

Frecuencias genotípicas en Niños con Leucemia Linfoblástica Aguda en dos centros Oncológicos.

*Correspondencia:

andreina_heavy08@hotmail.com

Av 12 de Abril y Agustín Cueva,
Campus Central. Carrera de
Bioquímica y Farmacia., Facultad
de Ciencias Químicas, Cuenca-
Ecuador.

Conflicto de intereses: Los
autores declaran no tener
conflictos de intereses.

Fondos: Ver la página 79

Recibido: 4 Febrero 2020
Aceptado: 27 Marzo 2020
Publicado: 30 Abril 2020

Membrete bibliográfico:

Murillo J, Ochoa M, Zaruma F. K, Villavicencio E, Andrade A, Roldán J. Frecuencias genotípicas en Niños con Leucemia Linfoblástica Aguda en dos centros Oncológicos. Polimorfismos genéticos de MTHFR 677C>T (rs1801133) y MTHFR 1298A>C (rs1801131). Rev. Oncol. Ecu 2020;30(1):66-82.

ISSN: 2661-6653

DOI: <https://doi.org/10.33821/473>

 Copyright Murillo J, et al. Este artículo es distribuido bajo los términos de [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), el cual permite el uso y redistribución citando la fuente y al autor original

Polimorfismos genéticos de MTHFR 677C>T (rs1801133) y MTHFR 1298A>C (rs1801131).

Genotypic frequencies in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia in two Oncology centers.

Genetic polymorphisms of MTHFR 677C> T (rs1801133) and MTHFR 1298A> C (rs1801131).

Johanna Andrea Murillo Guamán*¹, Maritza Raphaela Ochoa Castro¹

 **Fausto Leandro Zaruma Torres¹** 

1. Carrera de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca, Ecuador.

Resumen

Introducción: La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una de las oncopatologías más frecuentes a nivel infantil, ocupando el primer lugar de los cinco tipos de cáncer con mayor incidencia en Ecuador. El objetivo del estudio fue determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos genéticos de MTHFR 677C>T (rs1801133) y MTHFR 1298A>C (rs1801131) en niños con leucemia linfoblástica aguda de SOLCA – Loja y SOLCA – Cuenca.

Métodos: Es un estudio transversal, donde se evaluó a 160 pacientes pediátricos diagnosticados con LLA. La detección de los polimorfismos MTHFR 677C>T y 1298A>C se realizó mediante la técnica PCR en tiempo real. El análisis estadístico descriptivo se desarrolló a través del software IBM SPSS (versión 22) y el programa bioinformático SNPStats.

Resultados: Se determinó que las frecuencias genotípicas para el SNP MTHFR 677C>T fueron 25% C/C y 75% C/T con una frecuencia alélica del 38% para el alelo mutado (T). Para el SNP MTHFR 1298 A>C se encontró una frecuencia genotípica de 2% A/A, 16% A/C y 82% C/C, en tanto que su frecuencia alélica fue del 90% para el alelo mutado (C). No se encontró asociación genotípica ni alélica con ninguna de las variables intervinientes ($p>0.05$), así como tampoco se manifestó una correlación estadísticamente significativa de los polimorfismos en mención y el tipo de riesgo de LLA.

Conclusión: En la población estudiada con LLA, se evidenció para el SNP de MTHFR 677C>T una frecuencia genotípica del 75% para el heterocigoto C/T. Para el SNP MTHFR 1298A>C se encontró una frecuencia genotípica del 82% para el homocigoto mutado C/C. La distribución de la frecuencia alélica se mostró de la siguiente manera: para MTHFR 677C>T se obtuvo 38% para el alelo mutado T y en cuanto a MTHFR 1298 A>C, 90% correspondió para el alelo mutado C. En el análisis estadístico no se encontró asociación genotípica ni alélica con las variables demográficas y clínicas.

Palabras Claves: Leucemia Bifenotípica Aguda, Leucemia-Linfoma Linfoblástico de Células Precursoras, Polimorfismo Genético, MTHFR 677C>T, MTHFR 1298A>

DOI: 10.33821/473

Abstract

Introduction: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is one of the most frequent oncopathologies in childhood, occupying the first place of the five types of cancer with the highest incidence in Ecuador. The objective of the study was to determine the genotypic and allelic frequencies of the genetic polymorphisms of MTHFR 677C> T (rs1801133) and MTHFR 1298A> C (rs1801131) in children with acute lymphoblastic leukemia from SOLCA - Loja and SOLCA - Cuenca.

Methods: It is a cross-sectional study, where 160 pediatric patients diagnosed with ALL were evaluated. The detection of MTHFR 677C> T and 1298A> C polymorphisms was performed using the real-time PCR technique. The descriptive statistical analysis was developed using the IBM SPSS software (version 22) and the SNPStats bioinformatics program.

Results: It was determined that the genotype frequencies for the SNP MTHFR 677C> T were 25% C / C and 75% C / T with an allele frequency of 38% for the mutated allele (T). For the SNP MTHFR 1298 A> C, a genotype frequency of 2% A / A, 16% A / C and 82% C / C was found, while its allelic frequency was 90% for the mutated allele (C). No genotypic or allelic association was found with any of the intervening variables ($p > 0.05$), as well as no statistically significant correlation of the mentioned polymorphisms and the type of risk of ALL.

