,73)	5 (2,79)
Daturik ez	9 (5,03)	11 (6,15)	9 (5,03)	9 (5,03)
Nefrotoxizitatea, n (%)				
1-4 gradukoa	6 (3,35)	7 (3,91)	5 (2,79)	0 (0,00)
Daturik ez	8 (4,47)	11 (6,15)	9 (5,03)	9 (5,03)
MTX dosia kontsolidazioan, n (%)*				
3 g/m ²	–	77 (43,02)	–	–
5 g/m ²	–	101 (56,42)	–	–
MTX maila plasmatikoak kontsolidazioan, n (%)				
Globala (edozein momentutan)	–	62 (34,64)	–	–
48h (maila plasmatikoa >1 µM)	–	43 (24,02)	–	–
72h (maila plasmatikoa >0,2 µM)	–	56 (31,28)	–	–
48h (maila plasmatikoa >1µM) eta 72h (>0,2µM)	–	41 (22,91)	–	–
96h (maila plasmatikoa >0,2 µM)	–	33 (18,44)	–	–
Toxizitate hematologikoa ^				
Anemia (≥2 gradukoa)	71/75	56/71	–	–
Neutropenia (≥2 gradukoa)	71/75	58/75	–	–
Trombozitemia (≥2 gradukoa)	65/75	58/75	–	–

Oharrak: *, paziente batentzat ez ziren MTX datuak jaso; –, ez aplikagarria edo neurtu gabea; ^, datu hematologikoa bi ospitaletako 75 pazientetan jaso ziren.

7.2. Toxizitatearen ebaluazioa

Neurotoxizitatea MOE-ren Nerbio Sistema Periferikoko toxizitate irizpideen arabera graduatu zen (7. taula); hiru fenotipo kontsideratu ziren: edozein gradutako neurotoxizitatea (1–4 gradukoa), gradu baxuko neurotoxizitatea (1–2 gradukoa) eta gradu altuko neurotoxizitatea (3–4 gradukoa).

7. taula. Neurotoxizitate periferikoaren larritasuna graduatzeko MOE-ren toxizitate graduazio eskala.

PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM				
PARAMETROA	1 GRADUA	2 GRADUA	3 GRADUA	4 GRADUA
Neuropatia/Beheko atalen neuropatia motorea		Parestesia arina soilik behin-behinekoa.	Parestesia progresibo edo iraunkorra, oinetako erremisentsazioa, edo disestesia arinak; ahultasunik ez; tendoi sakonen erreflexu (TSE) aldaketa arin moderatuak; sentsibilitate galerarik ez.	Ahultasun garrantzitsu baten ezarpena, TSE murrizketa edo desagerpena, galtzerdi-eskularru distribuzioko sentsibilitate galera, sentsibilitate erradikular galera, nerbio kranial anitzen inplikazioa; gernu-maskuri edo hesteen disfuntzioa; faszikulazioak, horma torazikoaren ahultasunak eragindako arnasketa asaldura.
Miopatia edo lotura neuromuskularren kaltea	CPK igoera Normala edo arina (<2 x ULN)	Ahultasun proximal arina eta/edo funtzio motore nagusienak kaltetzen ez dituen atrofia. Mialgia arinak, +/- CPK igoera arina (<2 x ULN)	Muskulu proximalen ahultasuna eta/edo funtzio motorea kaltetzen duen atrofia +/- CPK igoera; edo mialgia larriak CPK >2 x ULN;	Miastenia-gisako sintomen ezarpena (ahultasun nekagarria, kanpo oftalmoplejia aldakor eta/edo ptosiarekin), edo lotura neuromuskularren blokeo sintomak (paralisi akutua).

Hepatotoxizitatea AST edo ALT aminotransferasen eta bilirubinaren igoera gisa neurtu zen. Hipertransaminasemia MOE-ren irizpideetatik egokitutako Hematologia eta Onkologia Pediatriko Erakunde Espainiarraren estandarren arabera graduatu zen (8.taula). Transaminasen maila hepatotoxikotzat hartu zen 2 gradutik 4 gradura (>2.6 x Normaltasunaren Goi Muga, ULN) eta hepatotoxikotasun altutzat 3 gradutik 4 gradura (>5.1 x ULN). Hiperbilirubinemiari dagokionez, pazienteak larritasun mailaren arabera graduatu ziren, 1 gradutik hasita kontsideratu zelarik.

8. taula. Hepatotoxizitatearen larritasuna zehazteko LAL-SHOP protokoloak darabilen eskala, MOE-ren irizpideetatik egokitutakoa.

	1 gradukoa	2 gradukoa	3 gradukoa	4 gradukoa
AST (SGOT)	1,25 – 2,5 x ULN	2,6 - 5 x ULN	5,1 - 10 x ULN	> 10 x ULN
ALT (SGPT)	1,25 – 2,5 x ULN	2,6 - 5 x ULN	5,1 - 10 x ULN	> 10 x ULN
Hiperbilirubinemia	1,1-1,5 x ULN	1,6-2,5 x ULN	2,6-5 x ULN	>5 x ULN

Materialak eta Metodoak

Toxizitate gastrointestinala mukositis, beherako edo goragale/gonbito gisa ebaluatu zen tratamenduaren fase guztietan zehar, eta MOE-ren irizpideei jarraiki graduatu zen 1 gradutik 4 gradura (9. taula). Toxikotzat hartu ziren 2 gradutik 4 gradura bitarteko kasuak.

9. taula. Toxizitate gastrointestinalaren larritasuna zehazteko LAL-SHOP protokoloak darabilen eskala, MOE-ren irizpideetatik egokitutakoa.

	1 gradukoa	2 gradukoa	3 gradukoa	4 gradukoa
Mukositisa	Ondoez/min arina, eritema	Eritema, ultzera (solidoak jateko aukera)	Ultzerak (soilik dieta likidoa posible)	Jateko ezintasuna
Beherakoa	Iragankorra (<2 egun)	Jasangarria baina >2 egun	Jasanezina, tratatu behar dena	Hemorragiak eta deshidratazioa
Goragale/Gonbitoak	Goragalea	Gonbito iragankorrak	Tratatu behar diren gonbitoak	Gonbito trataezinak

MTX mailak altutzat jo ziren baldin eta kontzentrazio plasmaticoek 48 h-tara 1 $\mu\text{mol/l}$ edo 72 h-tara edo 96 h-tara 0,2 $\mu\text{mol/l}$ gainditzen bazuten behintzat kontsolidazio faseko hiru dosietako baten ostean. Gainera, plasmako MTX maila altu globala kontsideratu zen, MTX maila ezarritako mugak baino altuago egon bazen zikloren batean.

Nefrotoxizitatea 1 gradutik 4 gradura kontsideratu zen plasmako kreatininaren $>1.26 \times \text{ULN}$ maila batetik hasita (10. taula).

10. taula. Nefrotoxizitatearen larritasuna zehazteko LAL-SHOP protokoloak darabilen eskala, MOE-ren irizpideetatik egokitua.

	1 gradukoa	2 gradukoa	3 gradukoa	4 gradukoa
Kreatinina	1.26-2.5 x ULN	2.6-5 x ULN	5.1-10 x ULN	>10 x ULN

Ikerketa honetan, 6. taulan aipatutako toxizitate guztiak aztertu genituen, nefrotoxizitatea izan ezik, gure populazioan toxizitate hau oso paziente gutxik garatu zutelako. Gainera, toxizitate hematologiako ere ez genuen aztertu, datu bilketaren unean ikerketan sartutako ia paziente orok anemia, neutropenia edo tronbozopenia gradu bat pairatzen zutela behatu baikenuen (indukzio fasean datu hematologikoak jaso ziren 75 pazienteetatik 71 pazienteek zuten toxizitatea), eta beraz asoziazio ikerketa aurrera eramateko bi talde alderagarri ez genituelako.

8. LAGINEN PROZESAMENDUA

8.1. ADN erauzketa

ADN genomiko germinala erremisioan zeuden LLA-dun pazienteen odol periferiko edo hezur muintetik (blasto zelula % < 5) erauzi zen fenol-kloroformo metodoa erabiliz (Sambrook, J 2001).

8.2. ADN kuantifikazioa eta kalitate ikuskatzea

ADN kontzentrazioa eta kalitatea NanoDrop® ND-1000 espektrofotometro bidez estimatu ziren. 260 eta 280 nm-tako absorbantzia ratioak erabili ziren ADN-aren purutasuna zehazteko. Orokorrean ADN-arentzat ~1,8-ko ratio bat onartu zen “puru” gisa.

9. MIKRORNA GENEETAKO POLIMORFISMOEN AUKERAKETA

Toxizitateari lotutako pre-miRNA-tako SNP (miR-SNP) gutxi batzuk ikertu direnez LLA-ren terapian eta kontuan izanik:

1. *Seed* eremuetan kokatutako SNP-ek miRNA-mRNA interakzioa ezegonkortu edo miRNA ituak aldatu ditzaketela.
2. miR-SNP-ek beren prozesamenduan eta/edo ituen aukeraketan (miRNA-mRNA interakzioa) eragin dezaketela (Slaby et al., 2012).
3. MiRNA-ek gaur egun guztiz definitu gabe dauden gene multzo zabal bat erregulatu dezaketela eta ondorioz LLA-ren terapian azaltzen diren toxizitateetan edozein miRNA-k eragin dezakeela.
4. Aukeraketaren unean, populazio kaukasiarrentzat deskribatutako alelo urrienaren maiztasuna (AUM) % 1 baino altuagoa zuten miR-SNP-en kopurua metodologikoki maneigarria zela.

Aukeraketa egin zen unean (2014-ko maiatza) deskribatuta zeuden pre-miRNA geneetako SNP guztiak ikerketaren barne hartzea erabaki genuen.

MiR-SNP-en bilaketarako, aukeraketa unean mibase-en (www.mirbase.org) deskribatutako miRNA guztiak SNIPER datu-basean (<http://www.integratomics-time.com/miRNA-SNiPer/>) sartu ziren. Ondoren, dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) datu-basea erabiliz SNP bakoitzaren AUM bilatu zen. Aukeraketaren unean ezagutzen ziren eta populazio europar/kaukasiarrean AUM % 1 baino altuagoa zuten (AUM $\geq 0,01$) miR-SNP guztiak aukeratu ziren, guztira 206 miRNA-tako 213 SNP (11.taula).

11. taula. Aukeratutako pre-miRNA-tako polimorfismoen zerrenda.

	Genea	SNP-a	Aleloak	Kromosoma	Kokapena
1	hsa-mir-449b	rs10061133	A>G	5	54466544
2	mir-1302-4	rs10173558	T>C	2	208133995
3	hsa-mir-5196	rs10406069	G>A	19	35836530
4	hsa-mir-4745	rs10422347	C>T	19	804959
5	hsa-mir-548ae-2	rs10461441	T>T	5	57825920
6	hsa-mir-2053	rs10505168	A>G	8	113655752
7	hsa-mir-4700	rs1055070	T>G	12	121161048
8	hsa-mir-943	rs1077020	T>T	4	1988193
9	hsa-mir-6074	rs10878362	T>T	12	66417493
10	hsa-mir-544b	rs10934682	T>G	3	124451312
11	hsa-mir-603	rs11014002	T>T	10	24564653
12	hsa-mir-1343	rs11032942	T>T	11	34963459
13	mir-624	rs11156654	T>A	14	31483955
14	hsa-mir-5579	rs11237828	T>T	11	79133220
15	hsa-mir-1265	rs11259096	T>C	10	14478618
16	hsa-mir-196a-2	rs11614913	C>T	12	54385599
17	hsa-mir-548at	rs11651671	T>T	17	40646803
18	hsa-mir-5092	rs11713052	C>G	3	124870376
19	hsa-mir-4792	rs11714172	T>G	3	24562877
20	hsa-mir-3192	rs11907020	T>C	20	18451325
21	hsa-mir-4653	rs11983381	A>G	7	100802786
22	hsa-mir-548a-1	rs12197631	T>T	6	18572056
23	hsa-mir-202	rs12355840	T>C	10	135061112
24	hsa-mir-3117	rs12402181	G>A	1	67094171
25	hsa-mir-1269b	rs12451747	T>T	17	12820632
26	hsa-mir-4744	rs12456845	T>C	18	46576058
27	hsa-mir-4433	rs12473206	T>T	2	64567916
28	hsa-mir-4274	rs12512664	A>G	4	7461769
29	hsa-mir-4277	rs12523324	T>T	5	1708983
30	hsa-mir-4293	rs12780876	T>A	10	14425204
31	hsa-mir-612	rs12803915	G>A	11	65211979
32	hsa-mir-4309	rs12879262	G>C	14	103006047
33	hsa-mir-300	rs12894467	C>T	14	101507727
34	hsa-mir-1294	rs13186787	T>T	5	153726769
35	hsa-mir-3152	rs13299349	G>A	9	18573360
36	hsa-mir-548ac	rs1414273	T>T	1	117102649
37	hsa-mir-3175	rs1439619	A>C	15	93447631
38	hsa-mir-5007	rs1572687	C>T	13	55748673
39	hsa-mir-3612	rs1683709	C>T	12	128778703
40	hsa-mir-5700	rs17022749	T>T	12	94955603
41	hsa-mir-2110	rs17091403	C>T	10	115933905
42	hsa-mir-4422	rs17111728	T>C	1	55691384
43	mir-1908	rs174561	T>C	11	61582708
44	hsa-mir-3143	rs17737028	A>G	6	27115467
45	hsa-mir-633	rs17759989	A>G	17	61021611
46	hsa-mir-3652	rs17797090	G>A	12	104324266
47	hsa-mir-4733	rs17885221	C>T	17	29421443
48	hsa-mir-5197	rs2042253	A>G	5	143059433
49	hsa-mir-605	rs2043556	A>G	10	53059406
50	hsa-mir-4511	rs2060455	T>T	15	66011630
51	hsa-mir-3620	rs2070960	C>T	1	228284991
52	hsa-mir-1206	rs2114358	T>C	8	129021179
53	hsa-mir-4494	rs215383	G>A	12	47758032
54	hsa-mir-3130-1	rs2241347	T>T	2	207647981
55	hsa-mir-4707	rs2273626	C>A	14	23426182
56	hsa-mir-492	rs2289030	C>G	12	95228286
57	hsa-mir-1229	rs2291418	C>T	5	179225324
58	hsa-mir-564	rs2292181	G>C	3	44903434
59	hsa-mir-149	rs2292832	T>T	2	241395503
60	hsa-mir-604	rs2368392	C>T	10	29834003

11. taula. Aukeratutako pre-miRNA-tako polimorfismoen zerrenda (Jarraipena).

	Genea	SNP-a	Aleloak	Kromosoma	Kokapena
61	hsa-mir-4432	rs243080	C>T	2	60614572
62	hsa-mir-4636	rs257095	A>G	5	9053945
63	hsa-mir-1208	rs2648841	C>A	8	129162433
64	hsa-mir-3183	rs2663345	T>T	17	925764
65	hsa-mir-4804	rs266435	C>G	5	72174432
66	hsa-mir-6128	rs2682818	C>A	12	81329536
67	hsa-mir-4308	rs28477407	C>T	14	55344901
68	hsa-mir-378d-1	rs28645567	G>A	4	5925054
69	hsa-mir-4472-1	rs28655823	G>C	8	143257760
70	hsa-mir-1255a	rs28664200	T>C	4	102251501
71	hsa-mir-146a	rs2910164	G>C	5	159912418
72	hsa-mir-5695	rs2967897	G>G	19	13031210
73	hsa-mir-4803	rs3112399	T>A	5	71465361
74	hsa-mir-577	rs34115976	C>G	4	115577997
75	hsa-mir-4669	rs35196866	T>T	9	137271318
76	hsa-mir-2278	rs356125	G>A	9	97572244
77	hsa-mir-5189	rs35613341	C>G	16	88535407
78	hsa-mir-6076	rs35650931	G>C	14	50433227
79	hsa-mir-449c	rs35770269	A>T	5	54468124
80	hsa-mir-3166	rs35854553	A>T	11	87909673
81	hsa-mir-3936	rs367805	G>A	5	131701279
82	hsa-mir-6499	rs3734050	C>T	5	150901699
83	hsa-mir-499a	rs3746444	T>C	20	33578251
84	hsa-mir-5090	rs3823658	G>A	7	102106201
85	hsa-mir-4751	rs4112253	C>G	19	54786022
86	hsa-mir-96	rs41274239	A>G	7	129414574
87	hsa-mir-187	rs41274312	G>A	18	33484792
88	hsa-mir-154	rs41286570	G>G	14	10152612
89	hsa-mir-216a	rs41291179	A>T	2	56216090
90	hsa-mir-122	rs41292412	C>T	18	56118358
91	hsa-mir-3135b	rs4285314	T>T	6	32717702
92	hsa-mir-548ap	rs4414449	T>C	15	86368898
93	hsa-mir-6084	rs45530340	C>C	1	20960230
94	hsa-mir-548ap	rs4577031	A>T	15	86368959
95	hsa-mir-4268	rs4674470	T>C	2	220771223
96	hsa-mir-941-1	rs4809383	C>T	20	62550780
97	hsa-mir-548j	rs4822739	C>G	22	26951185
98	hsa-mir-5680	rs487571	T>T	8	103137693
99	hsa-mir-595	rs4909237	C>T	7	158325503
100	hsa-mir-608	rs4919510	C>G	10	102734778
101	hsa-mir-548al	rs515924	A>G	11	74110353
102	hsa-mir-3671	rs521188	A>G	1	65523519
103	hsa-mir-4424	rs56088671	T>T	1	178646884
104	hsa-mir-323b	rs56103835	T>C	14	101522556
105	hsa-mir-548aw	rs56195815	T>T	9	135821099
106	hsa-mir-5189	rs56292801	G>A	16	88535341
107	hsa-mir-1283-1	rs57111412	T>T	19	54191743
108	hsa-mir-559	rs58450758	T>T	2	47604866
109	hsa-mir-656	rs58834075	C>T	14	101533093
110	hsa-mir-888	rs5965660	T>G	X	145076302
111	hsa-mir-3928	rs5997893	G>A	22	31556103
112	hsa-mir-4762	rs60308683	T>T	22	46156446
113	hsa-mir-4326	rs6062431	G>C	20	61918164
114	hsa-mir-4467	rs60871950	G>A	7	102111936
115	hsa-mir-596	rs61388742	T>C	8	1765425
116	hsa-mir-3922	rs61938575	G>A	12	104985443
117	hsa-mir-412	rs61992671	G>A	14	101531854
118	hsa-mir-4772	rs62154973	C>T	2	103048780
119	hsa-mir-585	rs62376935	C>T	5	168690635
120	hsa-mir-4482	rs641071	T>T	10	106028157

11. taula. Aukeratutako pre-miRNA-tako polimorfismoen zerrenda (Jarraipena).

	Genea	SNP-a	Aleloak	Kromosoma	Kokapena
121	hsa-mir-3679	rs6430498	G>A	2	134884700
122	hsa-mir-423	rs6505162	T>T	17	28444183
123	hsa-mir-646	rs6513496	T>C	20	58883534
124	hsa-mir-4731	rs66507245	T>T	17	15154966
125	hsa-mir-3622a	rs66683138	T>T	8	27559214
126	hsa-mir-6128	rs67042258	G>A	11	56511354
127	hsa-mir-3167	rs670637	T>T	11	126858392
128	hsa-mir-4642	rs67182313	A>G	6	44403438
129	hsa-mir-4431	rs6726779	T>C	2	52929680
130	MIR3910-1, MIR3910-2	rs67339585	T>T	9	94398581
131	hsa-mir-3135a	rs6787734	T>T	3	20179097
132	hsa-mir-4305	rs67976778	T>T	13	40238175
133	hsa-mir-3144	rs68035463	C>A	6	120336327
134	hsa-mir-1255b-1	rs6841938	T>T	4	36428048
135	hsa-mir-3683	rs6977967	A>G	7	7106636
136	hsa-mir-3686	rs6997249	T>T	8	130496365
137	hsa-mir-4427	rs701213	T>T	1	233759918
138	hsa-mir-378h	rs702742	A>G	5	154209024
139	hsa-mir-548aj-2	rs7070684	T>T	10	12172775
140	hsa-mir-1283-2	rs71363366	C>G	19	54261549
141	hsa-mir-140	rs7205289	C>C	16	69967005
142	hsa-mir-2117	rs7207008	T>A	17	41522213
143	hsa-mir-4741	rs7227168	C>T	18	20513374
144	hsa-mir-3188	rs7247237	C>T	19	18392894
145	hsa-mir-3689f	rs72502717	T>T	9	137742597
146	hsa-mir-105-2	rs72631816	T>A	X	151562938
147	hsa-mir-222	rs72631825	G>A	X	45606471
148	hsa-mir-16-1	rs72631826	T>T	13	50623143
149	hsa-mir-106b	rs72631827	G>G	7	99691652
150	hsa-mir-323b	rs72631831	G>G	7	1062656
151	hsa-mir-183	rs72631833	G>G	7	129414804
152	hsa-mir-3972	rs72646786	C>T	1	17604437
153	hsa-mir-3976	rs72855836	G>A	18	5840810
154	hsa-mir-4999	rs72996752	A>G	19	8454236
155	hsa-mir-4459	rs73112689	T>T	5	53371399
156	hsa-mir-1178	rs7311975	T>C	12	120151493
157	hsa-mir-647	rs73147065	T>T	20	62574006
158	hsa-mir-4532	rs73177830	T>T	20	56470471
159	hsa-mir-548h-4	rs73235381	T>T	8	26906402
160	hsa-mir-1269a	rs73239138	G>A	4	67142620
161	hsa-mir-4739	rs73410309	T>T	17	77681036
162	hsa-mir-4474	rs74428911	G>T	9	20502274
163	hsa-mir-6504	rs74469188	T>C	16	81644970
164	hsa-mir-3615	rs745666	C>G	17	72744798
165	hsa-mir-518d	rs74704964	C>T	19	54238208
166	hsa-mir-2682	rs74904371	C>T	1	98510847
167	hsa-mir-5702	rs74949342	C>G	2	227523436
168	hsa-mir-4719	rs7500280	T>T	16	76902847
169	hsa-mir-4477a	rs75019967	A>A	9	68415338
170	hsa-mir-4742	rs7522956	A>C	1	224585958
171	hsa-mir-520f	rs75598818	G>A	19	54185492
172	hsa-mir-944	rs75715827	T>C	3	189547735
173	hsa-mir-4298	rs75966923	C>A	11	1880730
174	hsa-mir-182	rs76481776	C>T	7	129410227
175	hsa-mir-4521	rs76800617	A>G	17	8090294
176	hsa-mir-1303	rs77055126	T>T	5	154065348
177	hsa-mir-4634	rs7709117	A>G	5	174178774
178	hsa-mir-576	rs77639117	A>T	4	110409933
179	hsa-mir-4743	rs78396863	G>C	18	46196971
180	hsa-mir-6075	rs78541299	G>A	5	1510904

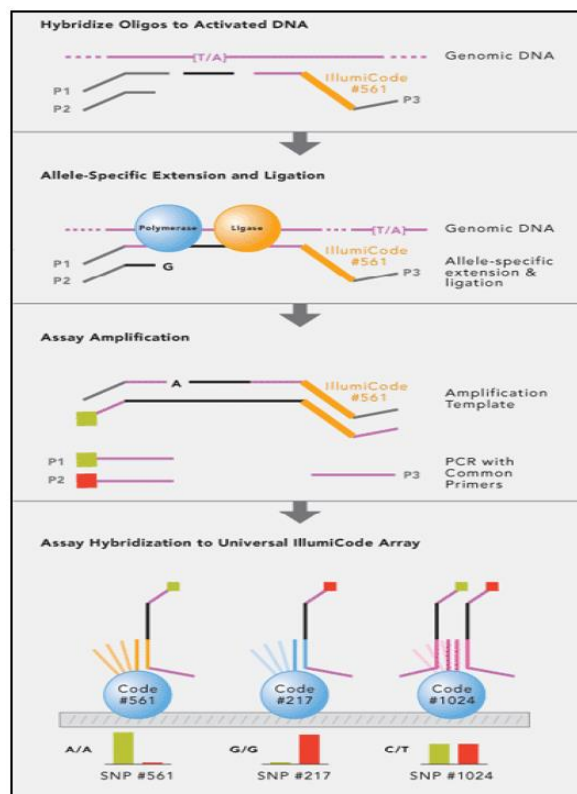
11. taula. Aukeratutako pre-miRNA-tako polimorfismoen zerrenda (Jarraipena).

	Genea	SNP-a	Aleloak	Kromosoma	Kokapena
181	hsa-mir-6083	rs78790512	G>A	3	124093220
182	hsa-mir-4789	rs78831152	C>T	3	175087408
183	hsa-mir-4786	rs78832554	G>A	2	240882476
184	hsa-mir-4481	rs7896283	A>G	10	12695177
185	hsa-mir-1307	rs7911488	A>G	10	105154089
186	hsa-mir-597	rs79397096	G>A	8	9599276
187	hsa-mir-3976	rs79512808	T>G	5	82136024
188	hsa-mir-5707	rs80128580	G>A	7	158384368
189	hsa-mir-3176	rs8054514	T>G	16	593277
190	hsa-mir-4520a	rs8078913	C>T	17	6558768
191	hsa-mir-4698	rs832733	T>T	12	47581629
192	hsa-mir-550a-3	rs850108	T>T	7	29720404
193	hsa-mir-4751	rs8667	G>A	19	50436371
194	hsa-mir-4671	rs877722	A>T	1	234442257
195	mir-27a	rs895819	T>C	19	13947292
196	hsa-mir-4519	rs897984	T>T	16	30886643
197	hsa-mir-5689	rs9295535	T>T	6	10439968
198	hsa-mir-3141	rs936581	G>A	5	153975576
199	hsa-mir-5186	rs9842591	C>A	3	151283691
200	hsa-mir-5680	rs9877402	A>G	3	120768492
201	hsa-mir-548h-3	rs9913045	T>T	17	13446924
202	MIR4302	rs11048315	G>A	12	26026988
203	MIR3908	rs111803974	T>T	12	124021017
204	MIR299, MIR380	rs111906529	T>C	14	101489703
205	MIR520G	rs112328520	C>T	19	54225501
206	mir-1282	rs11269	G>G	15	44085909
207	MIR4532	rs113808830	C>T	20	56470456
208	hsa-mir-4479	rs116932476	G>A	9	139781193
209	MIR296	rs117258475	G>A	20	57392686
210	hsa-mir-6717	rs117650137	G>A	14	21491532
211	MIR3649	rs117723462	T>G	12	1769533
212	MIR4436B2	rs163642	T>T	2	111042483
213	MIR3689	rs62571442	A>G	9	137742124

10. SNP-EN GENOTIPAZIOA

MiR-SNP-en genotipazioa Genotipazio Zentro Nazionalean (CeGen-ISCI) burutu zen, Veracode teknologiadun GoldenGate Genotipazio Saiakuntza erabiliz argitaratutako Illumina protokoloaren arabera. GoldenGate® plataformak multiplex PCR entsegu bat baimentzen du, zeinak aldi berean SNP kopuru altu bat prozesatzea ahalbidetzen duen, denbora eta beharrezko erreaktibo eta materialak minimizatuz.

GoldenGate® entseguak zenbait pausu ditu. Lehendabizi, ADN lagina (250 ng, 50 ng/μl-tara) biotiniz edo streptavidinaz markatzen da. Marka hau erabilgarria da gero emango den *primer*-en atxikimendurako. *Primer* hauek SNP bakoitzarentzat espezifikoki diseinatzen dira, hiru bakoitzarentzat: SNP-aren alelo bakoitzari espezifikoak diren bi *primer*, Oligo Alelo-Espezifikoak (ASO) eta hirugarrena SNP-aren gunetik *downstream* dauden zenbait base hibridatzen dituena, Oligo Lokus-Espezifikoa (LSO). LSO-ak SNP bakoitza identifikatzen duen kode bakar bat dauka. Hibridazioari jarraiki, hurrengo pausuak ASO-en estentsioa eta luzatutako produktua LSO-arekin lotzea dira. Ondoren eremu hauek PCR bidez anplifikatzen dira *primer* unibertsalak erabiliz. *Primer* hauek koloratzaile ezberdinekin markatzen dira ASO bakoitzarentzat (Cy-3 eta Cy-5) SNP-aren alelo bakoitzaren identifikazioa baimenduz. Produktu hauek SNP-en fluoreszentsia seinale irakurketarako matrize baten hibridatzen dira (16. irudia).



16. irudia. GoldenGate® genotipazio entseguaren ikuspegi orokorra.

Erreakzio bakoitzerako guztira 400 ng ADN behar dira. ADN-a Espainiar Genotipazio Zentroan birkuantifikatu zen PicoGreen teknika (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) erabiliz eta 50 ng/ μ l-tako amaierako kontzentrazioa izateko diluitu zen. ADN kontzentrazioa neurtzeko teknika, ADN-ren harizpi bikoitzari lotzen zaion tindagai fluoreszente baten erabileran oinarritzen da (PicoGreen[®], Molecular Probes), zeina ondoren fluorometro baten bidez kuantifikatzen den.

Datuak genotipoen *clustering* eta *calling*-erako GenomeStudio (Illumina Inc.) software bidez analizatu ziren. Plaketan zehar lagin bikoiztuak eta CEPH hirukoak (Coriell Cell Repository, Camden, New Jersey, AEB) genotipatu ziren. Transmisio-aleliko mendeliar akatsak edo genotipo diskordanteak erakusten zituzten SNP-ak analitik baztertu ziren.

Guztira, aukeratutako 213 SNP-etatik 53 ikerketatik baztertu ziren (24.88%) laginen % 20 baino gehiagok genotipazioan huts egin zutelako (12. taula).

12. taula. Ikerketatik baztertutako SNP-ak.

	SNP-a	Genea
1	rs10461441	hsa-mir-548ae-2
2	rs1077020	hsa-mir-943
3	rs10878362	hsa-mir-6074
4	rs11014002	hsa-mir-603
5	rs11032942	hsa-mir-1343
6	rs11237828	hsa-mir-5579
7	rs11651671	hsa-mir-548at
8	rs12197631	hsa-mir-548a-1
9	rs12451747	hsa-mir-1269b
10	rs12473206	hsa-mir-4433
11	rs12523324	hsa-mir-4277
12	rs13186787	hsa-mir-1294
13	rs1414273	hsa-mir-548ac
14	rs17022749	hsa-mir-5700
15	rs2060455	hsa-mir-4511
16	rs2241347	hsa-mir-3130-1
17	rs2292832	hsa-mir-149
18	rs2663345	hsa-mir-3183
19	rs35196866	hsa-mir-4669
20	rs4285314	hsa-mir-3135b
21	rs487571	hsa-mir-5680
22	rs56088671	hsa-mir-4424
23	rs56195815	hsa-mir-548aw
24	rs57111412	hsa-mir-1283
25	rs58450758	hsa-mir-559
26	rs60308683	hsa-mir-4762
27	rs641071	hsa-mir-4482
28	rs6505162	hsa-mir-423
29	rs66507245	hsa-mir-4731
30	rs66683138	hsa-mir-3622a
31	rs67339585	hsa-mir-3910-1 hsa-mir-3910-2
32	rs6787734	hsa-mir-3135a
33	rs67976778	hsa-mir-4305
34	rs6841938	hsa-mir-1255b-1
35	rs6997249	hsa-mir-3686
36	rs701213	hsa-mir-4427
37	rs7070684	hsa-mir-548aj-2
38	rs72502717	hsa-mir-3689f
39	rs73112689	hsa-mir-4459
40	rs73147065	hsa-mir-647
41	rs73177830	hsa-mir-4532
42	rs73235381	hsa-mir-548h-4
43	rs73410309	hsa-mir-4739
44	rs7500280	hsa-mir-4719
45	rs77055126	hsa-mir-1303
46	rs7911488	hsa-mir1307
47	rs832733	hsa-mir-4698
48	rs850108	hsa-mir-550a-3
49	rs897984	hsa-mir-4519
50	rs9295535	hsa-mir-5689
51	rs9913045	hsa-mir-548h-3
52	rs111803974	hsa-mir-3908
53	rs163642	hsa-mir-4436B2

11. ANALISI ESTATISTIKOAK

Genotipazio arrakasta tasa Haploview (4.2.) software bidez kalkulatu zen.

Adina, sexua edo dosi kopura bezalako kobarietateen eta toxizitateen arteko erlazioa erregresio logistikoa multibariante ereduak eta korrelazio koefizienteak erabiliz neurtu zen. Toxizitate baten erlazioa fase ezberdinetan zehar edo indukzioan zehar toxizitate gastrointestinal ezberdinen (mukositis, beherakoa eta gonbitoak) arteko erlazioa erregresio logistikoa unibariante ereduak eta korrelazio koefizienteak erabiliz neurtu zen. MiRNA polimorfismoen eta LLA terapiaren toxizitate ezberdinen arteko asoziazioa χ^2 edo Fisher-en frogak zehatz bidez ebaluatu zen. Asoziazio efektuen tamaina odds ratio bidez estimatu zen. Eredu dominante eta errezesiboen arteko frogak esanguratsuen aukeratu zen. Eredu dominanteak arrisku aleloaren kopia bakar bat arriskua eraldatzeko nahiko dela proposatu du, eredu errezesiboak aldiz, bi kopiak beharrezkoak direla postulatu du. Kasu guztietan esangura maila % 5-ean ezarri zen. Analisak R v3.3.0. software bidez gauzatu ziren.

Ikertu diren SNP kopuru altuagatik, eta ondorioz egin behar diren konparaketa kopuru handia dela eta, positibo faltsuak ez dira arraroak. Horregatik, emaitzak konparaketa anitzentzat doitu ziren false discovery rate (FDR) zuzenketa (SNP esanguratsuen kopurua kontsideratuz kalkulatu) (Benjamini et al., 2001) eta Bonferroni zuzenketa (metodo kontserbadoreagoa, ikertutako konparaketa guztiak kontuan hartzen baititu) (Rice et al., 2008) erabiliz. OpenEpi softwarea erabili zen asoziazioen botere estatistiko kalkulatzeko (Sullivan et al., 2009).

12. ANALISI BIOINFORMATIKOAK

12.1. MiRNA-en egitura sekundarioen iragarpena

Emaitza esanguratsuak erakutsi zituzten miRNA-entzat, SNP-ek egitura sekundarioen gutxieneko energia askean (GEA) zuten inpaktua neurtu zen RNAfold web tresna (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) bidez, eta miRNA-en egitura sekundario egonkorrenak iragarri ziren (Gruber et al., 2008). MiRNA-en GEA-etatik urkila egituren energia aldaketa ($\Delta\Delta G$) kalkulatu zen.

12.2. Geneen itua aukeraketa

MiRNA-en itua geneak miRWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html>) datu-basean oinarrituta aukeratu ziren (Dweep and Gretz, 2015). MiRWalk-en baitako 12 iragarpen programetatik (miRWalk, miRDB, PITA,

Materialak eta Metodoak

MicroT4, miRMap, RNA22, miRanda, miRNAMap, RNAhybrid, miRBridge, PICTAR2 and TargetsCan), gutxienez 6 programek konfirmatutako geneak aukeratu ziren soilik.

12.3. Bidezidorren analisia

Farmako toxizitate garapenean eragina duten geneen identifikaziorako, lehen estrategia farmakoekin erlazionatutako ADME gene ezagunen azterketara zuzendu zen. Alternatiba moduan beste itu gene potentzial batzuk identifikatzeko bigarren estrategia bat aplikatu zen, bidezidorren aberaste analisia.

Lehenengo estrategian, miRNA bakoitzarentzat iragarritako itu geneen zerrenda farmakoen bidezidor PK eta PD-etako geneen zerrendekin gurutzatu zen, azken zerrenda hau Pharmacogenomic Knowledge Base (PharmGKB) (<https://www.pharmgkb.org/>) eta literatura araketa bidez eraiki zelarik.

Bigarren estrategia batean, itu gene potentzialak zehaztu ziren ConsensusPath (CPdB) (<http://consensuspathdb.org/>) datu-baseko bidezidorren aberaste analisi bidez, gainerrepresentazio analisi modulua erabiliz (Kamburov et al., 2013). MiRWalk-eko itu geneen zerrendak analizatu ziren KEGG (Kanehisa et al., 2017), Reactome (Fabregat et al., 2016) eta BioCarta (http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta_Pathways) bidezidorren datu baseetako berezko bildumekin erkatuta. P-balio muga kontserbatzailea (0,0001) ezarri zen.

EMAITZAK

Vinkristinaren miR-farmakogenetika eta neurotoxizitate periferikoa haurtzaroko B-zelulen leuzemia linfoblastiko akutuan.

Umerez, Maitane^{1*}, PhD ikaslea; Gutierrez-Camino, Ángela^{1*}, PhD; Martín-Guerrero Idoia¹, PhD; García de Andoin, Nagore^{2,3}, MD; Santos, Borja¹, PhD; Sastre, Ana⁴, MD; Echebarria-Barona, Aizpea⁵, PhD; Astigarraga, Itziar^{3,5,6}, PhD; Navajas, Aurora^{5,6} PhD; Garcia-Orad, Africa^{1,6}, PhD.

*Autore hauek egiletza partekatzen dute.

¹Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Medikuntza eta Odontologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Espainia; ²Pediatria Saila, Donostia Unibertsitate Ospitalea, Donostia, Espainia; ³Pediatria Saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV/EHU, Leioa, Espainia; ⁴Onkohematologia Pediatriko Saila, La Paz Unibertsitate Ospitalea, Madril, Espainia; ⁵Pediatria Saila, Gurutzeta Unibertsitate Ospitalea, Barakaldo, Espainia; ⁶BioCruces Osasun Ikerketa Institutua, Barakaldo, Espainia.

LABURPENA

Vinkristinak (VCR), haurtzaroko B-zelulen leuzemia linfoblastiko akutuan erabiltzen den terapiaren osagai garrantzitsua dena, neurotoxizitate sentzoriala eta motorea sor ditzakeke. Neurotoxizitate honek dosiaren murrizketa edo tratamendua etetea eragin dezake, eta ondorioz biziraupena murriztu. Ildo honetan, hainbat ikerketek erlazionatu dituzte neurotoxizitate periferikoa eta VCR-ren farmakozinetikan (PK) eta farmakodinamikan (PD) inplikaturako geneen polimorfismoak. Gaur egun, jakina da gene horiek mikroRNA (miRNA) bidez erregulatuta daudela, eta miRNA-tan dauden SNP-ek beren maila edo funtzioa alda ditzaketela. Hori dela eta, ikerketa honen helburua miRNA-tan dauden SNP-ak VCR-ak induzitutako neurotoxizitatearekin erlazionatuta egon daitezkeen zehaztea izan zen. Hau lortzeko, VCR-rekin erlazionatutako geneak erregulatzen zituzten miRNA-tako SNP guztiak (alelo urrienaren maiztasuna (AUM) \geq 0,01) aztertu genituen, B-zelula aitzindarien LLA (B-LLA) zuten eta LAL/SHOP protokoloekin homogeneoki tratatuak izan ziren haur espainiarren kohorte handi batean. Bi SNP aurkitu genituen VCR-k induzitutako neurotoxizitatearekin esanguratsuki asoziatuta, alde batetik, miR-3117-3p-ren *seed* eremuan kokatutako rs12402181-ren A aleloa, zeinak *ABCC1* eta *RALBP1* geneekiko loturan eragin zezakeen. Bestetik, miR-4481-ren *pre-mature* sekuentzia kokatutako rs7896283-ren C aleloa, zeina nerbio periferikoen erregenerazioarekin erlazionatuta egon zitezkeen. Aurkikuntza hauek VCR-ren neurotoxizitatearekin asoziatutako miRNA-tako bi SNP-en inplikazio posiblea erakusten dute.

Hitz gakoak: B-zelulen leuzemia linfoblastiko akutua, vinkristina, mikroRNAk, nukleotido bakarreko polimorfismoak.

SARRERA

Vinkristina (VCR) osagai garrantzitsua da haurtzaroko leuzemia linfoblastiko akutuaren (LLA) terapian, haurtzaroko minbizirik ohikoena (Johnston et al., 2010). Eraginkortasun klinikoa gorabehera, VCR-k neurotoxizitate sentzoriala eta motorea sor ditzake (Carozzi et al., 2015), tratamenduaren edozein fasetan ager daitekeen eragin desiragaitza. Protokolo desberdinetan ematen diren VCR dosien maiztasun, kopuru eta kontzentrazioak eragina izan dezakete neurotoxizitatearen intzidentzian eta maizago agertuko den tratamenduaren fasean (indukzioa edo mantenimendua) (Gutierrez-Camino et al., 2016). Hala ere, edonoiz agertzen dela ere, neurotoxizitateak VCR dosi murrizketa edo tratamenduaren etetea eragin dezake (Ceppi et al., 2014) ondorio gisa, biziraupena murriztuz (Carozzi et al., 2015; Ceppi et al., 2014; Postma et al., 1993). Hori dela eta, medikuntzaren erronketako bat VCR-rekin erlazionatutako neurotoxizitatea zein pazienteek garatuko duten aurreikustea da, alde aurretik tratamendua egokitu ahal izateko.

Azken urteotan hainbat ikerketek aztertu dute aldaera genetikoaren eta VCR-ri lotutako neurotoxizitatearen arteko harremana, batez ere, VCR-ren farmakozinetikan (PK) eta farmakodinamikan (PD) inplikaturako geneetan oinarrituta (Ceppi et al., 2014; Diouf et al., 2015; Egbelakin et al., 2011; Hartman et al., 2010; Lopez-Lopez et al., 2016; Moore et al., 2011; Plasschaert et al., 2004). Ildo honetan, emaitza interesgarrienetako bat Diouf eta lankideek aurkitu zuten LLA-dun paziente pediatriko talde handi batean egindako Genoma Osoko Aldaera Genetikoaren Asoziazio Ikerketa (GWAS) batean (Diouf et al., 2015). Ikerketa honek, asoziazioa aurkitu zuen tratamenduaren fase berantiarretan agertzen zen neuropatia periferikoaren eta *CEP72* genearen eremu promotorean zegoen rs924607 SNP-aren artean. Datu interesgarria da, SNP hau, era berean LOC100996325 deitzen den RNA ez kodifikatzaile baten kokatua dagoela. Gainera, GWAS honetan identifikaturako beste lau SNP esanguratsuetatik hiru (rs17032980, rs12786200 eta rs4463516) ere eremu ez kodifikatzaileetan kokatuak zeuden (Diouf et al., 2015).

Gaur egun, ondo ezagutzen da RNA ez kodifikatzaileek, hala nola microRNA-ek (miRNAk), gure geneen % 50 baino gehiago erregulatzen dituztela, farmako desberdinen PK-n eta PD-n parte hartzen duten geneak barne (Li et al., 2016; Nakajima and Yokoi, 2011). MiRNA-en aldaera genetikoek beren maila edo funtzioa alda dezakete eta ondorioz, haien iturri geneen adierazpenean eragin. Ildo honetan, gure taldean egin berri dugun ikerketa batean, alde batetik, asoziazioa aurkitu genuen miR-1206-ko rs2114358-ren eta metotrexatoak (MTX) eragindako aho mukositisaren artean (Gutierrez-Camino et al., 2017b) eta beste alde batetik, asoziazioa aurkitu

genuen miR-5198, miR-595 eta miR-453n zeuden hiru SNP eta MTX maila plasmatikoen artean (Iparraguirre et al., 2016; Lopez-Lopez et al., 2014b). Baliteke, miRNA hauek MTX-aren *SLC46A1*, *SLC19A1* eta *SLCO1A2* garraio geneak erregulatzea, eta beraz, garraiatzaile hauen adierazpen aldaketak MTX-aren argitzea aldatzea. Ondorioz, gure hipotesia honakoa litzateke: VCR-aren PK eta PD geneak ituztat dituzten miRNA-tako aldaerak B-LLA-dun haurretan VCR-k induzitutako neurotoxizitatearekin asoziatuak egon litezkeela.

Hori dela eta, ikerketa honetan, VCR-rekin erlazionatutako geneak erregulatzen zituzten miRNA-tako SNP guztiak (alelo urrienaren maiztasuna (AUM) $\geq 0,01$) aztertu genituen, B-LLA zuten eta homogeneoki tratatuak izan ziren haur espainiarren kohorte handi batean.

MATERIALAK ETA METODOAK

Pazienteak

Atzera begirako ikerketa honetan, haurtzaroko B-LLA zuten 179 paziente espainiar sartu ziren, zeintzuk, hiru espainiar ospitaleetako onkologia pediatriko unitatean diagnostikatuak izan ziren (Gurutzea Unibertsitate Ospitalea, Donostia Unibertsitate Ospitalea, La Paz Unibertsitate Ospitalea, 2000 eta 2013 urte bitartean). Laginak hartu baino lehen paziente guztien edo haien gurasoen idatzizko baimen informatua jaso zen. Ikerketa honek Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) batzordearen onarpena (CEISH/102R/2011) jaso zuen.

Tratamendua eta toxizitatearen ebaluazioa

Ikerketan sartutako paziente guztiak homogeneoki tratatuak izan ziren Espainiako LAL-SHOP 94/99/2005 protokoloen arabera. Protokoloak aurretik deskribatuta zeuden (Lopez-Lopez et al., 2016). Laburbilduz, astean behin emandako lau VCR dosi ($1,5 \text{ mg/m}^2$) administratu ziren indukzioan. Tratamenduaren ondorengo faseetan, kontsolidazio fasean izan ezik, 6 eta 16 dosi ($1,5 \text{ mg/m}^2$) bitartean administratu ziren fasearen eta arrisku taldearen arabera hilean behineko edo astean behineko maiztasunarekin. VCR-z gain, tratamendu protokolo hauetan daunorribizina, prednisona, ziklofosfamida, asparraginasia eta metotrexato-zitarabina-hidro kortisona terapia intratekala ere erabili ziren. LAL/SKOP 99 protokoloan arrisku altuko pazienteek metotrexato dosi 3 g/m^2 dosi bakar bat ere jaso zuten +15 egunean. Tratamenduaren ondorengo faseak heterogeneoagoak izan ziren arrisku taldeen segregazioan oinarrituta. Beste farmako horietako batek ere ez du neurotoxikotasun periferikoa sortzen eragin desiragaitz arrunt gisa.

Tratamendu fase guztietako toxizitate datuak genotipoen jaso ziren gaixoen historia klinikoetatik kasu guztietan bi ikertzaile aditu berdinen eskutik. Hiru ospitaleetan pazienteak VCR-ren neuropatia ebaluatzen trebatuak zeuden medikuek ebaluatu zituzten, hiru zentroetan estandar berak eta ebaluazio maiztasun bera erabiliz. Neurotoxizitatea MOE-ren Nerbio Sistema Periferikoko toxikotasun irizpideen arabera graduatu zen (ikus 7.taula); hiru fenotipo hartu ziren kontuan: edozein gradutako neurotoxizitatea (1-4 gradukoa), neurotoxizitate arina (1-2 gradukoa) eta neurotoxizitate altua (3-4 gradukoa). Beste datu garrantzitsu batzuk, hala nola adina, sexua, VCR dosi kopurua eta arrisku taldea sistematikoki jaso ziren historia klinikoetatik.

Ikerketa honetan, neurotoxizitate analisia indukzio fasean oinarritu genuen, fase honetan gaixo guztiek VCR dosi berdina jaso zutelako, gure kohortean neurotoxizitate kasu gehienak indukzioan garatu zirelako, eta azkenik, fase honetan ez zirelako normalean neurotoxizitatea sortzen duten beste farmakorik administratu. Gainera, hiru fenotipoak tratamenduaren edozein fasetan ere aztertu genituen (indukzioan, kontsolidazioan, intentsifikazioan edo maitenimenduan) eta neurotoxizitate global gisa definitu genuen.

Gene eta polimorfismoen aukeraketa

Kontuan hartuz, gaur egun, miRNA-ren itzak ez daudela guztiz definituta eta edozein miRNA zuzenki edo zeharka VCR-rekin erlazionatutako geneak erregulatzen egon daitekeela, ikerketa unean (2014-ko maiatza) SNP-ak deskribatuta zituzten miRNA gene guztiak aukeratu genituen. SNP-en aukeraketarako, mirbase (<http://www.mirbase.org/>), miRNA SNIPER (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP2/index.php>), eta dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) datu-baseak erabili genituen, baita literaturaren araketa ere (ikus 11.taula).

Guztirako 969 miRNA-tako 1910 SNP-en artetik Europar/Kaukasiar populazioan AUM >0.01 zuten SNPak aukeratu genituen. Irizpide hauekin 206 miRNA-tako 213 SNP aukeratu ziren azkenean ikerketarako (ikus 11. taula).

Genotipazioa

ADN genomikoa erremisioan zeuden LLA-dun pazienteen odol periferiko edo hezur muintetik erauzi zen fenol-kloroformo metodoa erabiliz, aurrez deskribatu bezala (Sambrook, J, 2001). ADN-a PicoGreen (Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornia, AEB) bidez kuantifikatu zen. Lagin bakoitzarentzat, 400 ng DNA genotipatu ziren Veracode teknologiadun GoldenGate Genotipazio Saiakuntza (Illumina Inc., San Diego, Kalifornia, AEB) erabiliz argitaratutako Illumina

protokoloaren arabera. Datuak genotipoen *clustering* eta *calling*-erako GenomeStudio (Illumina Inc.) software bidez analizatu ziren. Lagin bikoiztuak eta CEPH hirukoak (Coriell Cell Repository, Camden, New Jersey, AEB) genotipatu ziren plaketan zehar. Transmisio-aleliko mendeliar akatsak edo genotipo diskordanteak erakusten zituzten SNPak analitiko baztertu ziren.

