



Impacto de las variantes de un solo nucleótido en la ruta del folato y translocaciones cromosómicas sobre la recaída y muerte en pacientes con leucemia linfoblástica aguda bajo tratamiento

Zaruma-Torres Fausto^a, Ochoa-Castro Maritza^a, Guerrero Enmanuel^{a,b,c}, Andrade Andrés^{b,c}, Orellana Adriana^b, Acurio Catherine^d, Jiménez Soledad^d, Caroca Rodrigo^e

(a) *Departamento de Biociencias. Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.*

(b) *Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.*

(c) *Instituto del Cáncer SOLCA. Cuenca, Ecuador.*

(d) *Instituto del Cáncer SOLCA. Loja, Ecuador.*

(e) *Departamento de Biología. Universidad del Azuay - Cuenca, Ecuador.*

Recibido el 15 de junio de 2024; aceptado el 17 de septiembre de 2024

Resumen

Objetivo:

El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar el efecto de algunas variantes de un solo nucleótido (SNVs) involucradas en la ruta metabólica del folato y translocaciones cromosómicas específicas en la recaída y muerte en pacientes pediátricos con LLA bajo tratamiento.

Métodos:

Se analizaron datos demográficos, frecuencias genotípicas y alélicas, y la presencia de translocaciones cromosómicas en 141 pacientes pediátricos con LLA, los cuales se dividieron en grupos si presentaban (casos) o no presentaban (controles) recaída o muerte durante su tratamiento. Se utilizó el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) para evaluar la distribución de SNVs. Se realizaron análisis de correlación y modelos de herencia para determinar asociaciones con la recaída y muerte en los pacientes.

Resultados:

La translocación t(12;21) fue prevalente en ambos grupos sin diferencias significativas. La recaída se asoció principalmente con la muerte como desenlace en los pacientes (OR: 3.67, IC95%: 1.5643-16.9282, p:0.039), además los SNV CDK9 rs1544106 T/T, CDK9 rs1544106 C/T, SLCO1B1 rs4149057 C/T, mostraron una relación positiva con la muerte.

PALABRAS CLAVE

Muerte.
Recaída.
Leucemia.
SNVs.
Traslocaciones cromosómicas.

La edad de 9 a 16 años y el sexo masculino se relacionaron con un mayor riesgo de muerte. Aunque no se encontraron asociaciones significativas en los modelos de herencia, se observaron tendencias sugestivas con recaída o muerte en los SNVs SLCO1B1 rs4149057 y CDK9 rs1544106.

Conclusiones:

Los SNVs SLCO1B1 rs4149057 y CDK9 rs1544106 tienen tendencias interesantes en la recaída y muerte en pacientes pediátricos con LLA. La recaída, la edad y el sexo son factores críticos en el pronóstico y tratamiento de la enfermedad. Estos hallazgos resaltan la importancia de la personalización del tratamiento, sin embargo, es necesario llevar a cabo investigaciones adicionales.

© 2024 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Death.

Relapse.

Leukemia.

SNVs.

Chromosomal Translocations.

Impact of Single Nucleotide Variants in the Folate Pathway and Chromosomal Translocations on Relapse and Death in Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Under Treatment

Abstract

Objective:

The aim of our study was to evaluate the effect of certain single nucleotide variants (SNVs) involved in the folate metabolic pathway and specific chromosomal translocations on relapse and death in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) under treatment.

Methods:

Demographic data, genotypic and allelic frequencies, and the presence of chromosomal translocations were analyzed in 141 pediatric patients with ALL. These patients were divided into groups based on whether they experienced relapse or death during their treatment (cases) or did not (controls). Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was used to evaluate the distribution of SNVs. Correlation analyses and inheritance models were performed to determine associations with relapse and death in the patients.

Results:

The translocation t(12;21) was prevalent in both groups without significant differences. Relapse was mainly associated with death as an outcome in patients (OR: 3.67, 95% CI: 1.5643-16.9282, p:0.039). Additionally, the SNVs CDK9 rs1544106 T/T, CDK9 rs1544106 C/T, and SLCO1B1 rs4149057 C/T showed a positive relationship with death. Age between 9 to 16 years and male sex were associated with a higher risk of death. Although no significant associations were found in the inheritance models, suggestive trends with relapse or death were observed for the SNVs SLCO1B1 rs4149057 and CDK9 rs1544106.