Conclusion: In the population studied with ALL, a genotypic frequency of 75% was evidenced for the MTHFR 677C> T SNP for the heterozygous C / T. For the SNP MTHFR 1298A> C, a genotypic frequency of 82% was found for the homozygous mutated C / C. The allelic frequency distribution was shown as follows: for MTHFR 677C> T, 38% was obtained for the mutated allele T and for MTHFR 1298 A> C, 90% corresponded to the mutated allele C. In the statistical analysis No genotypic or allelic association was found with demographic and clinical variables.

Keywords: Leukemia, Biphenotypic, Acute; Precursor Cell Lymphoblastic Leukemia-Lymphoma, Polymorphism, Genetic, MTHFR 677C>T, MTHFR 1298A>.

DOI: 10.33821/473

Introducción

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer que se presenta con mayor frecuencia en la edad pediátrica, generalmente en menores de 15 años. En el mundo se estima que aproximadamente del 30% del total de neoplasias malignas en pacientes pediátricos, el 75% son por leucemia linfoblástica aguda, la misma que es más común en varones [1]

Se ha demostrado que existe gran variabilidad entre los pacientes, con respecto tanto al efecto terapéutico, como a la toxicidad del tratamiento inducida por fármacos antifolatos utilizados en la LLA. Estos fármacos emplean la vía del folato, la cual está regulada por la función coordinada de varias enzimas como la metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

[2], actuando así sobre el ciclo celular inhibiendo la MTHFR. El fallo terapéutico por tanto, puede ser ocasionado por la propia resistencia de las células oncógenas o en su defecto, a una disminución en la exposición al fármaco a causa de una posible biotransformación apresurada dentro de los sistemas enzimáticos del individuo [3].

Es por ello, que los pacientes con una actividad endógena baja de la enzima tienen mayor riesgo de padecer principalmente toxicidad mucosa y hematológica inducida por los fármacos en mención [4]. El gen de la enzima MTHFR manifiesta 2 alelos considerados como polimórficos, el primero y el más frecuente, presenta una mutación situada en la posición C677T y el segundo la presenta en A1298C, por lo que esto desencadena la derivación de proteínas cuya actividad enzimática se encuentra disminuida. En cuanto al alelo C677T que genera la sustitución de alanina a valina, da como resultado una variante que demostró ser termolábil in vitro; lo que ocasiona una brusca disminución de alrededor del 70% de la actividad de la enzima en comparación con el alelo de tipo salvaje por lo que se verá afectada la distribución intracelular de folatos, dando paso a la retención del mismo que iría dirigido a la síntesis de novo [5].

Respecto al alelo A1298C que origina la sustitución de un residuo de alanina por glutamato, la actividad de la enzima se reduce mostrando un 60% de actividad frente a los individuos que poseen el alelo salvaje. Además de ello, aquellos individuos que sean heterocigotos tanto en C677T como en A1298C pueden presentar incluso una disminución de actividad enzimática incluso del 50% aproximadamente. Al disminuir la actividad de la enzima MTHFR, esto conduce al aumento de la concentración de homocisteína a nivel plasmático y a una ineficiente metilación del ADN en pacientes oncológicos.

Por ello entre otras causas los polimorfismos de la MTHFR se involucran relativamente de manera directa en la farmacoterapia de la LLA, particularmente con los fármacos antifolatos; y en constancia de ello ya se publican reportes en donde se muestra que los individuos que padecen LLA, quienes manifiestan uno o dos alelos mutados; claramente presentan pobre supervivencia libre de eventos [3, 6]. Hasta el momento no se dispone de estudios semejantes que se hayan llevado a cabo dentro del país, cuyos resultados contribuyan de cierta forma a la medicina de precisión o translacional para este tipo de oncopatología de gran impacto en el medio.

Por lo expuesto, se plantea este estudio observacional para determinación de la frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos C677T y A1298C en el gen de la enzima MTHFR en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda de SOLCA – Loja y SOLCA – Cuenca.

Materiales y Métodos

Diseño del estudio

Estudio transversal, observacional.

Escenario

El estudio se realizó en el Instituto del Cáncer SOLCA, de la ciudad de Cuenca –Ecuador, y el Instituto de Cáncer de SOLCA, núcleo de Loja. El período comprendido del estudio fue 1ro de enero del 2019 al 31 de Septiembre del 2019. El período de campo fue considerado como período de reclutamiento y exposición. El seguimiento de los resultados se terminó el 13 de Octubre del 2019 y el período de recopilación de datos terminó el 1 de Noviembre del 2019.

Participantes

Participaron todos pacientes en edades de 0 a 18 años, diagnosticados de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Se seleccionaron los registros de pacientes con todos los datos completos en la historia clínica. Se excluyeron pacientes con LLA concomitante con otra enfermedad oncológica, síndrome de Down o VIH.

Variables

Las variables fueron descritas como demográficas: edad, sexo, procedencia. Las variables clínicas: índice de masa corporal, hemoglobina, hematocrito, inmunofenotipo. Variables principales del estudio fueron la frecuencia genotípica del polimorfismo MTHFR 677C>T, MTHFR 1298A>C, la frecuencia alélica de los polimorfismos 677C>T y 1298A>C del gen MTHFR.

Fuentes de datos / medición

Para cada variable se utilizó el software institucional para registro de historias clínicas como fuente de datos, se consultó el expediente clínico electrónico SOFTCASE. Los datos fueron compilados en una hoja electrónica para posteriormente ser transferidos al software estadístico. El proceso de toma de muestras de sangre fue realizada por el personal de salud correspondiente, en SOLCA-Cuenca y SOLCA-Loja. La totalidad de las muestras tomadas se mantuvieron en cadena de frío entre 4 y 8° C hasta que fueron transportadas hasta el laboratorio de biotecnología perteneciente a la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay. El proceso en su totalidad fue desarrollado paso a paso dentro de la Cabina de Flujo CSB C4.