Analisi estatistikoak

Neurotoxizitatearen eta polimorfismo genetikoen arteko asoziazioa χ^2 edo Fisher-en froga zehatz bidez ebaluatu zen. Asoziazio efektuen tamaina odds ratio (OR) bidez estimatu zen. Toxizitate globala analizatzeko orduan, VCR dosiaren efektu nahasle posiblea kontabilizatzeko erregresio logistiko multibariantea erabili zen. Eredu dominante eta errezesiboen arteko froga esanguratsua aukeratu zen. Kasu guztietan esangura maila % 5-ean ezarri zen. Emaizak konparaketa anitzetarako egokitu ziren false discovery rate (FDR) zuzenketa erabiliz eta test guztientzat % 5-eko esangura maila onartuz (Benjamini et al., 2001). Asoziazioen botere estatistikoa neurtzeko OpenEpi softwarea erabili zen (Sullivan et al., 2009). Analisiak R v3.3.0. software bidez gauzatu ziren.

Analisi bioinformatikoak

- *MiRNA-en egitura sekundarioen iragarpena*

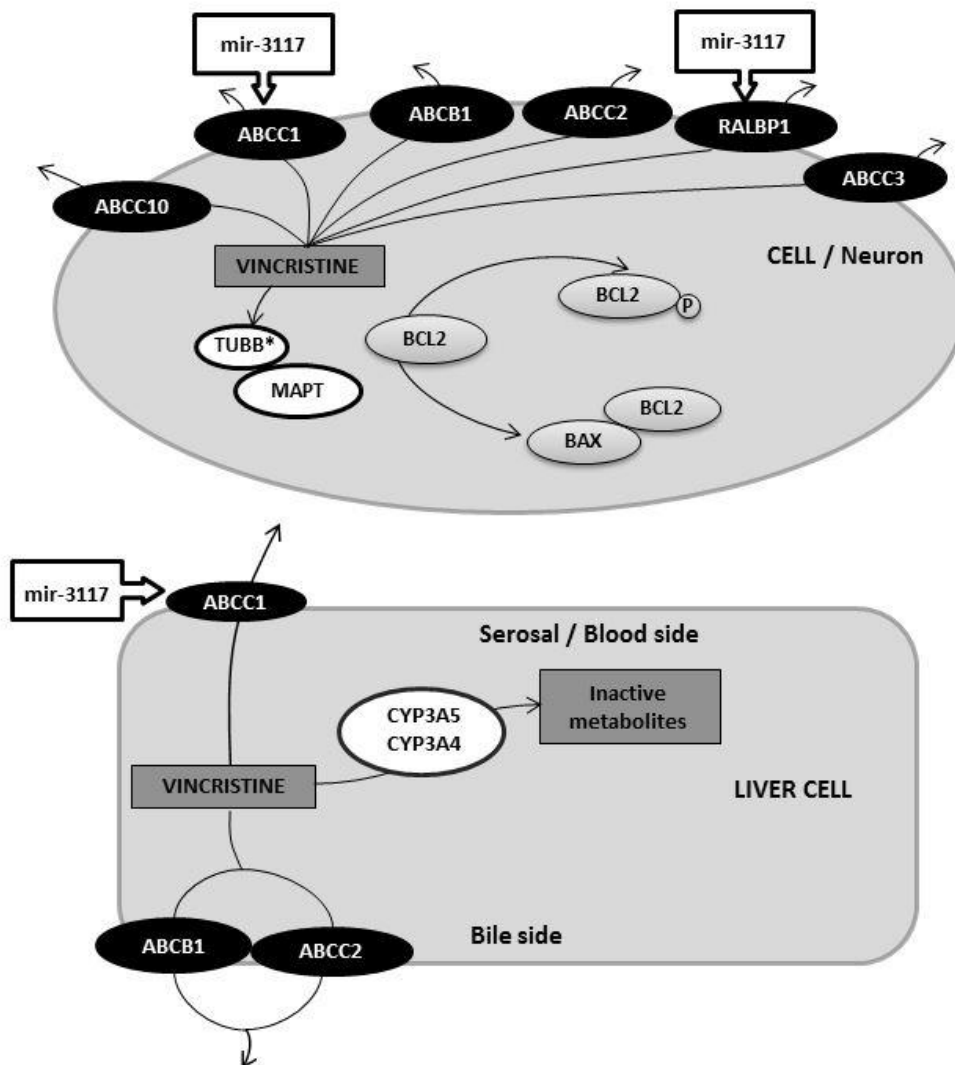
Emaizta esanguratsuenak zituzten miRNA-entzat, RNAfold web tresna (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) (Gruber et al., 2008) erabili zen SNP-ek egitura sekundarioen gutxieneko energia aske eta urkila egituren energia aldaketan ($\Delta\Delta G$) zuten inpaktua kalkulatzeko.

- *Itu geneen aukeraketa eta bidezidorren analisia*

MiRNA esanguratsu bakoitzarentzat itu geneak miRWalk (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/index.html>) datu-basetik atera ziren (Dweep et al., 2011). MiRWalk-en baitako 12 iragarpen programetarik, gutxienez 6 programek konfirmatutako geneak aukeratu ziren soilik.

MiRNA esanguratsuen bidezidor analisiari dagokionez, lehen estrategiari jarraiki, VCR-ren PK eta PD-an inplikaturako geneak kontsideratu genituen (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC10*, *ABCC2*, *ABCC3*, *CYP3A4*, *CYP3A5* eta *BAX*, *BCL2*, *RALBP1*, *CEP72*, *MAPT*, *TUBB1*, *TUBB2A*, *TUBB2B*, *TUBB3*, *TUBB4*) (17. irudia) Pharmacogenomic Knowledge Base (PharmGKB) (<https://www.pharmgkb.org/>) datu-basean oinarrituta eta literaturaren araketa bidez. Ondoren, VCR-k induzitutako neurotoxizitatean inplikaturako beste gene batzuk identifikatzeko bigarren estrategia batean, bidezidorren aberaste analisia gauzatu genuen ConsensusPathDB

web tresnaren (CPdB) (<http://consensuspathdb.org/>) (Kamburov et al., 2013) gainerrepresentazioa modulua erabiliz. MiRWalk-eko itu geneen zerrendak analizatu ziren KEGG (Kanehisa et al., 2017), Reactome (Fabregat et al., 2016) eta BioCarta ([http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta Pathways](http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta_Pathways)) bidezidor datu baseetako berezko bildumekin erkatuta. P-balio muga kontserbatzaile bat (0,0001) ezarri zen.



17. irudia. VCR-ren PK/PD bidezidorretako geneak eta ikerketa honetako miRNA esanguratsuen, miR-3117, bere itu geneak seinatuz.

EMAITZAK

Pazienteen ezaugarriak

Ikerketa honetan, guztira haurtzaroko B-LLA-dun 179 paziente sartu ziren, VCR-k eragindako neurotoxizitateari buruzko datuak hauetako 175 pazientetan eskuragarri zeudelarik (13. taula). Neurotoxizitate kasuen gehiengo bat indukzio fasean agertu ziren (47/55 paziente, % 85,45). Soilik 8 pazientek garatu zuten neurotoxizitate periferikoa ondorengo faseren batean (3

pazientek kontsolidazioan, 4 pazientek intentsifikazioan eta paziente batek mantenimenduan) (14. taula).

13. taula. Hautzaroko B-LLA-dun pazienteen ezaugarriak.

Paziente kopurua	175
Sexua, n (%)	
Emakumezkoa	72 (41,14)
Gizonezkoa	103 (58,86)
Adina diagnostikoan, batezbestekoa \pm DE (urteak)	5,12 \pm 3,23
Emakumezkoa	5,10 \pm 3,22
Gizonezkoa	5,70 \pm 3,20
Tratamendu protokoloa, n (%) ¹	
LAL-SHOP 94/99	68 (38,86)
LAL-SHOP 2005	105 (60,00)
Neurotoxizitatea, n (%)	
Indukzioa	
1-4 gradukoa	47 (26,86)
1-2 gradukoa	28 (16,00)
3-4 gradukoa	19 (10,86)
Globala	
1-4 gradukoa	55 (31,43%)
1-2 gradukoa	32 (18,29%)
3-4 gradukoa	24 (13,71%)

Laburdurak: B-LLA, B-zelulen leuzemia linfoblastiko akutua; DE, desbideraketa estandarra.

Oharrak: ¹Bi pazienterentzat ez zen tratamendu protokoloari buruzko informazioa eskuratu.

14. taula. VCR-ren neurotoxizitate periferiko datuak.

	Indukzioa			Globala		
	1-4 gradua n (%)	1-2 gradua n (%)	3-4 gradua n (%)	1-4 gradua n (%)	1-2 gradua n (%)	3-4 gradua n (%)
Neurotoxizitaterik ez	128 (73,14)	128 (73,14)	128 (73,14)	120 (68,57)	120 (68,57)	120 (68,57)
Neurotoxizitatea	47 (26,86)	28 (16,00)	19 (10,86)	55 (31,43)	32 (18,29) ²	24 (13,71) ²
NA	0 (0,00)	19 (10,86) ¹	28 (16,00) ¹	0 (0,00)	23 (13,14) ¹	31 (17,71) ¹

Laburdurak: NA, ez eskuragarri.

Oharrak: ¹paziente batean 1-2 graduko edo 3-4 graduko neurotoxizitatea soilik bazegoen, beste gradurako NA gisa kodifikatu zen; ² paziente batek bi gradutako toxizitateak aurkeztu zituen, 1-2 gradukoa eta 3-4 gradukoa.

Genotipazio emaitzak

Genotipazio arrakastatsua 179 ADN laginetik 155-etan (% 88,59) lortu zen. Genotipazio prozesuan zehar, 213 SNP-etik 53-k (% 24,88) laginen % 20 baino gehiagotan huts egin zuten eta ikerketatik baztertu ziren (ikus 12. taula). Genotipazio huts egite hauek PCR anplifikazio ezagatik, kluster banaketarako intentsitate urriagatik edo klusterren definizio ezagatik gertatu ziren. Genotipazio arrakastatsua lortu zen 160 SNP-entzat (% 75,12).

Asoziazio azterketa

MiRNA-tako aldaera genetikoek VCR-k induzitutako neurotoxizitatean eragina duten ikertzeko, arrakastaz genotipatutako 154 miRNA-tako 160 polimorfismoren eta neurotoxizitate periferikoari zegozkion datuen arteko asoziazioa neurtu genuen. Ikerketa populazioa genotipo eta toxizitate datuak eskuragarri izan zituzten homogeneoki tratatutako haurtzaroko B-LLA-dun 155 espainiar pazientekoa izan zen. Analisi nagusiak indukzio fasean burutu ziren, neurotoxizitate kasuen % 85,45 detektatu ziren fasea. Neurotoxizitate periferikoaren larritasuna ebaluatu genuen, edozein gradutako neurotoxizitatea (1-4) (47 paziente), gradu arinekoa (1-2) (28 paziente) eta gradu altukoa (3-4) (19 paziente) garatu zituzten pazienteak kontsideratuz.

Ikerketa honetako emaitza esanguratsuen miR-3117-ko rs12402181-arentzat aurkitu zen (15. taula). AG+AA genotipoak 1-4 neurotoxiziterako 0,16 bider arrisku txikiagoarekin asoziatu ziren ($P = 0,00042$) eta AA genotipoa ez zen inoiz aurkitu neurotoxizitate periferikodun pazienteetan. Botere estatistikoa % 70-ekoa zela kalkulatu zen toxizitatedun 39 paziente (AUM = % 3,8) eta toxizitate gabeko 116 (AUM = % 18) datuetatik abiatuz. Indukzio fasean asoziazio esanguratsua modu kontsistentean aurkitu zen toxizitate gradu arin eta gradu altuko analisietan, 0,0069 eta 0,0099 p-balioekin hurrenez hurren.

Bigarren emaitza esanguratsuen miR-4481-eko rs7896283-arentzat aurkitu zen. CC genotipoa VCR-k induzitutako neurotoxizitatea garatzeko 2,6 bider arrisku altuagoarekin asoziatu zen ($P = 0,017$). Botere estatistikoa % 54-an kalkulatu zen toxizitatea zuten 39 paziente (AUM = % 51) eta toxizitate gabeko 97 paziente (AUM = % 32) datuetatik. Kasu honetan, C aleloa gradu altuko neurotoxizitatearekin asoziatu zen ($P = 0,0148$) (15. taula). Hirugarren polimorfismo esanguratsuen miR-6076-ko rs35650931 izan zen. CC genotipoa babeslea zen eta ez zen toxizitate kasu batean ere ageri ($P = 0,017$). Asoziazio hau 1-2 graduko neurotoxizitatearentzat ere aurkitu zen ($P = 0,014$) (15. taula). Beste 9 SNP-ek asoziazio esanguratsua ($p < 0,05$) erakutsi zuten indukzio fasean VCR-k induzitutako neurotoxizitatearekin (16. taula).

VCR-k induzitutako neurotoxizitate globala, edozein fasetan garatutakoa, analizatu zenean, berriro emaitzarik esanguratsuenak miR-3117-ko rs12402181 eta miR-4481-eko rs7896283-arentzat aurkitu ziren (17. taula).

SNP batek berak ere ez zituen p-balio esanguratsuak lortu FDR zuzenketa aplikatu zenean. Hala ere, miR-3117-ko rs12402181 ia p-balio esanguratsura ($p=0.06$) iritsi zen FDR zuzenketa ondoren.

15. taula. Hautzaroko B-LLA-n indukzio fasean zehar VCR-ren neurotoxizitatearekin asoziazio esanguratsuenak erakutsi dituzten miRNA-tako SNP-ak. Maiztasun genotipiko eta alelikoak.

miRNA SNP	Posizioa Kokapena	Genotipoa / Aleloa	1-4 graduko Tox (n=175)		Eredua OR (% 95 KT) P-balioa	1-2 graduko Tox (n=156)		Eredua OR (% 95 KT) P-balioa	3-4 graduko Tox (n=147)		Eredua OR (% 95 KT) P-balioa
			EZ Tox N=128	Tox N=47		EZ Tox N=128	Tox N=28		EZ Tox N=128	Tox N=19	
hsa-mir-3117 rs12402181	Kr.: 1 in_seed	GG	76 (65.5)	36 (92.3)	Dominantea 0.16 (0.05-0.55) 0.00042	76 (65.5)	21 (91.3)	Dominantea 0.18 (0.04-0.81) 0.0069	76 (65.5)	15 (93.8)	Dominantea 0.13 (0.02-0.99) 0.0099
		AG	37 (31.9)	3 (7.7)		37 (31.9)	2 (8.7)		37 (31.9)	1 (6.2)	
		AA	3 (2.6)	0 (0.0)		3 (2.6)	0 (0.0)		3 (2.6)	0 (0.0)	
		G	189 (81.5)	75 (96.1)	0.176 (0.053-0.584)	189 (81.5)	44 (95.7)	0.2 (0.047-0.856)	189 (81.5)	31(96.9)	0.142 (0.019-1.067)
A	43 (18.5)	3 (3.8)	0.0016	43 (18.5)	2(4.3)	0.0170	43(18.5)	1(3.1)	0.0283		
hsa-mir-4481 rs7896283	Kr.: 10 pre-miRNA	TT	46 (47.4)	10 (25.6)	Dominantea 2.62 (1.15-5.95) 0.0173	46 (47.4)	6 (26.1)	Dominantea 2.56 (0.93-7.03) 0.0578	46 (47.4)	4 (25.0)	Errezesiboa 4.69 (1.43-15.43) 0.0148
		CT	40 (41.2)	18 (46.2)		40 (41.2)	12 (52.2)		40 (41.2)	6 (37.5)	
		CC	11 (11.3)	11 (28.2)		11 (11.3)	5 (21.7)		11 (11.3)	6 (37.5)	
		T	132 (68)	38 (48.7)	2.241 (1.310-3.834)	132 (68)	24 (52.2)	1.952 (1.016-3.748)	132 (68)	14 (43.8)	2.737 (1.279-5.858)
C	62 (32)	40 (51.3)	0.0029	62 (32)	22 (47.8)	0.0425	62 (32)	18 (56.3)	0.0078		
hsa-mir-6076 rs35650931	Kr.: 14 pre-miRNA	GG	93 (80.2)	37 (94.9)	Dominantea 0.22 (0.05-0.97) 0.0175	93 (80.2)	23 (100.0)	Dominantea 0 (0.0) 0.0140	93 (80.2)	14 (87.5)	Dominantea 0.58 (0.12-2.72) 0.4636
		CG	21 (18.1)	2 (5.1)		21 (18.1)	0 (0.0)		21 (18.1)	2 (12.5)	
		CC	2 (1.7)	0 (0.0)		2 (1.7)	0 (0.0)		2 (1.7)	0 (0.0)	
		G	207 (89.2)	76 (97.4)	0.218 (0.050-0.942)	207 (89.2)	46 (100)	0 (-)	207 (89.2)	30 (93.8)	0.552 (0.124-2.450)
C	25 (10.8)	2 (2.6)	0.0261	25 (10.8)	0 (0)	0.0196	25 (10.8)	2 (6.3)	0.4283		

Laburdurak: B-LLA, B zelulen leuzemia linfoblastiko akutua; VCR, vinkristina; miRNA, mikroRNA; SNP, nukleotido bakarrekoko polimorfismoa; Tox, toxizitatea; OR, odds ratio; KT, konfiantza tarte; Kr, kromosoma; NA, ez eskuragarri.

Oharrak: letra lodiek P-balio esanguratsuenak adierazten dituzte.

16. taula. Hautzaroko LLA-n indukzio fasean VCR-k induzitutako neurotoxizitatearekin asoziatuiko hamabi miRNA SNP-en zerrenda.

miRNA SNP	Posizioa Kokapena	Genotipoa /Aleloa	1-4 graduko Tox (n=175)		Eredua OR. (% 95 KT) P-balioa	1-2 graduko Tox (n=156)		Eredua OR. (% 95 KT) P-balioa	3-4 graduko Tox (n=147)		Eredua OR. (% 95 KT) P-balioa
			EZ Tox N=128	Tox N=47		EZ Tox N=128	Tox N=28		EZ Tox N=128	Tox N=19	
hsa-mir-3117 rs12402181	Kr.: 1 in_seed	GG	76 (65.5)	36 (92.3)	Dominantea 0.16 (0.05-0.55) 0.00042	76 (65.5)	21 (91.3)	Dominantea 0.18 (0.04-0.81) 0.0069	76 (65.5)	15 (93.8)	Dominantea 0.13 (0.02-0.99) 0.0099
		AG	37 (31.9)	3 (7.7)		37 (31.9)	2 (8.7)		37 (31.9)	1 (6.2)	
		AA	3 (2.6)	0 (0.0)		3 (2.6)	0 (0.0)		3 (2.6)	0 (0.0)	
		G	189 (81.5)	75 (96.1)	0.176 (0.053-0.584)	189 (81.5)	44 (95.7)	0.2 (0.047-0.856)	189 (81.5)	31(96.9)	0.142 (0.019-1.067)
		A	43 (18.5)	3 (3.8)	0.0016	43 (18.5)	2(4.3)	0.0170	43(18.5)	1(3.1)	0.0283
hsa-mir-4481 rs7896283	Kr.: 10 pre-miRNA	TT	46 (47.4)	10 (25.6)	Dominantea 2.62 (1.15-5.95) 0.0173	46 (47.4)	6 (26.1)	Dominantea 2.56 (0.93-7.03) 0.0578	46 (47.4)	4 (25.0)	Errezesiboa 4.69 (1.43-15.43) 0.0148
		CT	40 (41.2)	18 (46.2)		40 (41.2)	12 (52.2)		40 (41.2)	6 (37.5)	
		CC	11 (11.3)	11 (28.2)		11 (11.3)	5 (21.7)		11 (11.3)	6 (37.5)	
		T	132 (68)	38 (48.7)	2.241 (1.310-3.834)	132 (68)	24 (52.2)	1.952 (1.016-3.748)	132 (68)	14 (43.8)	2.737 (1.279-5.858)
		C	62 (32)	40 (51.3)	0.0029	62 (32)	22 (47.8)	0.0425	62 (32)	18 (56.3)	0.0078
hsa-mir-6076 rs35650931	Kr.: 14 pre-miRNA	GG	93 (80.2)	37 (94.9)	Dominantea 0.22 (0.05-0.97) 0.0175	93 (80.2)	23 (100.0)	Dominantea 0 (0.0) 0.0140	93 (80.2)	14 (87.5)	Dominantea 0.58 (0.12-2.72) 0.4636
		CG	21 (18.1)	2 (5.1)		21 (18.1)	0 (0.0)		21 (18.1)	2 (12.5)	
		CC	2 (1.7)	0 (0.0)		2 (1.7)	0 (0.0)		2 (1.7)	0 (0.0)	
		G	207 (89.2)	76 (97.4)	0.218 (0.050-0.942)	207 (89.2)	46 (100)	0 (-)	207 (89.2)	30 (93.8)	0.552 (0.124-2.450)
		C	25 (10.8)	2 (2.6)	0.0261	25 (10.8)	0 (0)	0.0196	25 (10.8)	2 (6.3)	0.4283
hsa-mir-577 rs34115976	Kr.: 4 pre-miRNA	CC	78 (68.4)	21 (53.8)	Errezesiboa 6.40 (1.12-36.44) 0.0302	78 (68.4)	12 (52.2)	Errezesiboa 11.79 (2.02-68.91) 0.0049	78 (68.4)	9 (56.2)	Dominantea 1.69 (0.58-4.88) 0.3416
		CG	34 (29.8)	14 (35.9)		34 (29.8)	7 (30.4)		34 (29.8)	7 (43.8)	
		GG	2 (1.8)	4 (10.3)		2 (1.8)	4 (17.4)		2 (1.8)	0 (0.0)	
		C	190 (83.3)	56 (71.8)	1.964 (1.074-3.593)	190 (83.3)	31 (67.4)	2.42 (1.192-4.911)	190 (83.3)	25 (78.1)	1.4 (0.565-3.470)
		G	38 (16.7)	22 (28.2)	0.0267	38 (16.7)	15 (32.6)	0.0125	38 (16.7)	7 (21.9)	0.4658
hsa-mir-5197 rs2042253	Kr.: 5 pre-miRNA	AA	63 (54.3)	28 (73.7)	Dominantea 0.42 (0.19-0.95) 0.03157	63 (54.3)	18 (81.8)	Dominantea 0.26 (0.08-0.83) 0.012045	63 (54.3)	10 (62.5)	Dominantea 0.71 (0.24-2.09) 0.5343
		AG	50 (43.1)	9 (23.7)		50 (43.1)	3 (13.6)		50 (43.1)	6 (37.5)	
		GG	3 (2.6)	1 (2.6)		3 (2.6)	1 (4.5)		3 (2.6)	0 (0.0)	
		A	176 (75.9)	65 (85.5)	0.532 (0.262-1.078)	176 (75.9)	39 (88.6)	0.403 (0.151-1.072)	176 (75.9)	26 (81.3)	0.725 (0.284-1.852)
		G	56 (24.1)	11 (14.5)	0.0763	56 (24.1)	5 (11.4)	0.0612	56 (24.1)	6 (18.8)	0.5003
hsa-mir-449c rs35770269	Kr.: 5 in_seed	AA	57 (49.6)	12 (30.8)	Dominantea 2.21 (1.02-4.79) 0.0389	57 (49.6)	10 (43.5)	Errezesiboa 0.28 (0.04-2.23) 0.1566	57 (49.6)	2 (12.5)	Dominantea 6.88 (1.50-31.64) 0.0029
		AT	42 (36.5)	24 (61.5)		42 (36.5)	12 (52.2)		42 (36.5)	12 (75.0)	
		TT	16 (13.9)	3 (7.7)		16 (13.9)	1 (4.3)		16 (13.9)	2 (12.5)	
		A	156 (67.8)	48 (61.5)	1.32 (0.773-2.246)	156 (67.8)	32 (69.6)	0.92 (0.464-1.832)	156 (67.8)	16 (50)	2.10 (1.000-4.446)
		T	74 (32.2)	30 (38.5)	0.3102	74 (32.2)	14(30.4)	0.8173	74 (32.2)	16 (50)	0.0466

Laburdurak: B-LLA, B zelulen leuzemia linfoblastiko akutua; VCR, vinkristina; miRNA, mikroRNA; SNP, nukleotido bakarrekoko polimorfismoa; Tox, toxizitatea; OR, odds ratio; KT, konfiantza tarte; Kr, kromosoma; NA, ez eskuragarri.

Oharrak: letra lodiek P-balio esanguratsuak adierazten dituzte.

16. taula. Hautzaroko LLA-n indukzio fasean VCR-k induzitutako neurotoxizitatearekin asoziatutako hamabi miRNA SNP-en zerrenda (Jarraipena).

miRNA SNP	Posizioa Kokapena	Genotipoa /Aleloa	1-4 graduko Tox (n=175)		Eredua OR. (% 95 KT) P-balioa	1-2 graduko Tox (n=156)		Eredua OR. (% 95 KT) P-balioa	3-4 graduko Tox (n=147)		Eredua OR. (% 95 KT) P-balioa
			EZ Tox N=128	Tox N=47		EZ Tox N=128	Tox N=28		EZ Tox N=128	Tox N=19	
hsa-mir-1208 rs2648841	Kr.: 8 pre-miRNA	CC	88 (77.9)	23 (60.5)	Dominantea	88 (77.9)	12 (54.5)	Dominantea	88 (77.9)	11 (68.8)	Dominantea
		AC	22 (19.5)	14 (36.8)	2.30 (1.04-5.05)	22 (19.5)	10 (45.5)	2.93 (1.13-7.58)	22 (19.5)	4 (25.0)	1.60 (0.51-5.04)
		AA	3 (2.7)	1 (2.6)	0.0410	3 (2.7)	0 (0.0)	0.0291	3 (2.7)	1 (6.2)	0.4323
		C	198 (87.6)	60 (78.9)	1.886 (0.957-3.718)	198 (87.6)	34 (77.3)	2.080 (0.927-4.668)	198 (87.6)	26 (81.3)	1.632 (0.617-4.313)
		A	28 (12.4)	16 (21.1)	0.0640	28 (12.4)	10 (22.7)	0.0712	28 (12.4)	6 (18.8)	0.3195
hsa-mir-5090 rs3823658	Kr.: 7 in_seed	GG	95 (81.9)	25 (65.8)	Dominantea	95 (81.9)	14 (63.6)	Dominantea	95 (81.9)	11 (68.8)	Dominantea
		AG	19 (16.4)	12 (31.6)	2.35 (1.04-5.34)	19 (16.4)	8 (36.4)	2.59 (0.96-6.95)	19 (16.4)	4 (25.0)	2.06 (0.65-6.55)
		AA	2 (1.7)	1 (2.6)	0.0444	2 (1.7)	0 (0.0)	0.0677	2 (1.7)	1 (6.2)	0.2387
		G	209 (90.1)	62 (81.6)	2.052 (0.996-4.225)	209 (90.1)	36 (81.8)	2.02 (0.839-4.863)	209 (90.1)	26 (81.3)	2.097 (0.782-5.624)
		A	23 (9.9)	14 (18.4)	0.0477	23 (9.9)	8 (18.2)	0.1113	23 (9.9)	6 (18.8)	0.1340
hsa-mir-202 rs12355840	Kr.: 10 pre-miRNA	TT	62 (63.3)	18 (47.4)	Dominantea	62 (63.3)	8 (36.4)	Dominantea	62 (63.3)	10 (62.5)	Errezesiboa
		CT	31 (31.6)	19 (50.0)	1.91 (0.90-4.08)	31 (31.6)	14 (63.6)	3.01 (1.15-7.88)	31 (31.6)	5 (31.2)	1.24 (0.14-11.36)
		CC	5 (5.1)	1 (2.6)	0.0926	5 (5.1)	0 (0.0)	0.0215	5 (5.1)	1 (6.2)	0.8522
		T	155 (79.1)	55 (72.4)	1.443 (0.785-2.655)	155 (79.1)	30 (68.2)	2.140 (1.043-4.391)	155 (79.1)	25 (78.1)	1.059 (0.428-2.619)
		C	41 (20.9)	21 (27.6)	0.2363	41 (20.9)	14 (31.8)	0.12	41 (20.9)	7 (21.9)	0.9021
hsa-mir-4326 rs6062431	Kr.: 20 pre-miRNA	GG	59 (51.8)	26 (68.4)	Dominantea	59 (51.8)	17 (77.3)	Dominantea	59 (51.8)	9 (56.2)	Errezesiboa
		CG	41 (36.0)	10 (26.3)	0.50 (0.23-1.08)	41 (36.0)	4 (18.2)	0.32 (0.11-0.91)	41 (36.0)	6 (37.5)	0.48 (0.06-3.89)
		CC	14 (12.3)	2 (5.3)	0.0699	14 (12.3)	1 (4.5)	0.0229	14 (12.3)	1 (6.2)	0.4478
		G	159 (69.7)	62 (81.6)	0.52 (0.273-0.992)	159 (69.7)	38 (86.4)	0.364 (0.147-0.900)	159 (69.7)	24 (75)	0.77 (0.329-1.795)
		C	69 (30.3)	14 (18.4)	0.0448	69 (30.3)	6 (13.6)	0.0238	69 (30.3)	8 (25)	0.5414
mir-1908 rs174561	Kr.: 11 pre-miRNA	TT	67 (61.5)	17 (44.7)	Dominantea	67 (61.5)	14 (63.6)	Errezesiboa	67 (61.5)	3 (18.8)	Dominantea
		CT	36 (33.0)	20 (52.6)	1.97 (0.93-4.16)	36 (33.0)	8 (36.4)	0 (0.0)	36 (33.0)	12 (75.0)	6.91 (1.86-25.70)
		CC	6 (5.5)	1 (2.6)	0.0738	6 (5.5)	0 (0.0)	0.5887	6 (5.5)	1 (6.2)	0.0011
		T	170 (78)	54 (71)	1.44 (0.800-2.604)	170 (78)	36 (81.8)	0.79 (0.343-1.806)	170 (78)	18 (56.3)	2.755 (1.277-5.940)
		C	48 (22)	22 (29)	0.2220	48 (22)	8 (18.2)	0.5712	48 (22)	14(43.7)	0.0079
hsa-mir-4745 rs10422347	Kr.: 19 5p in_mature; 3p pre-miRNA	CC	88 (78.6)	35 (89.7)	Dominantea	88 (78.6)	19 (82.6)	Dominantea	88 (78.6)	16 (100.0)	Dominantea
		CT	22 (19.6)	4 (10.3)	0.42 (0.14-1.30)	22 (19.6)	4 (17.4)	0.77 (0.24-2.48)	22 (19.6)	0 (0.0)	0 (0.0)
		TT	2 (1.8)	0 (0.0)	0.1043	2 (1.8)	0 (0.0)	0.6581	2 (1.8)	0 (0.0)	0.0409
		C	198 (88.4)	74 (94.9)	0.412 (0.139-1.219)	198 (88.4)	42 (91.3)	0.73 (0.240-2.188)	198 (88.4)	32 (100)	0 (-)
		T	26 (11.6)	4 (5.1)	0.0994	26 (11.6)	4 (8.7)	0.5671	26 (11.6)	0 (0)	0.0420

Laburdurak: B-LLA, B zelulen leuzemia linfoblastiko akutua; VCR, vinkristina; miRNA, mikroRNA; SNP, nukleotido bakarrekoko polimorfismoa; Tox, toxizitatea; OR, odds ratio; KT, konfiantza tarte; Kr, kromosoma; NA, ez eskuragarri.

Oharrak: letra lodiek P-balio esanguratsuak adierazten dituzte.

17. taula. Hautzaroko LLA-n VCR-k induzitutako neurotoxizitate globalarekin asoziatutako hamabi SNP-en zerrenda.

miRNA SNP	Posizioa Kokapena	Genotipoa /Aleloa	1-4 graduko Tox (n=175)		Eredua OR. (% 95 KT) P-balioa/D zuzend. P	1-2 graduko Tox (n=152)		Eredua OR. (% 95 KT) P-balioa/D zuzend. P	3-4 graduko Tox (n=144)		Eredua OR. (% 95 KT) P-balioa/D zuzend. P
			EZ Tox N=120	Tox N=55		EZ Tox N=120	Tox N=32		EZ Tox N=120	Tox N=24	
hsa-mir-3117 rs12402181	Kr.: 1 in_seed	GG	72 (65.5)	40 (88.9)	Dominantea	72 (65.5)	23 (85.2)	Dominantea	72 (65.5)	18 (90.0)	Dominantea
		AG	35 (31.8)	5 (11.1)	0.24 (0.09-0.65)	35 (31.8)	4 (14.8)	0.33 (0.11-1.02)	35 (31.8)	2 (10.0)	0.21 (0.05-0.96)
		AA	3 (2.7)	0 (0.0)	0.0017/0.0026	3 (2.7)	0 (0.0)	0.0357/0.0464	3 (2.7)	0 (0.0)	0.0173/0.0272
		G	179 (81.4)	85 (94.4)	0.271 (0.104-0.710)	179 (81.4)	50 (92.6)	0.349 (0.119-1.022)	179 (81.4)	38 (95)	0.23 (0.053-0.991)
		A	41 (18.6)	5 (5.6)	0.0033	41 (18.6)	4 (7.4)	0.0460	41 (18.6)	2 (5)	0.0327
hsa-mir-4481 rs7896283	Kr.: 10 pre-miRNA	AA	45 (49.5)	11 (24.4)	Dominantea	45 (49.5)	6 (22.2)	Dominantea	45 (49.5)	5 (25)	Dominantea
		AG	36 (39.6)	22 (48.9)	3.02 (1.37-6.69)	36 (39.6)	13 (48.1)	3.42 (1.26-9.27)	36 (39.6)	9 (45)	2.93 (0.98-8.75)
		GG	10 (11.0)	12 (26.7)	0.0045/0.0103	10 (11.0)	8 (29.6)	0.0099/0.0186	10 (11.0)	6 (30)	0.0416/0.0838
		A	126 (69.2)	44 (48.9)	2.352 (1.399-3.955)	126 (69.2)	25 (46.3)	2.61 (1.403-4.855)	126 (69.2)	19 (47.5)	2.487 (1.240-4.987)
		G	56 (30.8)	46 (51.1)	0.0011	56 (30.8)	29 (53.7)	0.0020	56 (30.8)	21 (52.5)	0.0089
hsa-mir-646 rs6513496	Kr.: 20 pre-miRNA	TT	64 (58.7)	35 (77.8)	Dominantea	64 (58.7)	22 (81.5)	Dominantea	64 (58.7)	13 (65.0)	Dominantea
		CT	39 (35.8)	8 (17.8)	0.41 (0.18-0.90)	39 (35.8)	4 (14.8)	0.32 (0.11-0.92)	39 (35.8)	6 (30.0)	0.77 (0.28-2.07)
		CC	6 (5.5)	2 (4.4)	0.0214/0.0102	6 (5.5)	1 (3.7)	0.0221/0.0135	6 (5.5)	1 (5.0)	0.5959
		T	167 (76.6)	78 (86.7)	0.504 (0.254-0.998)	167 (76.6)	48 (88.9)	0.409 (0.166-1.012)	167 (76.6)	32 (80)	0.819 (0.355-1.888)
		C	51 (23.4)	12 (13.3)	0.0465	51 (23.4)	6 (11.1)	0.0471	51 (23.4)	8 (20)	0.6384
hsa-mir-4432 rs243080	Kr.: 2 pre-miRNA	CC	33 (31.1)	10 (22.7)	Errezesiboa	33 (31.1)	6 (23.1)	Errezesiboa	33 (31.1)	4 (20.0)	Errezesiboa
		CT	51 (48.1)	17 (38.6)	2.40 (1.12-5.18)	51 (48.1)	11 (42.3)	2.02 (0.79-5.15)	51 (48.1)	8 (40.0)	2.55 (0.93-6.99)
		TT	22 (20.8)	17 (38.6)	0.0261/0.0230	22 (20.8)	9 (34.6)	0.1482	22 (20.8)	8 (40.0)	0.0769
		C	117 (55.2)	37 (42)	1.698 (1.027-2.806)	117 (55.2)	23 (44.2)	1.553 (0.843-2.859)	117 (55.2)	16 (40)	1.847 (0.928-3.676)
		T	95 (44.8)	51 (58)	0.0381	95 (44.8)	29 (55.8)	0.1560	95 (44.8)	24 (60)	0.0776
hsa-mir-449c rs35770269	Kr.: 5 in_seed	AA	55 (50.5)	14 (31.1)	Dominantea	55 (50.5)	12 (44.4)	Errezesiboa	55 (50.5)	3 (15.0)	Dominantea
		AT	39 (35.8)	27 (60.0)	2.26 (1.08-4.70)	39 (35.8)	14 (51.9)	0.24 (0.03-1.91)	39 (35.8)	14 (70.0)	5.77 (1.60-20.83)
		TT	15 (13.8)	4 (8.9)	0.0264/0.0351	15 (13.8)	1 (3.7)	0.1046	15 (13.8)	3 (15.0)	0.0020/0.0029
		A	149 (68.3)	55 (61.1)	1.374 (0.824-2.291)	149 (68.3)	38 (70.4)	0.909 (0.475-1.742)	149 (68.3)	20 (50)	2.159 (1.091-4.272)
		T	69 (31.7)	35 (38.9)	0.2219	69 (31.7)	16 (29.6)	0.7742	69 (31.7)	20 (50)	0.0248
hsa-mir-5197 rs2042253	Kr.: 5 pre-miRNA	AA	59 (53.6)	32 (72.7)	Dominantea	59 (53.6)	20 (76.9)	Dominantea	59 (53.6)	13 (65.0)	Dominantea
		AG	48 (43.6)	11 (25.0)	0.43 (0.20-0.93)	48 (43.6)	5 (19.2)	0.35 (0.13-0.93)	48 (43.6)	7 (35.0)	0.62 (0.23-1.68)
		GG	3 (2.7)	1 (2.3)	0.0269/0.0175	3 (2.7)	1 (3.8)	0.0259/0.0187	3 (2.7)	0 (0.0)	0.3429
		A	166 (75.5)	75 (85.2)	0.533 (0.274-1.035)	166 (75.5)	45 (86.5)	0.478 (0.204-1.123)	166 (75.5)	33 (82.5)	0.652 (0.273-1.559)
		G	54 (24.5)	13 (14.8)	0.0604	54 (24.5)	7 (13.5)	0.0848	54 (24.5)	7 (17.5)	0.3334

Laburdurak: B-LLA, B zelulen leuzemia linfoblastiko akutua; VCR, vinkristina; miRNA, mikroRNA; SNP, nukleotido bakarrekoko polimorfismoa; Tox, toxizitatea; OR, odds ratio; KT, konfiantza tarte; D zuzend. P; dosiak zuzendutako p-balioa; Kr, kromosoma; NA, ez eskuragarri.

Oharrak: letra lodiek P-balio esanguratsuak adierazten dituzte.

17. taula. Hautzaroko LLA-n VCR-k induzitutako neurotoxizitate globalarekin asoziatutako hamabi SNP-en zerrenda (Jarraipena).

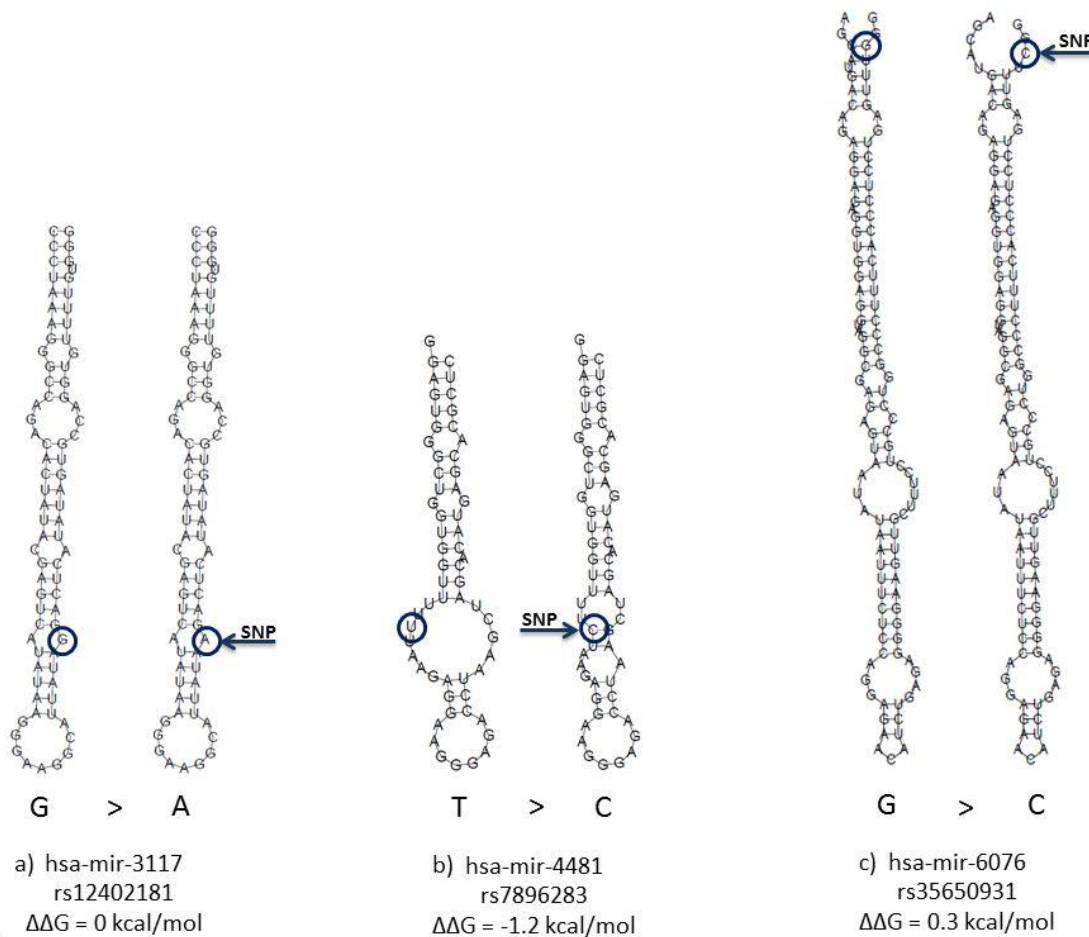
miRNA SNP	Posizioa Kokapena	Genotipoa /Aleloa	1-4 graduko Tox (n=175)		Eredua OR. (% 95 KT) P-balioa/D zuzend. P	1-2 graduko Tox (n=152)		Eredua OR. (% 95 KT) P-balioa/D zuzend. P	3-4 graduko Tox (n=144)		Eredua OR. (% 95 KT) P-balioa/D zuzend. P
			EZ Tox N=120	Tox N=55		EZ Tox N=120	Tox N=32		EZ Tox N=120	Tox N=24	
hsa-mir-1208 rs2648841	Kr.: 8 pre-miRNA	CC	84 (78.5)	27 (61.4)	Dominantea	84 (78.5)	15 (57.7)	Dominantea	84 (78.5)	12 (60.0)	Dominantea
		AC	20 (18.7)	16 (36.4)	2.30 (1.07-4.93)	20 (18.7)	11 (42.3)	2.68 (1.08-6.62)	20 (18.7)	7 (35.0)	2.43 (0.89-6.66)
		AA	3 (2.8)	1 (2.3)	0.0336/0.0237	3 (2.8)	0 (0.0)	0.0358/0.0243	3 (2.8)	1 (5.0)	0.0905
		C	188 (87.9)	70 (79.5)	1.859 (0.96-3.6)	188 (87.9)	41 (78.8)	1.94 (0.888-4.239)	188 (87.9)	31 (77.5)	2.099 (0.899-4.901)
		A	26 (12.1)	18 (20.5)	0.0630	26 (12.1)	11 (21.2)	0.0924	26 (12.1)	9 (22.5)	0.0813
hsa-mir-6128 rs67042258	Kr.: 11 pre-miRNA	GG	56 (50.9)	20 (44.4)	Errezesiboa	56 (50.9)	10 (37.0)	Errezesiboa	56 (50.9)	9 (45.0)	Errezesiboa
		AG	43 (39.1)	25 (55.6)	0 (0.0)	43 (39.1)	17 (63.0)	0 (0.0)	43 (39.1)	11 (55.0)	0 (0.0)
		AA	11 (10.0)	0 (0.0)	0.0347/0.0047	11 (10.0)	0 (0.0)	0.1211/0.0234	11 (10.0)	0 (0.0)	0.2130/0.0487
		G	155 (70.5)	65 (72.2)	0.917 (0.532-1.581)	155 (70.5)	37 (68.5)	1.096 (0.576-2.084)	155 (70.5)	29 (72.5)	0.905 (0.426-1.919)
		A	65 (29.5)	25 (27.8)	0.7556	65 (29.5)	17 (31.5)	0.7807	65 (29.5)	11 (27.5)	0.7936
hsa-mir-6504 rs74469188	Kr.: 16 in_mature	TT	75 (81.5)	29 (65.9)	Dominantea	75 (81.5)	18 (69.2)	Dominantea	75 (81.5)	13 (65.0)	Dominantea
		CT	17 (18.5)	13 (29.5)	2.28 (1.01-5.16)	17 (18.5)	7 (26.9)	1.96 (0.73-5.25)	17 (18.5)	6 (30.0)	2.38 (0.82-6.85)
		CC	0 (0.0)	2 (4.5)	0.0488/0.0321	0 (0.0)	1 (3.8)	0.1896	0 (0.0)	1 (5.0)	0.1189
		T	167 (90.8)	71 (80.7)	2.352 (1.137-4.868)	167 (90.8)	43 (82.7)	2.056 (0.857-4.931)	167 (90.8)	32 (80)	2.456 (0.977-6.172)
		C	17 (9.2)	17 (19.3)	0.0187	17 (9.2)	9 (17.3)	0.1008	17 (9.2)	8 (20)	0.0501
hsa-mir-577 rs34115976	Kr.: 4 pre-miRNA	CC	73 (67.6)	26 (57.8)	Errezesiboa	73 (67.6)	15 (55.6)	Errezesiboa	73 (67.6)	12 (60.0)	Dominantea
		CG	33 (30.6)	15 (33.3)	5.17 (0.91-29.32)	33 (30.6)	8 (29.6)	9.22 (1.59-53.37)	33 (30.6)	8 (40.0)	1.39 (0.52-3.71)
		GG	2 (1.9)	4 (8.9)	0.0541/0.0272	2 (1.9)	4 (14.8)	0.0107/0.0034	2 (1.9)	0 (0.0)	0.5137
		C	179 (82.9)	67 (74.4)	1.661 (0.919-3)	179 (82.9)	38 (70.4)	2.037 (1.029-4.033)	179 (82.9)	32 (80)	1.209 (0.516-2.835)
		G	37 (17.1)	23 (25.6)	0.0907	37 (17.1)	16 (29.6)	0.0386	37 (17.1)	8 (20)	0.6613
hsa-mir-4642 rs67182313	Kr.: 6 pre-miRNA	AA	71 (65.1)	32 (71.1)	Dominantea	71 (65.1)	15 (55.6)	Errezesiboa	71 (65.1)	18 (90.0)	Dominantea
		AG	35 (32.1)	11 (24.4)	0.76 (0.36-1.62)	35 (32.1)	10 (37.0)	2.83 (0.45-17.82)	35 (32.1)	2 (10.0)	0.21 (0.05-0.94)
		GG	3 (2.8)	2 (4.4)	0.4707	3 (2.8)	2 (7.4)	0.2912	3 (2.8)	0 (0.0)	0.0162/0.0168
		A	177 (81.2)	75 (83.3)	0.863 (0.451-1.654)	177 (81.2)	40 (74.1)	1.511 (0.753-3.034)	177 (81.2)	38 (95)	0.227 (0.053-0.980)
		G	41 (18.8)	15 (16.7)	0.6578	41 (18.8)	14 (25.9)	0.2436	41 (18.8)	2 (5)	0.0312
mir-1908 rs174561	Kr.: 11 pre-miRNA	TT	64 (62.1)	20 (45.5)	Dominantea	64 (62.1)	14 (53.8)	Errezesiboa	64 (62.1)	7 (35.0)	Dominantea
		CT	33 (32.0)	23 (52.3)	1.97 (0.96-4.02)	33 (32.0)	12 (46.2)	0 (0,0)	33 (32.0)	12 (60.0)	3.05 (1.12-8.30)
		CC	6 (5.8)	1 (2.3)	0.0620/0.0413	6 (5.8)	0 (0.0)	0.3472	6 (5.8)	1 (5.0)	0.0252/0.0095
		T	161 (78.2)	63 (71.6)	1.42 (0.804-2.508)	161 (78.2)	40 (76.9)	1.073 (0.52-2.216)	161 (78.2)	26 (65)	1.926 (0.929-3.993)
		C	45 (21.8)	25 (28.4)	0.2262	45 (21.8)	12 (23.1)	0.8482	45 (21.8)	14 (35)	0.0746

Laburdurak: B-LLA, B zelulen leuzemia linfoblastiko akutua; VCR, vinkristina; miRNA, mikroRNA; SNP, nukleotido bakarreko polimorfismoa; Tox, toxizitatea; OR, odds ratio; KT, konfiantza tarte; D zuzend. P; dosiak zuzendutako p-balioa; Kr, kromosoma; NA, ez eskuragarri.