Conclusions:

The SNVs SLCO1B1 rs4149057 and CDK9 rs1544106 show interesting trends in relapse and death in pediatric patients with ALL. Relapse, age, and sex are critical factors in the prognosis and treatment of the disease. These findings highlight the importance of personalized treatment; however, further research is necessary.

© 2024 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. All rights reserved.

Nukleotido bakar baten aldaerek folatoaren eta translokazio kromosomikoen ibilbidean duten inpaktua, leuzemia linfoblastiko akutua tratamenduan duten pazienteen gaixoberritzean eta heriotzean.

Laburpena

Helburua:

Gure lanaren helburua izan zen folatoaren ibilbide metabolikoan parte hartzen duten nukleotido bakar baten (SNV) aldaera batzuen eragina ebaluatzea, eta tratamenduan dagoen LLA duten pediatriako pazienteak gaixoberritzean eta hiltzean berariazko translokazio kromosomikoak egitea.

Metodoak:

Datu demografikoak, maiztasun genotipikoak eta alelikoak, eta translokazio kromosomikoen presentzia aztertu ziren LLA zuten 141 paziente pediatrikotan. Paziente horiek taldeetan banatu ziren tratamenduan berrerortzea edo hiltzea zuten (kasuak) edo ez (kontrolak). Hardy-Weinbergen (HWE) oreka erabili zen SNVen banaketa ebaluatzeko. Korrelazio-analisiak eta herentzia-ereduak egin ziren, gaixoen gaixoberritzearekin eta heriotzarekin loturak zehazteko.

Emaitzak:

t(12; 21) translokazioa nagusi izan zen bi taldeetan, alde esanguratsurik gabe. Gaixoberritzeak, batez ere, pazienteen heriotza eragin zuen amaiera gisa (OR: 3.67, KT % 95: 1.5643-16.9282, p: 0.039). Gainera, SNV CDK9 rs1544106 T/T, CDK9 rs1544106 C/T, SLCO1B1 rs4149057 C/T gaixotasunek lotura positiboa izan zuten heriotzarekin. 9-16 urte bitarteko adinak eta gizonezkoek heriotza-arrisku handiagoa zuten. Herentzia-ereduetan asoziazio esanguratsurik aurkitu ez zen arren, joera iradokitzaileak ikusi ziren, berriz gaixotzea edo hiltzea eragin zutenak SNVetan (SLCO1B1 rs4149057 eta CDK9 rs1544106).

Ondorioak:

SNV SLCO1B1 rs4149057 eta CDK9 rs1544106 sistemek joera interesgarriak dituzte LLA duten pediatriako pazienteak berriz gaixotzeko eta hiltzeko. Gaixoberritzea, adina eta sexua faktore kritikoak dira gaixotasunaren pronostikoan eta tratamenduan. Aurkikuntza horiek tratamenduaren pertsonalizazioaren garrantzia azpimarratzen dute, baina beharrezkoa da ikerketa osagarriak egitea.

© 2024 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. Eskubide guztiak gordeta.

GILTZA-HITZAK

Heriotza.
Bergaixotze.
Leuzemia.
SNVs.
Translokazio kromosomikoak.

Introducción

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) infantil es el cáncer pediátrico más común en el mundo; se trata de una enfermedad maligna de las células blancas de la sangre con una etiología multifactorial que implica la interacción de diferentes variables, incluidas las genéticas y las ambientales (Figura 1)^{1,2}. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su último reporte emitido en 2020, el total de muertes en América por todos los tipos de leucemia fue de 45,688, siendo más común la presencia de esta enfermedad en niños, aunque más letal en adultos. Se estima que más del 60% de los pacientes diagnosticados con LLA son niños menores de 15 años, con una incidencia más alta entre los 2 y 5 años de edad³. En Ecuador, la LLA es una de las oncopatologías pediátricas más frecuentes cuya morbilidad se encuentra en un 51.43% de un total de 1026 casos siendo su aparición más relevante de los 0 a los 9 años de edad⁴.

Como ya se mencionó, las características genéticas son una de las variables descritas con un gran peso en el desarrollo de la leucemia, dentro de estas causas genéticas las alteraciones cromosómicas ocupan un lugar importante, estas translocaciones incluyen t(9,22) que incluye la p190 y p210 y otras que aparecen en el cromosoma Filadelfia (Ph), tales como la t(4,11), t(1,19), y t(12,21), mismas que además permiten diagnosticar y clasificar a los pacientes de acuerdo a su riesgo y pronóstico⁵.