Extracción del ADN.

Para la extracción del ADN, se utilizó el Kit comercial PureLink™ Genomic DNA de Invitrogen Serie K1820-02, con aislamiento de columna de sílice. Adicionalmente se usó etanol absoluto al 96%. El protocolo de extracción a detalle se presentó en un trabajo previo (Tesis <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/33629/1/Trabajo%20de%20titulaci%C3%B3n.pdf>). Brevemente el proceso consta de 4 partes: : Lisis celular, purificación, lavado y elución.

Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN se realizó por el método de espectrofotometría. Se empleó el espectrofotómetro de Microplacas Epoch, con volumen de muestra de 2ul. Se usó el

protocolo de la placa Take3 y a través del Software Gen5, y que con una longitud de onda entre 260 y 280nm, reportó resultados obteniéndose un promedio de dos lecturas. Se realizó una electroforesis de ADN en gel de agarosa usando 80 ml de TAE (Tri Acetato EDTA), 8ul de SYBR Safe con una técnica estándar.

Amplificación de ADN mediante la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).

Para el desarrollo de la técnica se trabajó con el termociclador IANLONG Real Time PCR System TL, siendo compatible con las siguientes sondas empleadas:

a) La sonda Taqman® del polimorfismo rs1801133 con serie de ensayo: C__1202883_20, permitió identificar en las muestras de ADN el siguiente cambio: presencia del alelo A y ausencia del alelo G, en la secuencia: GAAAAGCTGCGTGATGATGAAATCG[G/A]CTCCCGCAGACACCTTCTCCTTCAA.

b) La sonda Taqman® del polimorfismo rs1801131 con serie de ensayo: C__850486_20, que permitió identificar en las muestras de ADN el siguiente cambio: presencia del alelo T y ausencia del alelo G, en la secuencia: AAGAACGAAGACTTCAAAGACACTT[G/T]CTTCACTGGTCAGCTCCTCCCCCA.

Las sondas vienen marcadas con los fluorocromos VIC y el FAM; el primero para detectar la secuencia de alelo 1 o silvestre y el segundo para detectar el alelo 2 o alelo mutado. Para las respectivas determinaciones, además se utilizará la Taqman® Genotyping Master Mix de Applied Biosystem®, correspondiente al número de ensayo 4351379 (Thermo Fisher, 2016). Se realizó la estandarización de la técnica de PCR en tiempo real con las instrucciones del proveedor (TaqMan®).

Control de las fuentes de sesgo

Se excluyeron historias clínicas cuyos datos no estuvieron completos, se evitó la imputación de datos perdidos o excluidos. El protocolo de este estudio fue aprobado por Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito (Aprobación MSP, Oficio No MSP-VGVS-2016-0244-O).

Tamaño del estudio

La muestra fue no probabilística, en la cual se incluyeron todos los casos potencialmente elegibles de los centros oncológicos.

Manejo de variables cuantitativas

Las variables cuantitativas en escala se presentan con promedios y desviación estándar. Las variables cuantitativas nominales se presentan con frecuencia y porcentaje. En las variables principales se presenta intervalos de confianza para proporciones.

Métodos Estadísticos

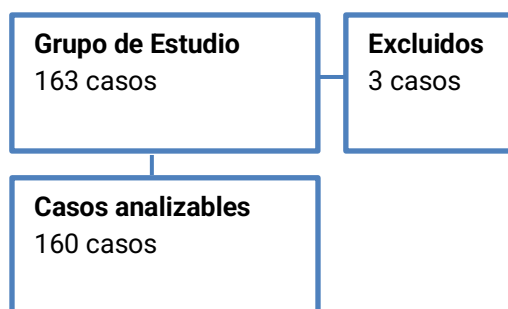
Para la determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos se empleó el programa Bioinformático SNPstas del Instituto de Oncología de la Universidad de Cataluña, disponible en línea en: http://bioinfo.iconcologia.net/SNPStats_web (D´Oncología, 2006). Para el análisis estadístico de los datos y resultados obtenidos se utilizó el paquete de software SPSS versión 21, en donde se establecieron frecuencias, porcentajes, así como la asociación y correlación entre las variables, para lo cual se trabajó con un nivel de confianza del 95% mediante Chi-cuadrado (χ^2) donde un valor de $P < 0.005$ se consideró estadísticamente significativo, el análisis de asociación del tipo de riesgo de LLA y las frecuencias genotípicas y alélicas se efectuó mediante χ^2 y Odds Ratio.

Resultados

Participantes

Fueron ingresados al estudio 160 pacientes. Fueron eliminados del grupo 3 casos por datos incompletos en el expediente (**Figura 1**).

Figura 1. Diagrama de flujo de los participantes del estudio.



Características de las pacientes

La población de estudio conformada por 160 pacientes mostró predominio por el sexo masculino $n=92/160$ (57.5%) y mujeres fueron $68/160$ (42.5%). Del grupo etario que se estableció, presentó igual distribución entre las edades de 6-11 y 12-18 años con el 41.9% ($n=67$) para ambos grupos. En cuanto al IMC, los pacientes se encontraron en su mayoría dentro del rango categórico considerado como peso normal o normopeso 58.1% ($n=93$), seguido de un porcentaje considerable de pacientes con sobrepeso 23.1% ($n=37$) y obesidad 16.3% ($n=26$), dejando como restante al porcentaje de la categoría de bajo peso (**Tabla 1**). El predominio del linaje de LLA correspondió a los pacientes que expresaron el inmunofenotipo para células B con el 79.4% (**Tabla 1**).