Oharrak: letra lodiek P-balio esanguratsuak adierazten dituzte.

Analisi bioinformatikoak

- *Aldaera genetikoek pre-miRNA-en egitura sekundarioan duten efektua*
- rs12402181 SNP-a miR-3117-3p-ren *seed* eremuan kokatua zegoen. G aleloa A-rengatik ordezkatzean ez zen ez energia aldaketarik ezta egitura sekundarioaren asaldurarik ere agertu (18. irudia, a). MiR-4481-eko rs7896283-rentzat, pre-miRNA sekuentzian kokatua, T aleloa C aleloagatik ordezkatzek $-1,2$ kcal/mol-eko energia aldaketa ($\Delta\Delta G$) bat eragin zuen ($-17,3$ -tik $-18,5$ kcal/mol-era). Aldaketa aleliko honek egitura sekundarioaren aldaketa ere eragin zuen (18. irudia, b). MiR-6076-ko rs35650931-eri dagokionez, hau ere pre-miRNA sekuentzian kokatua, G aleloa C aleloagatik ordezkatzek $0,3$ kcal/mol-eko energia aldaketa xume bat ($-41,20$ -tik $-40,90$ kcal/mol-era) eta egitura sekundarioaren aldaketa eragin zituen (18. irudia, c).



18. irudia. MiRNA-tako SNP esanguratsuenen (a. miR-3117, b. miR-4481 eta c. miR-6076) energia aldaketak ($\Delta\Delta G$) eta gutxieneko energia-aske egiturak, alelo ezberdinen presentzia dela eta, RNAfold web tresnatik erazita. MiRNA bakoitzarentzat SNP-en aleloak zirkulu baten barnean daude eta geziak aldaera aleloa markatzen du.

- *Ituen iragarpena eta bidezidorren analisia*

Lehenengo estrategia jarraituz, miRNA-en ituak bilatu genituen VCR-ren PK/PD-ko geneen artean. MiR-3117-rentzat bi garraiatzailerren geneak, *ABCC1* eta *RALBP1* (17. irudia), aurkitu genituen miR-4481 edo miR-6076-rentzat aldiz bat bera ere ez.

MiR-4481 eta miR-6076-rentzat bigarren estrategia batean, bidezidorren aberaste analisiak burutu ziren neurotoxizitatearekin erlazioatutako beste gene batzuk aurkitzeko asmoz. MiR-4481-entzat, 5 bidezidor posible aurkitu genituen, eta haietako lau nerbio sistemarekin erlazioatuak zeuden (18. taula). Axi-gidatze bidezidorra izan zen bidezidorrik esanguratsuena eta Reactome ($p = 1,36 \times 10^{-7}$) zein KEGG ($p = 7,83 \times 10^{-6}$) datu baseek identifikatu zuten. MiR-4481-ek guztira bidezidor honetako 40 gene zituen itutzat (19. taula). Beste bi bidezidorrak sinapsi-glutamartegikoarena eta sistema-neuronalea izan ziren. MiR-6076-ri dagokionez, ez genuen neurotoxizitatearekin erlazioatutako bidezidorrik aurkitu lehen itxuran behintzat.

18. taula. ConsensusPath datu-baseko bidezidorren aberaste analisi bidez miR-4481-entzat iragarritako bost bidezidorren zerrenda.

Zb.	Bidezidorra	Datu basea	p-balioa	q-balioa	Tamaina	Edukitako kandidatuak
1	Axi-gidatzea	Reactome	1.36e-07	0.000146	487	33 (% 6.8)
2	Garapenaren Biologia	Reactome	4.59e-07	0.000246	748	42 (% 5.6)
3	Axi gidatzea - Homo sapiens (gizakia)	KEGG	7.83e-06	0.0028	177	16 (% 9.0)
4	Sinapsi Glutamatergikoa - Homo sapiens (gizakia)	KEGG	4.26e-07	0.00023	114	12 (% 10.5)
5	Sistema neuronal	Reactome	5.94e-05	0.0127	251	22 (% 6.3)

19. taula. *In-silico* iragarritako axoi-gidatze bidezidorreko geneak miR-4481-en itu geneekin gainjartzen direnak Reactome edo KEGG datu baseen arabera.

Entrez-gene	Genearen izena	Datu basea
8829	NRP1 : neuropilin 1	Reactome, KEGG
2046	EPHA8 : EPH receptor A8	Reactome, KEGG
5362	PLXNA2 : plexin A2	Reactome, KEGG
1943	EFNA2 : ephrin A2	Reactome, KEGG
1944	EFNA3 : ephrin A3	Reactome, KEGG
10298	PAK4 : p21 (RAC1) activated kinase 4	Reactome, KEGG
3897	L1CAM : L1 cell adhesion molecule	Reactome, KEGG
9901	SRGAP3 : SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3	Reactome, KEGG
137970	UNC5D : unc-5 netrin receptor D	Reactome, KEGG
200734	SPRED2 : sprouty related EVH1 domain containing 2	Reactome
7408	VASP : vasodilator-stimulated phosphoprotein	Reactome
9260	PDLIM7 : PDZ and LIM domain 7	Reactome
1641	DCX : doublecortin	Reactome
6324	SCN1B : sodium voltage-gated channel beta subunit 1	Reactome
4629	MYH11 : myosin heavy chain 11	Reactome
9462	RASAL2 : RAS protein activator like 2	Reactome
8986	RPS6KA4 : ribosomal protein S6 kinase A4	Reactome
5156	PDGFRA : platelet derived growth factor receptor alpha	Reactome
8831	SYNGAP1 : synaptic Ras GTPase activating protein 1	Reactome
2906	GRIN2D : glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D	Reactome
8515	ITGA10 : integrin subunit alpha 10	Reactome
2263	FGFR2 : fibroblast growth factor receptor 2	Reactome
8874	ARHGEF7 : Rho guanine nucleotide exchange factor 7	Reactome
9826	ARHGEF11 : Rho guanine nucleotide exchange factor 11	Reactome
10048	RANBP9 : RAN binding protein 9	Reactome
55800	SCN3B : sodium voltage-gated channel beta subunit 3	Reactome
4627	MYH9 : myosin heavy chain 9	Reactome
64283	ARHGEF28 : Rho guanine nucleotide exchange factor 28	Reactome
784	CACNB3 : calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta 3	Reactome
6327	SCN2B : sodium voltage-gated channel beta subunit 2	Reactome
28964	GIT1 : GIT ArfGAP 1	Reactome
2886	GRB7 : growth factor receptor bound protein 7	Reactome
8682	PEA15 : phosphoprotein enriched in astrocytes 15	Reactome
5293	PIK3CD : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta	KEGG
6405	SEMA3F : semaphorin 3F	KEGG
6387	CXCL12 : C-X-C motif chemokine ligand 12	KEGG
10500	SEMA6C : semaphorin 6C	KEGG
7976	FZD3 : frizzled class receptor 3	KEGG
57715	SEMA4G : semaphorin 4G	KEGG
5535	PPP3R2 : protein phosphatase 3 regulatory subunit B, beta	KEGG

EZTABAIDA

Dagokigun ikerketan, 154 miRNA-tako 160 SNP eta VCR-ren neurotoxizitatearen arteko korrelazioa analizatu dugu indukzio fasean, espainiar LAL-SHOP 94/95/2005 protokoloekin homogeneoki tratatutako LLA-dun 155 haurretan. Eraitza interesgarriena eta esanguratsuena miR-3117-ko rs12402181-erentzat aurkitu zen, zeinen AA genotipoak VCR zeluletatik ateratzeko fluxua areagotu zezakeen *ABCC1* eta *RALBP1* geneak medio. Gainera, esangura maila baxuagoan bada ere, bigarren SNP interesgarri bat identifikatu zen, miR-4481-eko rs7896283, zeina axoi-gidatze bidezidorreko geneen erregulazioan inplikatuta egon zitekeen.

Ikerketa honetako eraitza esanguratsuena miR-3117-ko rs12402181-erentzat aurkitu zen, zeinetan AG+AA genotipoek neurotoxizitate periferikoa jasateko 0,2 bider arrisku txikiagoa erakutsi zuten eredu dominantearen baitan. Eraitza esanguratsu hau modu koherentean lortu zen analisi guztietan. SNP hau miR-3117-3p-ren *seed* eremuan kokatua dago, ondorioz, G aleloa A aleloarengatik ordezkatzek bere itu mRNA sekuentzien ezagutza zehatza kaltetuko luke. *In silico* analisisiek zehaztu zuten miR-3117-3p-k VCR-ren bi garraio gene zituela itutzat, *ABCC1* eta *RALBP1*. *ABCC1* geneak farmako anitzen erresistentziarako 1 proteina (MRP1) kodifikatzen du, zeinak bitartekotza lanak egiten dituen antineoplasiko talde zabal baten ATP-menpeko kanporatze fluxuan, VCR bezalako vinka alkaloideak barne (Franca et al., 2017; Kunicka and Soucek, 2014). Zinez, garraiatzailearen funtzioa kaltetuko luketen *ABCC1*-en baitako zenbait polimorfismo asoziatu dira dagoeneko VCR-rekin erlazionatutako neuropatiarekin (Franca et al., 2017; Lopez-Lopez et al., 2016). Bestalde, miR-3117-3p-ren ustezko bigarren itua, *RALBP1*, vinka alkaloideak zeluletatik ateratzeko prozesuan oso aktiboa den proteina gisa identifikatu da (Awasthi et al., 2005). *RALBP1*-en inhibizioa farmako pilaketarekin eta zitotoxizitate areagotuarekin asoziatu izan da (Drake et al., 2007). Ondorioz, rs12402181-en A aldaera aleloak miR-3117-3p-k *ABCC1* eta *RALBP1*-en mRNA-ei lotzeko duen gaitasunean eragingo luke, horrela beren adierazpena areagotuz. *ABCC1* eta *RALBP1* geneen adierazpen areagotuak VCR-ren zeluletatik kanporantzko fluxua areagotuko luke, VCR-ek induzitutako neurotoxizitate arrisku murrizketa azalduz. Rs12402181-ren efektuak zelulen VCR-rekiko sentsibilitatea jaisten duela dirudien arren, biziraupen orokorra (OS) eta gertaerarik gabeko biziraupena (EFS) analizatu zirenean ez zen asoziaziorik aurkitu (datuok ez dira erakusten).

Bigarren eraitza esanguratsuena miR-4481-eko rs7896283-ren CT+CC genotipoentzat behatu zen, zeintzuek indukzio fasean 2,62 bider neurotoxizitate (1-4 gradukoa) arrisku altuagoa erakutsi zuten eredu dominantearen baitan. SNP honek ere asoziazioa erakutsi zuen neurotoxizitate altuarekin (3-4 gradukoa), eta analisi globalak gauzatu zirenean esanguratsu

izaten jarraitu zuen. Rs7896283-ren C aleloa pre-miRNA sekuentzian kokatua dago eta T aleloa C aleloagatik ordezkatzek energia aldaketa negatibo bat eragiten du. Aldaketa honek miRNA-ren urkila egoera ezegonkor batetik egonkor batera ($\Delta\Delta G = -1,2$ kcal/mol) eraldatu lezake. Pre-miRNA egituraren egonkortasuna handitzeak miRNA helduaren produktua areagotuko lukeela proposatu da (Gong et al., 2012), eta horrela, bere itu geneen adierazpen murriztua ekarriko luke. Kasu honetan, ez genituen miR-4481-ren itu generik aurkitu VCR-ren PK edo PD-rekin erlazionatutako geneen artean. Hala ere, bidezidorren aberaste analisi bidez, VCR-k induzitutako neurotoxizitatean inplikaturik egon zitezkeen bost ustezko bidezidor aurkitu genituen. Nabarmenezko modukoa da bost bidezidor hauetatik lau nerbio sistemarekin erlazionatuak zeudela. Gainera, KEGG eta Reactome datu baseek axoi-gidatze bidezidorra iragarri zuten miR-4481-en itu bidezidor esanguratsua bezala. Axoi-gidatze bidezidorra nerbio periferikoen erregenerazio espontaneoan inplikaturik dago hauek kaltetuak daudenean (Chiono and Tonda-Turo, 2015). Beraz, rs7896283-ren C arrisku aleloak miR-4481-en egonkortasuna handitu lezake, honekin bere maila helduak areagotuz eta azken ondorio gisa itu geneen adierazpen murrizketa bat ekarriz. Horrela, nerbio periferikoen erregenerazioan inplikaturik dagoen geneen adierazpen murrizketa izan liteke areagotutako neuropatia periferikoaren azalpena.

VCR-k induzitutako neurotoxizitatearekin asoziazio esanguratsua erakutsi zuten beste 10 SNP aurkitu ziren indukzio fasean, zeintzuentzat ezin izan genuen funtzioa azaldu, adibidez miR-6076-ko rs35650931 (16. taula).

Ikerketa honek baditu aipatu beharreko zenbait muga, adibidez genotipazio teknikan izandako akats tasa erlatiboki altua. Hala ere, huts egite aukera altu hau ikerketa hasi zen unetik onartu zen, polimorfismo espezifikoak anplifikatzeko beste diseinu aukerarik ez zegoelako. Beste ahultasun posible bat SNP-ek FDR zuzenketa ondoren p-balio esanguratsua lortu ez zutela izan liteke. Hala ere, nabarmenezkoa da miR-3117-ko rs12402181-k FDR zuzenketa ondoren ia p-balio esanguratsua lortu zuela ($p = 0,06$), eta asoziazio hau modu koherentean lortu zen analisi guztietan. Honez gain, SNP honen eta neurotoxizitatearen arteko interakzio maila zehazteko botere estatistikoa % 70-koa izan zen, gure emaitzei indarra ematen diena. Modu kontrajarrian, bigarren SNP-arentzat botere estatistikoa % 54-koa izan zen soilik. Azkenik, itu geneak eta bidezidorrek zehazteko erabilitako datu-baseetako iragarpen algoritmoen zehazgabetasuna kontuan hartu behar dugu (Akhtar et al., 2016; Lee et al., 2015), hala ere, gaur egun muga hau onartu beharra dago.

Ikerketa honetan, miR-3117-3p-ren *seed* eremuan kokatutako rs12402181 eta miR-4481-en *pre-mature* sekuentziako rs7896283 identifikatu genituen VCR-k induzitutako neurotoxizitatearekin

esanguratsuki asoziatuak. MiR-3117-3p-ren kasuan, SNP-ak *ABCC1* and *RALBP1* itu geneekiko lotura galera eragin lezake, VCR-ren kanporaketa kaltetuz. MiR-4481-eri dagokionez, SNP-ak miRNA-aren mailetan eragin lezake eta ondorioz nerbio periferikoen erregenerazioan inplikaturako geneen adierazpenean aldaketak ekarri. Aurkikuntza hauek VCR-ren neurotoxizitatearekin asoziatutako miRNA-tako bi SNP-en inplikazio posiblea erakusten dute.

AITORPENAK

Ikerketa hau Eusko Jaurlaritzak sostengatu zuen (IT661-13 eta IT989-16). Espainiar Genotipazio Zentroaren (CeGen) sostengua eskertzen da.

INTERESEN GATAZKA

Egileek interes gatazka eza aitortzen dute.

ERREFERENTZIAK

Akhtar, M.M., Micolucci, L., Islam, M.S., Olivieri, F., and Procopio, A.D. (2016). Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Res.* 44, 24–44.

Awasthi, S., Hallene, K.L., Fazio, V., Singhal, S.S., Cucullo, L., Awasthi, Y.C., Dini, G., and Janigro, D. (2005). RLIP76, a non-ABC transporter, and drug resistance in epilepsy. *BMC Neurosci.* 6, 61.

Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., and Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav. Brain Res.* 125, 279–284.

Carozzi, V.A., Canta, A., and Chiorazzi, A. (2015). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? *Neurosci. Lett.* 596, 90–107.

Ceppi, F., Langlois-Pelletier, C., Gagne, V., Rousseau, J., Ciolino, C., De Lorenzo, S., Kevin, K.M., Cijov, D., Sallan, S.E., Silverman, L.B., et al. (2014). Polymorphisms of the vincristine pathway and response to treatment in children with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics* 15, 1105–1116.

Chiono, V., and Tonda-Turo, C. (2015). Trends in the design of nerve guidance channels in peripheral nerve tissue engineering. *Prog. Neurobiol.* 131, 87–104.

Diouf, B., Crews, K.R., Lew, G., Pei, D., Cheng, C., Bao, J., Zheng, J.J., Yang, W., Fan, Y., Wheeler, H.E., et al. (2015). Association of an inherited genetic variant with vincristine-related peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia. *JAMA* 313, 815–823.

Drake, K.J., Singhal, J., Yadav, S., Nadkar, A., Pungaliya, C., Singhal, S.S., and Awasthi, S. (2007). RALBP1/RLIP76 mediates multidrug resistance. *Int. J. Oncol.* 30, 139–144.

Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P., and Gretz, N. (2011). miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.* 44, 839–847.

Egbelakin, A., Ferguson, M.J., MacGill, E.A., Lehmann, A.S., Topletz, A.R., Quinney, S.K., Li, L., McCammack, K.C., Hall, S.D., and Renbarger, J.L. (2011). Increased risk of vincristine neurotoxicity associated with low CYP3A5 expression genotype in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* 56, 361–367.

Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Garapati, P., Gillespie, M., Hausmann, K., Haw, R., Jassal, B., Jupe, S., Korninger, F., McKay, S., et al. (2016). The Reactome pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 44, D481-7.

Franca, R., Rebora, P., Bertorello, N., Fagioli, F., Conter, V., Biondi, A., Colombini, A., Micalizzi, C., Zecca, M., Parasole, R., et al. (2017). Pharmacogenetics and induction/consolidation therapy toxicities in acute lymphoblastic leukemia patients treated with AIEOP-BFM ALL 2000 protocol. *Pharmacogenomics J.* 17, 4–10.

Gong, J., Tong, Y., Zhang, H.-M., Wang, K., Hu, T., Shan, G., Sun, J., and Guo, A.-Y. (2012). Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum. Mutat.* 33, 254–263.

Gruber, A.R., Lorenz, R., Bernhart, S.H., Neubock, R., and Hofacker, I.L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res.* 36, W70-4.

Gutierrez-Camino, A., Martin-Guerrero, I., Lopez-Lopez, E., Echebarria-Barona, A., Zabalza, I., Ruiz, I., Guerra-Merino, I., and Garcia-Orad, A. (2016). 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. *Pharmacogenet. Genomics* 26, 100–102.

Gutierrez-Camino, A., Oosterom, N., den Hoed, M.A.H., Lopez-Lopez, E., Martin-Guerrero, I., Pluijm, S.M.F., Pieters, R., de Jonge, R., Tissing, W.J.E., Heil, S.G., et al. (2017). The miR-1206 microRNA variant is associated with methotrexate-induced oral mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet. Genomics* 27, 303–306.

Hartman, A., van Schaik, R.H.N., van der Heiden, I.P., Broekhuis, M.J.C., Meier, M., den Boer, M.L., and Pieters, R. (2010). Polymorphisms in genes involved in vincristine pharmacokinetics or pharmacodynamics are not related to impaired motor performance in children with leukemia. *Leuk. Res.* 34, 154–159.

Iparraquirre, L., Gutierrez-Camino, A., Umerez, M., Martin-Guerrero, I., Astigarraga, I., Navajas, A., Sastre, A., Garcia de Andoin, N., and Garcia-Orad, A. (2016). MiR-pharmacogenetics of methotrexate in childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet. Genomics* 26, 517–525.

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

Kamburov, A., Stelzl, U., Lehrach, H., and Herwig, R. (2013). The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Res.* 41, D793-800.

Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., and Morishima, K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 45, D353–D361.

- Kunicka, T., and Soucek, P. (2014). Importance of ABCC1 for cancer therapy and prognosis. *Drug Metab. Rev.* 46, 325–342.
- Lee, Y.J.D., Kim, V., Muth, D.C., and Witwer, K.W. (2015). Validated MicroRNA Target Databases: An Evaluation. *Drug Dev. Res.* 76, 389–396.
- Li, M.-P., Hu, Y.-D., Hu, X.-L., Zhang, Y.-J., Yang, Y.-L., Jiang, C., Tang, J., and Chen, X.-P. (2016). MiRNAs and miRNA Polymorphisms Modify Drug Response. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13.
- Lopez-Lopez, E., Gutierrez-Camino, A., Bilbao-Aldaiturriaga, N., Pombar-Gomez, M., Martin-Guerrero, I., and Garcia-Orad, A. (2014). Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics* 15, 1383–1398.
- 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., et al. (2016). Vincristine pharmacokinetics pathway and neurotoxicity during early phases of treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics* 17, 731–741.
- Moore, A.S., Norris, R., Price, G., Nguyen, T., Ni, M., George, R., van Breda, K., Duley, J., Charles, B., and Pinkerton, R. (2011). Vincristine pharmacodynamics and pharmacogenetics in children with cancer: a limited-sampling, population modelling approach. *J. Paediatr. Child Health* 47, 875–882.
- Nakajima, M., and Yokoi, T. (2011). MicroRNAs from biology to future pharmacotherapy: regulation of cytochrome P450s and nuclear receptors. *Pharmacol. Ther.* 131, 330–337.
- Plasschaert, S.L.A., Groninger, E., Boezen, M., Kema, I., de Vries, E.G.E., Uges, D., Veerman, A.J.P., Kamps, W.A., Vellenga, E., de Graaf, S.S., et al. (2004). Influence of functional polymorphisms of the MDR1 gene on vincristine pharmacokinetics in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Pharmacol. Ther.* 76, 220–229.
- Postma, T.J., Benard, B.A., Huijgens, P.C., Ossenkoppele, G.J., and Heimans, J.J. (1993). Long-term effects of vincristine on the peripheral nervous system. *J. Neurooncol.* 15, 23–27.
- Sambrook, J, R.D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (New York: NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sullivan, K.M., Dean, A., and Soe, M.M. (2009). OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health. *Public Health Rep.* 124, 471–474.

Haurtzaroko leuzemia linfoblastiko akutuaren farmakoepigenetika: miRNA polimorfismoen inplikazioa hepatotoxizitatean

Umerez, Maitane^{1*}, PhD ikaslea; Gutierrez-Camino, Ángela^{1*}, PhD; Santos, Borja¹, PhD; Martín-Guerrero, Idoia¹, PhD; García de Andoin, Nagore^{2,3}, MD; Sastre, Ana⁴, MD; Navajas, Aurora^{5,6}, PhD; Astigarraga, Itziar^{3,5,6}, PhD; Garcia-Orad, Africa^{1,6}, PhD.

*Autore hauek egiletza partekatzen dute.

¹Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Medikuntza eta Odontologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Espainia; ²Onkohematologia Pediatriko Saila, Donostia Unibertsitate Ospitalea, Donostia, Espainia; ³Pediatria Saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV/EHU, Leioa, Espainia; ⁴Onkohematologia Pediatriko Saila, La Paz Unibertsitate Ospitalea, Madril, Espainia; ⁵Pediatria Saila, Gurutzeta Unibertsitate Ospitalea, Barakaldo, Espainia; ⁶BioCruces Osasun Ikerketa Institutua, Barakaldo, Espainia.

Laburpena

Helburuak: Hepatotoxizitatea haurtzaroko leuzemia linfoblastiko akutuaren (LLA) tratamenduan zehar azaltzen den farmakoek eragindako toxizitaterik ohikoenetako bat da. Gibelesko seinalizazio-bide espezifikoekin erlazionatutako gene ugari estuki kontrolatuak daude miRNA-engatik, eta miRNA-en funtzioa SNP-ek modulatu dezakete. Ondorioz, gure hipotesia miRNA-tako aldaerak farmakoek eragindako hepatotoxikotasunarekin asoziatu egon litezkeela da. **Metodoak:** 206 miRNA-tako 213 SNP analizatu genituen homogeneoki tratatutako LLA-dun 179 haurren kohorte batean. **Emaitzak:** SNP esanguratsuen FDR zuzenketa ondoren miR-1208-ko rs2648841 izan zen, segur aski bere itue geneen (*DHFR*, *MTR* eta *MTHFR*) efektua tarteko. **Ondorioak:** Emaitza hauek miRNA-tako SNP-ek kimioterapiaren toxizitatean duten eragin posiblea erakusten dute LLA-dun haurretan.

Hitz gakoak: Hepatotoxizitatea, SNP-ak, miRNA-ak, haurtzaroko leuzemia linfoblastiko akutua, kimioterapia, metotrexatoa.

SARRERA

Leuzemia linfoblastiko akutua (LLA) haurtzaroko minbizi mota ohikoena da, pediatriako gaitz onkohematologikoen % 30 zenbatzeraino herrialde garatuetan (Johnston et al., 2010). Azken hamarkadetan biziraupena igo da, % 90era iritsiz eta herrialde batzuetan gaudituz, neurri batean tratamendu protokoloetan egindako aurrerapenengatik (Pui et al., 2015). Hala ere, terapiaren arrakasta klinikoa gorabehera, sarri pazienteek toxizitatea jasaten dute, dosi jaitziera edo tratamenduaren gelditzea beharrezkoa eginez (Salazar et al., 2012), honek ekar dezakeen biziraupen kaltetzearekin. Testuinguru honetan, minbizi tratamenduen toxizitatea gutxitzearen garrantzia areagotu da (den Hoed et al., 2015).

Haurtzaroko LLA pazienteetan ematen den farmakoei loturiko toxizitaterik ohikoenetako bat hepatotoxizitatea da (Liu et al., 2017). Toxizitate hau, neurri batean serumeko aminotransferasen igoera bat bezala definitzen da, farmakoek eragindako hepatozitoen heriotzaren emaitza gisa. Haurtzaroko LLA pazienteen % 66,5-ak gutxi gorabehera gibel toxizitatea erakusten du LLA tratamenduan zehar punturen batean (Ladas et al., 2010). Hepatotoxizitatea garatzen den unea administratu den farmakoaren arabera izan daiteke (Iorga et al., 2017). Izatez, indukzio fasean zehar, Liu eta lankideek hepatotoxizitatea asparraginas (ASP) esposizioarekin lotu zuten, aldiz kontsolidazio fasean zehar, jakina da metotrexato (MTX) dosi altuek gibel toxizitatea eragiten dutela (Liu et al., 2017).

Zein fasetan ageri den kontuan izan gabe, medikuntzaren erronketako bat farmakoek eragindako hepatotoxizitatea zein pazienteek garatuko duten iragartzea da, dosia alde zurreratik doitu ahal izateko. Ildo honetan, ikerketa farmakogenetikoek aldaera genetikoen eta haurtzaroko LLA tratamenduan zeharreko hepatotoxizitatearen arteko asoziazioen berri eman dute (Erčulj et al., 2012; Gregers et al., 2010, 2015b; Liu et al., 2017). Adibidez, Liu eta lankideek Genoma Osoko Aldaera Genetikoen Asoziazio Ikerketa (GWAS) batean *PNPLA3*-ko rs738409 SNP-a identifikatu zuten irmoki asoziatuak hepatotoxizitatearekin LLA-dun haurretan indukzioan zehar (Liu et al., 2017), berriki erreplikaturako emaitza izanik (Gutierrez-Camino et al., 2017a). Kontsolidazioari dagokionez, hepatotoxizitatearen eragile nagusi gisa MTX-a kontsideratuz, ikerketa gehienek beren analisiak MTX-aren bidezidor farmakozinetiko eta farmakodinamikoetako aldaera gutxi batzuetara bideratu dituzte, adibide gisa, *RFC1* (80G>A) (Gregers et al., 2010), *ABCB1* (3435C>T) (Gregers et al., 2015a) edota *MTHFR* (677C>T eta 1298A>C) (Umerez et al., 2017), gibel toxizitate markatzaile argirik zehaztu gabe. Testuinguru honetan, farmakoepigenetika markatzaile iragarle berrien aurkikuntzarako erraminta gisa azaltzen da. Azpidiziplina honek mikroRNA-en (miRNA) (maila postranskripzionalean geneen

adierazpena erregulatzen duten RNA ez-kodifikatzaileak) azterketa hartzen du bere baitan eta miRNA-en adierazpen areagotuak edo gutxituak farmakoen eraginkortasuna sustatzen edo farmakoen funtzioa inhibitzen duten geneengan eragina izan dezakeela ematen du aditzera (Rukov et al., 2014). MiRNA-tako aldaera genetikoek bere maila zein funtzioa alda dezakete eta ondorioz bere itu geneen adierazpenean eragin. Izatez, zenbait ikerketek dagoeneko aurkitu dute farmakoek eragindako toxizitateen eta miRNA-tako SNP-en arteko asoziazioa (Amstutz et al., 2015; Gutierrez-Camino et al., 2017b; Iparraguirre et al., 2016; Zhan et al., 2012).

Egun, jakina da gibelego seinalizazio-bide espezifikoekin erlazionatutako gene ugari, farmakoen metabolismo zein garraioan parte hartzen dituztenak barne, estuki kontrolatuak daudela miRNA-engatik (Lauschke et al., 2017). Ondorioz, hipotesizat honako hau izan genezake: indukzioan ASP-rekin erlazionatutako geneak eta kontsolidazioan MTX-arekin erlazionatutako geneak itu gisa dituzten miRNA-tako aldaerak farmakoek eragindako hepatotoxikotasunarekin asoziatu egon litezke B-zelula aitzindarien leuzemia linfoblastiko akutua (B-LLA) duten haurretan. Ikerketa honetan, hepatotoxizitatearekin asoziatu egon zitezkeen miRNA-tako SNP guztiak (alelo urrienaren maiztasuna (AUM) $\geq 0,01$) aztertu genituen homogeneoki tratatutako B-LLA-dun haurren kohorte handi batean.

MATERIALAK ETA METODOAK

Pazienteak

Honakoa, hiru espainiar ospitaleetako Onkologia Pediatriko Unitateetan (Gurutzeta Unibertsitate Ospitalea, Donostia Unibertsitate Ospitalea, La Paz Unibertsitate Ospitalea, 2000 eta 2013 urte bitartean) B-LLA-z diagnostikatutako 179 haur espainiar barne hartu zituen atzera begirako ikerketa da. Paziente guztien edo beraien gurasoen idatzizko baimen informatua eskuratu zen lagin bilketa aurretik. Ikerketa honek Euskal Herriko Unibertsitatearen (UPV/EHU) onspena (CEISH/102R/2011) jaso zuen.

Tratamendua eta toxizitatearen ebaluazioa

Ikerketan sartu ziren paziente guztiak LAL-SHOP 94/99/2005 espainiar protokolo estandarraren baitan tratatu ziren homogeneoki. Indukzio fasean, asparraginas 5000-15000 μm^2 10 dosi administratu ziren, tratamendu besoaren arabera. Fase honetan zehar, vinkristina, daunorribizina, prednisona, ziklofosfamida eta metotrexato-zitarabina-hidrokortisona terapia intratekala ere eman ziren. LAL/SHOP 99 protokoloan arrisku altuko pazienteek, +15 egunean metotrexato 3 g/m^2 dosi bakar bat ere jaso zuten. Kontsolidazio fasean, pazienteak dosi altuko

MTX-aren hiru dosirekin (dosi bakoitza 3 edo 5 g/m²-koa), 6-merkaptopurinarekin, zitarabina lau dosirekin eta terapia intratekal hirukoitzaren lau dosirekin tratatu ziren.

Toxizitateari zegozkion datuak genotipoei itsu jaso ziren pazienteen historia kliniketarik, kasu guztietan bi ikertzaile aditu berberen eskutik. Gure analisiak aspartato aminotransferasa (AST) eta alanina aminotransferasa (ALT) igoera gisa neurtutako hepatotoxizitatean ardaztu genituen, pazienteen inklusio eta datu bilketa garaian indarrean zeuden gidei jarraiki (Bénichou, 1990; Robles-Diaz et al., 2014). Entzima hepatico hauek gutxienez astean behin neurtzen dira indukzio fasean zehar eta, kontsolidazioan zehar, nahitaezkoa da MTX administrazioaren ostean. Transaminasen mailak altu badaude, tratamendua atzeratzen da, bereziki kontsolidazio fasean. Hepatotoxizitatea MOE-ren irizpideetatik egokitutako Hematologia eta Onkologia Pediatriko Erakunde Espainiarraren estandarren arabera graduatu zen (ikus 8.taula). Transaminasen maila hepatotoxikotzat hartu zen 2 gradutik 4 gradura (> 2,6 x Normaltasunaren Goi Muga, ULN) eta hepatotoxikotasun altutzat 3 gradutik 4 gradura (> 5,1 x ULN). Plasmako AST edo ALT maila altuena jaso zen indukzioan eta kontsolidazioan. Gainera, gibel kaltea bilirrubinaren (BI) igoera gisa ere detektatu daitekeenez, datuok ere erregistratu ziren. BI toxizitatea 1 gradutik 4 gradura (> 1,1 x ULN) kontsideratu zen (ikus 8.taula). Baliorik altuena jaso zen indukzioan eta kontsolidazioan. Sexua eta adina bezalako beste datu batzuk ere sistematikoki jaso ziren historia klinikoetatik.

Gene eta polimorfismoen aukeraketa

MiRNA-en iturak gaur egun guztiz definituak ez daudela kontuan izanik, eta edozein miRNA zuzenki edo zeharka hepatotoxizitatearen garapenean zerikusia duten geneen erregulazioan inplikaturik egon litekeelako, ikerketa gauzatu zen unean (2014-ko maiatza) deskribatuak zeuden miRNA geneetako SNP guztiak aukeratu genituen. Guztirako 969 miRNA-tako 1910 SNP-en artetik europar/kaukasiar populazioan AUM > 0,01 zuten SNP-ak aukeratu genituen. SNP-en aukeraketarako, mirbase (<http://www.mirbase.org/>), miRNA SNIPER (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP2/index.php>), eta dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) datu-baseak erabili genituen, baita literaturaren araketa ere (ikus 11.taula).

Genotipazioa

ADN genomikoa erremisioan zeuden LLA-dun pazienteen odol periferiko edo hezur muintetik erauzi zen fenol-kloroformo metodoa erabiliz, aurrez deskribatu bezala (Sambrook, J, 2001). ADN-a PicoGreen (Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornia, AEB) bidez kuantifikatu zen.

Lagin bakoitzarentzat, 400 ng ADN genotipatu ziren Veracode teknologiadun GoldenGate Genotipazio Saiakuntza (Illumina Inc., San Diego, Kalifornia, AEB) erabiliz argitaratutako Illumina protokoloaren arabera. Datuak genotipoen *clustering* eta *calling*-erako GenomeStudio (Illumina Inc.) software bidez analizatu ziren. Lagin bikoiztuak eta CEPH hirukoak (Coriell Cell Repository, Camden, New Jersey, AEB) genotipatu ziren plaketan zehar. Transmisio-aleliko mendeliar akatsak edo genotipo diskordanteak erakusten zituzten SNPak analititik baztertu ziren.

Analisi estatistikoak

Transaminasen igoera bezala neurtutako hepatotoxizitatearen eta genotipoen arteko erlazioa indukzioan eta kontsolidazioan erregresio logistikoko modelo unibariante eta korrelazio koefiziente bidez neurtu zen. Adinak, sexuak eta MTX-aren dosiak eta maila plasmatikoek hepatotoxizitatean izan lezaketen efektu nahasle posiblea kontabilizatzeko erregresio logistikoko multibarianteak erabili ziren. Hepatotoxizitatearen eta polimorfismo genetikoaren arteko asoziazioa χ^2 edo Fisher-en froga zehatz bidez ebaluatu zen. Asoziazio efektuen tamaina odds ratio bidez estimatu zen. Eredu dominante eta errezesiboen arteko froga esanguratsua aukeratu zen. Kasu guztietan esangura maila % 5-ean ezarri zen. Emaizak konparaketa anitzetarako false discovery rate (FDR) zuzenketa bidez egokitu ziren (Benjamini et al., 2001). Analisisiak R v3.3.0. software bidez gauzatu ziren.

Analisi bioinformatikoak

- *MiRNA-en egitura sekundarioen iragarpena*

Emaizta esanguratsua erakutsi zituzten miRNA-entzat, RNAfold web tresna (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) (Gruber et al., 2008) erabili zen SNP-ek egitura sekundarioen gutxienerako energia aske eta urkila egituren energia aldaketan ($\Delta\Delta G$) zuten inpaktua kalkulatzeko.

- *Itu geneen aukeraketa*

MiRNA-en itu geneak miRWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html>) datu-basean oinarrituta aukeratu ziren (Dweep and Gretz, 2015). MiRWalk-en baitako 12 iragarpen programetarik, gutxienez 6 programek

konfirmatutako geneak aukeratu ziren soilik. ASP eta MTX-arekin potentzialki erlazonatutako geneak aukeratu ziren literaturaren araketa bidez eta Pharmacogenomic Knowledge Base (PharmGKB) (<https://www.pharmgkb.org/>) datu-basea erabiliz.

EMAITZAK

Pazienteen ezaugarriak

Ikerketa honetan guztira 179 paziente sartu genituen eta analisiak transaminasen igoeran oinarritu genituen. Transaminasen balioak eskuragarri izan ziren 170 pazienterentzat indukzio fasean eta 168-rentzat kontsolidazio fasean (20.taula). Indukzio fasean zehar, 170-etik 55-ek (%32,3) aurkeztu zuten transaminasa mailen igoera bat (≥ 2 gradukoa), haietatik 29-k (% 17,1) igoera altua (≥ 3 gradukoa) jasan zutelarik. Kontsolidazio fasean, 168 pazienteetatik 49-k (% 29,2) ≥ 2 graduko transaminasa igoera izan zuten, haietako 19-ren kasuan igoera altua (≥ 3 gradukoa) izan zelarik. Indukzio fasean transaminasa igoera jasan zuten pazienteetatik, soilik 20-k garatu zuten igoera hau kontsolidazio fasean zehar ere, eta ez zen toxizitateon arteko asoziaziorik aurkitu ($p = 0,16$). Ez genuen transaminasen eta aztertutako adin, sexu, MTX dosi eta MTX plasma maila kobarianteen arteko asoziaziorik aurkitu, hau horrela, ez genituen kobarianteak hurrengo asoziazio analisietan kontuan hartu.

20.taula. Pazienteen ezaugarriak.

Ezaugarriak	Indukzio fasea	Kontsolidazio fasea
Paziente kopurua	170	168
Sexua, n (%)		
Gizonezkoak	100 (58,8)	100 (59,5)
Emakumezkoak	70 (41,2)	68 (40,5)
Adina diagnostikoan, batezbestekoa \pm DE (urteak)		
Gizonezkoak	5,27 \pm 3,24	5,28 \pm 3,24
Emakumezkoak	4,91 \pm 3,28	4,98 \pm 3,30
Tratamendu protokoloa, n (%)		
LAL/SHOP 94/99	63 (37,1)	62 (36,9)
LAL/SHOP 2005	107 (62,9)	106 (63,1)
Hepatotoxizitatea, n (%)		
Transaminasen igoera	55 (32,3)	49 (29,2)
Bilirrubina igoera	29 (17,1)	14 (8,3)

Laburdurak: DE, desbideraketa estandarra.

BI-ri dagokionean, paziente gutxi batzuek aurkeztu zituzten maila toxikoak. Indukzioan, 29 pazientek zituzten BI maila altuak (haietatik lauk bakarrik izan zuten 1 gradukoa baino altuagoa zen toxizitatea) eta kontsolidazioan, 14 pazientek (soilik bik zuten 1 gradukoa ez zen toxizitatea) (20. taula).

Genotipazio emaitzak

Genotipazioa arrakasta 179 ADN laginetik 158-rentzat (% 88,3) eta 160 (% 75,12) SNP-entzat lortu zen. Genotipazioak huts egin zuen PCR amplifikazio ezagatik, kluster banaketarako intentsitate urriagatik edo klusterren definizio ezagatik.

Asoziazio azterketa

MiRNA-tako aldaera genetikoek transaminasen igoera gisa neurtutako hepatotoxizitatean eragina duten ikertzeko, arrakastaz genotipatutako 154 miRNA-tako 160 polimorfismoren eta gibel toxizitate datuen arteko asoziazioa neurtu genuen. Analisi hau indukzio eta kontsolidazio faseetan gauzatu zen, B-LLA-dun 158 haur espainiarren kohorte batean.

Indukzio fasean, ≥ 2 graduko hepatotoxizitatea analizatu genuenean, miR-4707, miR-3689d2 eta miR-300-en kokatutako hiru SNP aurkitu genituen esanguratsuki asoziatuak. Gure analisia hepatotoxizitate altura (≥ 3 gradukoa) zuzendu genuenean, asoziazioa miR-5197 eta miR-3936-en kokatutako bi SNP-entzat, aurkitu zen (21.taula). Haietatik bat bera ere ez zen esanguratsua izan FDR zuzenketaren ondoren.

21. taula. Indukzio fasean ≥ 2 graduko hepatotoxizitatearekin eta ≥ 3 graduko hepatotoxizitatearekin asoziatutako miRNA-tako SNP esanguratsuenak B-LLA pediatrikoan. Maiztasun genotipiko eta alelikoak.

miRNA SNP	Posizioa Kokapena	Genotipoa / Aleloak	Hepatotoxizitatea ≥ 2 gradukoa (n=170)		Eredua OR (% 95 KT) P-balioa/FDR	Hepatotoxizitatea ≥ 3 gradukoa (n=144)		Eredua OR (%95 KT) P-balioa
			EZ Tox n=115 (%)	TOX n= 55 (%)		EZ Tox n=115 (%)	TOX n=29 (%)	
miR-4707 rs2273626	Kr: 14 In seed	AA	25 (24,5)	21 (44,7)	Dominantea 0,40 (0,19-0,83) 0,014/0,59	25 (24,5)	9 (33,3)	Errezesiboa 1,62 (0,62-4,22) 0,328/0,648
		AC	56 (54,9)	15 (31,9)		56 (54,9)	10 (37,0)	
		CC	21 (20,6)	11 (23,4)		21 (20,6)	8 (29,6)	
		A	106 (52)	57 (60,6)	0,70 (0,42-1,15)	106 (52)	28 (51,9)	1,0 (0,55-1,83)
		C	98 (48)	37 (39,4)	0,162	98 (48)	26 (48,1)	0,988
miR-3689d2 rs62571442	Kr: 9 pre-miRNA	AA	26 (25,5)	13 (27,7)	Errezesiboa 2,46 (1,07-5,65) 0,035/0,59	26 (25,5)	7 (25,9)	Errezesiboa 2,44 (0,91-6,58) 0,085/0,648
		AG	61 (59,8)	20 (42,6)		61 (59,8)	12 (44,4)	
		GG	15 (14,7)	14 (29,8)		15 (14,7)	8 (29,6)	
		A	113 (55,4)	46 (48,9)	1,296 (0,74-2,11)	113 (55,4)	26 (48,1)	1,337 (0,73-2,43)
		G	91 (44,6)	48 (51,1)	0,299	91 (44,6)	28 (51,9)	0,342
miR-300 rs12894467	Kr: 14 pre-miRNA	CC	42 (40,8)	15 (31,9)	Errezesiboa 2,81 (1,01-7,83) 0,049/0,59	42 (40,8)	9 (33,3)	Errezesiboa 2,70 (0,80-9,05) 0,121/0,648
		CT	53 (51,5)	23 (48,9)		53 (51,5)	13 (48,1)	
		TT	8 (7,8)	9 (19,1)		8 (7,8)	5 (18,5)	
		C	137 (66,5)	53 (56,4)	1,53 (0,93-2,53)	137 (66,5)	31 (57,4)	1,47 (0,79-2,71)
		T	69 (33,5)	41 (43,6)	0,091	69 (33,5)	23 (42,6)	0,213
miR-5197 rs2042253	Kr: 5 pre-miRNA	AA	64 (62,7)	23 (48,9)	Dominantea 1,76 (0,87-3,53) 0,113/0,59	64 (62,7)	11 (40,7)	Dominantea 2,45 (1,03-5,83) 0,040/0,648
		AG	36 (35,3)	22 (46,8)		36 (35,3)	14 (51,9)	
		GG	2 (2,0)	2 (4,3)		2 (2)	2 (7,4)	
		A	164 (80,4)	68 (72,3)	1,568 (0,88-2,76)	164 (80,4)	36 (66,7)	2,05 (1,05-3,97)
		G	40 (19,6)	26 (27,7)	0,119	40 (19,6)	18 (33,3)	0,031
miR-3936 rs367805	Kr:5 pre-miRNA	GG	53 (52,5)	19 (40,4)	Dominantea 1,63 (0,81-3,28) 0,171/0,63	53 (52,5)	7 (25,9)	Dominantea 3,15 (1,23-8,12) 0,012/0,648
		AG	41 (40,6)	23 (48,9)		41 (40,6)	17 (63)	
		AA	7 (6,9)	5 (10,6)		7 (6,9)	3 (11,1)	
		G	147 (72,8)	61 (64,9)	1,446 (0,85-2,44)	147 (72,8)	31 (57,4)	1,98 (1,06-3,69)
		A	55 (27,2)	33 (35,1)	0,167	55 (27,2)	23 (42,6)	0,029

Laburdurak: B-LLA, B zelulen leuzemia linfoblastiko akutua; miRNA, mikroRNA; SNP, nukleotido bakarreko polimorfismoa; Tox, toxizitatea; OR, odds ratio; KT, konfiantza-tartea; FDR, False Discovery Rate; Kr, Kromosoma.

Oharrak: Letra lodiek P-balio esanguratsuenak adierazten dituzte.

Konsolidazio fasean, ≥ 2 graduko gibel toxizitatea analizatzerakoan, hiru SNP aurkitu ziren asoziatuak, miR-1208, miR-3615 eta miR-3144-n kokatuak. Analisiak hepatotoxizitate altura (≥ 3 gradukoa) mugatu zirenean, zortzi SNP, mir-4745, mir-4467, mir-5189, mir-1908, mir-5197, mir-4634 eta mir-4472-1, izan ziren esanguratsuki asoziatuak (22. eta 23. taulak). FDR zuzenketa ondoren, p-balio esanguratsua lortu zuen emaitza bakarra ≥ 2 graduko hepatotoxizitatea eta miR-1208-ko rs2648841 artekoa izan zen, zeinetan GT + TT genotipoak 0,1-bider gutxiagoko arriskua ($p = 0,00006$) erakutsi zuen. T aleloak toxizitate honekiko babeska eskaintzen du 0,0004-ko p-balio batekin. Analisiak hepatotoxizitate altuan (≥ 3 gradukoa) ardaztu zirenean ere asoziazio hau aurkitu zen ($p = 0,001$) (22. taula).

22. taula. Konsolidazio fasean ≥ 2 graduko hepatotoxizitatearekin eta ≥ 3 graduko hepatotoxizitatearekin asoziatuak miRNA-tako SNP esanguratsuenak B-LLA pediatrikoan. Maiztasun genotipiko eta alelikoak.

miRNA/SNP	Posizioa Kokapena	Genotipoa /Aleloak	Hepatotoxizitatea ≥ 2 gradukoa (n=168)		Eredua OR (%95 KI) P-balioa	Hepatotoxizitatea ≥ 3 gradukoa (n=138)		Eredua OR (%95 KI) P-balioa
			EZ Tox n=119 (%)	TOX n=49 (%)		EZ Tox n=119 (%)	TOX N=19 (%)	
miR-1208 rs2648841	Kr: 8 pre-miRNA	GG	68 (66,7)	40 (95,2)	Dominantea	68 (66,7)	18 (100)	Dominantea
		GT	31 (30,4)	2 (4,8)	0,10 (0,02-0,44)	31 (30,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
		TT	3 (2,9)	0 (0,0)	0,00006*	3 (2,9)	0 (0,0)	0,0016
		G	167 (81,9)	82 (97,6)	0,11 (0,02-0,46)	167 (81,9)	36 (100)	0
		T	37 (18,1)	2 (2,4)	0,0004	37 (18,1)	0 (0)	0,0055

Laburdurak: B-LLA, B zelulen leuzemia linfoblastiko akutua; miRNA, mikroRNA; SNP, nukleotido bakarreko polimorfismoa; Tox, toxizitatea; OR, odds ratio; KI, konfiantza-tartea; FDR, False Discovery Rate; Kr, Kromosoma.

Oharrak: *, esanguratsua FDR zuzenketa ondoren (0.0062); letra lodiek P-balio esanguratsuenak adierazten dituzte.