Desde hace algunas décadas la supervivencia en la LLA infantil ha ido en aumento, alcanzando un porcentaje cercano al 90%⁶. Estos avances en la mejora de la supervivencia de los pacientes se deben principalmente a la intensificación de la quimioterapia, el incremento en la atención de apoyo a los pacientes y progresos en el trasplante de células madre hematopoyéticas⁷. A pesar de estos logros, la recurrencia de la enfermedad sigue

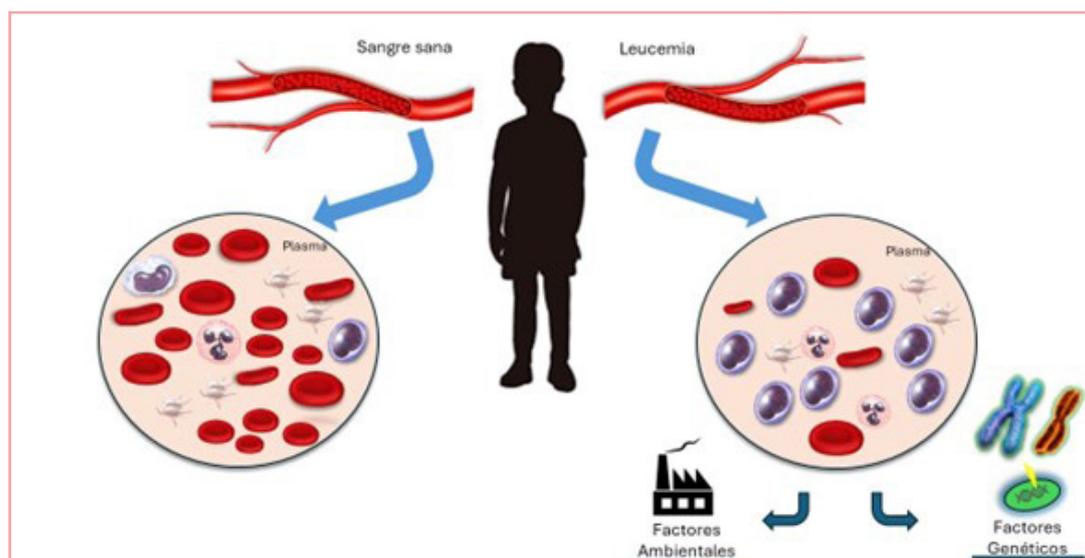


Figura 1. Representación de la etiología multifactorial de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) infantil. La ilustración muestra células blancas normales y células leucémicas, destacando la influencia de factores genéticos (mutaciones en el ADN) y ambientales (contaminación, radiación, pesticidas) en el desarrollo de la enfermedad. La interacción de estos factores contribuye a la malignidad de las células blancas en la sangre de los pacientes pediátricos.

siendo un desafío significativo⁷, ya que entre el 8% y el 20% de los pacientes experimentan una recaída durante la primera remisión, y solo la mitad de ellos logran la supervivencia a largo plazo⁸.

Para los pacientes con LLA, la supervivencia frecuentemente se ve obstaculizada por efectos adversos graves ocasionados por el tratamiento quimioterapéutico. Durante la fase inicial del tratamiento, entre el 1.5% y el 5% de los pacientes fallecen debido a complicaciones relacionadas con la misma enfermedad y con la quimioterapia como lo son las infecciones y los efectos tóxicos⁹, además, es bien sabido que los pacientes que experimentan una recaída son aún más vulnerables a padecer efectos adversos por la quimioterapia, debido al efecto acumulativo de las toxicidades de los órganos y la alta intensidad del tratamiento con algunos medicamentos en específico¹⁰. En este sentido, uno de los medicamentos fundamentales en el tratamiento de la LLA pediátrica es el metotrexato (MTX), un agente quimioterapéutico eficaz que actúa inhibiendo la síntesis de ácido fólico, lo que interfiere con la proliferación celular. Aunque el MTX ha demostrado ser efectivo en el control de la enfermedad, su uso conlleva una serie de efectos adversos en los pacientes^{11,12}. Algunos autores han reportado que existen variaciones genéticas puntuales denominadas variantes de un solo nucleótido "SNVs" (Single Nucleotide Variants), que se han visto involucradas en la respuesta tanto enzimática (como la metilentetrahidrofolato reductasa-MTHFR) como la función de los transportadores membranales de folato y

de resistencia a fármacos (SLC01B1, SLC19A1 y ABCB1) y en consecuencia pueden producir un desorden en la farmacocinética y farmacodinamia (PK/PD) de los principios activos de MTX^{13,14}. Esto es importante ya que se ha reportado que la aparición de efectos adversos por MTX está directamente relacionada con su PK/PD (nivel plasmático de MTX) y se caracteriza por cuadros de mucositis, neurotoxicidad, nefrotoxicidad, entre otras, lo que pudiera llevar a modificar la recaída y sobrevida en los pacientes de manera muy desfavorable^{15,16}.