Los valores de hemoglobina (75%) y hematocrito (77.5%), predominaron como normales en ambos parámetros. De la totalidad de la población en estudio se observó que los pacientes eran en su mayoría procedentes de la región sierra 72.5% (n=116%), ocupando la costa y oriente el segundo y tercer lugar respectivamente.

Resultados principales

Frecuencia genotípica de los polimorfismos 677C>T (rs1801133) y 1298A>C (rs1801131) del gen MTHFR.

El procesamiento de los datos ingresados obtenidos tras la ejecución de la técnica de PCR en tiempo real identificaron que, de los grupos genotípicos posibles para el SNP 677C>T se encuentran: el wild type (C/C), heterocigoto (C/T) y homocigoto mutado (T/T); se obtuvo que el grupo heterocigoto (C/T) presenta la mayor frecuencia con el 75%, en comparación con el grupo silvestre o wild type (C/C) que presentó el 25%. No se encontró población que presente el genotipo mutado. Las frecuencias están presentadas en la **tabla 2**.

Frecuencia alélica de los polimorfismos 677C>T (rs1801133) y 1298A>C (rs1801131) del gen MTHFR.

La frecuencia alélica presentada por el SNP 677C>T reportó el 38% para el alelo mutado T. En tanto que, para el SNP 1298A>C el alelo mutado presentó una frecuencia del 90%.

Tabla 1. Características Demográficas y Clínicas de los pacientes.

SEXO	n=150	%
Mujer	68	42.5
Hombre	92	57.5
EDAD		
1-5 Años	26	16.3
6-11 Años	67	41.9
12-18 Años	67	41.9
INDICE DE MASA CORPORAL		
Bajo Peso	4	2.5
Normal	93	58.1
Sobrepeso	37	23.1
Obesidad	26	16.3
PROCEDENCIA		
Costa	27	16.87
Sierra	116	72.5
Oriente	17	10.63
HEMOGLOBINA		
Baja	23	14.4
Normal	120	75.0
Alta	17	10.6
INMUNOFENOTIPO		
Células B	127	79.4
Células T	11	6.9
Pre-B	19	11.9
Bifenotípica	3	1.9

Tabla 2. Frecuencia genotípica del SNP

SNP rs1801133	n=160	%
C/C	40	25.0
C/T	120	75.0
T/T	-	-
SNP1298A>C		
A/A	3	2.0
A/C	25	16.0
C/C	132	82.0

SNP: rs1801133: C/C: wild Type. C/T Heterocitogo, TT Homocigoto Mutado
 SNP 1298A>c: A/A: wild Type. A/C Heterocitogo, C7C Homocigoto Mutado

Tabla 3. Frecuencia Alélica del Gen MTHFR

MTHFR 677C>T	n=160	%
Alelo C	200	62.0
Alelo T	120	38.0
MTHFR 1289A>C		
Alelo A	31	10.0
Alelo C	289	90.0

El Gen MTHFR tiene 2 alelos, por lo que se reportan 320 alelos de 160 pacientes.

Análisis Secundarios

Se demostró que no existe asociación entre el sexo/Edad/índice de masa y los genotipos MTHFR 677C>T y MTHFR 1298A>C. Tampoco hubo asociación entre los inmunofenotipos o niveles de hemoglobina y los genotipos MTHFR 677C>T y MTHFR 1298A>C ($P>0.05$). Tampoco sus alelos demostraron asociación con estas variables.

En la **figura 2**, se indica la distribución en conjunto de los genotipos más frecuentes para cada polimorfismo, el genotipo heterocigoto C/T para 677C>T y el homocigoto mutado para 1298A>C de acuerdo a su lugar de procedencia. Es así, que Azuay ocupa el primer lugar con el 28.7% para el grupo C/T y el 34.4% para C/C; en segundo lugar se encuentra la provincia de Loja con el 13.8%(C/T) y el 14.4%(C/C), seguido de El Oro con el 10.6% tanto para C/T como para C/C. Cañar y Morona Santiago ocupan el cuarto y quinto lugar respectivamente.

No se demostró asociación entre los Genotipos del SNP según del riesgo de LLA y el inmunofenotipo (**Tabla 4**).