23. taula. Kontsolidazio fasean ≥ 2 graduko hepatotoxizitatearekin eta ≥ 3 graduko hepatotoxizitatearekin asoziatuako miRNA-tako SNP esanguratsuenak B-LLA pediatrikoan. Maiztasun genotipiko eta alelokoak.

miRNA/SNP	Posizioa Kokapena	Genotipoa / Aleloak	Hepatotoxizitatea ≥ 2 gradukoa (n=168)		Eredua OR (%95 KT) P-balioa/ P-balio zuzendua	Hepatotoxizitatea ≥ 3 gradukoa (n=138)		Eredua OR (%95 KT) P-balioa/P-balio zuzendua
			EZ Tox n=119 (%)	TOX n=49 (%)		EZ Tox n=119 (%)	TOX n=19 (%)	
miR-1208 rs2648841	Kr: 8 pre-miRNA	GG	68 (66,7)	40 (95,2)	Dominantea	68 (66,7)	18 (100)	Dominantea
		GT	31 (30,4)	2 (4,8)	0,10 (0,02-0,44)	31 (30,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
		TT	3 (2,9)	0 (0,0)	0,00006/0,0062	3 (2,9)	0 (0,0)	0,0016/0,16
		C	167 (81,9)	82 (97,6)	0,11 (0,026-0,468)	167 (81,9)	36 (100)	0
		A	37 (18,1)	2 (2,4)	0,0004	37 (18,1)	0 (0)	0,0055
miR-3615 rs745666	Kr: 17 pre-miRNA	CC	43 (40,6)	14 (34,1)	Errezesiboa	43 (40,6)	4 (22,2)	Dominantea
		CG	54 (50,9)	17 (41,5)	3,48 (1,30-9,33)	54 (50,9)	11 (61,1)	2,16 (0,52-8,88)
		GG	9 (8,5)	10 (24,4)	0,014/0,43	9 (8,5)	3 (16,7)	0,125/0,56
		C	140 (66)	45 (54,9)	1,59 (0,95-2,68)	140 (66)	19 (52,8)	1,74 (0,85-3,55)
		G	72 (34)	37 (45,1)	0,075	72 (34)	17 (47,2)	0,125
miR-3144 rs68035463	Kr: 6 pre-miRNA	CC	53 (50,0)	22 (53,7)	Errezesiboa	53 (50,0)	10 (58,8)	Errezesiboa
		AC	47 (44,3)	11 (26,8)	4,04 (1,31-12,50)	47 (44,3)	5 (29,4)	2,22 (0,41-12,04)
		AA	6 (5,7)	8 (19,5)	0,015/0,43	6 (5,7)	2 (11,8)	0,382/0,64
		C	153 (72,2)	55 (67,1)	1,273 (0,735-2,206)	153 (72,2)	25 (73,5)	0,934 (0,412-2,117)
		A	59 (27,8)	27 (32,9)	0,389	59 (27,8)	9 (26,5)	0,869
miR-4745 rs10422347	Kr:19 In mature	CC	89 (86,4)	30 (73,2)	Dominantea	89 (86,4)	10 (55,6)	Dominantea
		CT	13 (12,6)	10 (24,4)	2,33 (0,96-5,68)	13 (12,6)	7 (38,9)	5,09 (1,71-15,08)
		TT	1 (1,0)	1 (2,4)	0,066/0,59	1 (1)	1 (5,6)	0,004/0,21
		C	191 (92,7)	70 (85,4)	2,18 (0,97-4,89)	191 (92,7)	27 (75)	4,244 (1,69-10,64)
		T	15 (7,3)	12 (14,6)	0,0534	15 (7,3)	9 (25)	0,001
miR-4467 rs60871950	Kr:7 In mature	AA	26 (25,2)	16 (38,1)	Dominantea	26 (25,2)	10 (55,6)	Dominantea
		AG	45 (43,7)	17 (40,5)	0,55 (0,26-1,18)	45 (43,7)	6 (33,3)	0,27 (0,10-0,76)
		GG	32 (31,1)	9 (21,4)	0,127/0,59	32 (31,1)	2 (11,1)	0,012/0,41
		A	97 (47,1)	49 (58,3)	0,63 (0,381-1,062)	97 (47,1)	26 (72,2)	0,342 (0,157-0,746)
		G	109 (52,9)	35 (41,7)	0,082	109 (52,9)	10 (27,8)	0,005
miR-5189 rs35613341	Kr:16 pre-miRNA	CC	53 (50,5)	16 (38,1)	Dominantea	53 (50,5)	4 (22,2)	Dominantea
		CG	40 (38,1)	20 (47,6)	1,66 (0,80-3,44)	40 (38,1)	10 (55,6)	3,57 (1,10-11,55)
		GG	12 (11,4)	6 (14,3)	0,172/0,59	12 (11,4)	4 (22,2)	0,022/0,44
		C	146 (69,5)	52 (61,9)	1,40 (0,82-2,38)	146 (69,5)	18 (50)	2,28 (1,11-4,67)
		G	64 (30,5)	32 (38,1)	0,208	64 (30,5)	18 (50)	0,021
miR-1908 rs174561	Kr: 11 pre-miRNA	TT	55 (54,5)	27 (67,5)	Dominantea	55 (54,5)	14 (82,4)	Dominantea
		CT	39 (38,6)	12 (30,0)	0,58 (0,27-1,24)	39 (39,6)	3 (17,6)	0,26 (0,07-0,95)
		CC	7 (6,9)	1 (2,5)	0,153/0,59	7 (6,9)	0 (0,0)	0,023/0,44
		T	149 (73,8)	66 (82,5)	0,596 (0,30-1,15)	149 (73,8)	31 (91,2)	0,272 (0,08-0,92)
		C	53 (26,2)	14 (17,5)	0,120	53 (26,2)	3 (8,8)	0,027

Laburdurak: B-LLA, B zelulen leuzemia linfoblastiko akutua; miRNA, mikroRNA; SNP, nukleotido bakarrekoko polimorfismoa; Tox, toxizitatea; OR, odds ratio; KT, konfiantza-tartea; Kr, Kromosoma.

Oharrak: letra lodiek P-balio esanguratsuenak adierazten dituzte.

23. taula. Kontsolidazio fasean ≥ 2 graduko hepatotoxizitatearekin eta ≥ 3 graduko hepatotoxizitatearekin asoziatutako miRNA-tako SNP esanguratsuenak B-LLA pediatrikoan. Maiztasun genotipiko eta alelokoak. (Jarraipena)

miRNA/SNP	Posizioa Kokapena	Genotipoa / Aleloak	Hepatotoxizitatea ≥ 2 gradukoa (n=168)		Eredua OR (%95 KT) P-balioa/ P-balio zuzendua	Hepatotoxizitatea ≥ 3 gradukoa (n=138)		Eredua OR (%95 KT) P-balioa/ P-balio zuzendua
			EZ Tox n=119 (%)	TOX n=49 (%)		EZ Tox n=119 (%)	TOX n=19 (%)	
miR-5189 rs56292801	Kr:16 pre-miRNA	GG	58 (55,2)	19 (45,2)	Dominantea	58 (55,2)	5 (27,8)	Dominantea
		AG	39 (37,1)	19 (45,2)	1,49 (0,73-3,07)	39 (37,1)	11 (61,1)	3,21 (1,07-9,65)
		AA	8 (7,6)	4 (9,5)	0,272/0,593	8 (7,6)	2 (11,1)	0,029/0,44
		G	155 (73,8)	57 (67,9)	1,33 (0,76-2,31)	155 (73,8)	21 (58,3)	2,01 (0,97-4,17)
		A	55 (26,2)	27 (32,1)	0,303	55 (26,2)	15 (41,7)	0,057
miR-5197 rs2042253	Kr: 5 pre-miRNA	AA	65 (61,9)	22 (52,4)	Errezesiboa	65 (61,9)	9 (50)	Errezesiboa
		AG	39 (37,1)	17 (40,5)	8,00 (0,81-79,23)	39 (37,1)	7 (38,9)	13 (1,11-151,78)
		GG	1 (1,0)	3 (7,1)	0,050/0,59	1 (1)	2 (11,1)	0,036/0,44
		A	169 (80,5)	61 (72,6)	1,55 (0,8-2,8)	169 (80,5)	25 (69,4)	1,81 (0,82-3,98)
		G	41 (19,5)	23 (27,4)	0,140	41 (19,5)	11 (30,6)	0,134
miR-4634 rs7709117	Kr: 5 pre-miRNA	AA	23 (22,3)	8 (19,0)	Errezesiboa	23 (22,3)	2 (11,1)	Errezesiboa
		AG	63 (61,2)	24 (57,1)	1,58 (0,66-3,81)	63 (61,2)	9 (50)	3,22 (1,09-9,49)
		GG	17 (16,5)	10 (23,8)	0,314/0,606	17 (16,5)	7 (38,9)	0,040/0,44
		A	109 (52,9)	40 (47,6)	1,23 (0,74-2,05)	109 (52,9)	13 (36,1)	1,988 (0,95-4,13)
		G	97 (47,1)	44 (52,4)	0,413	97 (47,1)	23 (63,9)	0,062
miR-4472-1 rs28655823	Kr:8 In seed	GG	83 (79,0)	37 (88,1)	Dominantea	83 (79)	18 (100)	Dominantea
		CG	20 (19,0)	5 (11,9)	0,51 (0,18-1,45)	20 (19)	0 (0,0)	0 (0,0)
		CC	2 (1,9)	0 (0,0)	0,185/0,591	2 (1,9)	0 (0,0)	0,040/0,44
		G	186 (88,6)	79 (94)	0,491 (0,18-1,33)	186 (88,6)	36 (100)	0 (-)
		C	24 (11,4)	5 (6)	0,154	24 (11,4)	0 (0)	0,032

Laburdurak: B-LLA, B zelulen leuzemia linfoblastiko akutua; miRNA, mikroRNA; SNP, nukleotido bakarreko polimorfismoa; Tox, toxizitatea; OR, odds ratio; KT, konfiantza-tartea; Kr, Kromosoma.

Oharrak: letra lodiek P-balio esanguratsuenak adierazten dituzte.

BI-ri dagokionez, kontsolidazio fasean zehar, guztira 11 SNP izan ziren 1 gradutik 4 gradurako BI maila altuekin asoziatuak (24. taula). Kontsolidazioan zehar, guztira 4 SNP izan ziren asoziatuak.

Bat bera ere ez zen FDR zuzenketa ondoren esanguratsu mantendu (24. taula).

24. taula. Indukzio eta kontsolidazio faseetan zehar hiperbilirrubinemiarekin asoziatutako miRNA-tako SNP esanguratsuenak B-LLA pediatrikoan. Maiztasun genotipiko eta alelikoak.

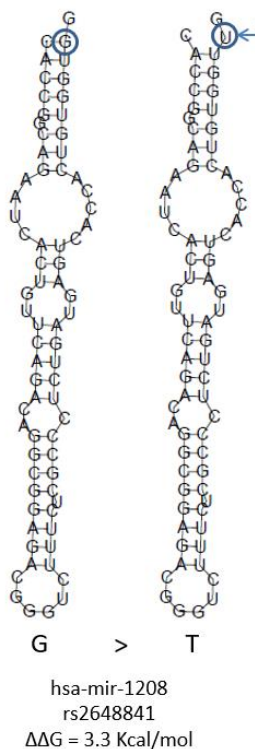
miRNA SNP	Posizioa Kokapena	Genotipoa Aleloak	Bilirrubina Induk (n=170)		Eredua OR (%95 KT) P-balioa	Bilirrubina Kons (n=168)		Eredua OR (%95 KT) P-balioa
			EZ Tox n=141 (%)	TOX n=29 (%)		EZ Tox n=154 (%)	TOX n=14 (%)	
hsa-mir-4634 rs7709117	Kr.: 5 pre-miRNA	AA	30 (24,8)	1 (3,8)	Dominantea	31 (23,5)	0 (0,0)	Errezesiboa
		AG	69 (57)	20 (76,9)	8,24 (1,07-63,44)	80 (60,6)	7 (53,8)	4,53 (1,38-14,83)
		GG	22 (18,2)	5 (19,2)	0,00639	21 (15,9)	6 (46,2)	0,01624
		A	129 (53,3)	22 (42,3)	1,557 (0,85-2,852)	142 (53,8)	7 (26,9)	3,159 (1,285-7,768)
		G	113 (46,7)	30 (57,7)	0,15	122 (46,2)	19 (73,1)	0,0089
hsa-mir-3188 rs7247237	Kr.: 19 pre-miRNA	CC	67 (54,5)	14 (51,9)	Errezesiboa	74 (54,8)	6 (46,2)	Dominantea
		CT	49 (39,8)	7 (25,9)	4,73 (1,45-15,49)	49 (36,3)	6 (46,2)	1,42 (0,45-4,43)
		TT	7 (5,7)	6 (22,2)	0,01351	12 (8,9)	1 (7,7)	0,5503
		C	183 (74,4)	35 (64,8)	1,577 (0,842-2,954)	197 (73)	18 (69,2)	1,199 (0,5-2,877)
		TT	63 (25,6)	19 (35,2)	0,1528	73 (27)	8 (30,8)	0,6835
hsa-mir-1208 rs2648841	Kr.: 8 pre- miRNA	GG	86 (71,7)	24 (92,3)	Dominantea	98 (74,8)	10 (76,9)	Errezesiboa
		GT	32 (26,7)	1 (3,8)	0,21 (0,05-0,94)	31 (23,7)	2 (15,4)	5,37 (0,45-63,69)
		TT	2 (1,7)	1 (3,8)	0,014847	2 (1,5)	1 (7,7)	0,2341
		G	204 (85)	49 (94,2)	0,347 (0,103-1,173)	227 (86,6)	22 (84,6)	1,179 (0,384-3,626)
		T	36 (15)	3 (5,8)	0,0761	35 (13,4)	4 (15,4)	0,7734
hsa-mir-4642 rs67182313	Kr.: 6 pre-miRNA	AA	88 (72,1)	13 (48,1)	Dominantea	88 (65,7)	10 (76,9)	Dominantea
		AG	31 (25,4)	12 (44,4)	2,79 (1,19-6,54)	41 (30,6)	3 (23,1)	0,57 (0,152-1,9)
		GG	3 (2,5)	2 (7,4)	0,01884	5 (3,7)	0 (0,0)	0,3978
		A	207 (84,8)	38 (70,4)	2,356 (1,192-4,654)	217 (81)	23 (88,5)	0,555 (0,16-1,92)
		G	37 (15,2)	16 (29,6)	0,0119	51 (19)	3 (11,5)	0,3463
hsa-mir-577 rs34115976	Kr.: 4 pre-miRNA	CC	71 (58,7)	22 (81,5)	Dominantea	83 (62,4)	9 (69,2)	Dominantea
		CG	44 (36,4)	4 (14,8)	0,32 (0,11-0,91)	43 (32,3)	4 (30,8)	0,74 (0,22-2,52)
		GG	6 (5)	1 (3,7)	0,02071	7 (5,3)	0 (0,0)	0,6224
		C	186 (76,9)	48 (88,9)	0,415 (0,169-1,021)	209 (78,6)	22 (84,6)	0,667 (0,221-2,013)
		G	56 (23,1)	6 (11,1)	0,0495	57 (21,4)	4 (15,4)	0,4693
hsa-mir-4636 rs257095	Kr.: 5 pre-miRNA	AA	95 (77,2)	18 (66,7)	Errezesiboa	103 (76,3)	8 (61,5)	Errezesiboa
		AG	28 (22,8)	7 (25,9)	0 (0,0)	31 (23,0)	4 (30,8)	11,17 (0,66-189,99)
		GG	0 (0)	2 (7,4)	0,03141	1 (0,7)	1 (7,7)	0,1265
		A	218 (88,6)	43 (79,6)	1,992 (0,922-4,303)	237 (87,8)	20 (76,9)	2,155 (0,807-5,754)
		GG	28 (11,4)	11 (20,4)	0,0753	33 (12,2)	6 (23,1)	0,1181
hsa-mir-6128 rs2682818	Kr.: 8 pre-miRNA	CC	97 (79,5)	21 (77,8)	Errezesiboa	109 (81,3)	8 (61,5)	Dominantea
		AC	25 (20,5)	4 (14,8)	0 (0,0)	23 (17,2)	5 (38,5)	2,72 (0,82-9,04)
		AA	0 (0)	2 (7,4)	0,03183	2 (1,5)	0 (0,0)	0,11531
		C	219 (89,8)	46 (85,2)	1,523 (0,646-3,59)	241 (89,9)	21 (80,8)	2,125 (0,741-6,093)
		A	25 (10,2)	8 (14,8)	0,333	27 (10,1)	5 (19,2)	0,1524

24. taula. Indukzio eta kontsolidazio faseetan zehar hiperbilirrubinemiarekin asoziatutako miRNA-tako SNP esanguratsuenak B-LLA pediatrikoan. Maiztasun genotipiko eta alelikoak (Jarraipena).

miRNA SNP	Posizioa Kokapena	Genotipoa	Bilirrubina Induk (n=170)		Eredua OR (%95 KT) P-balioa	Bilirrubina Kons (n=168)		Eredua OR (%95 KT) P-balioa
			Aleloak	EZ Tox n=141 (%)		TOX n=29 (%)	EZ Tox n=154 (%)	
hsa-mir-604 rs2368392	Kr.: 10 pre-miRNA	CC	75 (61)	13 (48,1)	Errezesiboa	80 (59,3)	6 (46,2)	Errezesiboa
		CT	46 (37,4)	11 (4,7)	7,56 (1,20-47,71)	52 (38,5)	5 (38,5)	8,00 (1,21-53,06)
		TT	2 (1,6)	3 (11,1)	0,03267	3 (2,2)	2 (15,4)	0,05213
		C	196 (79,7)	37 (68,5)	1,801 (0,938-3,46)	212 (78,5)	17 (65,4)	1,935 (0,82-4,566)
		T	50 (20,3)	17 (31,5)	0,0747	58 (21,5)	9 (34,6)	0,1264
hsa-mir-548ap rs4577031	Kr.: 15 pre-miRNA	AA	52 (42,3)	9 (33,3)	Errezesiboa	53 (39,3)	6 (46,2)	Errezesiboa
		AT	62 (50,4)	12 (44,4)	3,62 (1,17-11,24)	70 (51,9)	5 (38,5)	1,86 (0,37-9,41)
		TT	9 (7,3)	6 (22,2)	0,03337	12 (8,9)	2 (15,4)	0,4757
		A	166 (67,5)	30 (55,6)	1,66 (0,912-3,023)	176 (65,2)	17 (65,4)	0,991 (0,425-2,31)
		T	80 (32,5)	24 (44,4)	0,0955	94 (34,8)	9 (34,6)	0,9837
hsa-mir-548ap rs4414449	Kr.: 15 in_mature	TT	46 (40,4)	8 (30,8)	Errezesiboa	47 (37,9)	5 (38,5)	Errezesiboa
		CT	56 (49,1)	11 (42,3)	3,13 (1,09-8,98)	61 (49,2)	6 (46,2)	1,23 (0,25-6,05)
		CC	12 (10,5)	7 (26,9)	0,04092	16 (12,9)	2 (15,4)	0,805
		T	148 (64,9)	27 (51,9)	1,713 (0,932-3,147)	155 (62,5)	16 (61,5)	1,042 (0,454-2,391)
		C	80 (35,1)	25 (48,1)	0,0808	93 (37,5)	10 (38,5)	0,9233
hsa-mir-5197 rs2042253	Kr.: 5 pre-miRNA	AA	76 (62,3)	11 (40,7)	Dominantea	80 (59,7)	7 (53,8)	Dominantea
		AG	42 (34,4)	16 (59,3)	2,4 (1,03-5,63)	50 (37,3)	6 (46,2)	1,27 (0,40-3,99)
		GG	4 (3,3)	0 (0)	0,04115	4 (3,0)	0 (0,0)	0,6833
		A	194 (79,5)	38 (70,4)	1,634 (0,843-3,166)	210 (78,4)	20 (76,9)	1,086 (0,417-2,83)
		G	50 (20,5)	16 (29,6)	0,1434	58 (21,6)	6 (23,1)	0,8656
hsa-mir-4481 rs7896283	Kr.: 10 pre-miRNA	AA	43 (38,7)	11 (45,8)	Errezesiboa	46 (36,5)	7 (87,5)	Dominantea
		AG	46 (41,4)	12 (50,0)	0,18 (0,02-1,37)	59 (46,8)	0 (0)	0,08 (0,01-0,69)
		GG	22 (19,8)	1 (4,2)	0,03591	21 (16,7)	1 (12,5)	0,003636
		A	132 (59,5)	34 (70,8)	0,604 (0,307-1,189)	151 (59,9)	14 (87,5)	0,214 (0,048-0,96)
		G	90 (40,5)	14 (29,2)	0,142	101 (40,1)	2 (12,5)	0,0279
hsa-mir-5007 rs1572687	Kr.: 13 pre-miRNA	CC	37 (30,1)	12 (44,4)	Dominantea	39 (28,9)	8 (61,5)	Dominantea
		CT	64 (52,0)	8 (29,6)	0,54 (0,23-1,26)	70 (51,9)	2 (15,4)	0,25 (0,08-0,82)
		TT	22 (17,9)	7 (25,9)	0,15727	26 (19,3)	3 (23,1)	0,020464
		C	138 (56,1)	32 (59,3)	0,878 (0,483-1,598)	148 (54,8)	18 (69,2)	0,539 (0,227-1,283)
		T	108 (43,9)	22 (40,7)	0,6712	122 (45,2)	8 (30,8)	0,1572
hsa-mir-4671 rs877722	Kr.: 1 pre-miRNA	AA	91 (74,0)	19 (70,4)	Errezesiboa	97 (71,9)	13 (100)	Dominantea
		AT	28 (22,8)	6 (22,2)	2,38 (0,41-13,71)	32 (23,7)	0 (0,0)	0 (0,0)
		TT	4 (3,3)	2 (7,4)	0,3569	6 (4,4)	0 (0,0)	0,02199
		A	210 (85,4)	44 (81,5)	1,326 (0,612-2,87)	226 (83,7)	26 (100)	0 (-)
		T	36 (14,6)	10 (18,5)	0,4731	44 (16,3)	0 (0)	0,0257

rs2648841-ek miR-1208-en egitura sekundarioan duen efektuaren iragarpena

Analisia SNP esanguratsuenarekin gauzatu genuen, hots miR-1208-ko rs2648841-rekin. Kasu honetan, G aleloa T aleloarengatik ordezkatzek 3,3 kcal/mol-tako energia aldaketa eragin zuen (-26,1-etik -22,8 kcal/mol-tara). Ordezkapen honek egitura sekundarioaren aldaketa ere eragin zuen (19. irudia).



19. irudia. Alelo ezberdinen presentziagatik miRNA-ko SNP esanguratsuenaren energia aldaketa eta gutxieneko energia-aske egitura, RNAfold web tresnatik aterata.

miR-1208-en itu iragarpena

miR-1208-rentzako itu iragarpen analisia gauzatu genuenean, miRNA honek itutzat MTX-aren bidezidorretako bost gene zituela ikusi genuen, bidezidor farmakodinamikoko 3 gene, *DHFR*, *MTHFR* eta *MTR*, eta bidezidor farmakozinetikoko bi gene, *SLCO1A2* eta *SLC46A1* (20. irudia).

areagotzea ekarriko luke. MiR-1208-rentzat iragarritako ituen artean MTX-aren bidezidor farmakodinamikoko hiru gene aurkitzen ditugu, *DHFR*, *MTR* eta *MTHFR*, baita bidezidor farmakozinetikoko bi gene ere, *SLCO1A2* eta *SLC46A1*. Hauen artean, *DHFR* MTX-aren itu nagusia da (Wojtuszkiewicz et al., 2015), beraz, gene honen adierazpen altuago batek MTX-aren efektua arin lezake, hepatozitoen heriotza ekiditen lagunduz. Izatez, *DHFR*-ren adierazpen altua MTX-aren erresistentziarekin asoziatu da (Dulucq et al., 2008), honek azalduko lukeelarik rs2648841-ren T aleloak hepatotoxizitatean duen eginkizun babeslea. *MTR* (homozisteina metionina emateko metilatzen duen entzima) (Krajinovic et al., 2005) eta *MTHFR*-ri (aurreko erreakziorako metil taldea sortzen duen entzima) dagokienez (Krajinovic et al., 2005) (20. irudia), entzimon adierazpen altu batek emaitzatzat zelula barneko homozisteina mailen jaitsiera ekarriko luke. Homozisteina maila baxu hauek apoptosiarekiko babesa emango lukete (Kubota et al., 2014; Yang et al., 2017), berriro T aleloaren eginkizun babeslea azalduz. Bidezidor farmakozinetikoari dagokionez, *SLCO1A2* eta *SLC46A1* garraiatzaileek hepatotoxizitate mekanismoan eraginik ez dutela kontsideratzen dugu, izan ere garraiatzaile hauek MTX-a plasmatik gibel-zelulara barneratzeko prozesuan parte hartzen dute eta MTX-aren maila plasmaticoak gure kohortean ez zeuden transaminasen igoerarekin asoziatuak. Ondorioz, miR-1208-ko rs2648841-en T aleloak miRNA-ren egitura sekundarioa alda lezake, bere maila helduak gutxiagotuz. MiRNA mailen gutxitze honek bidezidor farmakodinamikoko itu geneen (*DHFR*, *MTR* eta *MTHFR*) adierazpen altuagoa ekar lezake, hepatozittoa apoptositik babestuz.

Bestalde, ikerketa honen beste emaitza interesgarri bat izan zen transaminasen igoerarekin asoziatuak SNP-ak desberdinak izan zirela indukzio eta kontsolidazio faseetan. Hau horrela, miR-1208-ko rs2648841, kontsolidazio faseko transaminasen igoerarekin asoziatuak egon zen espezifikoki, indukzio fasean p-balio esanguratsura iristetik urrun gelditu zelarik ($p = 0,21$). Gainera, indukzio fasean hepatotoxizitatea garatu zuten pazienteak kontsolidazio fasean garatu zutenen ezberdinak izan ziren, bi gertaeren arteko asoziaziorik egon ez zelarik. Ondorioz, datu guzti hauek fase bakoitzeko hepatotoxizitatea mekanismo desberdinak medio, farmako desberdinei lotua legokeela sostengatzen dute.

BI-ren analisisiei dagokienez, paziente gutxi aurkeztu zuten toxizitate hau indukzio eta kontsolidazioan eta SNP bat bera ere ez zen p-balio esanguratsua izatera iritsi FDR zuzenketa aplikatu ondoren. Interesgarria izango litzateke toxizitate hau kohorte handiago batean ikertzea.

Ikerketa honek baditu aipatu beharreko zenbait muga, adibidetzat genotipazio teknikan izandako akats tasa erlatiboki altua. Hala ere, arazo hau ikerketa hasi zen unetik onartu zen, polimorfismo espezifikook anplifikatzeko beste diseinu aukerarik ez zegoelako. Gainera, 6-

merkaptopurina bezala aldi berean emandako beste farmako batzuek ere hepatotoxizitatea sor lezakete. Honen harira, miR-1208-ren ituen artean *TPMT*, *ABCC5* eta *NT5C2* aurkitzen ditugu, 6-MP-ren bidezidorreko geneak. MiR-1208-ren maila murriztuek gene hauen adierazpen areagotzea eragin lezakete eta beraz 6-MP-ren inaktibazio (*TPMT*) altuago batera (Kotur et al., 2012; Maxwell and Cole, 2017), tiopurina eta haien metabolitoen hepatozitoetatiko irteera (*ABCC5*) altuago batera (Krajinovic et al., 2016; Teft et al., 2015) eta 6-tioinositol monofosfatoaren desfosforilazio eta inaktibazio (*NT5C2*) altuago batera (Tzoneva et al., 2013) lagundu, rs2648841-ren eginkizun babeslea azalduz. Azkenik, erabilitako datu-baseetako iragarpen algoritmoen zehazgabetasuna kontuan hartu behar dugu, hala ere, gaur egun muga hau onartu beharra dago.

Laburbilduz, kontsolidazio fasean transaminasen igoera gisa neurtutako hepatotoxizitatearekin asoziatu egon litezkeen 5 miRNA-tako 5 SNP aurkitu ditugu eta indukzio fasean asoziatu egon litezkeen beste 10 miRNA-tako 11 SNP, fase bakoitzerako hepatotoxizitate mekanismo desberdin bat iradokiz. Emaitzarik esanguratsuen miR-1208-ko rs2648841 izan zen, espezifikoki asoziatua kontsolidazio faseko hepatotoxizitate eta hepatotoxizitate altuarekin, seguraski *DHFR*, *MTR* eta *MTHFR* geneen adierazpen altuagoan duen eginkizunagatik. Interesgarria litzateke beste kohorte batean TT genotipoaren babes efektu indartsua balioztatzea.

Laburpena

- Hautzaroko LLA terapiaren arrakasta dela eta, toxizitatea murrizteak interesa irabazi du.
- Hepatotoxizitatea LLA tratamenduaren toxizitate ohikoenetako bat da, zeina indukzio fasean zehar ASP-gatik eta kontsolidazioan zehar MTX-agatik sortua egon litekeen.
- Farmakoepigenetika, miRNA-en ikerketa bere baitan hartzen duena, toxizitate markatzaile berriak identifikatzeko tresna gisa aurkeztu da.
- MiRNA-tako SNP-ek farmakoek eragindako hepatotoxizitatean izan dezaketen asoziazioa ikertu dugu tratamenduaren bi fase ezberdinetan LLA diagnostikodun haur espainiarren kohorte handi batean.
- Fase bakoitzeko hepatotoxizitatearen garapena ez dago erlazionatua, mekanismo ezberdinak inplikatuak egon litezkeela iradokiz.
- MiR-1208-ko rs2648841 transaminasen igoera gisa neurtutako hepatotoxizitatearekin eta hepatotoxizitate altuarekin asoziatua izan zen FDR zuzenketa ondoren kontsolidazio fasean zehar.
- MiR-1208-ko rs2648841-k miRNA mailak aldaraz ditzake eta beraz, bere itua geneen adierazpenean eragin.
- MiR-1208-ren ituen artean MTX-aren bidezidor farmakodinamikoko geneak aurkitzen ditugu, zeinak hepatozitoen heriotzan inplikatuak egon litezkeen.

AITORPENAK

Espaniar Genotipazio Zentroaren (CeGen) sostengua eskertzen da.

INTERESEN GATAZKA

Ez dago interes gatazkarik.

ERREFERENTZIAK

Amstutz, U., Offer, S.M., Sistonen, J., Joerger, M., Diasio, R.B., and Lardiader, C.R. (2015). Polymorphisms in MIR27A Associated with Early-Onset Toxicity in Fluoropyrimidine-Based Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 21, 2038–2044.

Bénichou, C. (1990). Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. *J Hepatol.* 11, 272–276.

Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., and Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav. Brain Res.* 125, 279–284.

Dulucq, S., St-Onge, G., Gagné, V., Ansari, M., Sinnett, D., Labuda, D., Moghrabi, A., and Krajcinovic, M. (2008). DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood* 111, 3692–3700.

Dweep, H., and Gretz, N. (2015). miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat. Methods* 12, 697.

Erčulj, N., Kotnik, B.F., Debeljak, M., Jazbec, J., and Dolžan, V. (2012). Influence of folate pathway polymorphisms on high-dose methotrexate-related toxicity and survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 53, 1096–1104.

Gong, J., Tong, Y., Zhang, H.-M., Wang, K., Hu, T., Shan, G., Sun, J., and Guo, A.-Y. (2012). Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum. Mutat.* 33, 254–263.

Gregers, J., Christensen, I.J., Dalhoff, K., Lausen, B., Schroeder, H., Rosthoej, S., Carlsen, N., Schmiegelow, K., and Peterson, C. (2010). The association of reduced folate carrier 80G>A polymorphism to outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia interacts with chromosome 21 copy number. *Blood* 115, 4671–4677.

Gregers, J., Gréen, H., Christensen, I.J., Dalhoff, K., Schroeder, H., Carlsen, N., Rosthoej, S., Lausen, B., Schmiegelow, K., and Peterson, C. (2015a). Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* 15, 372–379.

Gregers, J., Green, H., Christensen, I.J., Dalhoff, K., Schroeder, H., Carlsen, N., Rosthoej, S., Lausen, B., Schmiegelow, K., and Peterson, C. (2015b). Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* 15, 372–379.

Gruber, A.R., Lorenz, R., Bernhart, S.H., Neubock, R., and Hofacker, I.L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res.* 36, W70-4.

Gutierrez-Camino, A., Martin-Guerrero, I., and Garcia-Orad, A. (2017a). PNPLA3 rs738409 and Hepatotoxicity in Children With B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Validation Study in a Spanish Cohort. *Clin. Pharmacol. Ther.*

Gutierrez-Camino, A., Oosterom, N., den Hoed, M.A.H., Lopez-Lopez, E., Martin-Guerrero, I., Pluijm, S.M.F., Pieters, R., de Jonge, R., Tissing, W.J.E., Heil, S.G., et al. (2017b). The miR-1206 microRNA variant is associated with methotrexate-induced oral mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet. Genomics* 27, 303–306.

den Hoed, M.A.H., Lopez-Lopez, E., te Winkel, M.L., Tissing, W., de Rooij, J.D.E., Gutierrez-Camino, A., Garcia-Orad, A., den Boer, E., Pieters, R., Pluijm, S.M.F., et al. (2015). Genetic and metabolic determinants of methotrexate-induced mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* 15, 248–254.

Iorga, A., Dara, L., and Kaplowitz, N. (2017). Drug-Induced Liver Injury: Cascade of Events Leading to Cell Death, Apoptosis or Necrosis. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1018.

Iparraguirre, L., Gutierrez-Camino, A., Umerez, M., Martin-Guerrero, I., Astigarraga, I., Navajas, A., Sastre, A., Garcia de Andoin, N., and Garcia-Orad, A. (2016). MiR-pharmacogenetics of methotrexate in childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet. Genomics* 26, 517–525.

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

Kotur, N., Stankovic, B., Kassela, K., Georgitsi, M., Vicha, A., Leontari, I., Dokmanovic, L., Janic, D., Krstovski, N., Klaassen, K., et al. (2012). 6-mercaptopurine influences TPMT gene transcription in a TPMT gene promoter variable number of tandem repeats-dependent manner. *Pharmacogenomics* 13, 283–295.

Krajinovic, M., Robaey, P., Chiasson, S., Lemieux-Blanchard, E., Rouillard, M., Primeau, M., Bournissen, F.G., and Moghrabi, A. (2005). Polymorphisms of genes controlling homocysteine levels and IQ score following the treatment for childhood ALL. *Pharmacogenomics* 6, 293–302.

Krajinovic, M., Elbared, J., Drouin, S., Bertout, L., Rezgui, A., Ansari, M., Raboisson, M.-J., Lipshultz, S.E., Silverman, L.B., Sallan, S.E., et al. (2016). Polymorphisms of ABCC5 and NOS3 genes influence doxorubicin cardiotoxicity in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* 16, 530–535.

Kubota, M., Nakata, R., Adachi, S., Watanabe, K.-I., Heike, T., Takeshita, Y., and Shima, M. (2014). Plasma homocysteine, methionine and S-adenosylhomocysteine levels following high-dose methotrexate treatment in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia or Burkitt lymphoma: association with hepatotoxicity. *Leuk. Lymphoma* 55, 1591–1595.

Ladas, E.J., Kroll, D.J., Oberlies, N.H., Cheng, B., Ndao, D.H., Rheingold, S.R., and Kelly, K.M. (2010). A randomized, controlled, double-blind, pilot study of milk thistle for the treatment of hepatotoxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer* 116, 506–513.

Lauschke, V.M., Mkrtchian, S., and Ingelman-Sundberg, M. (2017). The role of microRNAs in liver injury at the crossroad between hepatic cell death and regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482, 399–407.

Liu, Y., Fernandez, C.A., Smith, C., Yang, W., Cheng, C., Panetta, J.C., Kornegay, N., Liu, C., Ramsey, L.B., Karol, S.E., et al. (2017). Genome-Wide Study Links PNPLA3 Variant With Elevated Hepatic Transaminase After Acute Lymphoblastic Leukemia Therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 102, 131–140.

Maxwell, R.R., and Cole, P.D. (2017). Pharmacogenetic Predictors of Treatment-Related Toxicity Among Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 12, 176–186.

Pui, C.-H., Yang, J.J., Hunger, S.P., Pieters, R., Schrappe, M., Biondi, A., Vora, A., Baruchel, A.A., Silverman, L.B., Schmiegelow, K., et al. (2015). Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J. Clin. Oncol.* 33, JCO.2014.59.1636.

Robles-Diaz, M., Lucena, M.I., Kaplowitz, N., Stephens, C., Medina-Cáliz, I., González-Jimenez, A., Ulzurrun, E., Gonzalez, A.F., Fernandez, M.C., Romero-Gómez, M., et al. (2014). Use of Hy's law and a new composite algorithm to predict acute liver failure in patients with drug-induced liver injury. *Gastroenterology* 147, 109–118.e5.

Rukov, J.L., Wilentzik, R., Jaffe, I., Vinther, J., and Shomron, N. (2014). Pharmaco-miR: linking microRNAs and drug effects. *Brief. Bioinform.* 15, 648–659.

Salazar, J., Altes, A., del Rio, E., Estella, J., Rives, S., Tasso, M., Navajas, A., Molina, J., Villa, M., Vivanco, J.L., et al. (2012). Methotrexate consolidation treatment according to pharmacogenetics of MTHFR ameliorates event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenomics J.* 12, 379–385.

Sambrook, J, R.D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (New York: NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Teft, W.A., Welch, S., Lenehan, J., Parfitt, J., Choi, Y.-H., Winqvist, E., and Kim, R.B. (2015). OATP1B1 and tumour OATP1B3 modulate exposure, toxicity, and survival after irinotecan-based chemotherapy. *Br. J. Cancer* 112, 857–865.

Tzoneva, G., Perez-Garcia, A., Carpenter, Z., Khiabani, H., Tosello, V., Allegretta, M., Paietta, E., Racevskis, J., Rowe, J.M., Tallman, M.S., et al. (2013). Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat. Med.* 19, 368–371.

Umerez, M., Gutierrez-Camino, Á., Muñoz-Maldonado, C., Martin-Guerrero, I., and Garcia-Orad, A. (2017). MTHFR polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia: Influence on methotrexate therapy. *Pharmgenomics. Pers. Med.* 10, 69–78.

Wojtuszkiewicz, A., Peters, G.J., van Woerden, N.L., Dubbelman, B., Escherich, G., Schmiegelow, K., Sonneveld, E., Pieters, R., van de Ven, P.M., Jansen, G., et al. (2015). Methotrexate resistance in relation to treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Hematol. Oncol.* 8, 61.

Yang, A., Sun, Y., Mao, C., Yang, S., Huang, M., Deng, M., Ding, N., Yang, X., Zhang, M., Jin, S., et al. (2017). Folate Protects Hepatocytes of Hyperhomocysteinemia Mice From Apoptosis via Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)-Activated Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Cell. Biochem.* 118, 2921–2932.

Zhan, X., Wu, W., Han, B., Gao, G., Qiao, R., Lv, J., Zhang, S., Zhang, W., Fan, W., Chen, H., et al. (2012). Hsa-miR-196a2 functional SNP is associated with severe toxicity after platinum-based chemotherapy of advanced nonsmall cell lung cancer patients in a Chinese population. *J. Clin. Lab. Anal.* 26, 441–446.

MiRNA-tako polimorfismoen inplikazioa mukositisaren garapenean hautzaroko leuzemia linfoblastiko akutuen tratamenduan

Umerez, Maitane^{1*}, PhD student; Gutierrez-Camino, Ángela^{1*}, PhD; Lopez-Lopez, Elixabet¹, PhD; Santos, Borja¹, PhD; Martin-Guerrero, Idoia¹, PhD; García de Andoin, Nagore^{2,3}, MD; Sastre, Ana⁴, MD; Navajas, Aurora^{5,6}, PhD; Astigarraga, Itziar^{3,5,6}, PhD; Garcia-Orad, Africa^{1,6}, PhD.

*Autore hauek egiletza partekatzen dute.

¹Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Medikuntza eta Odontologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Espainia; ²Onkohematologia Pediatriko Saila, Donostia Unibertsitate Ospitalea, Donostia, Espainia; ³Pediatria Saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV/EHU, Leioa, Espainia; ⁴Onkohematologia Pediatriko Saila, La Paz Unibertsitate Ospitalea, Madril, Espainia; ⁵Pediatria Saila, Gurutzeta Unibertsitate Ospitalea, Barakaldo, Espainia ⁶BioCruces Osasun Ikerketa Institutua, Barakaldo, Espainia.

Laburpena

Mukositis, hautzaroko leuzemia linfoblastiko akutuen (LLA) terapian agertzen den eragin desiragaitz ahulgarri eta ohikoenetakoa, digestio traktuaren edozein zatitako mukosen inflamazioagatik ezaugarritzen da eta sarri aho-eztarriko ultzerekin, gonbitoekin eta beherakoarekin batera agertzen da. Ondorio gisa, atzerapenak eta etenaldiak egoten dira tratamenduan, zeintzuek biziraupena kaltetu dezaketen. Mukositis antileuzemiko ezberdinekin lotu daiteke, hala nola metotrexatoarekin (MTX), daunorubinarekin (DNR) edo ziklofosfamidarekin (CPA). Gaur egun jakina da miRNA-ek farmako hauen bidezidor farmakozinetiko (PK) eta farmakodinamikoetan (PD) inplikaturako geneak erregulatzen dituztela. MiRNA-tako SNP-ek beren maila eta funtzioan eragina izan dezakete eta ondorioz bidezidor hauetako itu geneak asaldatu. Ondorioz, ikerketa honen helburua mukositisarekin erlacionaturako geneak ituztat dituzten miRNA-tako aldaera genetikoaren eta toxizitate hau jasateko arriskuaren arteko asoziazioa zehaztea izan zen. Helburu hau lortzeko, 206 miRNA-tako 213 SNP analizatu genituen LAL/SHOP protokoloarekin homogeneoki trataturako B-zelula aitzindarien (B-LLA) LLA-dun 179 haur espainiarren kohorte batean. MiR-4268, miR-4751 eta miR-3117-ren baitako hiru SNP identifikatu genituen hurrenez hurren mukositis, beherako eta gonbitoekin asoziatuak, zeintzu farmakoen PK eta PD geneen zein mukosa kaltearekin erlacionaturako beste gene batzuen gaineko efektuagatik azal daitezkeen.

Hitz gakoak: mukositis, leuzemia linfoblastiko akutua, mikroRNA-k, nukleotido bakarreko polimorfismoak

SARRERA

Mukositis kimioterapia antileuzemikoaren eragin desiragaitz ahulgarri eta ohikoenetakoa da haurtzaroko leuzemia linfoblastiko akutuan (LLA) (Sangild et al., 2017; Schmiegelow et al., 2017), minbizi pediatriko arruntena (Johnston et al., 2010). Toxizitate hau mukosa barreren ahultze batengatik bereizten da, aho-barrunbe eta traktu gastrointestinalaren ultzerazio larriak eragiten dituelarik (Van Sebille et al., 2015; Sonis, 2004a, 2004b, 2004c). Ondorio gisa, haur hauek min abdominala, gonbitoak eta beherakoa pairatzen dituzte, zeintzuek pisu galera, sostengu nutrizional beharra eta infekzioen arrisku areagotzea dakarten (Kuiken et al., 2017). Adierazpen kliniko hauek tratamenduen atzeratzeak, programazioz kanpoko etenaldiak edota terapiaren amaiera goiztiarrak eragiten dituzte (Cinausero et al., 2017), zeintzuek ondorioz biziraupenaren narriadura bat ekar dezaketen.

Mukositis agente antileuzemiko ugariarekin lotu daiteke, hala nola, metotrexatoarekin (MTX), zitarabinarekin, daunorribizinarekin (DNR) edo ziklofosfamidarekin (CPA) (Cinausero et al., 2017; Schmiegelow et al., 2017). Prebalentzia eta larritasuna farmako motaren arabera alda badaitezke ere, mukosaren kaltetzea dakarten gertaera zelularrek antzekoak dirudite (Al-Ansari et al., 2015; Cinausero et al., 2017). Mekanismoak bere baitan hartzen ditu kaskadan ematen diren zenbait gertaera biologiko kritiko, hala nola, oxigenoaren espezie errektiboen (ROS) sorrera, NF- κ B aktibazioa, zitokina inflamatorioen askapena eta MAPK seinalizazioaren aktibazioa, zeintzuek apoptosia, berriztatze galera, atrofia eta ultzerazio bultzatzen dituzten (Cinausero et al., 2017; Le et al., 2017; Sonis et al., 2004, 2013). Mukosaren kaltea farmako mukotoxikoen bidezidor farmakozinetiko eta farmakodinamikoetako geneen aldaketek eragindakoa izan liteke.

Ilido honetan, haurtzaroko LLA-ren tratamenduan dagoeneko zenbait ikerketek aurkitu dituzte *ABCC1*, *ABCC2* edo *ABCC4* bezalako MTX-aren bidezidorretako geneetako polimorfismoen eta mukositisaren arteko asoziazioak kontsolidazio fasean, toxizitate hau orokorrean dosi-altuko MTX-arekin erlazionatu izan ohi den fasea (den Hoed et al., 2015; Liu et al., 2014b; Lopez-Lopez et al., 2013; Radtke et al., 2013). MTX-aren garraio gene hauek beren erregulazio edo funtzioan eragin dezakete (Gervasini et al., 2017; Muralidharan et al., 2015). Nabarmenezkoa, berriki aurkitu dugun MTX-ak induzitutako mukositisaren eta miR-1206-ko rs2114358-ren GG genotipoaren arteko asoziazio esanguratsua (Gutierrez-Camino et al., 2017b; Lopez-Lopez et al., 2014a). MiRNA geneetako SNP-ek beren mailak eta funtzioa aldatzeko

gaitasuna dutela kontsideratuz, aldaera hauek MTX-aren bidezidorretako geneen adierazpenean eragina izan dezaketela proposaten dugu (Gutierrez-Camino et al., 2017b).

Konsolidazio fasean aurkitutako emaitza interesgarri hauek gorabehera, mukositis eta mukosa lesioaren beste zenbait adierazpen kliniko, hala nola, beherakoa eta gonbitoak sarri indukzio fasean ere garatzen dira. Fase honetan DNR eta CPA bezalako beste farmako mukotoxiko batzuk ere administratzen dira MTX-az gain. Ondorioz hipotesi hau proposa genezak: DNR, CPA edo MTX-ren bidezidorretako geneak, zein mukositisarekin erlazionatutako beste edozein gene ituztat dituzten miRNA-tako aldaerak, indukzio fasean ere mukositisarekin asoziatuak egon litezkeela haurtzaroko LLA-ren tratamenduan. Horrela, toxizitate honen eta ikerketaren unean deskribatuak zeuden eta alelo urrienaren maiztasuna (AUM) $\geq 0,01$ zuten miRNA-tako SNP guztien arteko asoziazioa analizatu genuen, B-LLA-rako homogeneoki tratatuak ziren 179 haur espainiarren kohorte handi batean. Gainera, beherakoa eta gonbitoak ere aztertu genituen, biak mukosen kaltearekin erlazionatutako adierazpen klinikoak.

MATERIALAK ETA METODOAK

Pazienteak

Honakoa, hiru espainiar ospitaleetako Onkologia Pediatriko Unitateetan (Gurutzeta Unibertsitate Ospitalea, Donostia Unibertsitate Ospitalea, La Paz Unibertsitate Ospitalea, 2000 eta 2013 urte bitartean) B-LLA-z diagnostikatutako 179 haur espainiar barne hartu zituen atzera begirako ikerketa da. Paziente guztien edo beraien gurasoen idatzizko baimen informatua eskuratu zen lagin bilketa aurretik. Ikerketa honek Euskal Herriko Unibertsitatearen (UPV/EHU) onespina (CEISH/102R/2011) jaso zuen.

Tratamendua eta toxizitatearen ebaluazioa

Ikerketan sartu ziren paziente guztiak LAL-SHOP 94/99/2005 espainiar protokolo estandarren baitan tratatu ziren homogeneoki. Protokolo hauen indukzio fasean, DNR-ren hurrenez-hurreneko bi dosi (120 mg/m^2), VCR lau dosi ($1,5 \text{ mg/m}^2$ /astean) eta prednisona (60 mg/m^2 /egun 28 egunez, 30 mg/m^2 /egun 4 egunez eta 15 mg/m^2 /egun azken 4 egunetan). Gainera, tratamendu besoaren arabera 0-2 CPA dosi (1000 mg/m^2 /dosiko), ASP hamar dosi ($5\ 000 - 15\ 000 \text{ U/m}^2$ tratamendu besoaren arabera) eta arrisku taldearen arabera bi edo hiru MTX-zitarabina-hidrokortisona (MTX $8-12 \text{ mg}$ dosi baxua) dosi intratekal ere ematen dira indukzio fasean. LAL/SKOP 99 protokoloan arrisku-altuko pazienteek +15 egunean MTX 3 g/m^2 dosi bakar bat ere jaso zuten.

Toxizitateari zegozkion datuak genotipoei itsu jaso ziren pazienteen historia kliniketatik, kasu guztietan bi ikertzaile aditu berberen eskutik. Mukositis 1-etik 4-ra bitartean graduatu zen, MOE-ren irizpideetatik egokitutako Hematologia eta Onkologia Pediatriko Erakunde Espainiarraren estandarrei jarraiki (ikus 9. taula). Gainera, beharakoari eta gonbitoei zegozkien datuak ere jaso genituen, izan ere biak dira mukosaren lesioaren adierazpen klinikoak. Bitik laura bitarteko graduak kontsideratu ziren toxikotzat. Sexua, adina, tratamendu protokoloa, arrisku taldea eta tratamendu besoa gisako beste datu batzuk sistematikoki jaso ziren historia klinikoetatik.