En este sentido y sabiendo la importancia de los factores genéticos, Kang H y colaboradores¹⁷, desarrollaron un clasificador de expresión génica de 38 genes, predictivo de la supervivencia libre de recaída (RFS) y un clasificador de expresión génica de 21 genes predictivo de enfermedad mínima residual en pacientes con LLA, esto ayudó a poder clasificar por riesgo de recaída y muerte a los pacientes con LLA según su perfil genético. Por otro lado, Vujkovic M y colaboradores¹⁸, en su trabajo describieron distintas asociaciones entre variantes genéticas en las vías de metabolismo del folato y el riesgo de recaída en la LLA pediátrica, tales como *SLC19A1*, *TPMT*, *MTR* y *SLC19A1* en pacientes hospitalizados en el norte de Estados Unidos.

Es una realidad que el análisis genético de SNVs en poblaciones específicas es un enfoque que puede ayudar a pronosticar el riesgo que posee un paciente a un efecto adverso puntual, a pronosticar la sobrevida, o a desarrollar una enfermedad como la LLA, así lo reportó Zaruma-Torres F y colaboradores¹⁴, quienes en su tra-

bajo encontraron que ciertas SNVs específicas involucradas en la ruta del folato incrementaban el riesgo de padecer LLA en niños de población mexicana. A su vez, Gómez-Gómez Y, y colaboradores¹⁹, reportaron que algunas SNVs del gen del dihidrofolato reductasa tenían un riesgo muy significativo con la supervivencia y el riesgo de recaída de la LLA en niños.

La ruta del folato es considerada como esencial para la síntesis y reparación del ADN, y es posible que las SNVs específicas en esta vía puedan afectar la eficacia del tratamiento²⁰. Además, como se mencionó las translocaciones cromosómicas son eventos genéticos significativos que pueden influir en la agresividad de la LLA y la respuesta a la quimioterapia²¹. Estos factores genéticos contribuyen a la recaída y mortalidad en la LLA en niños y su estudio puede permitir desarrollar tratamientos más personalizados y efectivos, mejorando así los resultados clínicos para los pacientes.

El objetivo de nuestro trabajo fue comprobar el impacto de algunas SNVs involucradas en la ruta del folato, así como translocaciones cromosómicas específicas sobre la recaída y muerte en un grupo de pacientes con LLA bajo Tratamiento en Ecuador.

Materiales y métodos

Se trata de un estudio de tipo observacional, prospectivo, longitudinal, comparativo y de asociación. El proyecto se sometió previamente a la evaluación del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos Universidad San Francisco de Quito, acreditado por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador, con número de aprobación 2017-106E de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Se incluyeron 141 pacientes de ambos sexos de entre 1 a 18 años de edad, con un promedio de 72.3 meses de tratamiento al momento del estudio. Los pacientes fueron divididos en grupos de casos (si presentaban muerte o recaída) y controles (si no presentaban muerte o recaída). Todos los pacientes fueron diagnosticados con LLA según los criterios de la Asociación Franco-Americano-Británica de Hematología²². Cada paciente estaba recibiendo tratamiento de quimioterapia según el protocolo St Jude TOTAL XV²³. Se pidió a todos los padres de los pacientes que firmaran el consentimiento informado, y a los niños mayores de 7 años se les pidió que aceptaran el consentimiento informado.

Obtención de muestra

Las muestras de sangre fueron extraídas a través de una cánula intravenosa previamente insertada en el brazo de cada uno de los pacientes que recibieron quimioterapia; se recolectaron 3 mL de muestras de sangre en tubos de plástico con heparina como anticoagulante (Sarstedt®). Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

Determinación de translocaciones

A todos los pacientes se les realizó la identificación de las translocaciones del cromosoma Filadelfia "12/21" y

"1/19" mediante una combinación de técnicas complementarias, incluyendo cariotipo e inmunofenotipo por citometría de flujo.