Figura 2. Distribución geográfica de los genotipos

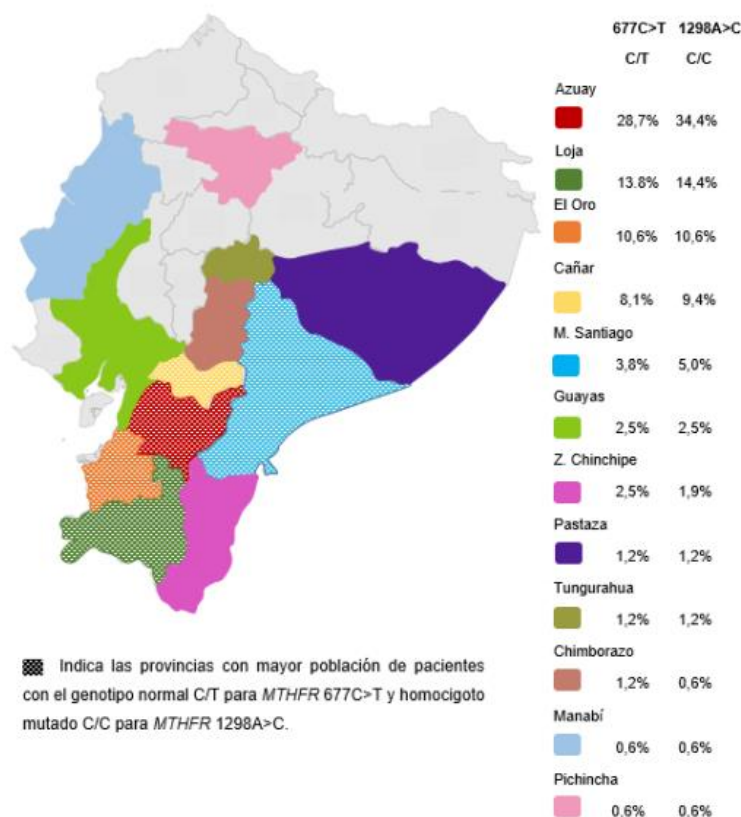


Tabla 4. Asociación Genotípica del SNP según el tipo de Riesgo de LLA por el inmunofenotipo

Genotipo	Alto Riesgo n=146	Alto Riesgo n=146	OR (IC95%)	P
SNP 677C>T: C/T vs C/C	11 (78.6%)	109 (74.7%)	0.72 (0.18-3.58)	0.64
SNP 1298A>C: A/C vs A/A+C/C	3 (21.4%)	22 (15.1%)	0.54 (0.13-2.22)	0.41
SNP 677C>T: T vs C	11 (6.9%)	109 (68.1%)	1.24 (0.32-4.70)	0.74

Discusión

Los resultados principales del presente estudio, el SNP 677C>T del gen MTHFR obtuvo la siguiente distribución genotípica: 25% para el homocigoto normal o wild type C/C y 75% para el heterocigoto C/T, no se obtuvieron resultados para el genotipo mutado T/T, en cuanto a su frecuencia alélica se manifestó el 38% para el alelo mutado (T). El segundo SNP en estudio MTHFR 1298A>C del mismo gen presentó: 2% para el homocigoto normal A/A, 16% para el heterocigoto A/C y 82% para el homocigoto mutado C/C, mostrando una frecuencia alélica del 90% en cuanto al alelo mutado (C). Los resultados fueron parcialmente

semejantes con una investigación reciente realizada en niños mexicanos diagnosticados de LLA en un Centro Oncológico Pediátrico de Baja California (México) [7]; en donde se relató que el 40% presentó el alelo mutado (T) de MTHFR 677C>T, porcentaje bastante similar con el expuesto inicialmente. Sin embargo para MTHFR 1298A>C el resultado contrastó, pues en tal estudio se encontró que sólo el 22% mostró el alelo mutado C. Genotípicamente los resultados comparados variaron para ambos polimorfismos, ya que en MTHFR 677C>T, los niños mexicanos si reportaron resultados para el genotipo mutado T/T con el 15% y en cuanto a MTHFR 1298A>C la mayor frecuencia se asentó en el genotipo wild type con el 67%. Gutiérrez demuestra además que existe una asociación significativa entre el genotipo 1298CC y el riesgo a LLA, quien sustenta que la existencia de esta variante en MTHFR en tales individuos pueda deberse a una insuficiente distribución intracelular de ácido fólico, el cual es necesario para conservar la estructura tridimensional de la proteína; teniendo así como resultado la producción de una metilación de ADN aberrante y la posterior síntesis de nucleótidos que aumentaría el riesgo de desarrollar LLA [7]. Esto resulta importante mencionarlo, pues en nuestra población existió una alta frecuencia del genotipo mutado C/C (82%), por lo que posiblemente pudiera existir de igual manera tal asociación. Sin embargo, mientras no se logre comparar con población sana o normal, esto no sería posible saberlo.

Los resultados genotípicos obtenidos también difieren en parte con los de Zanrosso et al. [8], quienes estudiaron la asociación de MTHFR en la patogenia de leucemias agudas de un grupo de niños de origen brasileño con LLA y encontraron que, el 10% de ellos presentó el genotipo mutado T/T para 677C>T y en cuanto a 1298A>C la mayor frecuencia se situó en el genotipo wild type con el 51% [8]. La variabilidad en la comparación de los resultados obtenidos particularmente con el genotipo mutado de 1298A>C y los de otras poblaciones se sustenta en que por una parte, la distribución de este polimorfismo es menos conocida que el SNP 677C>T; además de que su frecuencia varía ampliamente de una población a otra [9]. Lo anterior se puede dilucidar al observar la diferencia entre frecuencias genotípicas y alélicas determinada en algunos países según un estudio de prevalencia realizado en el año 2016; donde México y África Occidental presentaron las frecuencias más altas y más bajas del alelo T y genotipo T/T de 677C>T respectivamente. Al contrario, estos dos países fueron las áreas con las frecuencias más bajas del alelo C y genotipo C/C de 1298A>C, siendo Francia quien presentó la frecuencia más alta [10].