Gene eta polimorfismoen aukeraketa

MiRNA-en itiak gaur egun guztiz definituak ez daudela kontuan izanik, eta edozein miRNA zuzenki edo zeharka mukositisaren garapenean zerikusia duten geneen erregulazioan inplikaturik egon litekeelako, ikerketa gauzatu zen unean (2014ko maiatza) deskribatuak zeuden miRNA geneetako SNP guztiak aukeratu genituen. Guztirako 969 miRNA-tako 1910 SNP-en artetik europar/kaukasiar populazioan AUM > 0,01 zuten SNP-ak aukeratu genituen. SNP-en aukeraketarako, mirbase (<http://www.mirbase.org/>), miRNA SNIPER (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP2/index.php>), eta dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) datu-baseak erabili genituen, baita literaturaren araketa ere (ikus 11. taula).

Genotipazioa

ADN genomikoa erremisioan zeuden LLA-dun pazienteen odol periferiko edo hezur muintetik erauzi zen fenol-kloroformo metodoa erabiliz, aurrez deskribatu bezala (Sambrook, J, 2001). ADN-a PicoGreen (Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornia, AEB) bidez kuantifikatu zen.

Lagin bakoitzarentzat, 400 ng ADN genotipatu ziren Veracode teknologiadun GoldenGate Genotipazio Saiakuntza (Illumina Inc., San Diego, Kalifornia, AEB) erabiliz argitaratutako Illumina protokoloaren arabera. Datuak genotipoen *clustering* eta *calling*-erako GenomeStudio (Illumina Inc.) software bidez analizatu ziren. Lagin bikoiztuak eta CEPH hirukoak (Coriell Cell Repository, Camden, New Jersey, AEB) genotipatu ziren plaketan zehar. Transmisio-aleliko mendeliar akatsak edo genotipo diskordanteak erakusten zituzten SNPak analisitik baztertu ziren.

Analisi estatistikoak

Toxizitateen (mukositis, beherakoa eta gonbitoak) arteko erlazioa indukzioan erregresio logistiko modelo unibariante eta korrelazio koefiziente bidez neurtu zen. Adinak, sexuak, tratamendu protokoloak, arrisku taldeak eta tratamendu besoak toxizitatean izan lezaketen efektu nahasle posiblea kontabilizatzeko erregresio logistiko unibariante eta multibarianteak erabili ziren. Toxizitatearen eta polimorfismo genetikoaren arteko asoziazioa χ^2 edo Fisher-en frogaz zehatz bidez ebaluatu zen. Asoziazio efektuen tamaina odds ratio bidez estimatu zen. Eredu dominante eta errezesiboen arteko frogaz esanguratsuen aukeratu zen. Kasu guztietan esangura maila % 5-ean ezarri zen. Emaitzak konparaketa anitzetarako false discovery rate (FDR) zuzenketa bidez egokitu ziren (Benjamini et al., 2001). Analisisak R v3.3.0. software bidez gauzatu ziren.

Analisi bioinformatikoak

- *MiRNA-en egitura sekundarioen iragarpena*

Toxizitatearekin esanguratsuki asoziatutako miRNA-entzat, RNAfold web tresna (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) (Gruber et al., 2008) erabili zen SNP-ek egitura sekundarioen gutxienezko energia aske eta urkila egituren energia aldaketan ($\Delta\Delta G$) zuten inpaktua kalkulatzeko.

- *Geneen itua aukeraketa eta bidezidorraren analisia*

MiRNA-en itua geneak miRWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html>) datu-basean oinarrituta aukeratu ziren (Dweep and Gretz, 2015). MiRWalk-en baitako 12 iragarpen programetarik, gutxienez 6 programek konfirmatutako geneak aukeratu ziren soilik.

MiRNA esanguratsuen bidezidor analisei dagokienez, lehendabizi DNR-ren (antraziklinak), MTX-aren eta CPA-ren bidezidor farmakozinetiko eta farmakodinamikoko geneak kontsideratu genituen, Pharmacogenomic Knowledge Base (PharmGKB) (<https://www.pharmgkb.org/>) datu basearen eta literaturaren araketan oinarrituta. Bigarren planteamendu batean, mukosen toxizitatean zerikusia izan zezaketen beste gene batzuk identifikatzeko asmoz, bidezidorraren aberaste analisi bat gauzatu genuen ConsensusPathDB (CPdB) (<http://consensuspathdb.org/>) (Kamburov et al., 2013) web tresnaren gainerrepresentazio modulua erabiliz. MiRWalk-eko itua geneen zerrendak analizatu ziren KEGG (Kanehisa et al., 2017), Reactome (Fabregat et al., 2016) eta BioCarta (http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta_Pathways) bidezidor datu baseetako berezko bildumekin erkatuta.

EMAITZAKPazienteen ezaugarriak

Ikerketa honetan 179 paziente pediatriko sartu genituen. Mukositisari, beherakoari zein gonbitoari zegozkien datuak 170 pazienterentzat jaso ahal izan ziren. Indukzio fasean zehar, 170-etik 36-k (% 21,2) izan zuten ≥ 2 graduko mukositis, 22-k (% 12,9) ≥ 2 graduko beherakoa eta 45-ek (% 26,5) ≥ 2 graduko gonbitoak (25. taula). Asoziazioa aurkitu genuen mukositisaren eta beherakoaren artean ($p = 4 \times 10^{-6}$) eta mukositis eta gonbitoaren artean ($p = 0,0001$), baita beherakoa eta gonbitoaren artean ere ($p = 0,0005$). Ez genuen asoziaziorik aurkitu kobarianteen (adina, sexua, tratamendu protokoloa, arrisku taldea eta tratamendu besoa) eta toxizitateen (mukositis, beherakoa eta gonbitoak) artean. Horrela, ez genituen kobariante hauek kontuan hartu gainontzeko asoziazio analisietan.

25. taula. Pazienteen ezaugarriak.

Ezaugarriak	Indukzio fasea	Kontsolidazio fasea
Paziente kopurua	170	168
Sexua, n (%)		
Gizonezkoak	100 (58,8)	100 (59,5)
Emakumezkoak	70 (41,2)	68 (40,5)
Adina diagnostikoan, batezbestekoa \pm DE (urteak)		
Gizonezkoak	5,22 \pm 3,27	5,23 \pm 3,27
Emakumezkoak	4,91 \pm 3,28	4,84 \pm 3,36
Tratamendu protokoloa, n (%)		
LAL/SHOP 94/99	63 (37,1)	62 (36,90)
LAL/SHOP 2005	107 (62,9)	106 (63,10)
Mucositis, n (%)	36 (21,18)	16 (9,52)
Beherakoa, n (%)	22 (12,94)	10 (5,95)
Gonbitoak, n (%)	45 (26,47)	40 (23,81)

Laburdurak: DE, desbideraketa estandarra.

Genotipazio emaitzak

Genotipazioa arrakastatsua izan zen 179 ADN laginetik 158 laginentzat (% 88,3) eta 160 SNP-entzat (% 75,12). Genotipazioak huts egin zuen PCR amplifikazio ezagatik, kluster banaketarako intentsitate urriagatik edo klusterren definizio ezagatik.

Asoziazio azterketa

MiRNA-tako aldaera genetikoek toxizitate gastrointestinalan eragina duten ikertzeko, arrakastaz genotipatutako 154 miRNA-tako 160 polimorfismoren eta mukositis, beherako eta gonbitoaren arteko asoziazioa neurtu genuen.

Mukositisari dagokionez, guztira 4 SNP izan ziren toxizitate honekin esanguratsuki asoziatuak (26. taula). Haien artean, miR-4268-ko rs4674470 izan zen estatistikoki esanguratsuen, AG+GG genotipoak 0,3-bider gutxiagoko mukositis arriskua ($p = 0,0093$) erakutsi zuelarik eredu dominantearen baitan. CC genotipodun pazienteetatik inork ez zuen mukositisa garatu. MiR-3683-ko rs6977967 SNP-ak p-balio esanguratsua ($p = 0,0098$) erakutsi zuen eredu errezesiboaren baitan, GG genotipoa izanik arrisku genotipoa. MiR-1908-ko rs174561 eta miR-4520a-ko rs8078913 SNP-ek ere emaitza esanguratsuak eman zituzten. Batek berak ere ez zuen estatistikoki esanguratsu izaten jarraitu FDR zuzenketa ondoren.

26. taula. Mukositisarekin asoziazio esanguratsuenak erakutsi dituzten miRNA-tako SNP-ak indukzio fasean zehar haurtzaroko B-LLA-n. Maiztasun genotipiko eta alelikoak.

miRNA SNP	Posizioa Kokapena	Genotipoa /Aleloa	MukosInduk (n=170)		Eredua OR (% 95 KT) P-balioa
			EZ Tox N=134 (%)	TOX 36 (%)	
hsa-mir-4268 rs4674470	Kr.: 2 pre-miRNA	AA	68 (58,1)	27 (81,8)	Dominantea 0,31 (0,12-0,80) 0,009339
		AG	39 (33,3)	6 (18,2)	
		GG	10 (8,5)	0 (0)	
		A	175 (74,8)	60 (90,9)	0,297 (0,122-0,722) 0,005
		G	59 (25,2)	6 (9,1)	
hsa-mir-3683 rs6977967	Kr.: 7 pre-miRNA	AA	82 (70,1)	22 (66,7)	Errezesiboa 0 (0,0) 0,009897
		AG	35 (29,9)	8 (24,2)	
		GG	0 (0)	3 (9,1)	
		A	199 (85)	52 (78,8)	1,531 (0,767-3,055) 0,2247
		G	35 (15)	14 (21,2)	
mir-1908 rs174561	Kr.: 11 pre-miRNA	TT	71 (64)	13 (41,9)	Dominantea 2,46 (1,09-5,53) 0,02852
		CT	34 (30,6)	16 (51,6)	
		CC	6 (5,4)	2 (6,5)	
		T	176 (79,3)	42 (67,7)	1,822 (0,977-3,399) 0,0572
		C	46 (20,7)	20 (32,3)	
hsa-mir-4520a rs8078913	Kr.: 17 in_mature	CC	38 (35,5)	10 (31,2)	Errezesiboa 2,59 (1,03-6,47) 0,04722
		CT	53 (49,5)	12 (37,5)	
		TT	16 (15)	10 (31,2)	
		C	129 (60,3)	32 (50)	1,518 (0,866-2,66) 0,1439
		T	85 (39,7)	32 (50)	

Laburdurak: B-LLA, B-zelulen leuzemia linfoblastiko akutua; miRNA, mikroRNA; SNP, nukleotido bakarrekoko polimorfismoa; Tox, toxizitatea; OR, odds ratio; KT, konfiantza tarte; Kr, Kromosoma.

Oharrak: letra lodiek P-balio esanguratsuak adierazten dituzte.

Beherakoari dagokionez, 6 SNP izan ziren asoziatuak toxizitate honekin, miR-4751-ko rs8667 izanik SNP-ik esanguratsuen eredu dominantearen baitan ($p = 0,0005$) (27. taula). AG+AA genotipoek beherakoa garatzeko arrisku areagotua erakutsi zuten. MiR-146a, miR-605, miR-202,

miR-1265 eta miR-196a-ren baitako beste 5 SNP-ek ere emaitza esanguratsuak erakutsi zituzten.

Batek berak ere ez zuen estatistikoki esanguratsu izaten jarraitu FDR zuzenketa ondoren.

27. taula. Beherakoarekin asoziazio esanguratsuenak erakutsi dituzten miRNA-tako SNP-ak indukzio fasean zehar haurtzaroko B-LLA-n. Maiztasun genotipiko eta alelikoak.

miRNA SNP	Posizioa Kokapena	Genotipoa /Aleloa	BeherakInduk (n=170)		Eredua OR (% 95 KT) P-balioa
			EZ Tox N=148 (%)	TOX 22 (%)	
hsa-mir-4751 rs8667	Kr.: 19 pre-miRNA	GG	52 (40,3)	1 (5)	Dominantea
		AG	62 (48,1)	15 (75)	12,83 (1,67-98,80)
		AA	15 (11,6)	4 (20)	0,0005
		G	166 (64,3)	17 (42,5)	2,441 (1,241-4,803)
		A	92 (35,7)	23 (57,5)	0,008
hsa-mir-146a rs2910164	Kr.: 5 in_seed	GG	75 (58,1)	5 (23,8)	Dominantea
		CG	44 (34,1)	12 (57,1)	4,44 (1,53-12,87)
		CC	10 (7,8)	4 (19)	0,002
		G	194 (75,2)	22 (52,4)	2,756 (1,413-5,376)
		C	64 (24,8)	20 (47,)	0,0023
hsa-mir-605 rs2043556	Kr.: 10 pre-miRNA	AA	68 (54)	17 (81)	Dominantea
		AG	52 (41,3)	3 (14,3)	0,28 (0,09-0,87)
		GG	6 (4,8)	1 (4,8)	0,015
		A	188 (74,6)	37 (88,1)	0,397 (0,15-1,053)
		G	64 (25,4)	5 (11,9)	0,056
hsa-mir-202 rs12355840	Kr.: 10 pre-miRNA	TT	64 (54,7)	15 (83,3)	Dominantea
		CT	47 (40,2)	3 (16,7)	0,24 (0,07-0,88)
		CC	6 (5,1)	0 (0)	0,015
		T	175 (74,8)	33 (91,7)	0,27 (0,08-0,912)
		C	59 (25,2)	3 (8,3)	0,025
hsa-mir-1265 rs11259096	Kr.: 10 pre-miRNA	TT	116 (89,9)	15 (71,4)	Dominantea
		CT	12 (9,3)	6 (28,6)	3,57 (1,18-10,80)
		CC	1 (0,8)	0 (0)	0,032
		T	244 (94,6)	36 (85,7)	2,905 (1,049-8,042)
		C	14 (5,4)	6 (14,3)	0,032
hsa-mir-196a-2 rs11614913	Kr.: 12 in_mature	CC	63 (48,8)	6 (28,6)	Errezesiboa
		CT	53 (41,1)	9 (42,9)	3,57 (1,18-10,80)
		TT	13 (10,1)	6 (28,6)	0,0326
		C	179 (69,4)	21 (50)	2,266 (1,171-4,385)
		T	79 (30,6)	21 (50)	0,0135

Laburdurak: B-LLA, B-zelulen leuzemia linfoblastiko akutua; miRNA, mikroRNA; SNP, nukleotido bakarrekoko polimorfismoa; Tox, toxizitatea; OR, odds ratio; KT, konfiantza tarte; Kr, Kromosoma.

Oharrak: letra lodiek P-balio esanguratsuak adierazten dituzte.

Gainera, gonbitoekin esanguratsuki asoziatuiko sei SNP aurkitu genituen (28. taula). Estatistikoki esanguratsuen miR-3117-ko rs12402181 SNP-a izan zen, zeinetan AG+AA genotipoak gonbitoak garatzeko 0,24-bider gutxiagoko arriskua erakutsi zuen eredu

dominantearen baitan ($p = 0,004$). Mir-3683, miR-548al, miR-4309, miR-3689d2 eta miR-5196-ko beste 5 SNP-ek ere emaitza esanguratsuak erakutsi zituzten, haietako bat bera ere ez zen estatistikoki esanguratsua izan FDR zuzenketaren ostean.

28. taula. Gonbitoekin asoziazio esanguratsuenak erakutsi dituzten miRNA-tako SNP-ak indukzio fasean zehar haurtzaroko B-LLA-n. Maiztasun genotipiko eta alelikoak.

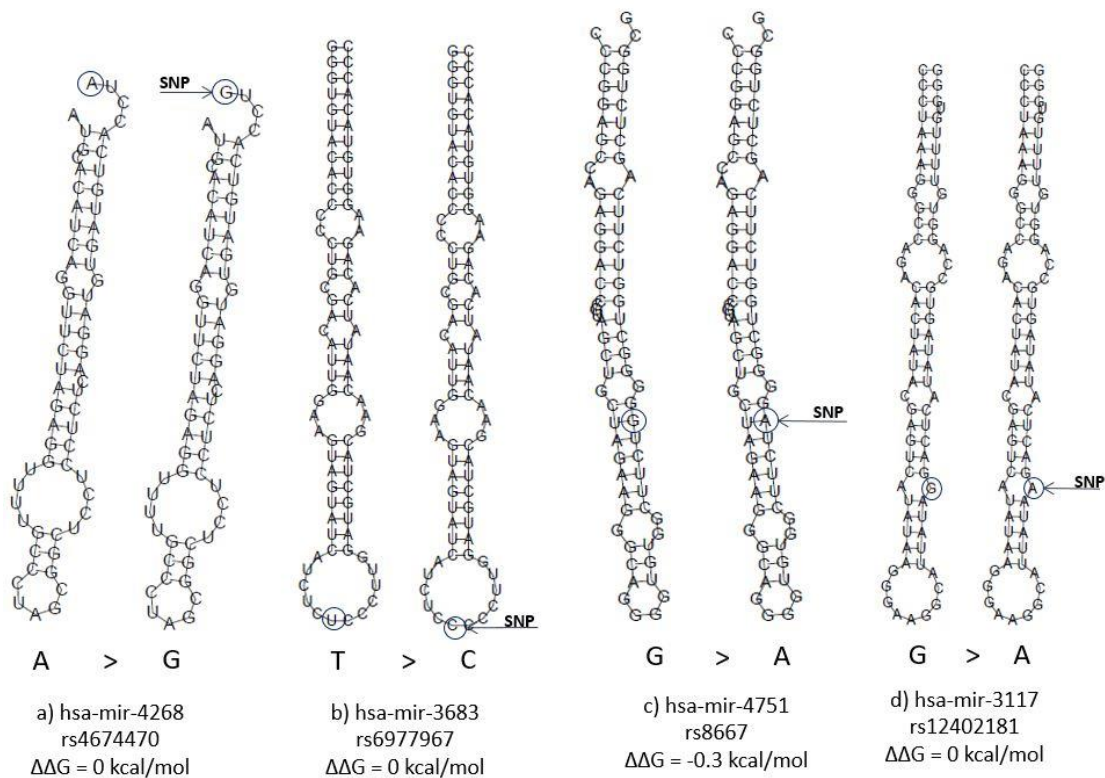
miRNA SNP	Posizioa Kokapena	Genotipoa /Aleloa	GonbitInduk (n=170)		Eredua OR (% 95 KT) P-balioa
			EZ Tox N=125 (%)	TOX 45 (%)	
hsa-mir-3117 rs12402181	Kr.: 1 in_seed	GG	75 (25)	34 (89,5)	Dominantea 0,24 (0,08-0,72) 0,004
		AG	34 (30,4)	4 (10,5)	
		AA	3 (2,7)	0 (0)	0,256 (0,088-0,74) 0,007
		A	184 (82,1)	72 (94,7)	
hsa-mir-3683 rs6977967	Kr.: 7 pre-miRNA	G	40 (17,9)	4 (5,3)	Errezesiboa 0 (0,0) 0,015
		AA	76 (25,9)	28 (73,7)	
		AG	36 (32,1)	7 (18,4)	1,078 (0,538-2,16) 0,833
		GG	0 (0)	3 (7,9)	
hsa-mir-548al rs515924	Kr.: 11 in_seed	A	188 (83,9)	63 (82,9)	Dominantea 2,82 (1,15-6,93) 0,026
		G	36 (16,1)	13 (17,1)	
		AA	97 (87,4)	27 (71,1)	2,786 (1,226-6,327) 0,011
		AG	14 (12,6)	10 (26,3)	
hsa-mir-4309 rs12879262	Kr.: 14 pre-miRNA	GG	0 (0)	1 (2,6)	Dominantea 0,38 (0,15-0,99) 0,034
		CG	35 (31,2)	6 (15,8)	
		CC	2 (1,8)	0 (0)	0,407 (0,165-1,002) 0,0447
		G	185 (82,6)	70 (92,1)	
MIR3689 seq_rs62571442	Kr.: 9 pre-miRNA	C	39 (17,4)	6 (7,9)	Errezesiboa 2,55 (1,08-6,01) 0,035
		AA	32 (28,8)	7 (18,4)	
		AG	62 (55,9)	19 (50,0)	1,71 (1,011-2,893) 0,044
		GG	17 (15,3)	12 (31,6)	
hsa-mir-5196 rs10406069	Kr.: 19 pre-miRNA	A	126 (56,8)	33 (43,4)	Dominantea 2,14 (1,01-4,51) 0,044
		G	96 (43,2)	43 (56,6)	
		AA	1 (0,9)	0 (0,0)	1,655 (0,904-3,028) 0,1005
		G	182 (81,3)	55 (72,4)	
		A	42 (18,8)	21 (27,6)	

Laburdurak: B-LLA, B-zelulen leuzemia linfoblastiko akutua; miRNA, mikroRNA; SNP, nukleotido bakarrekoko polimorfismoa; Tox, toxizitatea; OR, odds ratio; KT, konfiantza tarte; Kr, kromosoma.
Oharrak: letra lodiek p-balio esanguratsuak adierazten dituzte.

Analisi bioinformatikoa

- *MiRNA-en egitura sekundarioen iragarpena*

Analisiak estatistikoki esanguratsuenak izan ziren SNP-ekin gauzatu genituen, miR-4268-ko rs4674470-ekin, miR-3683-ko rs6977967-rekin, miR-4751-ko rs8667-rekin eta miR-3117-ko rs12402181-ekin (21. irudia). MiR-4268-ko rs4674470 eta miR-3683-ko rs6977967 SNP-ek ez zuten energia aldaketarik ($\Delta\Delta G$) ezta egitura sekundarioaren aldaketarik eragin. MiR-4751-ko rs8667-ren kasuan, G aleloa A aleloarengatik ordezkatzekak -0.3 kcal/mol-etako energia aldaketa xume bat (-40.2 kcal/mol-tik -40.5 -ra) eragin zuen egitura sekundarioaren aldaketarik eragin gabe. Azkenik, miR-3117-ko rs12402181-ek ere ez zuen energia zein egitura sekundarioaren aldaketarik eragin.



21. irudia. Alelo ezberdinen presentziagatik miRNA-ko SNP esanguratsuenen energia aldaketak eta gutxieneko energia-aske egiturak mukositisean (a eta b), beherakoan (c) eta gonbitoetan (d), RNAfold web tresnatik aterata.

- *Bidezidorren analisiak*

Lehenengo planteamendua jarraituz, miRNA-en ituen bilaketa egin genuen DNR, CPA eta MTX-ren farmakogeneen artean (22-24. irudiak). Mir-4268-rentzat DNR-ren (antraziklinen bidezidorra) bi farmakogene (*NFKBIE*, *CBR1*) aurkitu genituen eta beste hiru gene MTX-ren bidezidorrean (*MTHFR*, *MTR*, *SLC46A1*), CPA-ren bidezidorrean aldiz ez genuen itue generik aurkitu. MiR-3683-rentzat gene bat aurkitu genuen MTX-aren bidezidorrean (*SHMT1*) eta beste bat CPA-ren bidezidorrean (*ALDH5A1*). MiR-4751-rentzat, DNR-ren bidezidorreko gene bat aurkitu genuen (*NDUFS2*), MTX-rentzat beste bat (*SLC19A1*) eta beste bat CPA-ren bidezidorrean (*ERCC4*). Azkenik, miR-3117-rentzat DNR-ren bidezidorreko gene bat (*ABCC1*), MTX-ren bidezidorreko lau gene (*PPAT*, *SLC46A1*, *SLCO1A2*, *ABCC1*), eta CPA-ren bidezidorreko gene bat (*ALDH5A1*) aurkitu genituen.

Bigarren planteamendu batean, ConsensusPathDB web tresna erabiliz, bidezidorren aberaste analisiak gauzatu ziren miRNA hauentzat, mukositis, beherako eta gonbitoekin erlazionatutako beste itue gene batzuk detektatzeko. MiR-4268-entzat, D fosfolipasa (DFL) seinalizazioaren gain-adierazpen bat aurkitu genuen (p-balioa = 9.1×10^{-8}) hamar bidezidor esanguratsuenen artean (29. taula). Bidezidor honetan, miR-4268-k 29 itue-gene arte jotzen ditu (30. taula). Bidezidor hau gain-adierazitako beste zenbait bidezidorrekin erlazionatua dago, kolinareen metabolismoaren bidezidorra eta seinalizazio glutamatergiko eta neurotrofinen seinalizazio bidezidorrak kasu, izan ere 10-12 gene partekatzen dituzte.

29. taula. MiR-4268-rentzat bidezidor aberastuak.

Zb.	Bidezidorren izena	Set tamaina	Kandidatuak	p-balioa	q-balioa	Bidezidor iturria
1	Phospholipase D signaling pathway	144	29 (20.1%)	9.09e-08	0.000116	KEGG
2	Glutamatergic synapse	114	22 (19.3%)	6.67e-06	0.0034	KEGG
3	Signalling by NGF	433	54 (12.5%)	8.8e-06	0.0034	Reactome
4	Transcriptional misregulation in cancer	180	29 (16.1%)	1.07e-05	0.0034	KEGG
5	Transmembrane transport of small molecules	628	70 (11.1%)	2.16e-05	0.00514	Reactome
6	NGF signalling via TRKA from the plasma membrane	340	44 (12.9%)	2.42e-05	0.00514	Reactome
7	Pathways in cancer	397	49 (12.3%)	3.01e-05	0.00549	KEGG
8	Choline metabolism in cancer	101	19 (18.8%)	4.06e-05	0.00647	KEGG
9	Signaling by VEGF	290	38 (13.1%)	6.54e-05	0.00791	Reactome
10	Transmission across Chemical Synapses	218	31 (14.2%)	6.62e-05	0.00791	Reactome

30. taula. Mir-4268-ko ituztat dituen D fosfolipasa seinalizazio bidezidoreko geneak.

<i>Entrez-gene ID</i>	<i>Entrez-gene izena</i>
10411	RAPGEF3 : Rap guanine nucleotide exchange factor 3
2916	GRM6 : glutamate metabotropic receptor 6
5155	PDGFB : platelet derived growth factor subunit B
554	AVPR2 : arginine vasopressin receptor 2
9266	CYTH2 : cytohesin 2
3643	INSR : insulin receptor
1609	DGKQ : diacylglycerol kinase theta
7248	TSC1 : tuberous sclerosis 1
107	ADCY1 : adenylate cyclase 1
108	ADCY2 : adenylate cyclase 2
9846	GAB2 : GRB2 associated binding protein 2
185	AGTR1 : angiotensin II receptor type 1
208	AKT2 : AKT serine/threonine kinase 2
5332	PLCB4 : phospholipase C beta 4
5335	PLCG1 : phospholipase C gamma 1
5337	PLD1 : phospholipase D1
2768	GNA12 : G protein subunit alpha 12
5595	MAPK3 : mitogen-activated protein kinase 3
2912	GRM2 : glutamate metabotropic receptor 2
2914	GRM4 : glutamate metabotropic receptor 4
23396	PIP5K1C : phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type 1 gamma
2917	GRM7 : glutamate metabotropic receptor 7
6009	RHEB : Ras homolog enriched in brain
387	RHOA : ras homolog family member A
1956	EGFR : epidermal growth factor receptor
5578	PRKCA : protein kinase C alpha
27128	CYTH4 : cytohesin 4
3577	CXCR1 : C-X-C motif chemokine receptor 1
6654	SOS1 : SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1

MiR-3683-ri dagokionez, prozesu inflamatorioekin erlazionatutako bidezidor batzuk aurkitu genituen (31. taula).

31. taula. MiR-3683-rentzat bidezidor aberastuak.

Zb.	Bidezidorren izena	Set tamaina	Kandidatuak	p-balioa	q-balioa	Bidezidor iturria
1	Activation of BMF and translocation to mitochondria	3	2 (66.7%)	3.34e-05	0.0042	Reactome
2	Effects of PIP2 hydrolysis	27	3 (11.1%)	9.92e-05	0.00625	Reactome
3	Ion homeostasis	56	3 (5.4%)	0.000878	0.0341	Reactome
4	Cardiac conduction	135	4 (3.0%)	0.00108	0.0341	Reactome
5	Aldosterone synthesis and secretion	82	3 (3.7%)	0.00264	0.0613	KEGG
6	Muscle contraction	198	4 (2.0%)	0.00436	0.0613	Reactome
7	Inflammatory mediator regulation of TRP channels	99	3 (3.0%)	0.00449	0.0613	KEGG
8	Platelet calcium homeostasis	31	2 (6.5%)	0.00487	0.0613	Reactome
9	Downstream signaling of activated FGFR1	31	2 (6.5%)	0.00487	0.0613	Reactome
10	Activation of BH3-only proteins	31	2 (6.5%)	0.00487	0.0613	Reactome

MiR-4751-rentzat, Toll-like hartzaileen (TLR) seinalizazioarekin erlazionatutako bidezidorrak zeuden gain-adierazita, MAPK seinalizazio kaskada barne (32. taula).

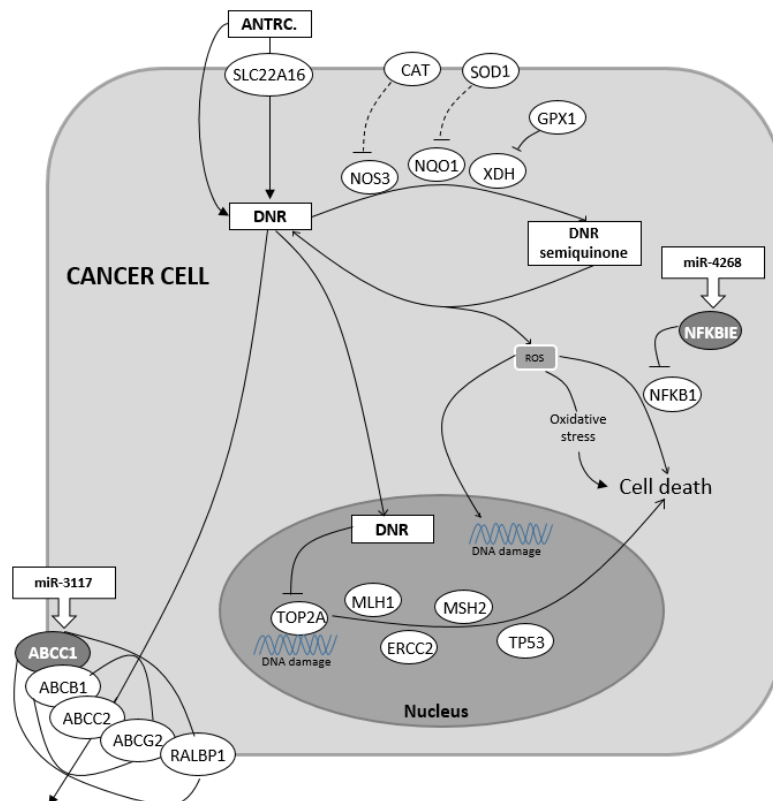
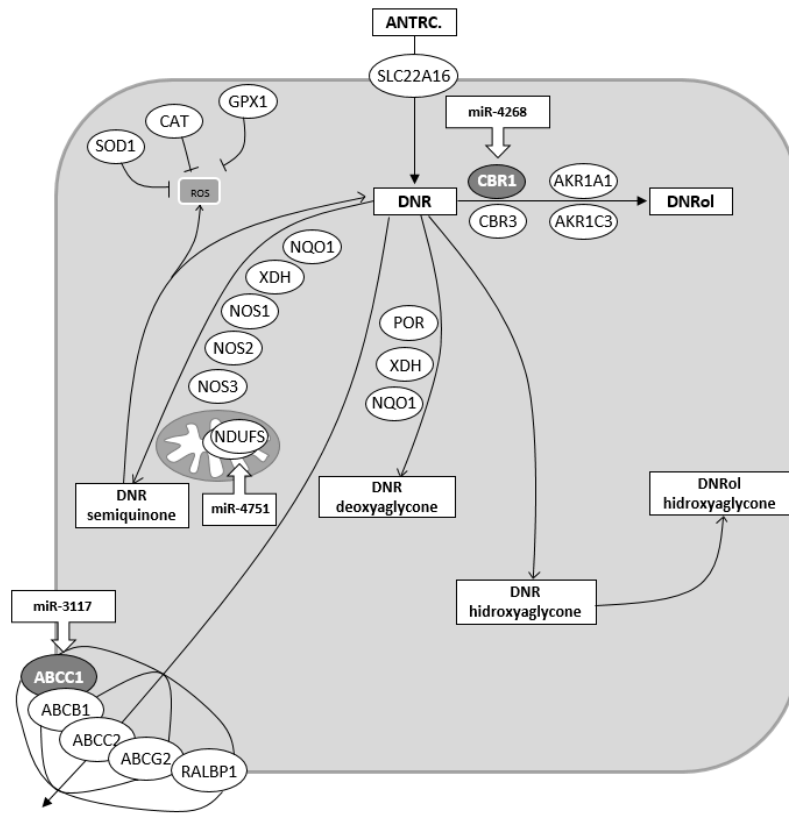
Table 32. MiR-4751-rentzat bidezidor aberastuak.

Zb.	Bidezidorren izena	Set tamaina	Kandidatuak	p-balioa	q-balioa	Bidezidor iturria
1	Acute myeloid leukemia	<u>57</u>	<u>10 (17.5%)</u>	5.52e-08	3.55e-05	KEGG
2	MAP kinase activation in TLR cascade	<u>62</u>	<u>10 (16.1%)</u>	1.27e-07	4.09e-05	Reactome
3	Nuclear Events (kinase and transcription factor activation)	<u>25</u>	<u>7 (28.0%)</u>	1.91e-07	4.09e-05	Reactome
4	TRAF6 Mediated Induction of proinflammatory cytokines	<u>74</u>	<u>10 (13.5%)</u>	7.05e-07	0.000108	Reactome
5	MAPK targets/ Nuclear events mediated by MAP kinases	<u>31</u>	<u>7 (22.6%)</u>	9.54e-07	0.000108	Reactome
6	TRIF-mediated TLR3/TLR4 signaling	<u>101</u>	<u>11 (10.9%)</u>	1.77e-06	0.000108	Reactome
7	MyD88-independent TLR3/TLR4 cascade	<u>101</u>	<u>11 (10.9%)</u>	1.77e-06	0.000108	Reactome
8	Toll Like Receptor 3 (TLR3) Cascade	<u>101</u>	<u>11 (10.9%)</u>	1.77e-06	0.000108	Reactome
9	MyD88 cascade initiated on plasma membrane	<u>82</u>	<u>10 (12.2%)</u>	1.85e-06	0.000108	Reactome
10	Toll Like Receptor 10 (TLR10) Cascade	<u>82</u>	<u>10 (12.2%)</u>	1.85e-06	0.000108	Reactome

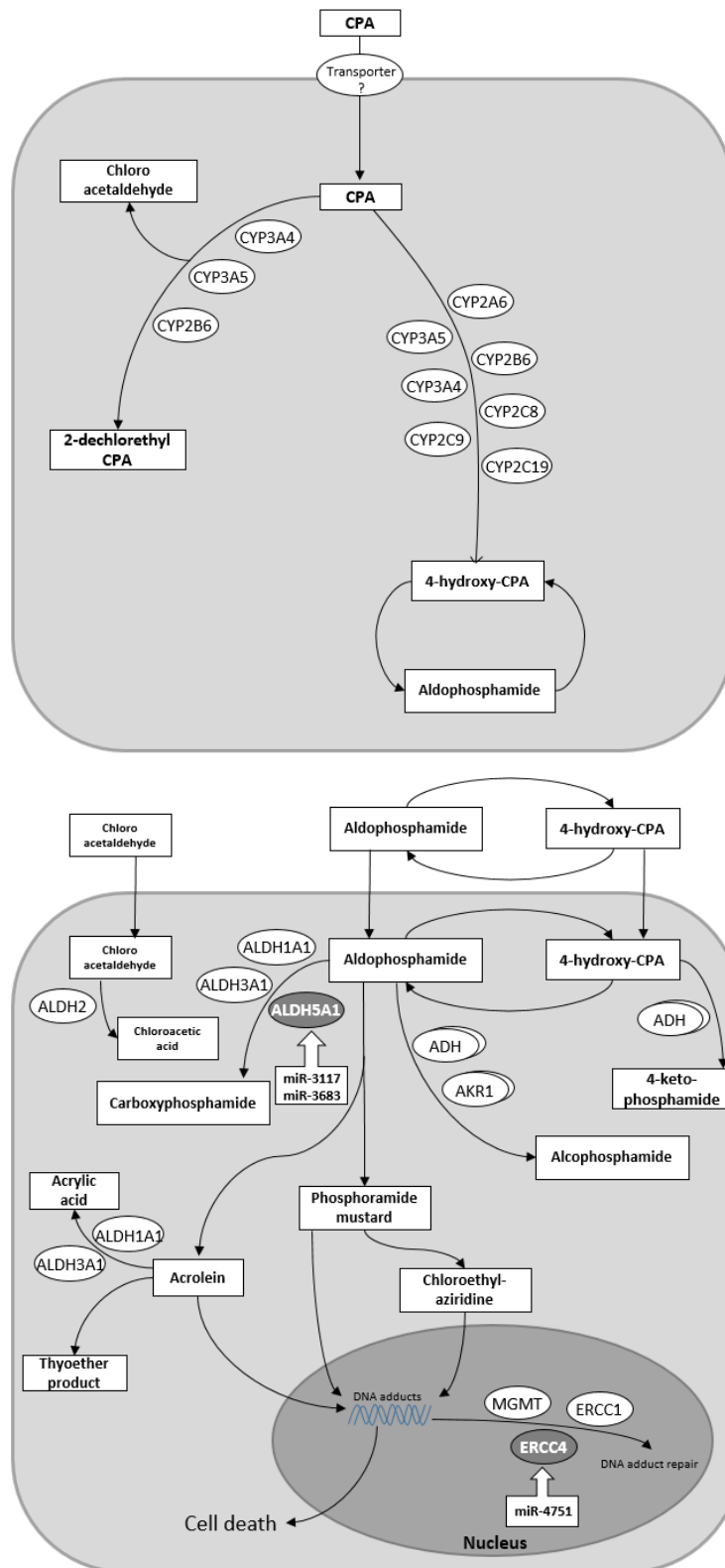
Azkenik, miR-3117-rentzat, MAPK seinalizazio bidezidorrak zeuden gain-adieraziak (33. taula).

33. taula. MiR-3117-3p-rentzat bidezidor aberastuak.

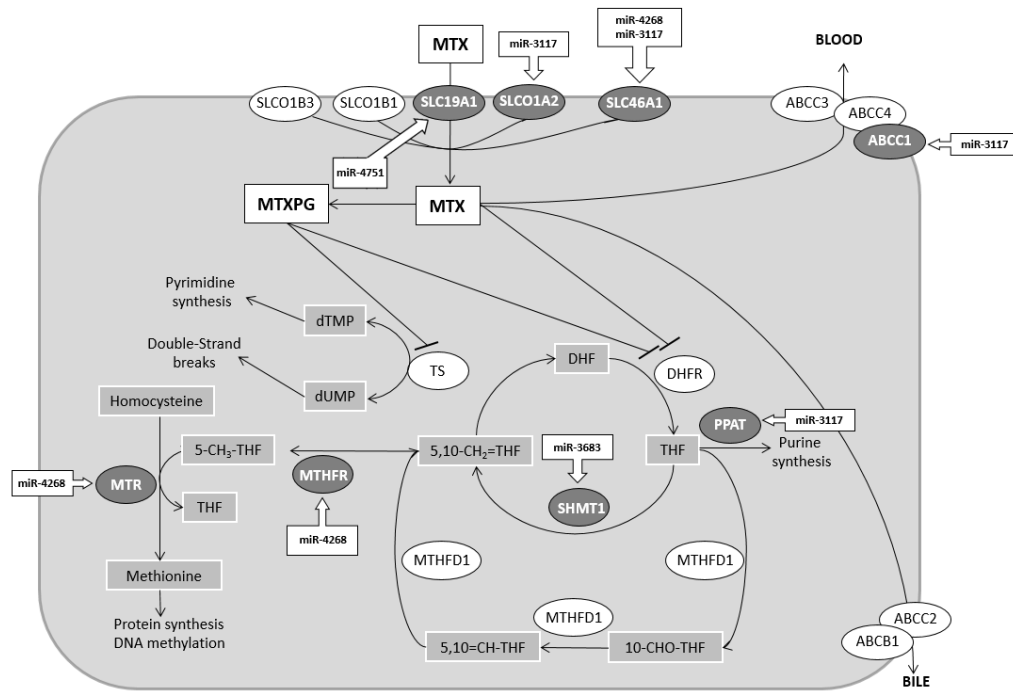
Zb.	Bidezidorren izena	Set tamaina	Kandidatuak	p-balioa	q-balioa	Bidezidor iturria
1	MAPK signaling pathway - Homo sapiens	257	24 (9.3%)	4.94e-07	0.000322	KEGG
2	Ras signaling pathway - Homo sapiens	228	21 (9.2%)	3.24e-06	0.00106	KEGG
3	Choline metabolism in cancer - Homo sapiens	101	13 (12.9%)	7.18e-06	0.00149	KEGG
4	PDGF signaling pathway	27	7 (25.9%)	9.14e-06	0.00149	BioCarta
5	Renal cell carcinoma - Homo sapiens	66	10 (15.2%)	1.95e-05	0.00254	KEGG
6	FoxO signaling pathway - Homo sapiens	134	14 (10.4%)	3.61e-05	0.00317	KEGG
7	ErbB signaling pathway - Homo sapiens	87	11 (12.6%)	4.32e-05	0.00317	KEGG
8	Signaling by EGFR in Cancer	15	5 (33.3%)	4.87e-05	0.00317	Reactome
9	Constitutive Signaling by Ligand-Responsive EGFR Cancer Variants	15	5 (33.3%)	4.87e-05	0.00317	Reactome
10	Signaling by Ligand-Responsive EGFR Variants in Cancer	15	5 (33.3%)	4.87e-05	0.00317	Reactome



22.irudia. Antraziklinen bidezidor PK/PD-ko geneak eta ikerketa honetako SNP esanguratsuenak dagozkion itu geneak seinatuz.



23.irudia. CPA-ren bidezidor PK/PD-ko geneak eta ikerketa honetako SNP esanguratsuenak dagozkion itu geneak seinalatuz.



24. irudia. MTX-aren bidezidor PK/PD-ko geneak eta ikerketa honetako SNP esanguratsuenak dagozkion itu geneak seinalatuz.

EZTABAIDA

Ikerketa honetan DNR, MTX edo CPA-ren bidezidorretako geneak zein mukositisarekin erlazionatutako beste gene batzuk ituztat dituzten miRNA-tako aldaeren eta mukositis, beherakoa eta gonbitoaren arteko asoziazioa zehaztu dugu. 206 miRNA-tako 213 SNP analizatu ditugu B-LLA diagnostikoa zuten eta LAL/SHOP protokoloekin homogeneoki tratatutako 179 haur espainiarretan.

Mukositisaren analisisian emaitza interesgarriena miR-4268-ko rs4674470-en AG+GG genotipoen eta toxizitate arrisku murriztuaren arteko asoziazioa izan zen. Azpimarragarria da, GG genotipodun paziente batek ere ez zuela mukositis garatu, eginkizun babeslea adieraziz. SNP hau miRNA urkilaren 3' amaieran kokatua dago, baina ez zituen ez egonkortasuna ez miRNA-ren egitura sekundarioa aldatu (21. irudia). Hala ere, kokapen hau DROSHA mikroprozesatzaileak pri-miRNA eta pre-miRNA arteko zatiketa gunea zehatz ezagutzeko posizio erabakiorra izan daiteke. DROSHA-k pre-miRNA-en mutur terminalak sortzen ditu, miRNA helduaren sekuentzia erabakiz, horrela, DROSHA bidezko prozesamendu zehatza erabakiorra da miRNA funtzionalen produkzioarako (Fang and Bartel, 2015; Kim et al., 2017). Ondorioz, SNP honen presentziak DROSHA-k zatiketa gunea ez ezagutzea ekar lezake eta beraz SNP aleloaren arabeko miRNA-ren produkzio baxuago batera. Aipagarria da miRNA hau miRbase datu-basean, miRNA-en erreferentziako datu-basea, G aleloarekin irudikatua dagoela, zeina alelo urriena den

(Kozomara and Griffiths-Jones, 2014). Erreferentzia datu-basean miRNA sekuentzia G aleloarekin irudikatua egoteak G aleloa dagoenean miRNA modu eraginkorragoan produzitzen dela adieraz lezake, DROSHA-k zatiketa gunea ezagutu duelako.

MiRNA honen bidezidoren analisiari dagokionez, DNR-ren bidezidorreko bi gene (*NFKBIE*, *CBR1*) eta MTX-ren bidezidorreko hiru gene (*MTHFR*, *MTR*, *SLC46A1*) aurkitu genituen. Hala ere, miR-4268-k gene hauek eragindako desregulazioak efektu kontrajarriak izan ditzake. Adibidez, *NFKBIE*-ren beheranzko erregulazioak zelula heriotzatik babestuko zukeen bitartean (Komissarova et al., 2008), *MTHFR* eta *MTR*-ren beheranzko erregulazioak apoptosi prozesu bat erraztuko luke (Kubota et al., 2014; Yang et al., 2017). Mukositisari lotutako beste gene batzuk identifikatzeko asmoz, bidezidoren aberaste analisi bat gauzatu genuen eta miR-4268-k itu gisa DFL-ren seinalizazio bidezidorra zuela ikusi genuen. Ikusi da *DFL*-ren adierazpena heste gaixotasun inflamatorioen mukosa inflamatueta gain adierazia dagoela (Zhou et al., 2016). *DFL*-k gene proinflamatorioen adierazpena modulatu du eta zitokinen jarioan eginkizun garrantzitsua du (Friday and Fox, 2016; Kang et al., 2014), mukositisaren garapenean eragina duen mekanismoa (Cinausero et al., 2017). Modu interesgarrian, *DFL*-ren isiltzeak zitokinen produkzioa eraginkorki blokeatu zuen (Sethu et al., 2010) eta heste mukosaren inflamazioa hobetu zuen (Zhou et al., 2016). Dagoeneko zehaztu da isiltze hau miRNA sorta batek bideratutakoa izan litekeela (Fite et al., 2016). Testuinguru honetan, miR-4268-ko rs4674470-ren GG genotipoak miRNA-ren adierazpen areagotze bat ekartzea posible litzateke DROSHA-ren ezagutza eraginkorrago bat medio eta miRNA-ren adierazpen areagotzeak aldi berean, *DFL*-rekin erlazionatutako geneen adierazpen baxuago bat ekarriko luke, bere eginkizun babeslea azalduz.

Beherakoari dagokionean, miR-4751-ko rs8667 izan zen SNP-ik estatistikoki esanguratsuen, AG+AA genotipoak eragin desiragaitza azaltzeko arrisku areagotua erakusten zuelarik eredu dominantearen baitan. SNP-a miR-4751-ren *pre-mature* sekuentzian kokatua dago, non A aleloak energia aldaketa xehe bat dakarren, zeinak ondorioz miRNA-ren mailak aldatuko lituzkeen (Gong et al., 2012). MiR-4751-k itutzat DNR-ren (*NDUFS2*), MTX-ren (*SLC19A1*) eta CPA-ren (*ERCC4*) bidezidorretako zenbait gene zituela aurkitu genuen. Gainera, bidezidoren aberaste analisiak TLR-en seinalizazio kaskadak gain adieraziak zeudela erakutsi zuen. TLR-en aktibazioak NF- κ B gisako transkripzio faktore proinflamatorioak induzitzen ditu, zeintzuek IL-1, IL-6 eta TNF bezalako gene proinflamatorioen adierazpena dakarten (Ramnath et al., 2017), mukosen kaltearen patobiologian eragina duten zenbait gertaera. Beraz, miR-4751-ko rs8667-k miRNA-ren maila alda lezake eta ondorioz haren farmako bidezidorretako zein TLR-en seinalizazioko itu geneen adierazpenean eragin, toxizitate areagotze bat bultzatuz.

Azkenik gonbitoan analisia, miR-3117-ko rs12402181 izan zen SNP-ik estatistikoki esanguratsuen eredu dominantearen baitan, zeinetan AG+AA genotipoek arrisku murriztua erakutsi zuten. SNP hau miR-3117-3p-ren *seed* sekuentzian kokatua dago eta ondorioz itu mRNA sekuentzien ezagupen zehatza oztopa lezake. Itu geneen artean DNR-ren (*ABCC1*), MTX-ren (*PPAT*, *SLC46A1*, *SLCO1A2* and *ABCC1*) eta CPA-ren (*ALDH5A1*) bidezidorretako zenbait gene aurkitzen ditugu. Bidezidorren aberaste analisi bidez, MAPK-ekin erlazionatutako bidezidorrak gain adieraziak zeudela aurkitu genuen. MAPK aktibitatea kritikoa da erantzun inflamatoriorako eta bere aktibazioa zenbait zitokinen produkzioarako aurrebaldintza da, IL-1, IL-8, IL-6 eta TNF kasu (van den Blink et al., 2001; Elsea et al., 2008; Reyes-Gibby et al., 2017). Ondorioz, *seed* eremuko rs12402181-k miR-3117-3p eta haren itu mRNA-en arteko ezagutza huts egitea eragin lezake, MAPK-ekin erlazionatutako bidezidorren aktibazio aberrante bat eraginez eta mukosaren kaltetzea bultzatuz.

Ikerketa honek baditu aipatu beharreko zenbait muga, adibidetzat genotipazio teknikan izandako akats tasa erlatiboki altua. Hala ere, akats aukera altu hau ikerketa hasi zen unetik onartu zen, genotipazio emaitza baxu bat aurreikusi arren polimorfismo espezifikook aplikatzeko beste diseinu aukerarik ez zegoelako. Beste ahultasun posible bat SNP-ek FDR zuzenketa aplikatu ondoren esangura estatistikora iritsi ez izana da. Hau miRNA-tako SNP-en maiztasun baxuagatik izan liteke, izan ere, mRNA-k eremu kontserbatuetan kokatuak egoten dira (Mishra et al., 2008). Azkenik, itu geneen eta bidezidorren determinazioarako erabilitako datu-baseetako iragarpen algoritmoen zehazgabetasuna kontuan hartu behar dugu, (Akhtar et al., 2016; Lee et al., 2015) hala ere, gaur egun muga hau onartu beharra dago.