En primera instancia para llevar a cabo la técnica de cariotipo, se procesaron las muestras de sangre total utilizando la técnica estándar de cultivo de linfocitos en medio de cultivo específico durante 72 horas a 37°C. Posteriormente, se agregó colchicina a las muestras para detener la división celular en metafase. Las células fueron tratadas con una solución hipotónica y fijadas en metanol: ácido acético (3:1). Las extensiones cromosómicas resultantes fueron teñidas con colorantes Giemsa, y examinadas al microscopio óptico de alta resolución para la identificación de anomalías cromosómicas, incluidas las traslocaciones.

Por otro lado, para la técnica de inmunofenotipo por citometría de flujo, las muestras de sangre fueron tratadas con anticuerpos monoclonales específicos Beckman Coulter® para antígenos de superficie celular asociados con la presencia de las traslocaciones "12/21" y "1/19". Estos anticuerpos estaban marcados con fluorocromos que permitían su detección por el citómetro de flujo. Las células fueron analizadas mediante el citómetro de flujo Navios Beckman Coulter® para evaluar la expresión de los antígenos diana. Los datos obtenidos fueron procesados por software Navios para la identificación y cuantificación de las células positivas para los antígenos específicos de las translocaciones.

Genotipificación

La genotipificación del ADN se obtuvo a partir de sangre completa utilizando el procedimiento de extracción de PureLink® Genomic DNA mini Kit de INVITROGEN. Su integridad y pureza se determinaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, teñido con Texas Red, y la cuantificación se realizó mediante espectrofotometría en Nanodrop® (Thermo Scientific, Estados Unidos). Los SNV: *LEP* rs7799040 número de ensayo C_1328079_10, *SLC19A1* rs2838957 número de ensayo C_15832103_10, *ABCB1* rs1128504 C_7586662_10, *SLC01B1* rs4149057 número de ensayo C_1901691_20, *CDK9* rs1544106 número de ensayo C_1462536_10, *ABCB1* rs1045643 número de ensayo es C_7586662_10, *MTHFR* rs1801133 número de ensayo C_1202883_20 y *MTHFR* rs1801131 número de ensayo C_850486_20, fueron determinados mediante qPCR utilizando sondas TaqMan específicas para cada SNV (Thermo Fisher Scientific®), en un termociclador StepOne®.

Valoración de recaída

La evaluación de la recaída en los pacientes abordó métodos clínicos, de laboratorio y de imagenología. Esto incluye la valoración clínica, valoración de la disminución de los niveles de glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas. Presencia de células blásticas (células inmaduras de más del 5% de blastos en la médula ósea).

Análisis estadístico

Se obtuvieron las frecuencias genotípicas y alélicas de los pacientes tanto de los casos y como de los controles. Se realizó un análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE). El software utilizado fue SNPStats (Instituto Catalán de Oncología, Barcelona, España)²⁴. Posteriormente, se comparó la frecuencia de los alelos entre los casos y los controles de cada SNV utilizando la prueba de Chi cuadrado (χ^2), considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Finalmente, se realizó un análisis de asociación de riesgo de Odds Ratio (OR)²⁵ para cada alelo de cada SNV entre los casos y los controles, así como los modelos de herencia en los que se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo, finalmente los análisis multivariados y las gráficas de coeficientes de correlación se llevaron a cabo con el software r y su complemento RStudio.

Resultados

La tabla I muestra los datos demográficos de la edad, sexo y tiempo de tratamiento, para los dos grupos en los pacientes con LLA casos y controles incluidos en el estudio. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

La tabla II muestra las frecuencias genotípicas y alélicas de los pacientes con LLA para cada SNV. Como se muestra, las SNVs *MTHFR* rs1801131, *MTHFR* rs1801133, *ABCB1* rs1045643, *SLC19A1* rs2838957 y *LEP* rs7799040 se encontraban en Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), mientras que *ABCB1* rs1128504, *SLC1B1* rs4149057 y *CDK9* rs1544106 no se encontraron en HWE.

La tabla III muestra la relación en la presencia de traslocaciones para los pacientes (casos y controles) incluidos en el estudio. Para el grupo de los casos la traslocación "12/21" se presentó en una relación de porcentaje 86.05%/13.95% (negativa y positiva su presencia respectivamente), mientras que para la traslocación 1/19 se presentó en una relación de porcentaje 100%/0% (negativa y positiva su presencia respectivamente). Por otro lado, en el grupo de los controles la traslocación "12/21" se presentó en una relación de porcentaje 81.82%/18.18% (negativa y positiva su presencia respectivamente), mientras que para la

traslocación 1/19 se presentó en una relación de porcentaje 100%/0% (negativa y positiva su presencia respectivamente). En ambas traslocaciones existieron diferencias estadísticamente significativas entre la presencia y ausencia de la traslocación en ambos grupos (12/21($p=0.01$) y 1/19($p=0.001$) respectivamente) y en los cuales se destaca que la presencia de la traslocación 12/21 (positiva) en los controles fue mayor que en los casos, resaltándola como un factor de buen pronóstico. En este mismo sentido encontramos que en el grupo de los casos el inmunofenotipo con mayor presencia fue el de células B (66% de los casos), de igual manera para el grupo de los controles (85.71% de los controles) (tabla IV).