En Ecuador no existen datos disponibles al respecto, por lo que este estudio se consideraría como uno de los primeros en describir el comportamiento de la frecuencia de los SNPs 677C>T y 1298A>C de MTHFR en pacientes diagnosticados con LLA. De acuerdo al lugar de procedencia de la población, se identificó que de los genotipos con mayor frecuencia, heterocigoto C/T en 677C>T y homocigoto mutado C/C en 1298 A/C; Azuay se registró en primer lugar, seguido de Loja, ocupando el Oro el tercer lugar. El género masculino fue el que predominó en los genotipos más frecuentes: 41.2% en el genotipo C/T de 677C>T y 45.6% en el genotipo mutado C/C para 1298A>C; no obstante, presentar el alelo raro en ambos polimorfismos tuvo mayor tendencia hacia las niñas, alelo T (41.2%) y alelo C (56.2%); lo que indicaría que el género femenino tiene más predisposición a poseer el alelo mutado que el masculino. Sin embargo, no se encontró asociación entre el sexo, obesidad y la distribución genotípica o alélica de los SPNs estudiados, lo cual coincide con otros reportes [9, 11].

Referente a la caracterización del fenotipo de la LLA y su distribución genotípica y alélica de los SNPs en estudio, no se observaron diferencias significativas, lo que concuerda con Skibola et al., quien luego de estudiar un grupo de pacientes con leucemia aguda del Centro de Investigación de Leucemia Británica, concluyó que no se observaron diferencias significativas en las frecuencias mutantes de MTHFR 677C>T y 1298A>C entre los grupos caracterizados en función del inmunofenotipo, considerando como uno solo a los de tipo ALL-B y ALL-T para su análisis [12]. De Jonge et al., también sostienen la anterior aclaración a través de un estudio más reciente en 245 pacientes pediátricos con LLA de Europa occidental, concluyendo que aún es reciente la exploración de conocer si los pacientes con determinado tipo de LLA difiere en la cinética del folato por medio de sus SNPs en MTHFR. Los autores excluyeron a los pacientes con ALL-T del análisis y obtuvieron que no existía resultados significativamente diferentes [13].

Si bien no se encontró relación entre el inmunofenotipo de la LLA y los polimorfismos en estudio del gen MTHFR, y además en vista de que no existían datos que reflejen la siguiente asociación; se planteó conseguir una asociación genotípica y alélica frente a una variable de respuesta que refirió el grupo de riesgo al que pertenecía cada individuo en base al inmunofenotipo de expresión. De ello, se obtuvo que en general no existe asociación estadísticamente significativa que se demuestre entre los SNPs de MTHFR 677C>T y 1298A>C con el tipo de riesgo de LLA, lo que indica que el riesgo es independiente de presentar determinado genotipo. Tomando en consideración que se ha demostrado asociaciones estadísticas entre los SNPs MTHFR 677C>T y 1298A>C y las concentraciones de folato y homocisteína [14], se intentó asociar los niveles de hemoglobina así como los del hematocrito. Esto, sabiendo de antemano que la hemoglobina requiere factores como la vitamina B12, hierro y ácido fólico para su producción y que en contexto con el metabolismo del ciclo de folato; estos podrían de alguna forma ser indicadores de desnutrición. No se encontró tal asociación genotípica ni alélica, en donde la población presentó valores normales de hemoglobina y hematocrito en los genotipos y alelos más frecuentes.

La importancia de desarrollar un análisis en cuanto a la distribución de las frecuencias de dos de los más influyentes polimorfismos correspondientes al gen de la enzima MTHFR radica en que ésta, es una de las enzimas potencialmente involucrada en el metabolismo y acción del MTX; fármaco antifolato utilizado en altas dosis en la mayoría de protocolos poliquimioterapéuticos durante la fase de consolidación y mantenimiento del tratamiento de la LLA y existe evidencia de que se manifiesta una asociación entre los polimorfismos más comunes del gen MTHFR, 677C>T y 1298A>C con la toxicidad y eficacia del tratamiento con MTX además de otros agentes antifolatos [13].

Los alelos 677T y 1298C provocados en MTHFR, claramente desencadenan una disminución en cuanto a la funcionalidad de su actividad enzimática [11-13]. Estudios demuestran que los individuos con el genotipo T/T de 677C>T presenta un 30% de actividad de la enzima MTHFR in vitro en comparación con el tipo salvaje y que aquellos con genotipo C/T mantienen alrededor del 60% de actividad de la enzima de tipo salvaje. Es factible asumir que en la población estudiada, la mayoría expresaría también el segundo porcentaje de actividad manifestada en cuanto a la enzima, ya que fue el genotipo heterocigoto C/T quien predominó en tales individuos. Algo parecido ocurriría con 1298A>C, ya que se manifiesta que poseer el genotipo C/C, el cual predominó en este estudio, presenta de igual

manera una disminución al 60% de actividad de MTHFR [15]. Los metabolitos del metotrexato inhiben a la MTHFR, y por consiguiente al poseer los pacientes con LLA baja actividad endógena, tendrán un mayor riesgo de mucositis, toxicidad hematológica y hepática inducida por el fármaco [4].

Sin embargo, hasta la fecha aún existen resultados que generan controversia. De manera retrospectiva en pacientes con LLA en terapia de mantenimiento con el genotipo T/T se asoció significativamente con un aumento de la toxicidad hepática durante la administración de metotrexato [16]. En adición a lo expuesto, Suthandiram et al., también demostraron que un alto porcentaje de pacientes con neoplasias hematológicas presentó toxicidad hematopoyética y hepática en relación con el genotipo mutado T/T de MTHFR 677C>T y que en cuanto al SNP 1298A>C no encontraron asociación con ningún tipo de toxicidad (Suthandiram et al., 2014). En contraste a ello, al desarrollar un estudio en 270 pacientes pediátricos con LLA de origen franco-canadiense; Krajinovic et al., concluyeron que no existe asociación entre los SNPs 677C>T y 1298A>C y la toxicidad inducida por fármacos antifolatos, mostrando incluso un efecto protector (Krajinovic et al., 2004).