Laburbilduz, haurtzaroko LLA terapiaren indukzio fasean, emaitzarik interesgarrienak miR-4268-ko, miR-4751-ko eta miR-3117-ko hiru SNP izan ziren hurrenez-hurren mukositis, beherako eta gonbitoan garapenean eragina izan lezaketenak. Eragin hau miRNA-ek farmako mukotoxikoen farmakozinetika eta farmakodinamikako geneetan duten efektuak azal lezake, baita mukosa lesioarekin erlazionatutako beste zenbait geneetan duten efektuak ere, bereziki erantzun inflamatorioan parte hartzen duten geneetan dutenak. Interesgarria litzateke emaitza hauek beste kohorte batean balidatzea.

AITORPENAK: Ikerketa hau Eusko Jaurlaritzak sostengatu zuen (IT989-16). Espainiar Genotipazio Zentroaren (CeGen) sostengua eskertzen da.

INTERESEN GATAZKA: Ezer deklaratzekorik.

ERREFERENTZIAK

Akhtar, M.M., Micolucci, L., Islam, M.S., Olivieri, F., and Procopio, A.D. (2016). Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Res.* 44, 24–44.

Al-Ansari, S., Zecha, J.A.E.M., Barasch, A., de Lange, J., Rozema, F.R., and Raber-Durlacher, J.E. (2015). Oral mucositis induced by anticancer therapies. *Curr. Oral Heal. Reports* 2, 202–211.

Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., and Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav. Brain Res.* 125, 279–284.

van den Blink, B., Juffermans, N.P., ten Hove, T., Schultz, M.J., van Deventer, S.J., van der Poll, T., and Peppelenbosch, M.P. (2001). p38 mitogen-activated protein kinase inhibition increases cytokine release by macrophages in vitro and during infection in vivo. *J. Immunol.* 166, 582–587.

Cinausero, M., Aprile, G., Ermacora, P., Basile, D., Vitale, M.G., Fanotto, V., Parisi, G., Calvetti, L., and Sonis, S.T. (2017). New frontiers in the pathobiology and treatment of cancer regimen-related mucosal injury. *Front. Pharmacol.* 8, 354.

Dweep, H., and Gretz, N. (2015). miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat. Methods* 12, 697.

Elsa, C.R., Roberts, D.A., Druker, B.J., and Wood, L.J. (2008). Inhibition of p38 MAPK suppresses inflammatory cytokine induction by etoposide, 5-fluorouracil, and doxorubicin without affecting tumoricidal activity. *PLoS One* 3, e2355.

Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Garapati, P., Gillespie, M., Hausmann, K., Haw, R., Jassal, B., Jupe, S., Korninger, F., McKay, S., et al. (2016). The Reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 44, D481-7.

Fang, W., and Bartel, D.P. (2015). The menu of features that define primary microRNAs and enable de novo design of microRNA genes. *Mol. Cell* 60, 131–145.

Fite, K., Elkhadragey, L., and Gomez-Cambronero, J. (2016). A Repertoire of MicroRNAs Regulates cancer cell starvation by targeting phospholipase D in a feedback loop that operates maximally in cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 36, 1078–1089.

Friday, S.C., and Fox, D.A. (2016). Phospholipase D enzymes facilitate IL-17- and TNF α -induced expression of proinflammatory genes in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (RASf). *Immunol. Lett.* 174, 9–18.

Gervasini, G., de Murillo, S.G., Jiménez, M., de la Maya, M.D., and Vagace, J.M. (2017). Effect of polymorphisms in transporter genes on dosing, efficacy and toxicity of maintenance therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Gene* 628, 72–77.

Gong, J., Tong, Y., Zhang, H.-M., Wang, K., Hu, T., Shan, G., Sun, J., and Guo, A.-Y. (2012). Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum. Mutat.* 33, 254–263.

- Gruber, A.R., Lorenz, R., Bernhart, S.H., Neubock, R., and Hofacker, I.L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res.* 36, W70-4.
- Gutierrez-Camino, A., Oosterom, N., den Hoed, M.A.H., Lopez-Lopez, E., Martin-Guerrero, I., Pluijm, S.M.F., Pieters, R., de Jonge, R., Tissing, W.J.E., Heil, S.G., et al. (2017). The miR-1206 microRNA variant is associated with methotrexate-induced oral mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet. Genomics* 27, 303–306.
- den Hoed, M.A.H., Lopez-Lopez, E., te Winkel, M.L., Tissing, W., de Rooij, J.D.E., Gutierrez-Camino, A., Garcia-Orad, A., den Boer, E., Pieters, R., Pluijm, S.M.F., et al. (2015). Genetic and metabolic determinants of methotrexate-induced mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* 15, 248–254.
- Johnston, W.T., Lightfoot, T.J., Simpson, J., and Roman, E. (2010). Childhood cancer survival: a report from the United Kingdom childhood cancer study. *Cancer Epidemiol.* 34, 659–666.
- Kamburov, A., Stelzl, U., Lehrach, H., and Herwig, R. (2013). The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Res.* 41, D793-800.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., and Morishima, K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 45, D353–D361.
- Kang, D.W., Choi, K.-Y., and Min, D.S. (2014). Functional regulation of phospholipase D expression in cancer and inflammation. *J. Biol. Chem.* 289, 22575–22582.
- Kim, B., Jeong, K., and Kim, V.N. (2017). Genome-wide mapping of DROSHA cleavage sites on primary microRNAs and noncanonical substrates. *Mol. Cell* 66, 258–269.e5.
- Komissarova, E. V, Li, P., Uddin, A.N., Chen, X., Nadas, A., and Rossman, T.G. (2008). Gene expression levels in normal human lymphoblasts with variable sensitivities to arsenite: identification of GGT1 and NFKBIE expression levels as possible biomarkers of susceptibility. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 226, 199–205.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 42, D68-73.
- Kubota, M., Nakata, R., Adachi, S., Watanabe, K.-I., Heike, T., Takeshita, Y., and Shima, M. (2014). Plasma homocysteine, methionine and S-adenosylhomocysteine levels following high-dose methotrexate treatment in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia or Burkitt lymphoma: association with hepatotoxicity. *Leuk. Lymphoma* 55, 1591–1595.
- Kuiken, N.S.S., Rings, E.H.H.M., Blijlevens, N.M.A., and Tissing, W.J.E. (2017). Biomarkers and non-invasive tests for gastrointestinal mucositis. *Support. Care Cancer* 25, 2933–2941.
- Le, Z., Niu, X., Chen, Y., Ou, X., Zhao, G., Liu, Q., Tu, W., Hu, C., Kong, L., and Liu, Y. (2017). Predictive single nucleotide polymorphism markers for acute oral mucositis in patients with nasopharyngeal carcinoma treated with radiotherapy. *Oncotarget* 8, 63026–63037.

- Lee, Y.J.D., Kim, V., Muth, D.C., and Witwer, K.W. (2015). Validated microRNA target databases: an evaluation. *Drug Dev. Res.* 76, 389–396.
- Liu, Y., Yin, Y., Sheng, Q., Lu, X., Wang, F., Lin, Z., Tian, H., Xu, A., and Zhang, J. (2014). Association of ABCC2 -24C>T polymorphism with high-dose methotrexate plasma concentrations and toxicities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 9, e82681.
- Lopez-Lopez, E., Ballesteros, J., Pinan, M.A., Sanchez de Toledo, J., Garcia de Andoin, N., Garcia-Miguel, P., Navajas, A., and Garcia-Orad, A. (2013). Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet. Genomics* 23, 53–61.
- Lopez-Lopez, E., Gutierrez-Camino, A., Pinan, M.A., Sanchez-Toledo, J., Uriz, J.J., Ballesteros, J., Garcia-Miguel, P., Navajas, A., and Garcia-Orad, A. (2014). Pharmacogenetics of microRNAs and microRNAs biogenesis machinery in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 9, e91261.
- Mishra, P.J., Mishra, P.J., Banerjee, D., and Bertino, J.R. (2008). MiRSNPs or MiR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: Introducing microRNA pharmacogenomics. *Cell Cycle* 7, 853–858.
- Muralidharan, N., Antony, P.T., Jain, V.K., Mariaselvam, C.M., and Negi, V.S. (2015). Multidrug resistance 1 (MDR1) 3435C>T gene polymorphism influences the clinical phenotype and methotrexate-induced adverse events in South Indian Tamil rheumatoid arthritis. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 71, 959–965.
- Radtke, S., Zolk, O., Renner, B., Paulides, M., Zimmermann, M., Moricke, A., Stanulla, M., Schrappe, M., and Langer, T. (2013). Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 121, 5145–5153.
- Ramnath, D., Powell, E.E., Scholz, G.M., and Sweet, M.J. (2017). The toll-like receptor 3 pathway in homeostasis, responses to injury and wound repair. *Semin. Cell Dev. Biol.* 61, 22–30.
- Reyes-Gibby, C.C., Melkonian, S.C., Wang, J., Yu, R.K., Shelburne, S.A., Lu, C., Gunn, G.B., Chambers, M.S., Hanna, E.Y., Yeung, S.-C.J., et al. (2017). Identifying novel genes and biological processes relevant to the development of cancer therapy-induced mucositis: An informative gene network analysis. *PLoS One* 12, e0180396.
- Sambrook, J, R.D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (New York: NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sangild, P.T., Shen, R.L., Pontoppidan, P.E.L., and Rathe, M. (2017). Animal models of chemotherapy-induced mucositis: translational relevance and challenges. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* ajpgi.00204.2017.
- Schmiegelow, K., Müller, K., Mogensen, S.S., Mogensen, P.R., Wolthers, B.O., Stoltze, U.K., Tuckuviene, R., and Frandsen, T. (2017). Open peer review non-infectious chemotherapy-associated acute toxicities during childhood acute lymphoblastic leukemia therapy. *F 1000 Res.* 1–14.
- Van Sebille, Y.Z.A., Stansborough, R., Wardill, H.R., Bateman, E., Gibson, R.J., and Keefe, D.M. (2015). Management of mucositis during chemotherapy: from pathophysiology to pragmatic therapeutics. *Curr. Oncol. Rep.* 17, 50.

- Sethu, S., Pushparaj, P.N., and Melendez, A.J. (2010). Phospholipase D1 mediates TNFalpha-induced inflammation in a murine model of TNFalpha-induced peritonitis. *PLoS One* 5, e10506.
- Sonis, S.T. (2004a). The pathobiology of mucositis. *Nat. Rev. Cancer* 4, 277–284.
- Sonis, S.T. (2004b). Oral mucositis in cancer therapy. *J. Support. Oncol.* 2, 3–8.
- Sonis, S.T. (2004c). A biological approach to mucositis. *J. Support. Oncol.* 2, 21-32-6.
- Sonis, S.T., Elting, L.S., Keefe, D., Peterson, D.E., Schubert, M., Hauer-Jensen, M., Bekele, B.N., Raber-Durlacher, J., Donnelly, J.P., Rubenstein, E.B., et al. (2004). Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer* 100, 1995–2025.
- Sonis, S.T., Antin, J., Tedaldi, M., and Alterovitz, G. (2013). SNP-based Bayesian networks can predict oral mucositis risk in autologous stem cell transplant recipients. *Oral Dis.* 19, 721–727.
- Staley, J.R., Blackshaw, J., Kamat, M.A., Ellis, S., Surendran, P., Sun, B.B., Paul, D.S., Freitag, D., Burgess, S., Danesh, J., et al. (2016). PhenoScanner: a database of human genotype-phenotype associations. *Bioinformatics* 32, 3207–3209.
- Yang, A., Sun, Y., Mao, C., Yang, S., Huang, M., Deng, M., Ding, N., Yang, X., Zhang, M., Jin, S., et al. (2017). Folate protects hepatocytes of hyperhomocysteinemia mice from apoptosis via cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-activated endoplasmic reticulum stress. *J. Cell. Biochem.* 118, 2921–2932.
- Zhou, G., Yu, L., Yang, W., Wu, W., Fang, L., and Liu, Z. (2016). Blockade of PLD2 ameliorates intestinal mucosal inflammation of inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm.* 2016, 2543070.

Metotrexatoaren miR-farmakogenetika haurtzaroko B-zelulen leuzemia linfoblastiko akutuan

Leire Iparraguirre¹; Angela Gutierrez-Camino¹; Maitane Umerez¹; Idoia Martin-Guerrero¹; Itziar Astigarraga^{2,3}; Aurora Navajas^{2,3}; Ana Sastre⁴; Nagore Garcia de Andoin⁵ eta Africa Garcia-Orad^{1,3}.

¹Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Medikuntza eta Odontologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Espainia; ²Hematologia/Onkologia Pediatriko Saila, Gurutzetako Unibertsitate Ospitalea, Bilbo, Espainia; ³Pediatria Saila, BioCruces Osasun Ikerketa Institutua, Barakaldo, Espainia; ⁴Onkohematologia Pediatriko Saila, La Paz Unibertsitate Ospitalea, Madril, Espainia; ⁵Onkohematologia Pediatriko Saila, Donostia Unibertsitate Ospitalea, Donostia, Espainia.

Laburpena

Helburuak: Metotrexatoak (MTX), farmako gakoa haurtzaroko B-zelulen leuzemia linfoblastiko akutuan (B-LLA), maiz toxizitatea sortzen du. MTX-aren garraio geneetako aldaera genetikoaren eta toxizitatearen arteko asoziazioa aurkitu da. Jakina da, garraiatzaile hauek mikroRNA-ek (miRNA) erregulatzen dituztela eta miRNA-ko nukleotido bakarreko polimorfismoek (SNP) miRNA-ren mailan eta funtzioan eragiten dute. B-zelulen LLA-ari dagokionez, aurrez aurkitua dugu itutzat *ABCC4* duen miR-323b-ko rs56103835, plasmako MTX mailekin asoziatua. Ebidentzia hauek izan arren eta gaur egun miRNA berrien kopuru handi bat zehaztu bada ere, miRNA polimorfismo eta MTX toxizitatearen inguruko ikerketak oso urriak dira. Hori horrela, ikerketa honen helburua, MTX-aren maila plasmatikoko eragina duten miRNA aldaera gehiago ote dauden zehaztea da. **Pazienteak eta metodoak:** LAL-SHOP protokoloarekin trataturiko haurtzaroko B-zelulen LLA zuten 167 gaixoen odol laginak aztertu ziren. MTX-aren garraio geneak itutzat dituzten miRNA guztiak definituak ez daudenez, MTX garraiatzaileak erregula ditzaketen pre-miRNA-tako SNP guztiak aukeratu genituen, alelo urrienaren frekuentzia % 1 baino handiagoa zutenak (213 SNP 206 miRNA-tan). Genotipazioa VeraCode GoldenGate plataforma erabiliz gauzatu zen. **Emaitzak:** Emaitza esanguratsuenen artean miR-5189-ko rs56292801, miR-595-eko rs4909237 eta miR-6083-ko rs78790512 aurkitu genituen plasmako MTX mailarekin erlazionaturik. *In silico* iragarri zen, miRNA hauek MTX-aren barneratzean parte hartzen duten *SLC46A1*, *SLC19A1* eta *SLCO1A2* geneak erregulatzen zituztela. **Ondorioak:** Ikerketa honetan, MTX-aren garraiatzaileak diren *SLC46A1*, *SLC19A1* eta *SLCO1A2* geneetan eragin dezaketen eta ondorioz haurtzaroko B-LLA duten pazienteen MTX mailetan eragin dezaketen 3 SNP detektatu ditugu miR-5189, miR-595 eta miR-6083-n.

Hitz gakoak: B-zelulen leuzemia linfoblastiko akutua, metotrexatoa, nukleotido bakarreko polimorfismoak.

SARRERA

Leuzemia linfoblastiko akutua (LLA) haurtzaroko minbizi mota ohikoena da (Johnston et al., 2010). Azken 20 urteotan, LLA-ren biziraupen tasa nabarmen hazi da kimioterapian eman diren aurrerapenak direla eta (Pui, 2010). LLA-ren terapiaren osagai garrantzitsu bat metotrexatoa (MTX) da. Eraginkorra den arren, MTX dosi altuek maiz toxizitatea sortzen dute, dosi murrizketa edo tratamendua etetea ekarriz, biziraupenean eragin dezakeelarik (Evans et al., 1998; Salazar et al., 2012; Treon and Chabner, 1996). Hori dela eta, medikuntza modernoaren erronketako bat toxizitatea zein pazientek jasango duten aurreikustea da tratamendua hasieratik doitu ahal izateko.

Azken urteotan, ikerketa ugari aztertu dute aldaera genetikoaren eta MTX-aren toxizitatearen arteko erlazioa (Lopez-Lopez et al., 2014b; Moriyama et al., 2015; Pui et al., 2015; Trevino et al., 2009). Eraitza interesgarrietako batzuk MTX-aren garraiatzaileetan aurkitu dira. Treviño eta lankideek (Trevino et al., 2009) aurkitu zuten lehen aldiz *SLCO1B1*-eko rs4149081 eta rs11045879 nukleotido bakarrek polimorfismoak (SNPak) MTX-aren argitzearekin irmoki asoziatuak zeudela LLA zuten pazienteetan. Lehen ekarpen horren ondoren, aldaera hauek eta *SLCO1B1*-eko beste batzuk baieztatuak izan dira ondorengo ikerketetan (Lopez-Lopez et al., 2011, 2013; Radtke et al., 2013; Ramsey et al., 2012, 2013). Ikerketa hauen ondorioz, beste lan batzuen interesa MTX-aren garraiatzaileetako aldaerak aztertzerantz bideratu da, hainbat SNP aurkitu direlarik berriro MTX mailekin asoziatuak, *SLC19A1*, *ABCC4* edo *ABCC2* bezalako geneetan (Laverdiere et al., 2002; Lopez-Lopez et al., 2013).

Gaur egun, jakina da MTX-aren garraiorako geneak, gure geneen % 50 bezala, mikroRNA-en (miRNA) bidez erregulatzen direla maila postranskripzionalean (Rukov and Shomron, 2011). Horregatik, miRNA-en mailetan edo funtzioan emandako aldaketek, beraien iturri geneen adierazpenean eragina izan dezakete. MiRNA-en geneetako SNP-ek, hauen mailan edo funtzioan eragin dezaketela kontuan hartuz, aldaera hauek MTX-aren garraio geneen erregulazioan eragina izan dezaketela espero genezake. Aldaera hauek dagoeneko beste farmako batzuen toxikotasunarekin erlazionatu dira (Amstutz et al., 2015; Meulendijks et al., 2016; Zhan et al., 2012). Haurtzaroko B-zelulen leuzemia linfoblastiko akutuari (B-LLA) dagokionez, gure taldeak aurretik gauzatutako ikerketa batean 42 pre-miRNA-tako 46 SNP aztertu genituen eta SNP bat aurkitu genuen kontsolidazio faseko MTX argitzearekin esanguratsuki asoziatuak, miR-453-ko (ezaguna miR-323b bezala ere) rs56103835 hain zuzen ere. Interesgarria da aipatzea, miRNA honek *ABCC4* duela ustezko iturri gene, zeina, MTX-en garraioarekin erlazionatuta dagoen (Lopez-Lopez et al., 2014a).

Kontuan hartuz gure azken ikerketaz geroztik zehaztuak izan diren miRNA-en kopurua nabarmen hazi dela (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014) eta miRNA-en ituak guztiz definituak ez daudela eta edozein miRNA-k MTX-aren garraio geneen erregulazioan parte har dezakeela, ikerketa honen helburua, egun deskribaturiko miRNA aldaeraren bat MTX-ren maila plasmaticoekin asoziatuak dagoen ikustea da haurtzaroko LLA duten pazienteetan. Hau lortzeko helburuarekin, alelo urrienaren frekuentzia 0,01 baino handiagoa zuten miRNA-tako aldaera guztiak aztertu genituen B-LLA-dun espainiar populazio handi batean.

PAZIENTEAK ETA METODOAK

Pazienteak

Atzera begirako ikerketa honetan, haurtzaroko B-LLA-dun 167 paziente espainiar sartu ziren, hiru ospitale espainiarretako onkologia pediatriko unitateetan diagnostikatuak (Gurutzeta Unibertsitate Ospitalea, Donostia Unibertsitate Ospitalea eta La Paz Unibertsitate Ospitalea, 2000-tik 2013-ra bitartean). Laginak jaso baino lehen paziente guztien edo haien gurasoen idatzizko baimen informatua jaso zen. Ikerketa honek Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) kontseiluaren onarpena (CEISH/102R/2011) lortu zuen.

Tratamendua eta toxizitatearen ebaluazioa

Ikerketan sarturiko paziente guztiak LAL-SHOP 94/99 eta 2005 protokoloekin homogeneoki tratatuak izan ziren. Protokolo hauen kontsolidazio fasean zehar MTX-aren hiru dosi (dosi bakoitzak 3 edo 5 g/m² zituen), 6-merkaptopurina (30 mg/m²/egun, 6 astez), zitarabinaren lau dosi (1 g/m²), eta terapia intratekalaren lau dosi ematen ziren. MTX-aren hiru dosietako bakoitza 24 orduko infusioan ematen zen, azido folinikoaren erreskateekin batera. Dosi bakoitzaren ondoren, MTX-ren kontzentrazioa plasmaticoa monitorizatu zen fluoreszentzia polarizazio immunoentsegu baten bidez TDx sistema batean (Abbott laborategiak, Abbott Park, Illinois, AEB). Plasma kontzentrazioak egunero neurtu ziren 0,2µmol/l azpitik egon ziren arte.

MTX-aren maila plasmaticoak kontsolidazio fasean jaso ziren, infusioa hasi eta 48, 72 eta 96 h-tara. Datuak pazienteen historia klinikoetatik jaso ziren, genotipoei itsu. MTX-aren mailak altutzat hartu ziren baldin eta hiru dosietako baten ondoren 48 h-tako kontzentrazioak 1 µmol/l gainditzen bazuen edo 72 h zein 96 h-tako kontzentrazioak 0,2 µmol/l baino altuagoak baziren, aurretik deskribatu bezala (Lopez-Lopez et al., 2013; Suthandiram et al., 2014). Horrez gain, plasmako MTX maila global altua kontsideratu zen, maila plasmaticoek ezarritako kontzentrazio atalaseak gainditzen bazituzten kontsolidazio faseko edozein ziklotan zehar. Sexu eta adin datuak erregistro klinikoetatik sistematikoki jaso ziren.

Gene eta polimorfismoen aukeraketa

Kontuan hartuz alde batetik, gaur egun MTX-aren garraiatzaileak itutzat dituzten miRNA-k ez daudela guztiz definituak eta bestetik, MTX-ren garraiatzaileen erregulazioan zuzenki edo zeharka edozein miRNA inplikaturik egon litekeela, ikerketa egin zen unean (2014-ko maiatza) SNPak deskribaturik zituzten miRNA gene guztiak aukeratu genituen. 969 miRNA-tako 1910 SNP-etatik, populazio europar/kaukasiarren alelo urrienaren frekuentzia 0,01 baino altuagoa zuten SNP-ak aukeratu genituen. SNP-en aukeraketarako, mirbase (<http://www.mirbase.org/>), miRNA SNIPER (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP2/index.php>), eta dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) datu baseak erabili genituen, baita literaturaren araketa ere.

Ikerketan 206 miRNA-tako 213 SNP aukeratu ziren (ikus 11. taula).

Genotipazioa

ADN genomikoa erremisioan zeuden LLA-dun pazienteen odol periferiko edo hezur muintetik erauzi zen fenol-kloroformo metodoa erabiliz, aurrez deskribatu bezala (Sambrook, J, 2001). ADN-a PicoGreen (Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornia, AEB) bidez kuantifikatu zen.

Lagin bakoitzarentzat, 400 ng ADN genotipatu ziren Veracode teknologiadun GoldenGate Genotipazio Saiakuntza (Illumina Inc., San Diego, Kalifornia, AEB) erabiliz argitaratutako Illumina protokoloaren arabera. Datuak genotipoen *clustering* eta *calling*-erako GenomeStudio (Illumina Inc.) software bidez analizatu ziren. Lagin bikoiztuak eta CEPH hirukoak (Coriell Cell Repository, Camden, New Jersey, AEB) genotipatu ziren plaketan zehar. Transmisio-aleliko mendeliar akatsak edo genotipo diskordanteak erakusten zituzten SNP-ak analitik baztertu ziren.

Analisi estatistikoa

MTX mailen eragina zehazteko χ^2 edo Fisher-en frogak zehatza erabili zen. Asoziazio efektuen tamaina odds ratio bidez estimatu zen. MTX dosiak izan lezakeen efektu nahasle posiblea kontabilizatzeko erregresio logistikoa multibarianteak erabili ziren. Gainera, 5 g/m²-ko dosiarekin tratatutako populazioa modu independentean aztertu genuen erregresio logistikoa unibariantea erabiliz. Analisi hau burutu genuen emaitza esanguratsuen lorpenerako 5 g/m²-ko dosiak ekarpen handiagoa izango zukeela kontsideratuz. Eredu dominante eta errezesiboen arteko frogak esanguratsuenak aukeratu zen. Kasu guztietan esangura maila % 5-ean ezarri zen. Emaitzak konparaketa anitzetarako false discovery rate (FDR) zuzenketa bidez egokitu ziren (Benjamini et al., 2001). Analisisak R v3.3.0. software bidez gauzatu ziren.

Analisi bioinformatikoa

MiRNA-en itu geneak miRWalk datu basean oinarrituz aukeratu ziren. MiRWalk-en baitako 12 iragarpen programetarik, gutxienez 6 programek konfirmatutako geneak aukeratu ziren (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html>) (Dweep et al., 2011). Itu gene guztietatik MTX-ren bidezidorrean parte hartzen zutenak aukeratzeko Pharmacogenomic Knowledge Base (PharmGKB) (<https://www.pharmgkb.org/>) datu-basea erabiliz. RNAfold web tresna (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) (Gruber et al., 2008) erabili zen SNP-ek egitura sekundarioen gutxienerako energia aske eta urkila egituren energia aldaketan ($\Delta\Delta G$) zuten inpaktua kalkulatzeko.

EMAITZAK

Pazienteen ezaugarriak

Ikerketa honetan, haurtzaroko B-LLA zuten eta kontsolidazio fasean MTX mailaren datua gutxienez puntu batean eskuragai zuten 167 paziente sartu genituen. Gizonezkoen kopuru altuagoa behatu zen, % 59,88 (n=100) gizonak eta % 40,12 (n=67) emakumezkoak baitziren. Batz besteko adina ez zen bi taldeen artean aldatu (34. taula).

MTX-ren plasmako mailaren datua 48 h-tara 159 pazienterentzat izan zen eskuragarri, 72 h-tara 163 pazienterentzat eta 96 h-tara 152 pazienterentzat (35. taula). Kontsolidazio faseko edozein puntutan, MTX maila altuak zeuzkaten pazienteen artean (n=62, % 37,13), plasmako MTX maila altuen maiztasuna altuagoa zen 5 g/m²-ko dosia jaso zutenentzat 3 g/m²-ko dosia jaso zutenentzat baino. (3,4 : 1). Desberdintasun hau 48 h (3,3 : 1) eta 72 h-tara (2,5 : 1) mantendu egin zen eta 96 h-tara areagotu (4,5 : 1) (35. taula).

Genotipazio emaitzak

Genotipazioa arrakasta lortu zen 167-tik 147 (% 88,02) ADN laginentzat. Genotipazio prozesuan zehar, 213 SNP-etatik 53-k (% 24,88) laginen % 20 baino gehiagotan huts egin zuten (ikus 12. taula) eta ondorioz ikerketatik baztertu ziren. Akats hauek PCR anplifikazio ezagatik, klusterraren banaketarako nahikoa ez zen intentsitateagatik edo klusterren definizio urri edo nuluagatik izan ziren. Genotipazio arrakastatsua 160 SNP-entzat lortu zen (% 75,12).

34. taula. Haurtzaroko B-LLA-dun pazienteen ezaugarriak.

Paziente kopurua, n	167
Sexua, n (%)	
Emakumezkoak	67(40,12)
Gizonezkoak	100 (59,88)
Adina diagnostikoan, batezbestekoa ± DE (urteak)	5,2 ± 3,26
Emakumezkoak	5,0 ± 3,13
Gizonezkoak	5,3 ± 3,23
Tratamendu protokoloa, n (%)	
LAL-SHOP 94/99	65 (38,92)
LAL-SHOP 2005	102 (61,08)
MTX dosia kontsolidazioan, n (%)	
3 g/m ²	72 (43,11)
5 g/m ²	95 (56,89)
MTX plasma maila globalak, n (%)	
MTX maila plasmatico altua	62 (37,13)
MTX maila plasmatico normala	105 (62,87)

35. taula. MTX maila plasmatico datuak.

	Globala	48h	72h	96h
5 g/m² (n=95)				
Maila normalak, n (%)	47 (49,48)	57 (60,0)	49 (51,58)	59 (62,10)
Maila altuak, n (%)	48 (50,52)	33 (34,74)	43 (45,26)	27 (28,42)
NA, n (%)	0 (0,0)	5 (5,26)	3 (3,16)	9 (9,48)
3 g/m² (n=72)				
Maila normalak, n (%)	58 (80,56)	59 (81,94)	58 (80,55)	60 (83,33)
Maila altuak, n (%)	14 (19,44)	10 (13,88)	17 (23,61)	6 (8,33)
NA, n (%)	0 (0,0)	3 (4,18)	1 (4,16)	6 (8,34)
5 g/m² eta 3 g/m² (n=167)				
Maila normalak, n (%)	105 (62,87)	116 (69,46)	107 (64,07)	119 (71,25)
Maila altuak, n (%)	62 (37,13)	43 (25,75)	56 (33,53)	33 (19,76)
NA, n (%)	0 (0,0)	8 (4,79)	4 (2,4)	15 (8,99)

Laburdurak: NA, datua ez eskuragarri denbora puntu horretan.

Asoziazio azterketa

MiRNA-tako aldaera genetikoek MTX mailetan eragina duten ikertzeko, era arrakastatsuan genotipaturiko 154 miRNA-tako 160 polimorfismoen eta plasmako MTX kontzentrazioen arteko asoziazioa aztertu genuen. Analisia MTX-ren infusioan zehar edozein momentutan, 48, 72 eta 96 h-tara egin zen homogeneoki tratatutako haurtzaroko B-LLA-dun 147 espainiar pazienteko kohorte batean. Guztira, 15 miRNA genetako 15 polimorfismok erakutsi zuten asoziazio esanguratsua MTX-ren maila plasmaticoekin ($P < 0,05$) (36. eta 37. taulak). Asoziazio esanguratsuenak eta gainera denbora puntu ezberdinetan koherente mantendu zirenak, miR-

5189, miR-595, eta miR-6083-rentzat aurkitu ziren (36. taula). SNP hauek ez ziren balio esanguratsuetara iritsi FDR zuzenketa aplikatzean.

MiR-5189-n, rs56292801 AA+AG genotipoek MTX-ren plasmako maila altuak izateko 0,4 aldiz arrisku txikiagoa erakutsi zuten analisi guztietan (36. taula). Analisia 5 g/m²-ko dosia jaso zuten pazienteen taldean burutzean, asoziazioak p-balio esanguratsua bat erakutsi zuen eta gainera, miRNA bereko beste SNP batek, rs35613341-ek emaitza esanguratsua azaldu zuen (38. taula).

MiR-595-ri dagokionez, rs4909237 TT genotipoa plasmako MTX maila altu globalak izateko 5,7 aldiz arrisku handiagoarekin asoziatu zen ($P = 0,028$), eta emaitza esanguratsua erakutsi zituen 48 h ($P = 0,031$) eta 72 h-tara ($P = 0,015$). 96 h-tara p-balio esanguratsura iritsi ez bazen ere, ia esanguratsua izan zen ($P = 0,065$).

MiR-6083-ren kasuan, rs78790512 AA genotipoa ez zen plasmako MTX maila altua zuten pazienteengan aurkitu. Balio esanguratsua aurkitu zen MTX-ren maila plasmatikoko globalarentzat ($P = 0,007$), baita 48 h ($P = 0,026$) eta 72h-tara ere ($P = 0,011$). Gainera, 96 h-tara ia esanguratsua izan zen ($P = 0,051$), aurreko denbora uneetako joera bera erakutsiz. 5 g/m²-ko dosia jaso zuten paziente taldean analisia gauzatu genuenean, plasmako MTX maila altuekin asoziatu zen baita ere (38. taula).

Beste 12 miRNA-tako 12 SNP MTX mailarekin asoziatu ziren gutxienez analisisietako batean. Baina, asoziazio hauek ez ziren modu koherentean aurkitu aztertutako denbora une guztietan (37. taula).

36. taula. B-LLA-dun gaixoetan plasmako MTX mailarekin asoziazio esanguratsuen erakusten duten miRNA-tako SNPak.

miRNA SNP	Posizioa Kokapena	Genotipoa	Globala (n=147)		Eredua OR. KT (% 95) P-balioa	48h (n=139)		Eredua OR. KT (% 95) P-balioa	72h (n=143)		Eredua OR. KT (% 95) P-balioa	96h (n=133)		Eredua OR. KT (% 95) P-balioa
			Maila normalak N=90	Maila altuak N=57		Maila normalak N=98	Maila altuak N=41		Maila normalak N=92	Maila altuak N=51		Maila normalak N=102	Maila altuak N=31	
hsa-mir-5189 rs56292801	Kr:16 Pre-mature	GG	41 (45.6)	36 (64.3)	Dominantea 0.42 (0.20-0.89)	44 (44.4)	26 (65.0)	Dominantea 0.4 (0.18-0.89)	42 (45.7)	32 (64.0)	Dominantea 0.42 (0.19-0.90)	48 (46.6)	21 (67.7)	Dominantea 0.41 (0.17-0.99)
		AG	40 (44.4)	18 (32.1)		44 (44.4)	13 (32.5)		41 (44.6)	16 (32.0)		44 (42.7)	9 (29.0)	
		AA	9 (10.0)	2 (3.6)		0.021	11 (11.1)		1 (2.5)	0.021		9 (9.8)	2 (4.0)	
hsa-mir-595 rs4909237	Kr:2 Pre-mature	CC	59 (65.6)	35 (62.5)	Errezesiboa 5.70 (1.02-31.70)	64 (64.6)	23 (57.5)	Errezesiboa 4.94 (1.08-22.6)	60 (65.2)	31 (62.0)	Errezesiboa 6.69 (1.21-37.04)	67 (65.0)	18 (58.1)	Errezesiboa 4.72 (0.89-24.94)
		CT	29 (32.2)	14 (25.0)		32 (32.3)	11 (27.5)		30 (32.6)	12 (24.0)		33 (32.0)	9 (29.0)	
		TT	2 (2.2)	7 (12.5)		0.028	3 (3.0)		6 (15.0)	0.031		2 (2.2)	7 (14.0)	
hsa-mir-6083 rs78790512	Kr:3 Pre-mature	GG	60 (66.7)	41 (71.9)	Errezesiboa 0.0 (0.0)	66 (66.7)	30 (73.2)	Errezesiboa 0.0 (0.0)	62 (67.4)	36 (70.6)	Errezesiboa 0.0 (0.0)	69 (67.0)	24 (77.4)	Errezesiboa 0.0 (0.0)
		AG	24 (26.7)	16 (28.1)		27 (27.3)	11 (26.8)		24 (26.1)	15 (29.4)		28 (27.2)	7 (22.6)	
		AA	6 (6.7)	0 (0.0)		0.007	6 (6.1)		0 (0.0)	0.026		6 (6.5)	0 (0.0)	

Laburdurak: OR, Odds-ratio; KT., Konfiantza tarte; Kr, kromosoma.

Oharrak: Letra lodiek P-balio esanguratsuek adierazten dituzte; paziente batzuen MTX maila plasmatikoen datuak ez ziren eskuragarri izan 48 h-tara (NA=8), 72 h-tara (NA=4) eta 96 h-tara (NA=14).

37. taula. B-LLA-dun gaixoetan plasmako MTX mailekin asoziazioa soilik denbora puntu batzuetan erakutsi zuten miRNA-tako SNP-ak.

miRNA	SNP	Posizioa Kokapena	Genotipoa	Globala (n=147)		Eredua OR. KT (% 95) P-balioa	48h (n=139)		Eredua OR. KT (% 95) P-balioa	72h (n=143)		Eredua OR. KT (% 95) P-balioa	96h (n=133)		Eredua OR. KT (% 95) P-balioa
				Maila normalak N=90	Maila altuak N=57		Maila normalak N=98	Maila altuak N=41		Maila normalak N=92	Maila altuak N=51		Maila normalak N=102	Maila altuak N=31	
hsa-mir-1206 rs2114358	Kr:8 Pre-mature	TT	27 (30.0)	25 (45.0)	Dominantea. 0.37 (0.17-0.82)	31 (31.3)	16 (41.0)	Dominantea 0.50 (0.21-1.15)	27 (29.3)	23 (70.6)	Dominantea 0.32 (0.14-0.73)	33 (32.0)	14 (45.2)	Dominantea 0.45 (0.19-1.10)	
		CT	45 (50.0)	24 (43.6)		49 (49.5)	19 (48.7)		47 (51.1)	21 (42.9)		52 (50.5)	13 (41.9)		
		CC	18 (20.0)	6 (10.9)		0.012	19 (19.2)		4 (10.3)	18 (19.6)		5 (10.2)	0.005		18 (17.5)
hsa-mir-4792 rs11714172	Kr:3 Pre-mature	TT	37 (41.6)	18 (31.6)	Dominantea 1.78 (0.84-3.78)	41 (41.8)	11 (26.8)	Dominantea 2.25 (0.97-5.21)	38 (41.8)	14 (27.5)	Dominantea 2.23 (1.01-4.92)	42 (41.2)	7 (22.6)	Dominantea 2.67 (1.04-5.99)	
		GT	37 (41.6)	32 (56.1)		40 (40.8)	27 (65.9)		38 (41.8)	31 (60.8)		43 (42.2)	20 (64.5)		
		GG	15 (16.9)	7 (12.3)		0.128	17 (17.3)		3 (7.3)	15 (16.5)		6 (1.8)	0.043		17 (16.7)
hsa-mir-5007 rs1572687	Kr:13 Pre-mature	CC	32 (35.6)	15 (26.3)	Errezesiboa 1.84 (0.75-4.52)	33 (33.3)	13 (31.7)	Errezesiboa 2.31 (0.92-2.18)	33 (35.9)	14 (27.5)	Errezesiboa 1.88 (0.76-4.66)	33 (32.0)	11 (35.5)	Errezesiboa 3.86 (1.46-10.19)	
		CT	44 (48.9)	28 (49.1)		51 (51.5)	16 (39.0)		45 (48.9)	24 (47.1)		55 (53.4)	8 (25.8)		
		TT	14 (15.6)	14 (24.6)		0.180	15 (15.2)		12 (29.3)	14 (15.2)		13 (25.5)	0.171		15 (14.6)
hsa-mir-4700 rs1055070	Kr:12 Mature	TT	76 (84.4)	56 (98.2)	Dominantea 0.11 (0.01-0.90)	85 (85.9)	40 (97.6)	Dominantea 0.18 (0.02-1.46)	78 (84.8)	50 (98.0)	Dominantea 0.13 (0.02-1.04)	89 (86.4)	30 (96.8)	Dominantea 0.26 (0.03-2.14)	
		GT	13 (14.4)	1 (1.8)		13 (13.1)	1 (2.4)		13 (14.1)	1 (2.0)		13 (12.6)	1 (3.2)		
		GG	1 (1.1)	0 (0.0)		0.007	1 (1.0)		0 (0.0)	1 (1.1)		0 (0.0)	0.014		1 (1.0)
hsa-mir-323b rs56103835	Kr:14 Pre-mature	TT	66 (73.3)	35 (61.4)	Dominantea 1.88 (0.87-4.05)	70 (70.7)	28 (68.3)	Dominantea 1.15 (0.50-2.63)	67 (72.8)	33 (64.7)	Errezesiboa 0.0 (0.0)	73 (70.9)	21 (67.7)	Errezesiboa 0.0 (0.0)	
		CT	19 (21.1)	21 (36.8)		24 (24.2)	12 (29.3)		19 (20.7)	18 (35.3)		24 (23.3)	10 (32.3)		
		CC	5 (5.6)	1 (1.8)		0.107	5 (5.1)		1 (2.4)	6 (6.5)		0 (0.0)	0.021		6 (5.8)
hsa-mir-4432 rs243080	Kr:2 Pre-mature	CC	25 (28.1)	16 (29.6)	Errezesiboa 2.15 (0.96-4.85)	26 (26.5)	14 (36.8)	Errezesiboa 1.75 (0.74-4.12)	27 (29.7)	13 (27.1)	Errezesiboa 2.56 (1.12-5.83)	28 (27.7)	12 (40.0)	Errezesiboa 1.80 (0.73-4.46)	
		CT	47 (52.8)	17 (31.5)		51 (52.0)	10 (26.3)		47 (51.6)	15 (31.2)		50 (49.5)	6 (20.0)		
		TT	17 (19.1)	21 (38.9)		0.063	21 (21.4)		14 (36.8)	17 (18.7)		20 (41.7)	0.025		23 (22.8)
hsa-mir-4268 rs4674470	Kr:2 Pre-mature	TT	61 (67.8)	31 (54.4)	Dominantea 2.33 (1.08-5.00)	66 (66.7)	23 (56.1)	Dominantea 1.95 (0.88-4.35)	61 (66.3)	29 (56.9)	Dominantea 1.82 (0.85-3.92)	68 (66.0)	17 (54.8)	Dominantea 2.00 (0.83-4.79)	
		CT	24 (26.7)	21 (36.8)		27 (27.3)	16 (39.0)		26 (28.3)	18 (35.3)		28 (27.2)	13 (41.9)		
		CC	5 (5.6)	5 (8.8)		0.027	6 (6.1)		2 (4.9)	5 (5.4)		4 (7.8)	0.121		7 (6.8)
hsa-mir-4520a rs8078913	Kr:17 Mature	CC	26 (31.0)	21 (40.4)	Errezesiboa 2.22 (0.81-6.12)	29 (31.9)	14 (36.8)	Errezesiboa 3.23 (1.11-9.36)	27 (31.4)	18 (39.1)	Errezesiboa 2.18 (0.79-6.06)	32 (33.0)	11 (37.9)	Errezesiboa 2.67 (0.86-8.29)	
		CT	44 (52.4)	20 (38.5)		48 (52.7)	14 (36.8)		45 (52.3)	18 (39.1)		50 (51.5)	11 (37.9)		
		TT	14 (16.7)	11 (21.2)		0.118	14 (15.4)		10 (26.3)	0.029		14 (16.3)	10 (21.7)		0.132
hsa-mir-4467 rs60871950	Kr:7 Mature	AA	28 (31.1)	14 (25.9)	Errezesiboa 0.61 (0.26-1.41)	29 (29.3)	10 (26.3)	Errezesiboa 0.35 (0.13-0.97)	28 (30.4)	11 (22.9)	Errezesiboa 0.68 (0.29-1.60)	28 (27.2)	9 (30.0)	Errezesiboa 0.38 (0.13-1.13)	
		AG	34 (37.8)	28 (51.9)		37 (37.4)	22 (57.9)		36 (39.1)	26 (54.2)		41 (39.8)	16 (53.3)		
		GG	28 (31.1)	12 (22.2)		0.244	33 (33.3)		6 (15.8)	0.033		28 (30.4)	11 (22.9)		0.370
hsa-mir-604 rs2368392	Kr: 10 Pre-mature	CC	55 (61.1)	31 (54.4)	Dominantea 1.76 (0.84-3.71)	61 (61.6)	21 (51.2)	Dominantea 1.88 (0.86-4.13)	56 (60.9)	27 (52.9)	Dominantea 1.75 (0.82-3.72)	63 (61.2)	14 (45.2)	Dominantea 2.50 (1.04-5.99)	
		CT	32 (35.6)	24 (42.1)		35 (35.4)	18 (43.9)		33 (35.9)	22 (43.1)		37 (35.9)	15 (48.4)		
		TT	3 (3.3)	2 (3.5)		0.133	3 (3.0)		2 (4.9)	3 (3.3)		2 (3.9)	0.142		3 (2.9)
hsa-mir.4745 rs10422347	Kr: 19 Mature	CC	73 (83.9)	44 (78.6)	Errezesiboa 0.0 (0.0)	81 (84.4)	32 (80.0)	Errezesiboa 0.0 (0.0)	73 (82)	42 (84)	Errezesiboa 0.0 (0.0)	83 (83.0)	25 (80.6)	Errezesiboa 0.0 (0.0)	
		CT	14 (16.1)	10 (17.9)		15 (15.6)	6 (15.0)		16 (18)	6 (12)		17 (17.0)	4 (12.9)		
		TT	0 (0.0)	2 (3.6)		0.114	0 (0.0)		2 (5.0)	0 (0)		2 (4)	0.092		0 (0.0)
hsa-mir-1265 rs11259096	Kr:10 Pre-mature	TT	82 (91.1)	47 (82.5)	Dominantea 2.35 (0.80-6.94)	91 (91.9)	33 (80.5)	Dominantea 3.23(1.03-10.12)	83 (90.2)	43 (84.3)	Dominantea 1.83 (0.61-5.47)	92 (89.3)	27 (87.1)	Dominantea 1.37 (0.37-4.98)	
		CT	7 (7.8)	10 (17.5)		7 (7.1)	8 (19.5)		8 (8.7)	8 (15.7)		10 (9.7)	4 (12.9)		
		CC	1 (1.1)	0 (0.0)		0.118	1 (1.0)		0 (0.0)	0.044		1 (1.1)	0 (0.0)		0.284

Laburdurak: OR, Odds-ratio; KT., Konfiantza tartea; Kr, kromosoma. **Oharrak:** Letra lodiek P-balio esanguratsuak adierazten dituzte; paziente batzuen MTX maila plasmatikoen datuak ez ziren eskuragarri izan 48 h-tara (NA=8), 72 h-tara (NA=4) eta 96 h-tara (NA=14).

38. taula. 5g/m² MTX dosiarekin tratatutako B-LLA-dun gaixoetan plasmako MTX mailarekin asoziazioa erakusten duten miRNA-tako SNPak.