La figura 2 muestra a través de un análisis multivariado la asociación (valores de coeficiente de correlación) entre las covariables y la muerte en los pacientes con LLA incluidos en el estudio, el coeficiente indica cómo cambia la probabilidad de que ocurra la muerte cuando una variable independiente cambia en una unidad, mientras se mantienen las demás variables constantes. Se observa que la recaída fue la variable mayormente asociada a la muerte en los pacientes, además, la estratificación por edad nos muestra un mayor riesgo en el grupo de los más grandes ya que el rango de 9 a 16 años y de 17 en adelante tuvieron una relación positiva con la muerte, el sexo masculino también se relacionó con un mayor pronóstico de muerte. En cuanto a las variables genéticas se observa que el rs1544106 T/T, rs1544106 C/T, rs4149057 C/T, se relacionaron positivamente con el riesgo de muerte. Por otro lado, en la figura 3 se muestra la relación entre las covariables y la recaída en los pacientes a través de un análisis multivariado. Las variables mayormente relacionadas fueron; el sexo masculino, el grupo de edad de 9 a 16 años y el SNV rs1544106 C/T. El análisis por medio de la prueba de Odds Ratio muestra un riesgo estadísticamente significativo de muerte cuando los pacientes sufren de recaída (OR: 3.67, IC95%: 1.5643-16.9282, $p:0.039$)

Se realizó un análisis por medio de modelos de herencia para conocer si existía asociación entre los SNV que estaban marcados como con "relación positiva" (*SLC1B1* rs4149057 y *CDK9* rs1544106) con la muerte y recaída respectivamente según el análisis de correlación

Tabla I

Comparación de la edad, sexo y tiempo de tratamiento, para los dos grupos en los pacientes con LLA casos y controles incluidos en el estudio.

N=141 pacientes			
	Casos n=12	Controles n= 129	p**
Edad (años)	10.36 ± 3.2*	10.77 ± 4.6*	0.07
Sexo (M/F)	8-Apr	69/70	
Tiempo DT	71.4	72.3	0.1

*DE= Desviación Estándar, **Prueba t de Student.

Tabla II

Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNV estudiados en los grupos de casos y controles en niños con LLA.

LEP rs7799040							
	Frecuencia Genotípica n (%)			Frecuencia Alélica n (%)		p*	WHE**
	A/A	A/G	G/G	A	G		
Controles	07(06%)	122(94%)	00(0%)	136(52%)	122(48%)	0.81	Si
Casos	01(08%)	11(92%)	00(0%)	13(54%)	11(56%)		
SLC19A1 rs2838957							
	Frecuencia Genotípica n (%)			Frecuencia Alélica n (%)		p*	HEW**
	G/G	G/A	A/A	G	A		
Controles	52(40%)	77(60%)	00(0%)	181(70%)	77(30%)	0.9	Si
Casos	04(33%)	08(67%)	00(0%)	16(67%)	08(33%)		
ABCB1 rs1128504							
	Frecuencia Genotípica n (%)			Frecuencia Alélica n (%)		P*	HEW**
	C/C	C/T	T/T	C	T		
Controles	41(32%)	58(45%)	30(23%)	140(54%)	118(46%)	<0.01	No
Casos	06(50%)	05(42%)	01(08%)	17(70%)	07(30%)		
SLCO1B1 rs4149057							
	Frecuencia Genotípica n (%)			Frecuencia Alélica n (%)		p*	HWE**
	C/C	C/T	T/T	C	T		
Controles	31(24%)	76(59%)	22(17%)	138(54%)	120(46%)	0.03	No
Casos	02(17%)	10(83%)	00(00%)	14(58%)	10(42%)		
CDK9 rs1544106							
	Frecuencia Genotípica n (%)			Frecuencia Alélica n (%)		p*	HWE**
	C/C	C/T	T/T	C	T		
Controles	37(29%)	58(45%)	34(26%)	132(52%)	126(48%)	0.01	No
Casos	01(08%)	07(58%)	04(34%)	09(37%)	15(63%)		
ABCB1 rs1045643							
	Frecuencia Genotípica n (%)			Frecuencia Alélica n (%)		p*	HEW**
	C/C	C/T	T/T	C	T		
Controles	54(38%)	49(42%)	26(20%)	152(59%)	106(41%)	0.45	Si
Casos	05(42%)	04(33%)	03(25%)	14(58%)	10(42%)		
MTHFR rs1801133							
	Frecuencia Genotípica n (%)			Frecuencia Alélica n (%)		p*	HWE**
	G/G	G/A	A/A	G	A		
Controles	44(34%)	85(66%)	00(00%)	173(67%)	85(33%)	0.2	Si
Casos	01(08%)	11(92%)	00(00%)	13(54%)	11(46%)		
MTHFR rs1801131							
	Frecuencia Genotípica n (%)			Frecuencia Alélica n (%)		p*	HWE**
	G/G	G/T	T/T	G	T		
Controles	03(02%)	24(18%)	102(80%)	30(11%)	228(89%)	0.80	Si
Casos	00(00%)	01(08%)	11(92%)	23(50%)	23(50%)		