El estudio de las frecuencias de polimorfismos genéticos en las enzimas que forman parte del metabolismo de la farmacoterapia de la LLA, como lo fue en el gen de la enzima MTHFR; representa el primer paso para estudiar el comportamiento de su distribución en diferentes poblaciones, y como ésta pueda manifestar un impacto significativo tanto en el control, riesgo así como en la toxicidad medicamentosa. Es así, que luego de comprender las bases moleculares de tales eventos, se podrá determinar la forma en la que éstas variantes genéticas influyen por ejemplo en las respuestas farmacológicas para así lograr optimizar su uso. Esto hace referencia a la medicina personalizada, la cual en pocas palabras se basa en administrar a cada paciente el fármaco en dosis y concentración adecuada en línea con su eficacia y seguridad.

Es posible, que en pocos años incluso se emplee un formato de genotipos específicos acorde a la frecuencia que prevalezca en la población para este tipo de neoplasia, para así conseguir identificar a su vez subconjuntos de pacientes predispuestos genéticamente a desarrollar posible toxicidad inducida por la farmacoterapia.

Conclusiones

En la población estudiada conformada por 160 pacientes diagnosticados con LLA, se evidenció para el SNP de MTHFR 677C>T una frecuencia genotípica de 25% para el homocigoto normal C/C y 75% para el heterocigoto C/T, sin encontrar resultados en el genotipo homocigoto mutado T/T. Para el SNP MTHFR 1298A>C se encontró una frecuencia genotípica de 2% para el homocigoto normal, 16% para el heterocigoto A/C y 82% para el homocigoto mutado C/C. La distribución de la frecuencia alélica se mostró de la siguiente manera: para MTHFR 677C>T se obtuvo 38% para el alelo mutado T y en cuanto a MTHFR 1298 A>C, 90% correspondió para el alelo mutado C. En el análisis estadístico no se encontró asociación genotípica ni alélica con las variables (sexo, edad, IMC, inmunofenotipo,

hemoglobina y hematocrito), así como tampoco se manifestó una correlación estadísticamente significativa entre el genotipo y alelo frente al tipo de riesgo de LLA.

Agradecimientos

Al personal del Solca –Cuenca, Solca Loja y laboratorio de biotecnología perteneciente a la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay lugares en donde se realizó el estudio.

Nota del Editor

La Revista Oncología Ecu permanece neutral con respecto a los reclamos jurisdiccionales en mapas publicados y afiliaciones institucionales.

Información adicional

Abreviaturas

aa: Aminoácido
ADN: Ácido desoxirribonucleico
bp: Pares de bases
CpG: Histonas precedidas de guanina
dbSNP: Base de Datos de Polimorfismo de Nucleótido Único
DHF: Dihidrofolato
dTMP: Monofostato de desoxitimidina
DUMP: Monofosfato de desoxiuridina
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
Hcy: Homocisteína
IMC: Índice de masa corporal
LLA: Leucemia linfoblástica aguda
LNH: Linfoma no Hodking
MIC: Diferenciación morfológica, inmunológica y citogenética
MTR: Metionina sintasa
MTHFR: Enzima metilentetrahidrofolato reductasa
ng/ul: Nanogramos por microlitro
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RNA: Ácido ribonucleico
SAM: S-adenosil-L-metionina
SNPs: Polimorfismo de un solo nucleótido
THF: Tetrahidrofolato
TS: Timidilato sintasa

Archivos Adicionales

Ninguno declarado por los autores.

Sistemas antiplagio

El documento fue escaneado por los sistemas antiplagio de la revista, reportando originalidad completa del documento y ausencia de redundancia hasta la fecha de aceptación del artículo.

Fondos

Los fondos de la investigación fueron propios de los autores del presente artículo.

Disponibilidad de datos y materiales

Existe la disponibilidad de datos bajo solicitud al autor de correspondencia. No se reportan otros materiales. La fuente original lo constituye la tesis de pregrado de los autores.

Contribuciones de los autores

JAMG, MROC trabajaron por igual en la idea de investigación, revisión bibliográfica, recolección de los datos, escritura del artículo, análisis estadístico. JAMG realizó las correcciones editoriales. MROC y FLZT participaron en la idea de investigación, análisis crítico del artículo, dirección de la investigación, control de calidad de los datos. Todos los autores leyeron y aprobaron la versión final del artículo.

Aprobación de ética y consentimiento para participar

El protocolo llevado a cabo cumplió tácitamente con los criterios bioéticos de la Declaración de Helsinki; y además, al ser el presente trabajo de titulación parte del proyecto “Translocaciones cromosómicas y polimorfismos genéticos de enzimas de la vía el folato y de transportadores de metotrexate como posibles marcadores predictores de la toxicidad en niños con Leucemia Linfoblástica Aguda”, cuenta con la aprobación del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito (Aprobación MSP, Oficio No MSP-VGVS-2016-0244-O). Los participantes o sus tutores firmaron el consentimiento/asentimiento para participar.

Consentimiento para publicación

Existe la autorización escrita de los participantes para publicar estos resultados.