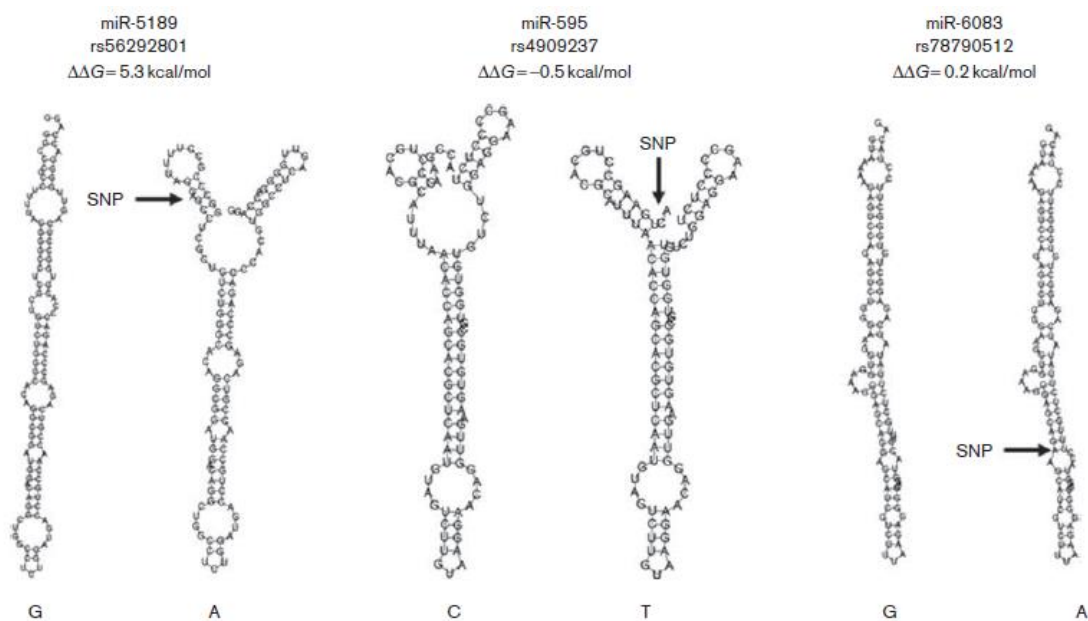
miRNA SNP	Posizioa Kokapena	Genotipoa	Globala (n=86)		Eredua OR. KT (% 95) p-balioa	48h (n=81)		Eredua OR. KT (% 95) p-balioa	72h (n=83)		Eredua OR. KT (% 95) p-balioa	96h (n=77)		Eredua OR. KT (% 95) p-balioa
			Maila normalak N=40	Maila altuak N=46		Maila normalak N=48	Maila altuak N=33		Maila normalak N=42	Maila altuak N=41		Maila normalak N=51	Maila altuak N=26	
hsa-mir-5189 rs56292801	Kr:16 Pre-mature	GG	15 (37.5)	31 (67.4)	Dominantea 0.29 (0.12-0.71)	18 (37.5)	23 (69.7)	Dominantea 0.26 (0.10-0.67)	16 (38.1)	27 (65.9)	Dominantea 0.32 (0.13-0.78)	21 (41.2)	20 (76.9)	Dominantea 0.21 (0.07-0.61)
		AG	22 (55.0)	13 (28.3)		26 (54.2)	9 (27.3)		23 (54.8)	12 (29.3)		26 (51.0)	5 (19.2)	
		AA	3 (7.5)	2 (4.3)		0.005	4 (8.3)		1 (3.0)	0.004		3 (7.1)	2 (4.9)	
		CC	15 (37.5)	28 (60.9)	Dominantea 0.39 (0.16-0.92)	18 (37.5)	21 (63.6)	Dominantea 0.34 (0.14-0.86)	16 (38.1)	25 (61.0)	Dominantea 0.39 (0.16-0.95)	21 (41.2)	18 (69.2)	Dominantea 0.31 (0.11-0.85)
		CG	20 (50.0)	15 (32.6)		23 (47.9)	11 (33.3)		21 (50.0)	13 (31.7)		23 (45.1)	7 (26.9)	
GG	5 (12.5)	3 (6.5)	0.029	7 (14.6)		1 (3.0)	0.020		5 (11.9)	3 (7.3)		0.036	7 (13.7)	
hsa-mir-6083 rs78790512	Kr:3 Pre-mature	GG	23 (57.5)	36 (78.3)	Dominantea 0.38 (0.15-0.96)	28 (58.3)	27 (81.8)	Dominantea 0.31 (0.11-0.89)	25 (59.5)	32 (78.0)	Dominantea 0.41 (0.16-1.08)	30 (58.8)	23 (88.5)	Dominantea 0.19 (0.05-0.70)
		AG	3 (32.5)	10 (21.7)		16 (33.3)	6 (18.2)		13 (31.0)	9 (22.0)		17 (33.3)	3 (11.5)	
		AA	4 (10.0)	0 (0.0)		0.038	4 (8.3)		0 (0.0)	0.022		4 (9.5)	0 (0.0)	
hsa-mir-5007 rs1572687	Kr:3 Pre-mature	CC	12 (30.0)	12 (26.1)	Errezesiboa 2.47 (0.79-7.76)	13 (27.1)	11 (33.3)	Errezesiboa 3.50 (1.14-10.73)	13 (31.0)	11 (26.8)	Errezesiboa 3.06 (0.97-9.68)	13 (25.5)	9 (34.6)	Errezesiboa 5.50 (1.74-17.43)
		CT	23 (57.5)	22 (47.8)		29 (60.4)	11 (33.3)		24 (57.1)	18 (43.9)		32 (62.7)	6 (23.1)	
		TT	5 (12.5)	12 (26.1)		0.109	6 (12.5)		11 (33.3)	0.024		5 (11.9)	12 (29.3)	
hsa-mir-604 rs2368392	Kr: 12 Pre-mature	CC	29 (72.5)	26 (56.5)	Dominantea 2.03 (0.82-5.02)	35 (72.9)	16 (48.5)	Dominantea 2.86 (1.12-7.28)	30 (71.4)	22 (53.7)	Dominantea 2.16 (0.87-5.35)	36 (70.6)	12 (46.2)	Dominantea 2.80 (1.05-7.45)
		CT	10 (25.0)	18 (39.1)		12 (25.0)	15 (45.5)		11 (26.2)	17 (41.5)		14 (27.5)	12 (46.2)	
		TT	1 (2.5)	2 (4.3)		0.121	1 (2.1)		2 (6.1)	0.025		1 (2.4)	2 (4.9)	
hsa-mir-4792 rs11714172	Kr:3 Pre-mature	TT	19 (47.5)	15 (32.6)	Dominantea 1.87 (0.78-4.48)	23 (47.9)	9 (27.3)	Dominantea 2.45 (0.95-6.36)	20 (47.6)	12 (29.3)	Dominantea 2.20 (0.89-5.43)	24 (47.1)	5 (19.2)	Dominantea 3.73 (1.22-11.44)
		GT	11 (27.5)	24 (52.2)		13 (27.1)	21 (63.6)		12 (28.6)	23 (56.1)		15 (29.4)	17 (65.4)	
		GG	10 (25.0)	7 (15.2)		0.158	12 (25.0)		3 (9.1)	0.059		10 (23.8)	6 (14.6)	
hsa-mir-4432 rs243080	Kr:2 Pre-mature	TT	9 (23.1)	19 (43.2)	Dominantea 0.39 (0.15-1.03)	13 (27.7)	12 (38.7)	Dominantea 0.61 (0.23-1.59)	9 (22.0)	18 (46.2)	Dominantea 0.33 (0.12-0.87)	14 (28.6)	11 (44.0)	Dominantea 0.51 (0.19-1.39)
		CT	19 (48.7)	13 (29.5)		22 (46.8)	9 (29.0)		19 (46.3)	12 (30.8)		21 (42.9)	6 (24.0)	
		CC	11 (28.2)	12 (27.3)		0.051	12 (25.5)		10 (32.3)	0.308		13 (31.7)	9 (23.1)	
hsa-mir-4520a rs8078913	Kr:17 Mature	CC	12 (32.4)	18 (42.9)	Errezesiboa 2.27 (0.54-9.50)	14 (32.6)	12 (38.7)	Errezesiboa 3.89 (0.92-16.48)	13 (33.3)	15 (40.5)	Errezesiboa 2.80 (0.67-11.78)	17 (35.4)	9 (37.5)	Errezesiboa 5.00 (1.13-22.18)
		CT	22 (59.5)	17 (40.5)		26 (60.5)	12 (38.7)		23 (59.0)	15 (40.5)		28 (58.3)	9 (37.5)	
		TT	3 (8.1)	7 (16.7)		0.246	3 (7.0)		7 (22.6)	0.053		3 (7.7)	7 (18.9)	
hsa-mir-4268 rs4674470	Kr: 2 Pre-mature	TT	31 (77.5)	26 (56.5)	Dominantea 2.65 (1.03-6.81)	35 (72.9)	20 (60.6)	Dominantea 1.75 (0.68-4.50)	31 (73.8)	24 (58.5)	Dominantea 2.00 (0.79-5.04)	36 (70.6)	16 (61.5)	Dominantea 1.50 (0.56-4.05)
		CT	9 (22.5)	15 (32.6)		12 (25.0)	11 (33.3)		11 (26.2)	13 (31.7)		13 (25.5)	9 (34.6)	
		CC	0 (0.0)	5 (10.9)		0.038	1 (2.1)		2 (6.1)	0.245		0 (0.0)	4 (9.8)	
hsa-miR-3689 rs62571442	Kr:9 Pre-mature	AA	13 (33.3)	8 (17.4)	Dominantea 2.37 (0.86-6.54)	15 (31.9)	4 (12.1)	Dominantea 3.40 (1.01-11.42)	13 (31.7)	6 (14.6)	Dominantea 2.71 (0.91-8.04)	16 (32.0)	3 (11.5)	Dominantea 3.61 (0.94-13.80)
		AG	19 (48.7)	30 (65.2)		23 (48.9)	24 (72.7)		21 (51.2)	27 (65.9)		26 (52.0)	18 (69.2)	
		GG	7 (17.9)	8 (17.4)		0.089	9 (19.1)		5 (15.2)	0.034		7 (17.1)	8 (19.5)	
hsa-mir-4494 rs215383	Kr:12 Pre-mature	GG	29 (72.5)	28 (63.6)	Errezesiboa 0.00 (0.0)	33 (70.2)	21 (65.6)	Errezesiboa 4.76 (0.47-47.96)	31 (73.8)	23 (59.0)	Errezesiboa 0.00 (0.0)	36 (72.0)	15 (57.7)	Errezesiboa 6.39 (0.63-64.83)
		AG	11 (27.5)	12 (27.3)		13 (27.7)	8 (25.0)		11 (26.2)	12 (30.8)		13 (26.0)	8 (30.8)	
		AA	0 (0.0)	4 (9.1)		0.117	1 (2.1)		3 (9.4)	0.150		0 (0.0)	4 (10.3)	

Laburdurak: OR., Odds-ratio; KT., Konfiantza tartea; Kr, kromosoma. **Oharrak:** Letra lodiek P-balio esanguratsuk adierazten dituzte; paziente batzuen MTX maila plasmatikoen datuak ez ziren eskuragarri izan 48 h-tara (NA=8), 72 h-tara (NA=4) eta 96 h-tara (NA=14).

Analisi bioinformatikoa

- *Aldaera genetikoaren eragina pre-miRNA-ren egitura sekundarioan*

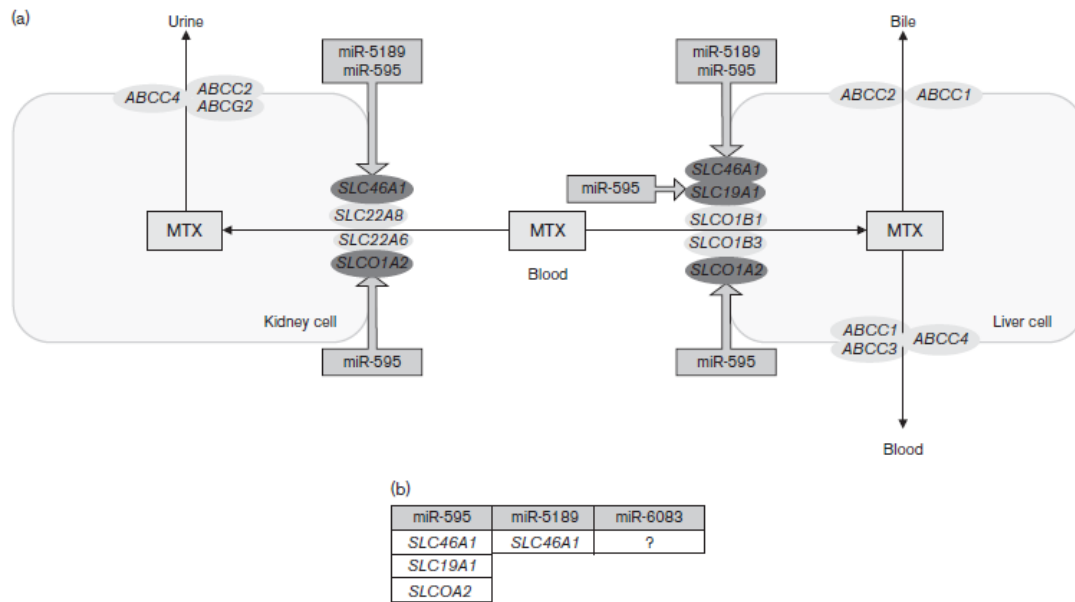
Ikerketa honetan aurkitutako 3 SNP esanguratsuenak, pre-miRNA sekuentzian kokatuta zeuden. *In-silico* analisi bidez iragarri zen, alelo aldaketak miRNA-ren egitura sekundarioan eragina duela, urkila egituraren energia aldaketa eragiten duelako. Aldaketa bereziki nabaria izan zen miR-5189-ko rs56292801-entzat, zeinetan, G aleloa A aleloagatik ordezkatzek 5,3 kcal/mol-eko energia aldaketa ($\Delta\Delta G$) eragin zuen ($-55,9$ -tik $-50,6$ kcal/mol-era). Alelo aldaketa honek egitura sekundarioaren aldaketa drastiko bat ere eragin zuen (25. irudia). MiR-595-eko rs4909237-entzat C aleloa T aleloagatik ordezkatzek $-0,5$ kcal/mol-eko energia aldaketa apala ($-29,20$ -tik $-29,70$ kcal/mol-era) eta egitura sekundarioan aldaketa nabaria eragin zuen (25. irudia). Azkenik, miR-6083-ko rs78790512-ren kasuan, G aleloa A aleloagatik ordezkatzek energia aldaketa ($\Delta\Delta G = 0,2$ kcal/mol; $-30,9$ -etik $-30,70$ kcal/mol-era) zein egituraren aldaketa txikia eragin zituen (25. irudia).



25. irudia. MiRNA-tako hiru SNP esanguratsuen energia aldaketak ($\Delta\Delta G$) eta gutxieneko energia-aske egiturak, alelo ezberdinen presentzia dela eta, RNAfold web tresnatik erazita.

- *Ituen iragarpena*

In-silico analisek miR-5189 eta miR-595-ek itua gisa MTX-aren 14 garraiatzaile geneetatik 3 zituztela iragarri zuten: SLC19A1, SLC10A2, eta SLC46A1. Emaitza aipagarriena miR-595-entzat aurkitu zen, zeinak 3 geneak erregulatzen dituen. MiR-6083-entzat, gaur egun ez daude iragarritako ituririk MTX-aren garraio geneen artean (26. irudia).



26. irudia. MTX-aren garraio bidezidorreko geneak gutxienez ikerketa honetako miRNA esanguratsuenetako batek erregulatuak. (a) miR-595 eta miR-5189-k ituztat dituzten MTX-aren garraio bidezidorreko geneak. (b) miRNA ituen laburpen taula.

EZTABAIDA

Ikerketa honetan, aukeraketa unean deskribaturiko miRNA-tako aldaera guztiek plasmako MTX mailen aldaketan izan dezaketen zeregina ebaluatu genuen, MTX-aren garraio geneetan izan zezaketen efektua kontuan hartuz. Horretarako, 154 miRNA-tako 160 SNP-en eta plasmako MTX mailen arteko korrelazioa ebaluatu genuen B-LLA diagnostikoa zuten eta LAL-SHOP 94/99 eta 2005 protokoloekin homogeneoki trataturiko 147 haurretan. Hiru SNP esanguratsuenak, ikertutako denbora une desberdinetan plasmako MTX mailekin modu koherentean asoziatuak egon zirenak, miR-5189, miR-595 eta miR-6083-n kokatuak zeuden.

Pre-miR-5189-ko rs56292801-en AA genotipoak denboran zehar MTX-aren pilaketarekiko eginkizun babeslea aurkeztzen zuela aurkitu genuen. Gainera, genotipo honek asoziazio handiagoa erakutsi zuen 5 g/m² dosiarekin trataturiko pazienteetan. Honez gain, paziente hauetan, miRNA bereko beste SNP bat ere, rs35613341, MTX maila plasmatikoeekin asoziatu zen esanguratsuki, MTX-a dosi altuan erabiltzean miR-5189-ren eginkizun garrantzitsu bat iradokiz. MiRNA honetan rs56292801-en A aleloak energia aldaketa positiboa eragiten du, honek miRNA-ren urkila egoera egonkor batetik desegonkor batera ($\Delta\Delta G = 5,3$ kcal/mol) daramala iradoki delarik. Egituraren egonkortasun galera horrek miRNA helduaren produktua gutxitu dezakeela proposatu da (Gong et al., 2012), eta hortaz, bere itu geneen adierazpenaren areagotzea eragin lezake. MiR-5189-rentzat iragarritako ituen artean SLC46A1 aurkitzen dugu, zeinek MTX-aren

garraioan inplikaturako protoiei akoplatutako folatoaren garraiatzailea kodetzen duen (Deng et al., 2009; Qiu et al., 2007; Zhao et al., 2008) (26. irudia). SLC46A1-en adierazpen gene garrantzitsuenen artean giltzurruna eta gibelak aurkitzen dira (Desmoulin et al., 2012; Hou and Matherly, 2014; Qiu et al., 2006). Protoiei akoplatutako folatoaren garraiatzaileak, MTX bezalako folato analogoen barneratzean parte hartu dezakeela proposatu da, analogoen kontzentrazioak nahikoa altuak direnean (Desmoulin et al., 2012). Hori dela eta, A aleloaren eginkizun babeslea miR-5189-ren egonkortasunean duen eraginak azal dezake, zeinek produktu heldua murriztu dezakeen – SLC46A1-en adierazpena areagotuz – eta aldi berean MTX-aren argitzea erraztuz. MiRNA hau plasmako MTX mailekin erlazionatu den lehen aldia da, segur aski duela gutxi deskribatu delako. Emaizta hau baieztatzeko ikerketa gehiagoren beharra dago.

Bigarren emaitza esanguratsua miR-595-eko rs4909237 TT genotipoarentzat aurkitu zen, zeinak, denboran zehar MTX maila altua edukitzeko arriskua areagotzen duela erakutsi duen. *In-silico* datuek T aleloak energia soilik apur bat aldatzen duela erakutsi dute ($\Delta\Delta G = -0,5$ kcal/mol) baina, egitura sekundarioan eragin nabarmenagoa duela adierazi dute. Gainera, interesgarria da aipatzea miR-595-ek aurretik aipaturiko SLC46A1 itutzat edukitzeaz gain, MTX-aren barneratzean parte hartzen duten beste bi garraio gene ere badituela itu gisa, SLC19A1 eta SLCO1A2 (26. irudia). SLC19A1-ek folatoaren garraiatzaile nagusia den folatoaren garraiatzaile erreduzitua (RFC1) kodetzen du, hau, gehienbat gibellean adierazten da eta bitartekaria da zeluletan MTX-aren harrerarako (Desmoulin et al., 2012). Gene honetako polimorfismoak MTX-aren toxizitate eta plasma kontzentrazioekin lotu izan dira haurtzaroko LLA-n (Faganel Kotnik et al., 2011; Imanishi et al., 2007; Laverdiere et al., 2002; Lopez-Lopez et al., 2013; Shimasaki et al., 2006; Suthandiram et al., 2014). Gure emaitzak indartuz, Wang eta lankideek miR-595-en loturarako gene bat sortzen duen SNP bat aurkitu zuten SLC19A1-en 3'UTR eremuan MTX-aren plasmako maila altuekin erlazionatua (Wang et al., 2014). Gure taldeak zein Wang eta lankideek aurkituriko asoziazioak miR-595-ek SLC19A1-en erregulazioan eginkizun garrantzitsua bete dezakeela iradokitzen dute eta ondorioz, MTX-aren garraioan eragin dezakeela. MiRNA honek erregulatzen duen hirugarren genea gibel eta giltzurrunean adierazten den SLCO1A2 da. Garraiatzaile honek MTX-aren harreran parte hartzen du (Badagnani et al., 2006; Callens et al., 2015; Desmoulin et al., 2012). Gainera, SLCO1A2-ren aldaerek MTX-aren garraioa eraldatzen dutela ikusi da eta beraz, MTX-aren banaketan eta toxizitatean eragina izango lukete (Badagnani et al., 2006; Zhou et al., 2013). Laburbiltzeko, SNP-aren ondorioz emango litzatekeen miR-595 helduaren areagotze batek hiru garraiatzaileen adierazpena murriztuko luke eta MTX-aren gerru iraizpena eta iraizpen biliarra murriztu, plasmako farmako metaketa eraginez.

Hirugarren asoziazio esanguratsuena miR-6083-ko rs78790512 GG+AG genotipoaren eta denboran zeharreko MTX kontzentrazio altuaren artean aurkitu zen. *In-silico* analisisiek G aleloa A aleloagatik ordezkatzeko energia aldaketa ($\Delta\Delta G = 0.2$ kcal/mol) eta egitura aldaketak txiki bat eragiten dituela adierazten dute. Kasu honetan, A aleloak MTX maila altuen aurrean egikizun babeslea duela dirudi, rs78790512-ren AA genotipoa zuen pazienteetako inork ez baitzuen MTX maila plasmatico alturik aurkeztu. Ezin dugu asoziazio hau energia edo bigarren mailako egituraren aldaketan oinarrituta azaldu (25. irudia). Bere itxur geneetan oinarrituta ere ezin dugu asoziazioa azaldu, gaur egun MTX garraio geneen artean ez baitago miR-6083-rentzat iragarritako itxur generik, hala ere, beste RNA ez-kodifikatzaile batzuk erregulatzen eragin ez zuzena eduki lezake.

Oraingo ikerketa honetan, gaixoen lagina emendatzean, aurreko azterketan balio esanguratsuak lortu ez zituzten 3 SNP-ek emaitza esanguratsuak lortu dituzte MTX-en maila plasmaticoekin asoziazioan (miR-1206-ko rs2114358, miR-604-ko rs2368392 eta miR-1265-eko rs11259096). Aipatzekoa da, aurretik MTX-aren argitzearekin erlazionatu zen miR-323b-ko rs56103835 ikerketa honetan ere asoziatua zegoela 72 h-tara plasmako MTX maila altuekin ($P=0,021$) (37. taula). Nabarmenezko, miRNA honek *ABCC4* genea du itutzat, zeinek farmako desberdinekiko erresistentzia 4 proteina (MRP4) kodetzen duen eta batez ere giltzurruneko MTX-aren kanporantze fluxuan parte hartzen duen (van Aubel et al., 2002; El-Sheikh et al., 2007). Gure emaitzekin bat, aurretik iradoki izan da *ABCC4*-ko aldaerek MTX-aren maila eta toxizitatean eragin dezaketela (Ansari et al., 2009; den Hoed et al., 2015; Krishnamurthy et al., 2008; Lopez-Lopez et al., 2013; Low et al., 2009; Nicoletti et al., 2012). Gainera, SNP esanguratsuak zituzten beste 8 miRNA berri plasmako MTX maila altuekin asoziatu ziren ikertutako denbora uneren batean. Emaitza guzti hauek ez ziren koherenteki lortu ikertutako denbora une guztietan, eta horregatik, arretaz jokatu beharra dago hauek kontuan hartzeko orduan.

Ikerketa honek baditu aipatu beharreko zenbait muga, adibidez genotipazio teknikan izandako akats tasa erlatiboki altua. Hala ere, huts egite aukera altu hau ikerketa hasi zen unetik onartu zen, polimorfismo espezifikoak anplifikatzeko beste diseinu aukerarik ez zegoelako. Beste ahultasun posible bat SNP-ek FDR zuzenketa ondoren p-balio esanguratsua lortu ez zutela izan liteke. Hala ere, nabarmenezkoa da SNP batzuentzat, miR-6083-ko rs78790512 kasu, AA genotipoa zuten paziente batek ere ez zuela MTX maila alturik aurkeztu. Horregatik, FDR zuzenketa ondoren p-balio esanguratsuen falta MTX maila altuen maiztasun urriak eragindako botere estatistikoko baxuen adierazle izan daiteke. Azkenik, datu-baseetako iragarpen algoritmoen

zehazgabetasuna kontuan hartu behar dugu (Akhtar et al., 2016; Lee et al., 2015), hala ere, gaur egun muga hau onartu beharra dago.

ONDORIOAK

Ikerketa honetan, hiru miRNA-tako hiru SNP detektatu genituen, miR-5189, miR-595 eta miR-6083-en adierazpena erregulatu lezaketak eta oraingoz itutzat MTX-aren hiru garraiatzaile (SLC19A1, SLCO1A eta SLC46A1) lituzketak. Aurkikuntza honek, miRNA-tako aldaerek MTX-aren garraio geneen erregulazioan izango luketen eragina erakusten du.

AITORPENAK

Ikerketa honek RTICC-en (RD12/0036/0060, RD12/0036/0036) eta Eusko Jaurlaritzaren babesak jaso du (IT661-13). Espainiar genotipazio zentro nazionalaren laguntza jaso zuen, hau aintzat hartzen da esker onez.

ERREFERENTZIAK

Akhtar, M.M., Micolucci, L., Islam, M.S., Olivieri, F., and Procopio, A.D. (2016). Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Res.* 44, 24–44.

Amstutz, U., Offer, S.M., Sistonen, J., Joerger, M., Diasio, R.B., and Largiader, C.R. (2015). Polymorphisms in MIR27A Associated with Early-Onset Toxicity in Fluoropyrimidine-Based Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 21, 2038–2044.

Ansari, M., Sauty, G., Labuda, M., Gagne, V., Laverdiere, C., Moghrabi, A., Sinnett, D., and Krajcinovic, M. (2009). Polymorphisms in multidrug resistance-associated protein gene 4 is associated with outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 114, 1383–1386.

van Aubel, R.A.M.H., Smeets, P.H.E., Peters, J.G.P., Bindels, R.J.M., and Russel, F.G.M. (2002). The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 595–603.

Badagnani, I., Castro, R.A., Taylor, T.R., Brett, C.M., Huang, C.C., Stryke, D., Kawamoto, M., Johns, S.J., Ferrin, T.E., Carlson, E.J., et al. (2006). Interaction of methotrexate with organic-anion transporting polypeptide 1A2 and its genetic variants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318, 521–529.

Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., and Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav. Brain Res.* 125, 279–284.

Callens, C., Debled, M., Delord, M., Turbiez-Stalain, I., Veyret, C., Bieche, I., and Brain, E. (2015). High-throughput pharmacogenetics identifies SLCO1A2 polymorphisms as candidates to elucidate the risk of febrile neutropenia in the breast cancer RAPP-01 trial. *Breast Cancer Res. Treat.* 153, 383–389.

- Deng, Y., Zhou, X., Kugel Desmoulin, S., Wu, J., Cherian, C., Hou, Z., Matherly, L.H., and Gangjee, A. (2009). Synthesis and biological activity of a novel series of 6-substituted thieno[2,3-d]pyrimidine antifolate inhibitors of purine biosynthesis with selectivity for high affinity folate receptors over the reduced folate carrier and proton-coupled folate transpo. *J. Med. Chem.* 52, 2940–2951.
- Desmoulin, S.K., Hou, Z., Gangjee, A., and Matherly, L.H. (2012). The human proton-coupled folate transporter: Biology and therapeutic applications to cancer. *Cancer Biol. Ther.* 13, 1355–1373.
- Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P., and Gretz, N. (2011). miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.* 44, 839–847.
- El-Sheikh, A.A.K., van den Heuvel, J.J.M.W., Koenderink, J.B., and Russel, F.G.M. (2007). Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with multidrug resistance protein (MRP) 2/ABCC2- and MRP4/ABCC4-mediated methotrexate transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320, 229–235.
- Evans, W.E., Relling, M. V., Rodman, J.H., Crom, W.R., Boyett, J.M., and Pui, C.H. (1998). Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 338, 499–505.
- Faganel Kotnik, B., Grabnar, I., Bohanec Grabar, P., Dolzan, V., and Jazbec, J. (2011). Association of genetic polymorphism in the folate metabolic pathway with methotrexate pharmacokinetics and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia and malignant lymphoma. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 67, 993–1006.
- Gong, J., Tong, Y., Zhang, H.-M., Wang, K., Hu, T., Shan, G., Sun, J., and Guo, A.-Y. (2012). Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum. Mutat.* 33, 254–263.
- Gruber, A.R., Lorenz, R., Bernhart, S.H., Neubock, R., and Hofacker, I.L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res.* 36, W70-4.
- den Hoed, M.A.H., Lopez-Lopez, E., te Winkel, M.L., Tissing, W., de Rooij, J.D.E., Gutierrez-Camino, A., Garcia-Orad, A., den Boer, E., Pieters, R., Pluijm, S.M.F., et al. (2015). Genetic and metabolic determinants of methotrexate-induced mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* 15, 248–254.
- Hou, Z., and Matherly, L.H. (2014). Biology of the major facilitative folate transporters SLC19A1 and SLC46A1. *Curr. Top. Membr.* 73, 175–204.
- Imanishi, H., Okamura, N., Yagi, M., Noro, Y., Moriya, Y., Nakamura, T., Hayakawa, A., Takeshima, Y., Sakaeda, T., Matsuo, M., et al. (2007). Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. *J. Hum. Genet.* 52, 166–171.
- Johnston, W.T., Lightfoot, T.J., Simpson, J., and Roman, E. (2010). Childhood cancer survival: a report from the United Kingdom Childhood Cancer Study. *Cancer Epidemiol.* 34, 659–666.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 42, D68-73.

- Krishnamurthy, P., Schwab, M., Takenaka, K., Nachagari, D., Morgan, J., Leslie, M., Du, W., Boyd, K., Cheok, M., Nakauchi, H., et al. (2008). Transporter-mediated protection against thiopurine-induced hematopoietic toxicity. *Cancer Res.* 68, 4983–4989.
- Laverdiere, C., Chiasson, S., Costea, I., Moghrabi, A., and Krajcinovic, M. (2002). Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100, 3832–3834.
- Lee, Y.J.D., Kim, V., Muth, D.C., and Witwer, K.W. (2015). Validated MicroRNA Target Databases: An Evaluation. *Drug Dev. Res.* 76, 389–396.
- Lopez-Lopez, E., Martin-Guerrero, I., Ballesteros, J., Pinan, M.A., Garcia-Miguel, P., Navajas, A., and Garcia-Orad, A. (2011). Polymorphisms of the SLCO1B1 gene predict methotrexate-related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* 57, 612–619.
- Lopez-Lopez, E., Ballesteros, J., Pinan, M.A., Sanchez de Toledo, J., Garcia de Andoin, N., Garcia-Miguel, P., Navajas, A., and Garcia-Orad, A. (2013). Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet. Genomics* 23, 53–61.
- Lopez-Lopez, E., Gutierrez-Camino, A., Bilbao-Aldaiturriaga, N., Pombar-Gomez, M., Martin-Guerrero, I., and Garcia-Orad, A. (2014a). Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics* 15, 1383–1398.
- Lopez-Lopez, E., Gutierrez-Camino, A., Pinan, M.A., Sanchez-Toledo, J., Uriz, J.J., Ballesteros, J., Garcia-Miguel, P., Navajas, A., and Garcia-Orad, A. (2014b). Pharmacogenetics of microRNAs and microRNAs biogenesis machinery in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 9, e91261.
- Low, S.-K., Kiyotani, K., Mushiroda, T., Daigo, Y., Nakamura, Y., and Zembutsu, H. (2009). Association study of genetic polymorphism in ABCC4 with cyclophosphamide-induced adverse drug reactions in breast cancer patients. *J. Hum. Genet.* 54, 564–571.
- Meulendijks, D., Henricks, L.M., Amstutz, U., Froehlich, T.K., Largiader, C.R., Beijnen, J.H., de Boer, A., Deenen, M.J., Cats, A., and Schellens, J.H.M. (2016). Rs895819 in MIR27A improves the predictive value of DPYD variants to identify patients at risk of severe fluoropyrimidine-associated toxicity. *Int. J. Cancer* 138, 2752–2761.
- Moriyama, T., Relling, M. V, and Yang, J.J. (2015). Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 125, 3988–3995.
- Nicoletti, P., Carstos, V.M., Palaska, P.K., Shen, Y., Floratos, A., and Zavras, A.I. (2012). Genomewide pharmacogenetics of bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: the role of RBMS3. *Oncologist* 17, 279–287.
- Pui, C.-H. (2010). Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Formos. Med. Assoc.* 109, 777–787.
- Pui, C.-H., Yang, J.J., Hunger, S.P., Pieters, R., Schrappe, M., Biondi, A., Vora, A., Baruchel, A.A., Silverman, L.B., Schmiegelow, K., et al. (2015). Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J. Clin. Oncol.* 33, JCO.2014.59.1636.

- Qiu, A., Jansen, M., Sakaris, A., Min, S.H., Chattopadhyay, S., Tsai, E., Sandoval, C., Zhao, R., Akabas, M.H., and Goldman, I.D. (2006). Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 127, 917–928.
- Qiu, A., Min, S.H., Jansen, M., Malhotra, U., Tsai, E., Cabelof, D.C., Matherly, L.H., Zhao, R., Akabas, M.H., and Goldman, I.D. (2007). Rodent intestinal folate transporters (SLC46A1): secondary structure, functional properties, and response to dietary folate restriction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293, C1669-78.
- Radtke, S., Zolk, O., Renner, B., Paulides, M., Zimmermann, M., Moricke, A., Stanulla, M., Schrappe, M., and Langer, T. (2013). Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 121, 5145–5153.
- Ramsey, L.B., Bruun, G.H., Yang, W., Trevino, L.R., Vattathil, S., Scheet, P., Cheng, C., Rosner, G.L., Giacomini, K.M., Fan, Y., et al. (2012). Rare versus common variants in pharmacogenetics: SLCO1B1 variation and methotrexate disposition. *Genome Res.* 22, 1–8.
- Ramsey, L.B., Panetta, J.C., Smith, C., Yang, W., Fan, Y., Winick, N.J., Martin, P.L., Cheng, C., Devidas, M., Pui, C.-H.C.-H., et al. (2013). Genome-wide study of methotrexate clearance replicates SLCO1B1. *Blood* 121, 898–904.
- Rukov, J.L., and Shomron, N. (2011). MicroRNA pharmacogenomics: post-transcriptional regulation of drug response. *Trends Mol. Med.* 17, 412–423.
- Salazar, J., Altes, A., del Rio, E., Estella, J., Rives, S., Tasso, M., Navajas, A., Molina, J., Villa, M., Vivanco, J.L., et al. (2012). Methotrexate consolidation treatment according to pharmacogenetics of MTHFR ameliorates event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenomics J.* 12, 379–385.
- Sambrook, J, R.D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (New York: NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Shimasaki, N., Mori, T., Samejima, H., Sato, R., Shimada, H., Yahagi, N., Torii, C., Yoshihara, H., Tanigawara, Y., Takahashi, T., et al. (2006). Effects of methylenetetrahydrofolate reductase and reduced folate carrier 1 polymorphisms on high-dose methotrexate-induced toxicities in children with acute lymphoblastic leukemia or lymphoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 28, 64–68.
- Suthandiram, S., Gan, G.-G., Zain, S.M., Bee, P.-C., Lian, L.-H., Chang, K.-M., Ong, T.-C., and Mohamed, Z. (2014). Effect of polymorphisms within methotrexate pathway genes on methotrexate toxicity and plasma levels in adults with hematological malignancies. *Pharmacogenomics* 15, 1479–1494.
- Treon, S.P., and Chabner, B.A. (1996). Concepts in use of high-dose methotrexate therapy. *Clin. Chem.* 42, 1322–1329.
- Trevino, L.R., Shimasaki, N., Yang, W., Panetta, J.C., Cheng, C., Pei, D., Chan, D., Sparreboom, A., Giacomini, K.M., Pui, C.-H., et al. (2009). Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J. Clin. Oncol.* 27, 5972–5978.
- Wang, S., Sun, L., Zeng, W., Wu, W., and Zhang, G. (2014). Effects of a microRNA binding site polymorphism in SLC19A1 on methotrexate concentrations in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *Med. Oncol.* 31, 62.

Zhan, X., Wu, W., Han, B., Gao, G., Qiao, R., Lv, J., Zhang, S., Zhang, W., Fan, W., Chen, H., et al. (2012). Hsa-miR-196a2 functional SNP is associated with severe toxicity after platinum-based chemotherapy of advanced nonsmall cell lung cancer patients in a Chinese population. *J. Clin. Lab. Anal.* 26, 441–446.

Zhao, R., Qiu, A., Tsai, E., Jansen, M., Akabas, M.H., and Goldman, I.D. (2008). The proton-coupled folate transporter: impact on pemetrexed transport and on antifolates activities compared with the reduced folate carrier. *Mol. Pharmacol.* 74, 854–862.

Zhou, F., Zheng, J., Zhu, L., Jodal, A., Cui, P.H., Wong, M., Gurney, H., Church, W.B., and Murray, M. (2013). Functional analysis of novel polymorphisms in the human *SLCO1A2* gene that encodes the transporter OATP1A2. *AAPS J.* 15, 1099–1108.

EZTABAIDA

Azken hamarkadetan, haurtzaroko LLA-ren biziraupen tasak % 90 arte iritsi dira (Pui et al., 2015; Tasian and Hunger, 2017), neurri batean behintzat tratamendu protokoloen aurrerapausoei esker. Hala ere, kimioterapikoak kezka iturri ere badira eragiten dituzten toxizitateak direla eta, izan ere, toxizitate larriak jasaten dituzten pazienteek sarri dosi murrizketak behar izaten dituzte baita tratamenduaren eteteak ere, honek biziraupenean duen efektu negatiboarekin (Pui et al., 2015; Tasian and Hunger, 2017). Agertoki honetan, non kaltetuak dauden pazienteen artean toxizitateak ez diren modu homogeneoan eta larritasun maila berarekin azaltzen, markatzaile iragarleen ikerketa interes handikoa da, klinikoak dosi indibidualizazioan are gehiago gidatzeko. Ikerketa farmakogenomikoek jada proposatu dituzte farmakoen bidezidor PK/PD-en eremu kodifikatzaileetako zenbait polimorfismo. Gaur egun jakina da miRNA-k PK/PD bidezidorretan inplikaturako gene hauek erregulatzen dituztela. MiRNA-tako polimorfismoek miRNA-en maila edo funtzioa aldatzeko gai dira, ondorio gisa beren itu geneen adierazpena asaldatur.

Testuinguru honetan, ikerketa honen jomuga nagusia haurtzaroko B-LLA terapian garatzen diren toxizitate ohikoenak azaldu ditzazketen miRNA-tako markatzaile genetiko berriak identifikatzea izan zen, miRNA horiek farmakoekin erlazionaturako geneak edo toxizitate garapenean inplikaturako beste gene batzuk ituztat dituztelarik. Markatzaile hauek tratamendua hasieratik egokitzea eta toxizitatea minimizatzea posible egingo lukete. Gure esfortzua neurotoxizitate periferikoan, gibel toxizitatean eta toxizitate gastrointestinalean ardazu genuen, haurtzaroko B-LLA-ren hiru toxizitate garrantzitsu, baita MTX-aren maila plasmaticoetan ere, dosi altuko MTX tratamenduan zehar zorrotz monitorizatzen direnak. Toxizitate hauek iragar ditzazketen miRNA-tako markatzaile berriak aurkitzeko asmoz, ikerketa honetan, aukeraketa unean deskribatuak zeuden eta %1 baino AUM altuagoa zuten miRNA-tako polimorfismo guztiak (206 miRNA-tako 213 SNP) ebaluatu genituen B-LLA diagnostikoa zuten eta LAL/SHOP protokolo estandarizatuarekin homogeneoki trataturako 179 haurretan.

Neurotoxizitate periferikoari dagokionez, eragin desiragaitz honen indukzio fasean zeharreko garapena azaldu dezaketen miRNA-tako bi SNP identifikatu ditugu. Asoziazio esanguratsuen miR-3117-ko rs12402181-rentzat aurkitu zen, zeinetan AG+AA genotipoek neurotoxizitate periferikoa izateko arrisku murriztua izan zuten. SNP hau miR-3117-ren *seed* eremuan kokatua dago, zeinetan G aleloa A aldaera aleloagatik ordezkatzek bere itu mRNA sekuentzien ezagupen zehatzean eragin dezakeen. Bere itu geneen artean *ABCC1* eta *RALBP1* aurkitzen dira, bi geneak VCR zelulatik ateratzen dituzten garraiatzaile gisa deskribatuak izan direlarik literaturan (Awasthi et al., 2005; Franca et al., 2017; Kunicka and Soucek, 2014). Are gehiago, *ABCC1*-eko polimorfismoak jada asoziatu dira VCR-ri lotutako neuropatiarekin (Franca et al., 2017; Lopez-

Eztabaida

Lopez et al., 2016) eta RALBP1-en inhibizioa farmakoen pilaketa eta zitotoxizitate areagotuarekin (Drake et al., 2007). Beraz, rs12402181-ren A aldaera aleloak miR-3117-3p-ren *ABCC1* eta *RALBP1*-en mRNA-ekiko louturan eragina izan dezake, beren adierazpen areagotzea ekarriz. *ABCC1* eta *RALBP1*-en adierazpen areagotu honek VCR-ren zelulatiko kanporaketa hobea sustatu dezake VCR-ek induzitutako neurotoxizitate periferiko arrisku baxuagoa azalduz.

VCR-k eragindako neurotoxizitatearentzat bigarren emaitza esanguratsuena miR-4481-eko rs789683-rentzat izan zen, zeinetan CT+CC genotipoak arrisku eginkizun bat azaldu zuen. SNP hau pre-miRNA sekuentzian kokatua dago, non T aleloa C aleloagatik ordezkatzek energia aldaketa negatibo bat erakutsi duen. Energia aldaketa negatibo honek miRNA urkila egoera ezegonkor batetik egonkorrago baterantz eraldatzen dela adierazten du, eta egituraren egonkortasun hazkuntza honek miRNA helduaren produktua areagotzen duela proposatu da (Gong et al., 2012), honek dakarren itu geneen adierazpen murrizketarekin. MiR-4481-entzat VCR-ren bidezidor PK/PD-ko itu generik aurkitu ez dugun arren, bidezidorren aberaste analisiak axoi-gidatzea iragarri zuen miR-4481-ek itutzat duen bidezidor esanguratsuena bezala. Axoi-gidatzea nerbio periferikoen erregenerazio espontaneoan inplikaturik dago hauek kaltetuak daudenean (Chiono and Tonda-Turo, 2015), horrela, rs7896283-ren C arrisku aleloak miR-4481-en egonkortasuna eta ondorioz miRNA helduaren maila areagotuko lituzke, bere itu geneen adierazpen murrizketa eraginez. Beraz, nerbio periferikoen erregenerazioan inplikatutako geneen adierazpen murriztua neuropatia periferiko areagotuaren azalpena izan daiteke.

Analizatutako bigarren toxizitatea transaminasen igoera gisa neurtutako gibel toxizitatea izan zen. Asoziazioa indukzio eta kontsolidazio faseetan analizatu genuen, hipetransaminasemiarekin asoziatutako SNP-ak bi fase hauetan desberdinak zirela behatuz, honek fase hauetako bakoitzean toxizitatea eragiten duten mekanismoak eta farmako eragileak desberdinak liratekeela babesten duelarik. Gure ikerketan aurkitutako emaitzarik interesgarriena miR-1208-ko rs2648841 eta kontsolidazio faseko transaminasen maila arteko asoziazioa izan zen. Gure emaitzek GT+TT genotipoak gibel toxizitatea (≥ 2 gradukoa) eta hepatotoxizitate altua (≥ 3 gradukoa) izateko arrisku murriztua eragiten zuela erakutsi zuten. Nabarmenki, TT genotipodun paziente batek ere ez zuen gradu baxuko toxizitatea garatu, ezta gradu altuko toxizitatea ere. Rs2648841-en T aldaera aleloak, miR-1208-ren pre-*mature* sekuentzian kokatua, miRNA urkila egoera ezegonkorrago batera eraldatuko luke, miRNA helduaren produktua murriztuz eta horrela itu geneen adierazpena areagotuz. Interesgarria da miR-1208-k MTX-aren bidezidor farmakodinamikoko hiru gene, *DHFR*, *MTR* eta *MTHFR*, dituela

itutzat. T aleloaren odoleko transaminasa igoeren aurkako eginkizun babesgarria azaldu daiteke lehendabizi *DHFR*-ren adierazpen areagotuagatik. MTX-aren efektu zitotoxikoa *DHFR* inhibizioa medio gertatzen da, zeinek purina eta pirimidina baseen sintesi etetea dakarren eta ondorioz zelularen heriotza. Horrela, *DHFR*-ren adierazpen areagotuak MTX-aren efektua arinduko luke hepatozitoen heriotza ekiditera lagunduz. Izan ere, *DHFR*-ren adierazpen altuagoa MTX erresistentziarekin asoziatu da (Dulucq et al., 2008). Bestalde, *MTR*-ren (homozisteina metionina emateko metilatzen duen entzima) eta *MTHFR*-ren (aurreko erreakziorako metil taldea sortzen duen entzima) (Krajinovic et al., 2005) adierazpen altuagoek homozisteinatik metioninaranzko erreakzioa bultzatuko lukete zelula barneko homozisteina mailak murriztuz. Homozisteina maila baxuago hauek apoptositik babestuko lukete (Kubota et al., 2014; Yang et al., 2017), berriro T aleloaren eginkizun babeslea azalduz.

Toxizitate gastrointestinalari dagokionez, analizatutako hirugarren toxizitatea, gure analisia mukositisera zuzendu genuen baita mukositisaren bi adierazpen klinikotan ere beheakoa eta gonbitoak hain zuzen ere. Mukositisaren analisisian, emaitzarik interesgarriena miR-4268-ko rs4674470-ren AG+GG genotipoaren eta toxizitate arrisku baxuagoaren arteko asoziazioa izan zen. Nabarmentzekoa da GG genotipodun pazienteetako inork ez zuela mukositis garatu, eginkizun babesle bat adieraziz. SNP hau miRNA urkilaren 3' muturreko posizioan kokatua dago. SNP honek egonkortasun aldaketarik ezta miRNA-ren egitura sekundarioen aldaketarik eragiten ez zuen arren, bere kokapena *DROSHA* mikroprozesatzaileak pri-miRNA eta pre-miRNA arteko zatiketa gunea zehatz ezagutzeko posizio erabakiorra izan daiteke. *DROSHA*-k pre-miRNA-en mutur terminalak sortzen ditu, miRNA helduaren sekuentzia erabakiz, horrela, *DROSHA* bidezko prozesamendu zehatza erabakiorra da miRNA funtzionalen produkzioarako (Fang and Bartel, 2015; Kim et al., 2017). Ondorioz, SNP honen presentziak *DROSHA*-k zatiketa gunea ez ezagutzea ekar lezake eta beraz SNP aleloaren arabera miRNA-ren produkzio baxuago batera. Aipagarria da miRNA hau miRbase datu-basean, miRNA-en erreferentziazko datu-basea, G aleloarekin irudikatua dagoela, zeina alelo urriena den (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014). Erreferentzia datu-basean miRNA sekuentzia G aleloarekin irudikatua egoteak miRNA G aleloa dagoenean modu eraginkorragoan produzitzen dela adieraz lezake, *DROSHA*-k zatiketa gunea ezagutu duelako.

MiRNA honen bidezidor analisiari dagokionez, farmakogeneetan oinarritutako lehenengo planteamendua jarraituz *DNR*-ren bidezidorreko bi gene aurkitu genituen (*NFKBIE*, *CBR1*) eta MTX-aren bidezidorreko hiru gene (*MTHFR*, *MTR*, *SLC46A1*). Hala ere, gene hauen desregulazioak efektu kontrajarriak izan ditzake. Adibidez, *NFKBIE*-ren behearanzko

Eztabaida

erregulazioak zelula heriotzatik babes dezake (Komissarova et al., 2008), *MTHFR* eta *MTR*-ren beheranazko erregulazioak aldiz apoptosia eragin dezakeen bitartean apoptosis (Kubota et al., 2014; Yang et al., 2017). Mukositisarekin erlazionatutako beste gene batzuk identifikatzeko asmoz, bidezidorren aberaste analisi bat gauzatu genuen eta miR-4268-k itutzat *DFL* seinalizazio bidezidorra zuela aurkitu genuen. Hesteetako gaixotasun inflamatorioetan mukosa inflamatueta *DFL*-ren adierazpena gorantz erregulatua dagoela ikusi da (Zhou et al., 2016). *DFL*-k gene proinflamatorioen adierazpena modulatu du eta zitokinen jariatetan eginkizun garrantzitsua du (Friday and Fox, 2016; Kang et al., 2014), mukositisaren garapenean zerikusia duen mekanismoa (Cinausero et al., 2017). Modu interesgarrian, *DFL*-ren isiltzeak zitokinen produkzioa eraginkorki blokeatu zuen (Sethu et al., 2010) eta heste mukosaren inflamazioa hobetu zuen (Zhou et al., 2016). Dagoeneko zehaztu da isiltze hau miRNA sorta batek bideratutakoa izan litekeela (Fite et al., 2016). Testuinguru honetan, miR-4268-ko rs4674470-ren GG genotipoak miRNA-ren adierazpen areagotze bat ekartzea posible litzateke *DROSHA*-ren ezagutza eraginkorragoa medio, eta honek aldi berean, *DFL*-rekin erlazionatutako geneen adierazpen baxuago bat, bere eginkizun babeslea azalduz mukositisen.

Beherako eta gonbitoan analisietan, SNP estatistikoki esanguratsuenak miR-4751-ko rs8667 eta miR-3117-ko rs12402181 izan ziren hurrenez hurren. MiR-4751-ko rs8667 *pre-mature* sekuentzian kokatua dago, non A aleloak modu arinean bada ere energia aldaketa bat eragiten duen eta ondorioz miRNA mailak aldaraz ditzakeen (Gong et al., 2012). MiR-3117-ko rs12402181 aldiz *seed* eremuan kokatua dago eta itu mRNA-en sekuentzia ezagupen zehatzean eragina izan dezake. Beren itu geneen artean *DNR*, *MTX* eta *CPA*-ren bidezidorretako zenbait gene aurki genitzake eta nabarmentzekoa da bi miRNA-ek erantzun inflamatorioarekin erlazionatutako bidezidorrak zituztela itutzat. Erantzun inflamatorioaren aktibazioa *IL-1*, *IL-8*, *IL-6* eta *TNF* bezalako zitokina anitzen produkzioarako aurrebalditza da (van den Blink et al., 2001; Elsea et al., 2008; Reyes-Gibby et al., 2017), mukosa kaltearen patobiologian inplikatuak. Beraz, miR-4751-ko rs8667-k eta miR-3117-ko rs12402181-ek miRNA-en maila eta funtzioan eragin dezakete eta beren farmako bidezidor eta erantzun-inflamatorioko itu geneen adierazpena asaldatu toxizitatea bultzatuz.