* Chi square test. (Frecuencia genotípica)

**Hardy Weinberg Equilibrium (HWE)

Tabla III

Porcentaje de traslocaciones encontradas en los pacientes (casos y controles) con LLA incluidos en el estudio.

Grupo	Translocaciones 12/21 (Negativo/Positivo)	Translocaciones 1/19 (Negativo/Positivo)
Casos	86.05%/13.95%	100%/0%
Controles	81.82%/18.18%	100%/0%
p*	0.01	0.001

** Chi square test.

Tabla IV

Porcentaje de cada inmunofenotipo encontrado en los pacientes (casos y controles) con LLA incluidos en el estudio.

Grupo	CÉLU-LAS B (%)	CÉLU-LAS T (%)	CÉLU-LAS B estadio preB (%)	CÉLULAS B estadio de maduración común (%)	CÉLULAS B estadio común (%)	linfoma lin-foblástico de células B (%)	linfoma lin-foblástico de células T (%)	linfoma lin-foblástico (%)	Ambiguo (%)
Casos	66.00	6.43	2.5	17.48	2.58	2.58	0.79	0.79	0.79
Controles	85.71	0	0	0	7.14	0	7.14	0	0

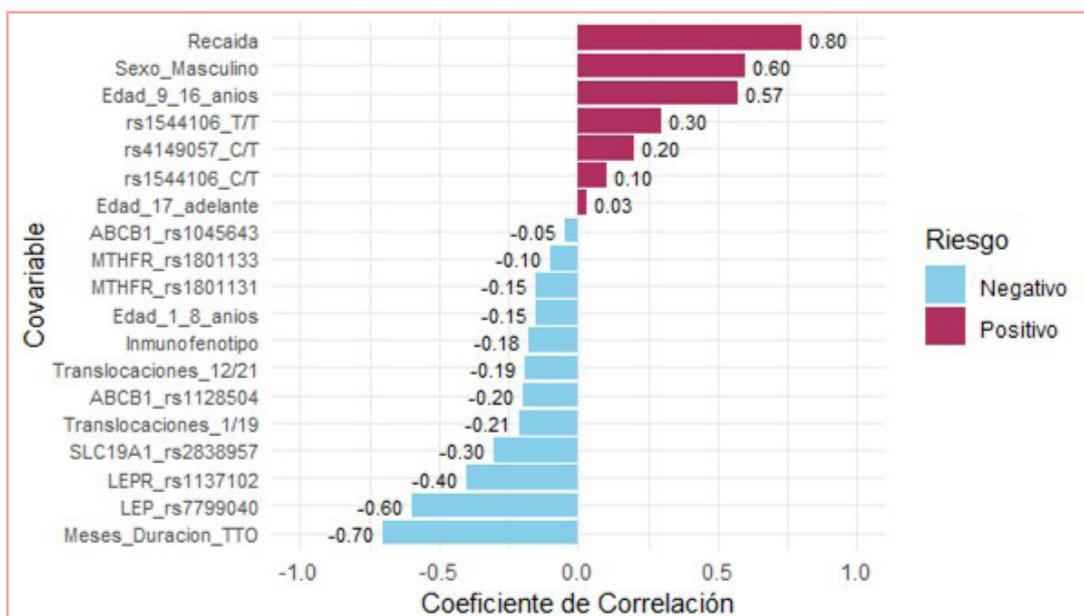


Figura 2. Asociación de covariables con muerte en todos los pacientes con LLA incluidos en el estudio. Las barras guindas corresponden a las variables que aumentan su relación con la muerte.