Información de los autores

Johanna Andrea Murillo Guamán, Bioquímica Farmacéutica por la Universidad de Cuenca.

Maritza Raphaela Ochoa Castro, Bioquímica Farmacéutica por la Universidad de Cuenca, Magíster en Atención Farmacéutica por la Universidad de Cuenca.

Fausto Leandro Zaruma Torres, Doctor en Bioquímica y Farmacia por la Universidad de Cuenca, Diploma Superior en Educación Universitaria en Ciencias de la Salud por la Universidad de Cuenca, Master En Tecnología y Control De Medicamentos, por la Universidad de la Habana, Doctor en Ciencias en Biotecnología (pHD) por el Instituto Politécnico Nacional.

Referencias

1. Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009 Aug;23(4):655-74. DOI: 10.1016/j.hoc.2009.04.009. PMID: 19577163.
2. Zaruma F, Lares I, Reyes A, Loera V, Almanza H, Arias MC. Impacto De Polimorfismos Genéticos De La Vía Metabólica Del Metotrexato Sobre La Sobrevida De Niños Mexicanos Con Leucemia Linfoblástica Aguda (Lla) Impact. *Vitae*;2015;22(3):177–187. SU: <https://www.redalyc.org/html/1698/169845538002/>
3. Gómez-Gómez Y, Organista-Nava J, Villanueva-Flores F, Estrada-Brito JS, Rivera-Ramírez AB, Saavedra-Herrera MV, et al. Association Between the 5,10-MTHFR 677C>T and RFC1 80G>A Polymorphisms and Acute Lymphoblastic Leukemia. *Arch Med Res.* 2019 May;50(4):175-180. DOI: 10.1016/j.arcmed.2019.07.010. Epub 2019 Sep 6. PMID: 31499477.
4. Prado Vizcaino Y, Arencibia A, Vizcaino M, Abeledo C, Rodeiro I, Cabrera E.. aplicada al tratamiento de la leucemia linfocítica aguda Pharmacogenetics applied to the treatment of acute lymphoid leukemia. In *Inmunología y Hemoterapia* 2011; 27: Retrieved from <http://scielo.sld.cu>
5. Wall AM, Rubnitz JE. Pharmacogenomic effects on therapy for acute lymphoblastic leukemia in children. *Pharmacogenomics J.* 2003;3(3):128-35. DOI: 10.1038/sj.tpj.6500174. PMID: [12815362](#)
6. Costea I, Moghrabi A, Laverdiere C, Graziani A, Krajnovic M. Folate cycle gene variants and chemotherapy toxicity in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2006 Aug;91(8):1113-6. Epub 2006 Jul 25. PMID: [16870553](#).
7. Gutiérrez O. Asociación de los polimorfismos de la TPMT*1,*2,*3A,*3B,*3C y la MTHFR (677C>T y 1298A>C) con la Farmacocinética de la 6-Mercaptopurina, las reacciones adversas y la susceptibilidad a Leucemia Linfoblástica Aguda en pacientes pediátricos. [Tesis Doctoral]. Instituto Politécnico Nacional, México 2016. Repositorio IPN-México. SU: repositorio.ipn.mx/24144
8. Zanrosso CW, Emerenciano M, Figueiredo A, Reis M, Nô S, Cordeiro S, et al. (2005). Influência da metileno-tetrahidrofolato redutase na patogênese das leucemias agudas infantis. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2005;51(4):289–295. SU: [2F20190708us-ea](#)
9. Martínez-Echevarría MT, Casanueva-Calero K, Hernández-Acea B, et al. Polimorfismo MTHFR A1298C en pacientes cubanos con trombocitopenia. *Rev Hematol Mex.* 2019;20(1):5-10. SU: [medigraphic/86380](#)
10. Guéant-Rodriguez RM, Guéant JL, Debarb R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr.* 2006 Mar;83(3):701-7. DOI: 10.1093/ajcn.83.3.701. PMID: [16522920](#)

Abreviaturas en las referencias

DOI: Digital Object Identifier

PMID: PubMed Identifier 33%

SU: Short URL

11. Alghasham A, Settin AA, Ali A, Dowaidar M, Ismail H. Association of MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms with hypertension. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2012 Jan;6(1):3-11. DOI: 10.12816/0005968. PMID: [23267299](#); PMCID: PMC3523778.
12. Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, Morgan G. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 26;96(22):12810-5. DOI: 10.1073/pnas.96.22.12810. PMID: [10536004](#); PMCID: PMC23109.
13. de Jonge R, Tissing WJ, Hooijberg JH, Jansen G, Kaspers GJ, Lindemans J, Peters GJ, Pieters R. Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2009 Mar 5;113(10):2284-9. DOI: 10.1182/blood-2008-07-165928. Epub 2008 Nov 19. PMID: [19020309](#).
14. Herrera J, Muñoz A, Parra B. Determinants of folate nutritional status and the role of the genetic variation of C677T methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) enzyme. *Rev. chil. nutr.* 2016;43(4):336-345. DOI: [10.4067/S0717-75182016000400001](#)
15. Pereira TV, Rudnicki M, Pereira AC, Pombo-de-Oliveira MS, Franco RF. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Oct;15(10):1956-63. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0334. PMID: [17035405](#).
16. Chiusolo P, Reddicono G, Casorelli I, Laurenti L, Sorà F, Mele L, Annino L, Leone G, Sica S. Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate. *Ann Oncol*. 2002 Dec;13(12):1915-8. DOI: 10.1093/annonc/mdf322. PMID: [12453860](#).