Bukatzeko, dosi altuko kontsolidazio fasean zeharreko *MTX*-aren maila plasmatikoei dagokienez, emaitza interesgarrienak bezala miR-5189-ko rs56292801 eta miR-595-eko rs4909237 hartu ditugu, analizatutako denbora puntu ezberdinetan zehar *MTX*-aren maila plasmatikoein modu koherentean asoziatutako bi SNP. Emaitza interesgarriena *pre-mature* sekuentziako miR-5189-ko rs56292801 izan zen, zeinetan *AG+AA* genotipoak denboran zehar *MTX* pilaketaren aurkako

eginkizun babeslea erakutsi zuen. MTX-aren maila plasmatico altuetan miR-5189-k duen garrantzia 5g/m²-ko dosia jaso zuten pazienteak bakarrik analizatzean maila plasmaticoekin aurkitutako asoziazioa oraindik esanguratsuagoa izatearen gertaerak babesten du. MiRNA honetan A aldaera aleloak energia aldaketa positibo bat eragin zuen, honek babestuko luke egituraren egonkortasun jaitsierak miR-5189 helduaren adierazpen murrizketa bat eragiten duela eta ondorio gisa bere ituen adierazpen areagotua. MiR-5189-rentzat iragarritako ituen artean *SLC46A1* aurkitzen dugu, zeinek MTX-aren garraioan inplikaturako protoiei akoplatutako folatoaren garraiatzailea kodetzen duen eta MTX bezalako folato analogoen barneratzean parte har dezakeen (Deng et al., 2009; Qiu et al., 2007; Zhao et al., 2008) MTX mailak nahikoa altuak direnean (Desmoulin et al., 2012). *SLC46A1*-en adierazpen gune garrantzitsuenetako bat giltzurruna da (Desmoulin et al., 2012; Hou and Matherly, 2014; Qiu et al., 2006), MTX-aren irazketa bide garrantzitsua. Hori dela eta, A aleloaren eginkizun babeslea miR-5189-ren egonkortasunean duen eraginak azal dezake, zeinek produktu heldua murriztu dezakeen *SLC46A1*-en adierazpena areagotuz eta MTX-aren argitzea erraztuz.

MTX maila plasmaticoentzat bigarren emaitza esanguratsuen miR-595-eko rs4909237-ren TT genotipoarentzat aurkitu zen, zeinak denboran zehar MTX maila plasmatico altuak izateko arrisku areagotua erakutsi duen. T aldaera aleloak *in silico* gutxieneko energia askearen aldaketa txiki bat erakutsi zuen arren, honek egitura sekundarioan izandako eragina handia izan zen, miR-595-en prozesamenduan eragin zezakeena. Nabarmentzekoa da miR-595-ek itutzat aurrez aipatutako *SLC46A1*-ez gain MTX-aren beste bi garraio gene ere badituela, *SLC19A1* eta *SLCO1A2*, MTX-aren barneratzean parte hartzen dutenak. *SLC19A1*-ek folatoaren garraiatzaile nagusia den folatoaren garraiatzaile erreduzitua (RFC1) kodetzen du, hau gehienbat gibelean adierazten da eta zeluletan MTX-aren harrerarako bitartekaria da (Desmoulin et al., 2012). Gure emaitzak indartuz, Wang eta lankideek miR-595-en loturarako gune bat sortzen duen SNP bat aurkitu zuten *SLC19A1*-en 3'UTR eremuan MTX-aren plasmako maila altuekin erlazionatuta (Wang et al., 2014). Gure taldeak zein Wang eta lankideek aurkituriko asoziazioak miR-595-ek *SLC19A1*-en erregulazioan paper garrantzitsua bete dezakeela iradokitzen dute eta ondorioz, MTX-aren garraioan eragin dezakeela. MiRNA honek erregulatzen duen hirugarren genea gibel eta giltzurrunean adierazten den *SLCO1A2* da. Garraiatzaile honek ere MTX-aren harreran parte hartzen du (Badagnani et al., 2006; Callens et al., 2015; Desmoulin et al., 2012). Hitz batez, SNP-aren ondorioz emango litzatekeen miR-595 helduaren areagotze batek hiru garraiatzaileen adierazpen baxuagoa ekarriko luke eta MTX-aren gerru irazpena eta irazpen biliarra murriztu, plasmako farmako metaketa eraginez.

Eztabaida

Laburbilduz, gure ikerketak haurtzaroko LLA pazienteetan toxizitate iragarpenerako 8 markatzaile kandidatu berri identifikatu ditu: miR-3117-ko rs12402181 eta miR-4481-eko rs7896283 VCR-k indukzio fasean induzitutako neurotoxizitate periferikoarentzat; miR-1208-ko rs2648841 kontsolidazioan zehar MTX-ak eragindako transaminasen igoerarentzat; miR-4268-ko rs4674470 mukositisarentzat, miR-4751-ko rs8667 beherakoarentzat eta miR-3117-ko rs12402181 gonbitoentzat indukzio fasean zehar eta amaitzeko miR-5189-ko rs56292801 eta miR-595-eko rs4909237 plasmako MTX maila altuentzat. Interesgarria litzateke emaitza hauek beste populazio batzuetan konfirmatzea eta ikerketa funtzionalen bitartez balidatzea.

ONDORIOAK

1. Lehenengo, VCR-k induzitutako neurotoxizitatean, miR-3117-ko rs12402181-en AG+AA genotipoak toxizitatearekin asoziatuak aurkitu genituen. Hau bere iturri geneen, VCR-ren bi garraio gene *ABCC1* eta *RALBP1*, gainadierazpenagatik izan liteke. MiR-4481-eko rs7896283-ren CT+CC genotipoen eta neurotoxizitatearen arteko asoziazio ere aurkitu genituen, zeina axoi-gidatze geneen beheranzko erregulazio bidez azal daitekeen.
2. Gibel toxizitateari dagokionez, miR-1208-ko rs2648841-eko GT+TT genotipoak kontsolidazio fasean zeharreko transaminasen maila igoerarekin asoziatu ziren. Asoziazio hau MTX-aren bidezko PD-ko *DHFR*, *MTR* eta *MTHFR* geneen gainadierazpenak azal dezake.
3. Toxizitate gastrointestinala kontuan hartuz, miR-4268-ko rs4674470-en AG+GG genotipoak, miR-4751-ko rs8667-ren AA+AG genotipoak eta miR-3117-ko rs12402181-en AA+AG genotipoak, hurrenez hurren mukositis, beheko eta gonbitoekin erlazionatuak egon litezke indukzio fasean. SNP hauen eragina DNR, MTX eta CPA farmako mukotoxikoen farmakozinetika eta farmakodinamikako geneetan duten efektuagatik izan liteke, baita mukosen lesioarekin erlazionatutako beste gene batzuetan duten efektuagatik ere, bereziki erantzun inflamatorioan parte hartzen dutenekin.
4. Kontsolidazio fasean zeharreko MTX-aren maila plasmatiko altuentzat, miR-5189-ko rs56292801-en AG+AA genotipoak eta miR-595-eko rs4909237-ren TT genotipoa aurkitu genituen, zeintzuek miRNA-en adierazpena alda zezaketen eta ondorioz beren *SLC46A1*, *SLC19A1* eta *SLCO1A2* iturri geneen adierazpena asaldatu.

Laburbilduz, gure ikerketak miRNA-tako aldaerak identifikatu ditu toxizitate markatzaile berri gisa haurtzaroko LLA-ren terapiarako. Aldaera hauek toxizitateak azaldu aurretik tratamendua egokitzeko balio dezaketela proposatzen dugu. LLA-ren tratamenduan ikerketa alor berri bat irekitzen dugu miRNA-en azterketan oinarrituta.

REFERENCES - ERREFERENTZIAK

REFERENCES - ERREFERENTZIAK

1000 Genomes Project Consortium, R.M., Abecasis, G.R., Altshuler, D., Auton, A., Brooks, L.D., Durbin, R.M., Gibbs, R.A., Hurles, M.E., McVean, G.A., Donnelly, P., et al. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* *467*, 1061–1073.

Abe, T., Unno, M., Onogawa, T., Tokui, T., Kondo, T.N., Nakagomi, R., Adachi, H., Fujiwara, K., Okabe, M., Suzuki, T., et al. (2001). LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* *120*, 1689–1699.

Accord Healthcare S.L.U. (2017a). Methotrexate [medicinal product official information].

Accord Healthcare S.L.U. (2017b). Citarabine [medicinal product official information].

Akhtar, M.M., Micolucci, L., Islam, M.S., Olivieri, F., and Procopio, A.D. (2016). Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Res.* *44*, 24–44.

Al-Ansari, S., Zecha, J.A.E.M., Barasch, A., de Lange, J., Rozema, F.R., and Raber-Durlacher, J.E. (2015). Oral mucositis induced by anticancer therapies. *Curr. Oral Heal. Reports* *2*, 202–211.

Amstutz, U., Offer, S.M., Sistonen, J., Joerger, M., Diasio, R.B., and Largiader, C.R. (2015). Polymorphisms in MIR27A Associated with Early-Onset Toxicity in Fluoropyrimidine-Based Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* *21*, 2038–2044.

Ansari, M., and Krajcinovic, M. (2007). Pharmacogenomics in cancer treatment defining genetic bases for inter-individual differences in responses to chemotherapy. *Curr. Opin. Pediatr.* *19*, 15–22.

Ansari, M., Sauty, G., Labuda, M., Gagne, V., Laverdiere, C., Moghrabi, A., Sinnett, D., and Krajcinovic, M. (2009). Polymorphisms in multidrug resistance-associated protein gene 4 is associated with outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *114*, 1383–1386.

Argyriou, A.A., Bruna, J., Marmiroli, P., and Cavaletti, G. (2012). Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): An update. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *82*, 51–77.

van Aubel, R.A.M.H., Smeets, P.H.E., Peters, J.G.P., Bindels, R.J.M., and Russel, F.G.M. (2002). The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J. Am. Soc. Nephrol.* *13*, 595–603.

Awasthi, S., Hallene, K.L., Fazio, V., Singhal, S.S., Cucullo, L., Awasthi, Y.C., Dini, G., and Janigro, D. (2005). RLIP76, a non-ABC transporter, and drug resistance in epilepsy. *BMC Neurosci.* *6*, 61.

Badagnani, I., Castro, R.A., Taylor, T.R., Brett, C.M., Huang, C.C., Stryke, D., Kawamoto, M., Johns, S.J., Ferrin, T.E., Carlson, E.J., et al. (2006). Interaction of methotrexate with organic-anion transporting polypeptide 1A2 and its genetic variants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *318*, 521–529.

Baxter Oncology GmbH (2017). Cyclophosphamide [medicinal product official information].

Bektaş-Kayhan, K., Küçük Hüseyin, Ö., Karagöz, G., Ünür, M., Öztürk, O., Ünüvar, A., Devocioğlu, Ö., and Yılmaz-Aydoğan, H. (2012). Is the MDR1 C3435T polymorphism responsible for oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia? *Asian Pac. J. Cancer Prev.* *13*, 5251–5255.

Bénichou, C. (1990). Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. *J Hepatol.* *11*, 272–276.

Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., and Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav. Brain Res.* *125*, 279–284.

References-Erreferentziak

- van den Bent, M.J. (2005). Prevention of Chemotherapy-Induced Neuropathy: Leukemia Inhibitory Factor. *Clin. Cancer Res.* *11*, 1691–1693.
- Bhojwani, D., Yang, J.J., and Pui, C.-H. (2015). Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr. Clin. North Am.* *62*, 47–60.
- van den Blink, B., Juffermans, N.P., ten Hove, T., Schultz, M.J., van Deventer, S.J., van der Poll, T., and Peppelenbosch, M.P. (2001). p38 mitogen-activated protein kinase inhibition increases cytokine release by macrophages in vitro and during infection in vivo. *J. Immunol.* *166*, 582–587.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* *10*, 185–191.
- Callens, C., Debled, M., Delord, M., Turbiez-Stalain, I., Veyret, C., Bieche, I., and Brain, E. (2015). High-throughput pharmacogenetics identifies SLCO1A2 polymorphisms as candidates to elucidate the risk of febrile neutropenia in the breast cancer RAPP-01 trial. *Breast Cancer Res. Treat.* *153*, 383–389.
- Carozzi, V.A., Canta, A., and Chiorazzi, A. (2015). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? *Neurosci. Lett.* *596*, 90–107.
- Celtikci, B., Lawrance, A.K., Wu, Q., and Rozen, R. (2009). Methotrexate-induced apoptosis is enhanced by altered expression of methylenetetrahydrofolate reductase. *Anticancer. Drugs* *20*, 787–793.
- Ceppi, F., Langlois-Pelletier, C., Gagne, V., Rousseau, J., Ciolino, C., De Lorenzo, S., Kevin, K.M., Cijov, D., Sallan, S.E., Silverman, L.B., et al. (2014). Polymorphisms of the vincristine pathway and response to treatment in children with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics* *15*, 1105–1116.
- Cinausero, M., Aprile, G., Ermacora, P., Basile, D., Vitale, M.G., Fanotto, V., Parisi, G., Calvetti, L., and Sonis, S.T. (2017). New frontiers in the pathobiology and treatment of cancer regimen-related mucosal injury. *Front. Pharmacol.* *8*, 354.
- Chiono, V., and Tonda-Turo, C. (2015). Trends in the design of nerve guidance channels in peripheral nerve tissue engineering. *Prog. Neurobiol.* *131*, 87–104.
- Dávila-Fajardo, C.L., Swen, J.J., Cabeza Barrera, J., and Guchelaar, H.-J. (2013). Genetic risk factors for drug-induced liver injury in rheumatoid arthritis patients using low-dose methotrexate. *Pharmacogenomics* *14*, 63–73.
- Deng, Y., Zhou, X., Kugel Desmoulin, S., Wu, J., Cherian, C., Hou, Z., Matherly, L.H., and Gangjee, A. (2009). Synthesis and biological activity of a novel series of 6-substituted thieno[2,3-d]pyrimidine antifolate inhibitors of purine biosynthesis with selectivity for high affinity folate receptors over the reduced folate carrier and proton-coupled folate transpo. *J. Med. Chem.* *52*, 2940–2951.
- Dennison, J.B., Kulanthaivel, P., Barbuch, R.J., Renbarger, J.L., Ehlhardt, W.J., and Hall, S.D. (2006). Selective metabolism of vincristine in vitro by CYP3A5. *Drug Metab. Dispos.* *34*, 1317–1327.
- Desmoulin, S.K., Hou, Z., Gangjee, A., and Matherly, L.H. (2012). The human proton-coupled folate transporter: Biology and therapeutic applications to cancer. *Cancer Biol. Ther.* *13*, 1355–1373.
- Diouf, B., Crews, K.R., Lew, G., Pei, D., Cheng, C., Bao, J., Zheng, J.J., Yang, W., Fan, Y., Wheeler, H.E., et al. (2015). Association of an inherited genetic variant with vincristine-related peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia. *JAMA* *313*, 815–823.
- Dougherty, P.M., Cata, J.P., Burton, A.W., Vu, K., and Weng, H.-R. (2007). Dysfunction in multiple primary afferent fiber subtypes revealed by quantitative sensory testing in patients with chronic vincristine-induced pain. *J. Pain Symptom Manage.* *33*, 166–179.

- Drake, K.J., Singhal, J., Yadav, S., Nadkar, A., Pungaliya, C., Singhal, S.S., and Awasthi, S. (2007). RALBP1/RLIP76 mediates multidrug resistance. *Int. J. Oncol.* *30*, 139–144.
- Dulucq, S., St-Onge, G., Gagné, V., Ansari, M., Sinnett, D., Labuda, D., Moghrabi, A., and Krajcinovic, M. (2008). DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood* *111*, 3692–3700.
- Dweep, H., and Gretz, N. (2015). miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat. Methods* *12*, 697.
- Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P., and Gretz, N. (2011). miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.* *44*, 839–847.
- Egbelakin, A., Ferguson, M.J., MacGill, E.A., Lehmann, A.S., Topletz, A.R., Quinney, S.K., Li, L., McCammack, K.C., Hall, S.D., and Renbarger, J.L. (2011). Increased risk of vincristine neurotoxicity associated with low CYP3A5 expression genotype in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* *56*, 361–367.
- El-Sheikh, A.A.K., van den Heuvel, J.J.M.W., Koenderink, J.B., and Russel, F.G.M. (2007). Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with multidrug resistance protein (MRP) 2/ABCC2- and MRP4/ABCC4-mediated methotrexate transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *320*, 229–235.
- Elsa, C.R., Roberts, D.A., Druker, B.J., and Wood, L.J. (2008). Inhibition of p38 MAPK suppresses inflammatory cytokine induction by etoposide, 5-fluorouracil, and doxorubicin without affecting tumoricidal activity. *PLoS One* *3*, e2355.
- Erčulj, N., Kotnik, B.F., Debeljak, M., Jazbec, J., and Dolžan, V. (2012). Influence of folate pathway polymorphisms on high-dose methotrexate-related toxicity and survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma* *53*, 1096–1104.
- Evans, W.E., Relling, M. V, Rodman, J.H., Crom, W.R., Boyett, J.M., and Pui, C.H. (1998). Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* *338*, 499–505.
- Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Garapati, P., Gillespie, M., Hausmann, K., Haw, R., Jassal, B., Jupe, S., Korninger, F., McKay, S., et al. (2016). The Reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* *44*, D481-7.
- Faganel Kotnik, B., Grabnar, I., Bohanec Grabar, P., Dolzan, V., and Jazbec, J. (2011). Association of genetic polymorphism in the folate metabolic pathway with methotrexate pharmacokinetics and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia and malignant lymphoma. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* *67*, 993–1006.
- Fang, W., and Bartel, D.P. (2015). The menu of features that define primary microRNAs and enable de novo design of microRNA genes. *Mol. Cell* *60*, 131–145.
- Fite, K., Elkhadragy, L., and Gomez-Cambronero, J. (2016). A Repertoire of MicroRNAs Regulates cancer cell starvation by targeting phospholipase D in a feedback loop that operates maximally in cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* *36*, 1078–1089.
- Franca, R., Rebora, P., Bertorello, N., Fagioli, F., Conter, V., Biondi, A., Colombini, A., Micalizzi, C., Zecca, M., Parasole, R., et al. (2017). Pharmacogenetics and induction/consolidation therapy toxicities in acute lymphoblastic leukemia patients treated with AIEOP-BFM ALL 2000 protocol. *Pharmacogenomics J.* *17*, 4–10.
- Friday, S.C., and Fox, D.A. (2016). Phospholipase D enzymes facilitate IL-17- and TNF α -induced expression of proinflammatory genes in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (RASf). *Immunol. Lett.* *174*, 9–18.

References-Erreferentziak

- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2008). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* *19*, 92–105.
- Fukuda, Y., Li, Y., and Segal, R.A. (2017). A Mechanistic Understanding of Axon Degeneration in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Front. Neurosci.* *11*, 481.
- Geng, L., and Wang, X. (2015). Epstein-Barr Virus-associated lymphoproliferative disorders: experimental and clinical developments. *Int. J. Clin. Exp. Med.* *8*, 14656–14671.
- Gervasini, G., de Murillo, S.G., Jiménez, M., de la Maya, M.D., and Vagace, J.M. (2017). Effect of polymorphisms in transporter genes on dosing, efficacy and toxicity of maintenance therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Gene* *628*, 72–77.
- Gong, J., Tong, Y., Zhang, H.-M., Wang, K., Hu, T., Shan, G., Sun, J., and Guo, A.-Y. (2012). Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum. Mutat.* *33*, 254–263.
- Gregers, J., Christensen, I.J., Dalhoff, K., Lausen, B., Schroeder, H., Rosthøj, S., Carlsen, N., Schmiegelow, K., and Peterson, C. (2010). The association of reduced folate carrier 80G>A polymorphism to outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia interacts with chromosome 21 copy number. *Blood* *115*, 4671–4677.
- Gregers, J., Green, H., Christensen, I.J., Dalhoff, K., Schroeder, H., Carlsen, N., Rosthøj, S., Lausen, B., Schmiegelow, K., and Peterson, C. (2015a). Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* *15*, 372–379.
- Gregers, J., Gréen, H., Christensen, I.J., Dalhoff, K., Schroeder, H., Carlsen, N., Rosthøj, S., Lausen, B., Schmiegelow, K., and Peterson, C. (2015b). Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* *15*, 372–379.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., and Shiekhattar, R. (2006). MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods Mol. Biol.* *342*, 33–47.
- Groninger, E., Meeuwse-de Boer, T., Koopmans, P., Uges, D., Sluiter, W., Veerman, A., Kamps, W., and de Graaf, S. (2005). Vincristine pharmacokinetics and response to vincristine monotherapy in an up-front window study of the Dutch Childhood Leukaemia Study Group (DCLSG). *Eur. J. Cancer* *41*, 98–103.
- Gruber, A.R., Lorenz, R., Bernhart, S.H., Neubock, R., and Hofacker, I.L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res.* *36*, W70–4.
- Gutierrez-Camino, A., Martin-Guerrero, I., Lopez-Lopez, E., Echebarria-Barona, A., Zabalza, I., Ruiz, I., Guerra-Merino, I., and Garcia-Orad, A. (2016). 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. *Pharmacogenet. Genomics* *26*, 100–102.
- Gutierrez-Camino, A., Martin-Guerrero, I., and Garcia-Orad, A. (2017a). PNPLA3 rs738409 and Hepatotoxicity in Children With B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Validation Study in a Spanish Cohort. *Clin. Pharmacol. Ther.* *102*, 906.
- Gutierrez-Camino, A., Oosterom, N., den Hoed, M.A.H., Lopez-Lopez, E., Martin-Guerrero, I., Pluijm, S.M.F., Pieters, R., de Jonge, R., Tissing, W.J.E., Heil, S.G., et al. (2017b). The miR-1206 microRNA variant is associated with methotrexate-induced oral mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet. Genomics* *27*, 303–306.
- Hartman, A., van Schaik, R.H.N., van der Heiden, I.P., Broekhuis, M.J.C., Meier, M., den Boer, M.L., and Pieters, R. (2010). Polymorphisms in genes involved in vincristine pharmacokinetics or pharmacodynamics are not related to impaired motor performance in children with leukemia. *Leuk. Res.* *34*, 154–159.

- Hashimoto, M., Yamashita, Y., and Mori, N. (2002). Immunohistochemical detection of CD79a expression in precursor T cell lymphoblastic lymphoma/leukaemias. *J. Pathol.* *197*, 341–347.
- Ho, D.H., Whitecar, J.P., Luce, J.K., and Frei, E. (1970). L-asparagine requirement and the effect of L-asparaginase on the normal and leukemic human bone marrow. *Cancer Res.* *30*, 466–472.
- den Hoed, M.A.H., Lopez-Lopez, E., te Winkel, M.L., Tissing, W., de Rooij, J.D.E., Gutierrez-Camino, A., Garcia-Orad, A., den Boer, E., Pieters, R., Pluijm, S.M.F., et al. (2015). Genetic and metabolic determinants of methotrexate-induced mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* *15*, 248–254.
- Hou, Z., and Matherly, L.H. (2014). Biology of the major facilitative folate transporters SLC19A1 and SLC46A1. *Curr. Top. Membr.* *73*, 175–204.
- Hunger, S.P., Winick, N.J., Sather, H.N., and Carroll, W.L. (2005). Therapy of low-risk subsets of childhood acute lymphoblastic leukemia: when do we say enough? *Pediatr. Blood Cancer* *45*, 876–880.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* *293*, 834–838.
- Imanishi, H., Okamura, N., Yagi, M., Noro, Y., Moriya, Y., Nakamura, T., Hayakawa, A., Takeshima, Y., Sakaeda, T., Matsuo, M., et al. (2007). Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. *J. Hum. Genet.* *52*, 166–171.
- Inada, T., and Makino, S. (2014). Novel roles of the multi-functional CCR4-NOT complex in post-transcriptional regulation. *Front. Genet.* *5*, 135.
- Iorga, A., Dara, L., and Kaplowitz, N. (2017). Drug-Induced Liver Injury: Cascade of Events Leading to Cell Death, Apoptosis or Necrosis. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 1018.
- Iparraguirre, L., Gutierrez-Camino, A., Umerez, M., Martin-Guerrero, I., Astigarraga, I., Navajas, A., Sastre, A., Garcia de Andoin, N., and Garcia-Orad, A. (2016). MiR-pharmacogenetics of methotrexate in childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet. Genomics* *26*, 517–525.
- Islam, M.N., and Iskander, M.N. (2004). Microtubulin binding sites as target for developing anticancer agents. *Mini Rev. Med. Chem.* *4*, 1077–1104.
- Johnston, W.T., Lightfoot, T.J., Simpson, J., and Roman, E. (2010). Childhood cancer survival: a report from the United Kingdom childhood cancer study. *Cancer Epidemiol.* *34*, 659–666.
- Jordan, M.A., and Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 253–265.
- Kamburov, A., Stelzl, U., Lehrach, H., and Herwig, R. (2013). The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Res.* *41*, D793-800.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., and Morishima, K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* *45*, D353–D361.
- Kang, D.W., Choi, K.-Y., and Min, D.S. (2014). Functional regulation of phospholipase D expression in cancer and inflammation. *J. Biol. Chem.* *289*, 22575–22582.
- Kim, V.N. (2004). MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol.* *14*, 156–159.

References-Erreferentziak

- Kim, B., Jeong, K., and Kim, V.N. (2017). Genome-wide mapping of DROSHA cleavage sites on primary microRNAs and noncanonical substrates. *Mol. Cell* 66, 258–269.e5.
- Komissarova, E. V, Li, P., Uddin, A.N., Chen, X., Nadas, A., and Rossman, T.G. (2008). Gene expression levels in normal human lymphoblasts with variable sensitivities to arsenite: identification of GGT1 and NFKBIE expression levels as possible biomarkers of susceptibility. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 226, 199–205.
- Kotur, N., Stankovic, B., Kassela, K., Georgitsi, M., Vicha, A., Leontari, I., Dokmanovic, L., Janic, D., Krstovski, N., Klaassen, K., et al. (2012). 6-mercaptopurine influences TPMT gene transcription in a TPMT gene promoter variable number of tandem repeats-dependent manner. *Pharmacogenomics* 13, 283–295.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 42, D68-73.
- Krajinovic, M., and Moghrabi, A. (2004). Pharmacogenetics of methotrexate. *Pharmacogenomics* 5, 819–834.
- Krajinovic, M., Robaey, P., Chiasson, S., Lemieux-Blanchard, E., Rouillard, M., Primeau, M., Bournissen, F.G., and Moghrabi, A. (2005). Polymorphisms of genes controlling homocysteine levels and IQ score following the treatment for childhood ALL. *Pharmacogenomics* 6, 293–302.
- Krajinovic, M., Elbared, J., Drouin, S., Bertout, L., Rezgui, A., Ansari, M., Raboisson, M.-J., Lipshultz, S.E., Silverman, L.B., Sallan, S.E., et al. (2016). Polymorphisms of ABCC5 and NOS3 genes influence doxorubicin cardiotoxicity in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* 16, 530–535.
- Krishnamurthy, P., Schwab, M., Takenaka, K., Nachagari, D., Morgan, J., Leslie, M., Du, W., Boyd, K., Cheok, M., Nakauchi, H., et al. (2008). Transporter-mediated protection against thiopurine-induced hematopoietic toxicity. *Cancer Res.* 68, 4983–4989.
- Kubota, M., Nakata, R., Adachi, S., Watanabe, K.-I., Heike, T., Takeshita, Y., and Shima, M. (2014). Plasma homocysteine, methionine and S-adenosylhomocysteine levels following high-dose methotrexate treatment in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia or Burkitt lymphoma: association with hepatotoxicity. *Leuk. Lymphoma* 55, 1591–1595.
- Kuiken, N.S.S., Rings, E.H.H.M., Blijlevens, N.M.A., and Tissing, W.J.E. (2017). Biomarkers and non-invasive tests for gastrointestinal mucositis. *Support. Care Cancer* 25, 2933–2941.
- Kunicka, T., and Soucek, P. (2014). Importance of ABCC1 for cancer therapy and prognosis. *Drug Metab. Rev.* 46, 325–342.
- Ladas, E.J., Kroll, D.J., Oberlies, N.H., Cheng, B., Ndao, D.H., Rheingold, S.R., and Kelly, K.M. (2010). A randomized, controlled, double-blind, pilot study of milk thistle for the treatment of hepatotoxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer* 116, 506–513.
- Lauschke, V.M., Mkrтчian, S., and Ingelman-Sundberg, M. (2017). The role of microRNAs in liver injury at the crossroad between hepatic cell death and regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482, 399–407.
- Laverdiere, C., Chiasson, S., Costea, I., Moghrabi, A., and Krajinovic, M. (2002). Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100, 3832–3834.
- Le, Z., Niu, X., Chen, Y., Ou, X., Zhao, G., Liu, Q., Tu, W., Hu, C., Kong, L., and Liu, Y. (2017). Predictive single nucleotide polymorphism markers for acute oral mucositis in patients with nasopharyngeal carcinoma treated with radiotherapy. *Oncotarget* 8, 63026–63037.
- Lee, W.M. (2003). Drug-Induced Hepatotoxicity. *N. Engl. J. Med.* 349, 474–485.

- Lee, Y.J.D., Kim, V., Muth, D.C., and Witwer, K.W. (2015). Validated microRNA target databases: an evaluation. *Drug Dev. Res.* 76, 389–396.
- Legha, S.S. (1986). Vincristine neurotoxicity. Pathophysiology and management. *Med. Toxicol.* 1, 421–427.
- Leveque, D., and Jehl, F. (2007). Molecular pharmacokinetics of catharanthus (vinca) alkaloids. *J. Clin. Pharmacol.* 47, 579–588.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20.
- Li, M.-P., Hu, Y.-D., Hu, X.-L., Zhang, Y.-J., Yang, Y.-L., Jiang, C., Tang, J., and Chen, X.-P. (2016). MiRNAs and miRNA Polymorphisms Modify Drug Response. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13.
- Li, S., Wang, L., Fu, B., Berman, M.A., Diallo, A., and Dorf, M.E. (2014). TRIM65 regulates microRNA activity by ubiquitination of TNRC6. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 6970–6975.
- Li, Y., Zhu, X., Gu, J., Dong, D., Yao, J., Lin, C., Huang, K., and Fei, J. (2010). Anti-miR-21 oligonucleotide sensitizes leukemic K562 cells to arsenic trioxide by inducing apoptosis. *Cancer Sci.* 101, 948–954.
- Liang, D.-C., Yang, C.-P., Lin, D.-T., Hung, I.-J., Lin, K.-H., Chen, J.-S., Hsiao, C.-C., Chang, T.-T., Peng, C.-T., Lin, M.-T., et al. (2010). Long-term results of Taiwan Pediatric Oncology Group studies 1997 and 2002 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 24, 397–405.
- Lim, J.Y.-S., Bhatia, S., Robison, L.L., and Yang, J.J. (2014). Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 120, 955–962.
- Liu, W., Baker, R.D., Bhatia, T., Zhu, L., and Baker, S.S. (2016). Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 1969–1987.
- Liu, Y., Yin, Y., Sheng, Q., Lu, X., Wang, F., Lin, Z., Tian, H., Xu, A., and Zhang, J. (2014a). Association of ABCC2 -24C>T Polymorphism with High-Dose Methotrexate Plasma Concentrations and Toxicities in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS One* 9, e82681.
- Liu, Y., Yin, Y., Sheng, Q., Lu, X., Wang, F., Lin, Z., Tian, H., Xu, A., and Zhang, J. (2014b). Association of ABCC2 -24C>T polymorphism with high-dose methotrexate plasma concentrations and toxicities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 9, e82681.
- Liu, Y., Fernandez, C.A., Smith, C., Yang, W., Cheng, C., Panetta, J.C., Kornegay, N., Liu, C., Ramsey, L.B., Karol, S.E., et al. (2017). Genome-Wide Study Links PNPLA3 Variant With Elevated Hepatic Transaminase After Acute Lymphoblastic Leukemia Therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 102, 131–140.
- Lopez-Lopez, E., Martin-Guerrero, I., Ballesteros, J., Pinan, M.A., Garcia-Miguel, P., Navajas, A., and Garcia-Orad, A. (2011). Polymorphisms of the SLCO1B1 gene predict methotrexate-related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* 57, 612–619.
- Lopez-Lopez, E., Ballesteros, J., Pinan, M.A., Sanchez de Toledo, J., Garcia de Andoin, N., Garcia-Miguel, P., Navajas, A., and Garcia-Orad, A. (2013). Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet. Genomics* 23, 53–61.
- Lopez-Lopez, E., Gutierrez-Camino, A., Pinan, M.A., Sanchez-Toledo, J., Uriz, J.J., Ballesteros, J., Garcia-Miguel, P., Navajas, A., and Garcia-Orad, A. (2014a). Pharmacogenetics of microRNAs and microRNAs biogenesis machinery in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 9, e91261.
- Lopez-Lopez, E., Gutierrez-Camino, A., Bilbao-Aldaiturriaga, N., Pombar-Gomez, M., Martin-Guerrero, I., and Garcia-Orad, A. (2014b). Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia.

References-Erreferentziak

Pharmacogenomics 15, 1383–1398.

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., et al. (2016). Vincristine pharmacokinetics pathway and neurotoxicity during early phases of treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics* 17, 731–741.

Lopomo, A., and Coppedè, F. (2017). Pharmacoepigenetics and pharmacoepigenomics of gastrointestinal cancers. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 1–14.

Low, S.-K., Kiyotani, K., Mushiroda, T., Daigo, Y., Nakamura, Y., and Zembutsu, H. (2009). Association study of genetic polymorphism in ABCC4 with cyclophosphamide-induced adverse drug reactions in breast cancer patients. *J. Hum. Genet.* 54, 564–571.

Malouf, C., and Ottersbach, K. (2017). Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cell. Mol. Life Sci.*

Maxwell, R.R., and Cole, P.D. (2017). Pharmacogenetic Predictors of Treatment-Related Toxicity Among Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 12, 176–186.

Merritt, W.M., Bar-Eli, M., and Sood, A.K. (2010). The dicey role of Dicer: implications for RNAi therapy. *Cancer Res.* 70, 2571–2574.

Meulendijks, D., Henricks, L.M., Amstutz, U., Froehlich, T.K., Largiader, C.R., Beijnen, J.H., de Boer, A., Deenen, M.J., Cats, A., and Schellens, J.H.M. (2016). Rs895819 in MIR27A improves the predictive value of DPYD variants to identify patients at risk of severe fluoropyrimidine-associated toxicity. *Int. J. Cancer* 138, 2752–2761.

Mikkelsen, T.S., Thorn, C.F., Yang, J.J., Ulrich, C.M., French, D., Zaza, G., Dunnenberger, H.M., Marsh, S., McLeod, H.L., Giacomini, K., et al. (2011). PharmGKB summary: methotrexate pathway. *Pharmacogenet. Genomics* 21, 679–686.

Mishra, P.J., Mishra, P.J., Banerjee, D., and Bertino, J.R. (2008). MiRSNPs or MiR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: Introducing microRNA pharmacogenomics. *Cell Cycle* 7, 853–858.

Mitchell, C., Richards, S., Harrison, C.J., and Eden, T. (2010). Long-term follow-up of the United Kingdom medical research council protocols for childhood acute lymphoblastic leukaemia, 1980–2001. *Leukemia* 24, 406–418.

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

Möricke, A., Zimmermann, M., Reiter, A., Henze, G., Schrauder, A., Gadner, H., Ludwig, W.D., Ritter, J., Harbott, J., Mann, G., et al. (2010). Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* 24, 265–284.

Moriyama, T., Relling, M. V., and Yang, J.J. (2015). Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 125, 3988–3995.

Muralidharan, N., Antony, P.T., Jain, V.K., Mariaselvam, C.M., and Negi, V.S. (2015). Multidrug resistance 1 (MDR1) 3435C>T gene polymorphism influences the clinical phenotype and methotrexate-induced adverse events in South Indian Tamil rheumatoid arthritis. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 71, 959–965.

Nakajima, M., and Yokoi, T. (2011). MicroRNAs from biology to future pharmacotherapy: regulation of

- cytochrome P450s and nuclear receptors. *Pharmacol. Ther.* *131*, 330–337.
- Navarro, V.J., and Senior, J.R. (2006). Drug-Related Hepatotoxicity. *N. Engl. J. Med.* *354*, 731–739.
- Nicoletti, P., Carstos, V.M., Palaska, P.K., Shen, Y., Floratos, A., and Zavras, A.I. (2012). Genomewide pharmacogenetics of bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: the role of RBMS3. *Oncologist* *17*, 279–287.
- Onuma, T., Waligunda, J., and Holland, J.F. (1971). Amino acid requirements in vitro of human leukemic cells. *Cancer Res.* *31*, 1640–1644.
- Pfizer, S.. (2017a). Vincristine [medicinal product official information].
- Pfizer, S.L. (2017b). Daunorubicin [medicinal product official information].
- Plasschaert, S.L.A., Groninger, E., Boezen, M., Kema, I., de Vries, E.G.E., Uges, D., Veerman, A.J.P., Kamps, W.A., Vellenga, E., de Graaf, S.S., et al. (2004). Influence of functional polymorphisms of the MDR1 gene on vincristine pharmacokinetics in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Pharmacol. Ther.* *76*, 220–229.
- Postma, T.J., Benard, B.A., Huijgens, P.C., Ossenkoppele, G.J., and Heimans, J.J. (1993). Long-term effects of vincristine on the peripheral nervous system. *J. Neurooncol.* *15*, 23–27.
- Preskorn, S.H., and Hatt, C.R. (2013). How pharmacogenomics (PG) are changing practice: implications for prescribers, their patients, and the healthcare system (PG series part I). *J. Psychiatr. Pract.* *19*, 142–149.
- Pui, C.-H. (2010). Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Formos. Med. Assoc.* *109*, 777–787.
- Pui, C.-H., and Evans, W.E. (2013). A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin. Hematol.* *50*, 185–196.
- Pui, C.-H., Yang, J.J., Hunger, S.P., Pieters, R., Schrappe, M., Biondi, A., Vora, A., Baruchel, A.A., Silverman, L.B., Schmiegelow, K., et al. (2015). Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J. Clin. Oncol.* *33*, JCO.2014.59.1636.
- Qiu, A., Jansen, M., Sakaris, A., Min, S.H., Chattopadhyay, S., Tsai, E., Sandoval, C., Zhao, R., Akabas, M.H., and Goldman, I.D. (2006). Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* *127*, 917–928.
- Qiu, A., Min, S.H., Jansen, M., Malhotra, U., Tsai, E., Cabelof, D.C., Matherly, L.H., Zhao, R., Akabas, M.H., and Goldman, I.D. (2007). Rodent intestinal folate transporters (SLC46A1): secondary structure, functional properties, and response to dietary folate restriction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *293*, C1669-78.
- Radtke, S., Zolk, O., Renner, B., Paulides, M., Zimmermann, M., Moricke, A., Stanulla, M., Schrappe, M., and Langer, T. (2013). Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *121*, 5145–5153.
- Ramnath, D., Powell, E.E., Scholz, G.M., and Sweet, M.J. (2017). The toll-like receptor 3 pathway in homeostasis, responses to injury and wound repair. *Semin. Cell Dev. Biol.* *61*, 22–30.
- Ramsey, L.B., Bruun, G.H., Yang, W., Trevino, L.R., Vattathil, S., Scheet, P., Cheng, C., Rosner, G.L., Giacomini, K.M., Fan, Y., et al. (2012). Rare versus common variants in pharmacogenetics: SLCO1B1 variation and methotrexate disposition. *Genome Res.* *22*, 1–8.
- Ramsey, L.B., Panetta, J.C., Smith, C., Yang, W., Fan, Y., Winick, N.J., Martin, P.L., Cheng, C., Devidas, M.,

References-Erreferentziak

- Pui, C.-H.C.-H., et al. (2013). Genome-wide study of methotrexate clearance replicates SLC01B1. *Blood* *121*, 898–904.
- Reyes-Gibby, C.C., Melkonian, S.C., Wang, J., Yu, R.K., Shelburne, S.A., Lu, C., Gunn, G.B., Chambers, M.S., Hanna, E.Y., Yeung, S.-C.J., et al. (2017). Identifying novel genes and biological processes relevant to the development of cancer therapy-induced mucositis: An informative gene network analysis. *PLoS One* *12*, e0180396.
- Rice, T., Schork, N., and Rao, D. (2008). Genetic Dissection of Complex Traits.
- Robles-Diaz, M., Lucena, M.I., Kaplowitz, N., Stephens, C., Medina-Cáliz, I., González-Jimenez, A., Ulzurrun, E., Gonzalez, A.F., Fernandez, M.C., Romero-Gómez, M., et al. (2014). Use of Hy's law and a new composite algorithm to predict acute liver failure in patients with drug-induced liver injury. *Gastroenterology* *147*, 109–118.e5.
- Rosenthal, S., and Kaufman, S. (1974). Vincristine neurotoxicity. *Ann. Intern. Med.* *80*, 733–737.
- Rukov, J.L., and Shomron, N. (2011). MicroRNA pharmacogenomics: post-transcriptional regulation of drug response. *Trends Mol. Med.* *17*, 412–423.
- Rukov, J.L., Wilentzik, R., Jaffe, I., Vinther, J., and Shomron, N. (2014). Pharmaco-miR: linking microRNAs and drug effects. *Brief. Bioinform.* *15*, 648–659.
- Ryan, B.M., Robles, A.I., and Harris, C.C. (2010). Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 389–402.
- Salazar, J., Altes, A., del Rio, E., Estella, J., Rives, S., Tasso, M., Navajas, A., Molina, J., Villa, M., Vivanco, J.L., et al. (2012). Methotrexate consolidation treatment according to pharmacogenetics of MTHFR ameliorates event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenomics J.* *12*, 379–385.
- Sambrook, J, R.D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (New York: NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sangild, P.T., Shen, R.L., Pontoppidan, P.E.L., and Rathe, M. (2017). Animal models of chemotherapy-induced mucositis: translational relevance and challenges. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *ajpgi.00204.2017*.
- Schmiegelow, K., Müller, K., Mogensen, S.S., Mogensen, P.R., Wolthers, B.O., Stoltze, U.K., Tuckuviene, R., and Frandsen, T. (2017). Open peer review non-infectious chemotherapy-associated acute toxicities during childhood acute lymphoblastic leukemia therapy. *F 1000 Res.* 1–14.
- Van Sebillle, Y.Z.A., Stansborough, R., Wardill, H.R., Bateman, E., Gibson, R.J., and Keefe, D.M. (2015). Management of mucositis during chemotherapy: from pathophysiology to pragmatic therapeutics. *Curr. Oncol. Rep.* *17*, 50.
- Sethu, S., Pushparaj, P.N., and Melendez, A.J. (2010). Phospholipase D1 mediates TNFalpha-induced inflammation in a murine model of TNFalpha-induced peritonitis. *PLoS One* *5*, e10506.
- Shimasaki, N., Mori, T., Samejima, H., Sato, R., Shimada, H., Yahagi, N., Torii, C., Yoshihara, H., Tanigawara, Y., Takahashi, T., et al. (2006). Effects of methylenetetrahydrofolate reductase and reduced folate carrier 1 polymorphisms on high-dose methotrexate-induced toxicities in children with acute lymphoblastic leukemia or lymphoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* *28*, 64–68.
- Silver pharma S.L. (2017). Mercaptopurine [medicinal product official information].
- Silverman, L.B., Declerck, L., Gelber, R.D., Dalton, V.K., Asselin, B.L., Barr, R.D., Clavell, L.A., Hurwitz, C.A.,

- Moghrabi, A., Samson, Y., et al. (2000). Results of Dana-Farber Cancer Institute Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1981-1995). *Leukemia* 14, 2247–2256.
- Slaby, O., Bienertova-Vasku, J., Svoboda, M., and Vyzula, R. (2012). Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer. *J. Cell. Mol. Med.* 16, 8–21.
- Song, J.-J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat. Struct. Biol.* 10, 1026–1032.
- Sonis, S.T. (2004a). The pathobiology of mucositis. *Nat. Rev. Cancer* 4, 277–284.
- Sonis, S.T. (2004b). Oral mucositis in cancer therapy. *J. Support. Oncol.* 2, 3–8.
- Sonis, S.T. (2004c). A biological approach to mucositis. *J. Support. Oncol.* 2, 21-32-6.
- Sonis, S.T. (2007). The pathobiology of oral mucositis. *Community Support. Oncol.* 5, 3–11.
- Sonis, S.T., Elting, L.S., Keefe, D., Peterson, D.E., Schubert, M., Hauer-Jensen, M., Bekele, B.N., Raber-Durlacher, J., Donnelly, J.P., Rubenstein, E.B., et al. (2004). Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer* 100, 1995–2025.
- Sonis, S.T., Antin, J., Tedaldi, M., and Alterovitz, G. (2013). SNP-based Bayesian networks can predict oral mucositis risk in autologous stem cell transplant recipients. *Oral Dis.* 19, 721–727.
- Spezialpräparate, M.G. für klinische (2017). Asparaginase [medicinal product official information].
- Sullivan, K.M., Dean, A., and Soe, M.M. (2009). OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health. *Public Health Rep.* 124, 471–474.
- Suthandiram, S., Gan, G.-G., Zain, S.M., Bee, P.-C., Lian, L.-H., Chang, K.-M., Ong, T.-C., and Mohamed, Z. (2014). Effect of polymorphisms within methotrexate pathway genes on methotrexate toxicity and plasma levels in adults with hematological malignancies. *Pharmacogenomics* 15, 1479–1494.
- Swerdlow, S., Campo, E., Harris, N., Jaffe, E., Pileri, S., Stein, H., Thiele, J., and Vardiman, J. (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Lyon:IARC;2008).
- Swerts, K., De Moerloose, B., Dhooge, C., Laureys, G., Benoit, Y., and Philippé, J. (2006). Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur. J. Cancer* 42, 295–309.
- Tasian, S.K., and Hunger, S.P. (2017). Genomic characterization of paediatric acute lymphoblastic leukaemia: an opportunity for precision medicine therapeutics. *Br. J. Haematol.* 176, 867–882.
- Teft, W.A., Welch, S., Lenehan, J., Parfitt, J., Choi, Y.-H., Winquist, E., and Kim, R.B. (2015). OATP1B1 and tumour OATP1B3 modulate exposure, toxicity, and survival after irinotecan-based chemotherapy. *Br. J. Cancer* 112, 857–865.
- Treon, S.P., and Chabner, B.A. (1996). Concepts in use of high-dose methotrexate therapy. *Clin. Chem.* 42, 1322–1329.
- Trevino, L.R., Shimasaki, N., Yang, W., Panetta, J.C., Cheng, C., Pei, D., Chan, D., Sparreboom, A., Giacomini, K.M., Pui, C.-H., et al. (2009). Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J. Clin. Oncol.* 27, 5972–5978.
- Turner, R.M., Park, B.K., and Pirmohamed, M. (2015). Parsing interindividual drug variability: an emerging

References-Erreferentziak

role for systems pharmacology. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 7, 221–241.

Tzoneva, G., Perez-Garcia, A., Carpenter, Z., Khiabani, H., Tosello, V., Allegretta, M., Paietta, E., Racevskis, J., Rowe, J.M., Tallman, M.S., et al. (2013). Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat. Med.* 19, 368–371.

Umerez, M., Gutierrez-Camino, Á., Muñoz-Maldonado, C., Martin-Guerrero, I., and Garcia-Orad, A. (2017). MTHFR polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia: Influence on methotrexate therapy. *Pharmgenomics. Pers. Med.* 10, 69–78.

Wang, S., Sun, L., Zeng, W., Wu, W., and Zhang, G. (2014). Effects of a microRNA binding site polymorphism in SLC19A1 on methotrexate concentrations in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *Med. Oncol.* 31, 62.

Wojtuszkiewicz, A., Peters, G.J., van Woerden, N.L., Dubbelman, B., Escherich, G., Schmiegelow, K., Sonneveld, E., Pieters, R., van de Ven, P.M., Jansen, G., et al. (2015). Methotrexate resistance in relation to treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Hematol. Oncol.* 8, 61.

Xia, L., Zhang, D., Du, R., Pan, Y., Zhao, L., Sun, S., Hong, L., Liu, J., and Fan, D. (2008). miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. *Int. J. Cancer* 123, 372–379.

Yang, A., Sun, Y., Mao, C., Yang, S., Huang, M., Deng, M., Ding, N., Yang, X., Zhang, M., Jin, S., et al. (2017). Folate protects hepatocytes of hyperhomocysteinemia mice from apoptosis via cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-activated endoplasmic reticulum stress. *J. Cell. Biochem.* 118, 2921–2932.

Zhan, X., Wu, W., Han, B., Gao, G., Qiao, R., Lv, J., Zhang, S., Zhang, W., Fan, W., Chen, H., et al. (2012). Hsa-miR-196a2 functional SNP is associated with severe toxicity after platinum-based chemotherapy of advanced nonsmall cell lung cancer patients in a Chinese population. *J. Clin. Lab. Anal.* 26, 441–446.

Zhao, R., Qiu, A., Tsai, E., Jansen, M., Akabas, M.H., and Goldman, I.D. (2008). The proton-coupled folate transporter: impact on pemetrexed transport and on antifolates activities compared with the reduced folate carrier. *Mol. Pharmacol.* 74, 854–862.

Zhou, F., Zheng, J., Zhu, L., Jodal, A., Cui, P.H., Wong, M., Gurney, H., Church, W.B., and Murray, M. (2013). Functional analysis of novel polymorphisms in the human SLCO1A2 gene that encodes the transporter OATP1A2. *AAPS J.* 15, 1099–1108.

Zhou, G., Yu, L., Yang, W., Wu, W., Fang, L., and Liu, Z. (2016). Blockade of PLD2 ameliorates intestinal mucosal inflammation of inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm.* 2016, 2543070.