Figura 3. Asociación de covariables con recaída en todos los pacientes con LLA incluidos en el estudio.

anteriormente mencionado (tabla V). El análisis crudo por medio de modelos de herencia muestra que no hubo asociaciones significativas entre los SNVs estudiados y la muerte o recaída, sin embargo, se observan algunas tendencias de en el caso del SNV *SLCO1B1* rs4149057 el genotipo HT del modelo codominante mostro un riesgo OR: 2.03 con una p:0.37 de muerte, mientras que para el SNV *CDK9* rs1544106 el genotipo HT de modelo codominante mostró un OR: 4.46, p:0.16, además se observó un riesgo aumentado para el genotipo HM del mismo modelo codominante (OR:5.44, p:0.13). No se encontraron tendencias importantes para la recaída y el SNV *CDK9* rs1544106 en los modelos de herencia.

Es importante señalar que de los 12 pacientes que murieron 8 de ellos (5 niños y 3 niñas) tuvieron recaída y 4 de ellos no (3 niños y 1 niña), la figura 4 muestra la distribución del evento recaída y muerte por sexo en los pacientes incluidos en el estudio.

Discusiones

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar el impacto de las SNVs en la ruta del folato y las translocaciones cromosómicas específicas sobre la recaída y la muerte en pacientes pediátricos con LLA bajo tratamiento en Ecuador. Existen otros estudios que han buscado esclarecer este tema^{26,27}, sin embargo, muy pocos o casi nulos en nuestro país.

En nuestra población, las SNVs *MTHFR* rs1801131, *MTHFR* rs1801133, *ABCB1* rs1045643, *SLC19A1* rs2838957 y *LEP* rs7799040 estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), mientras que *ABCB1* rs1128504, *SLCO1B1* rs4149057 y *CDK9* rs1544106 no lo estaban. La desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg puede indicar la presencia de factores de selección,

error en la genotipificación o estratificación de la población que deben considerarse.

La literatura ha mostrado que las variantes en *MTHFR*, como rs1801131 y rs1801133, pueden influir en el metabolismo del folato, afectando la respuesta al tratamiento en LLA^{28,29}. Las variantes en *ABCB1* también han sido asociadas con la resistencia a los medicamentos utilizados en la terapia de LLA y esto se ha reflejado en la supervivencia de los pacientes, así lo reporta Megías-Vericat JE y colaboradores³⁰, en su estudio sobre la Influencia de los polimorfismos *ABCB1* sobre la eficacia del tratamiento estándar para la leucemia mieloide aguda los cuales estuvieron asociados con una supervivencia general mayor para los poseedores de 1236C>T. Por otro lado, Huang WL y colaboradores³¹, reportaron la importancia de *CDK9* al inducir la apoptosis de las células de la LLA al inhibir el metabolismo glucolítico mediado por c-Myc, un SNV en este gen podría modificar la respuesta al tratamiento. Ramsey LB y colaboradores³², señalaron como resultado de su estudio que *SLCO1B1* rs4149056 estaba relacionado con una pobre respuesta de MTX en los pacientes, lo cual podría tener implicaciones en la recaída de la enfermedad.

Siguiendo con los factores genéticos, la translocación t(12;21), que resulta en la fusión *ETV6-RUNX1*, es una de las anomalías genéticas más comunes en LLA pediátrica y se ha asociado con un pronóstico favorable³³. Sin embargo, estudios recientes han sugerido que la presencia de recaída puede estar influenciada por otros factores genéticos y ambientales³⁴. En nuestro trabajo encontramos una alta prevalencia de la translocación t(12;21) en ambos grupos (casos y controles), sin embargo, en los controles o pacientes que no tuvieron recaída o muerte la aparición de esta traslocación fue más

Tabla V

Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNV estudiados en los grupos de casos y controles en niños con LLA.

SNV	Modelo Co-dominante	Casos (n = 12)	Controles (n = 129)	OR	IC	p*	
SLCO1B1 rs4149057	HS (CC)	2	31	1	-	-	
	HT (CT)	10	76	2.03	0.4223-9.8484	0.37	
	HM (TT)	0	22	0.28	0.0128-6.1182	0.41	
	Alelo mayor (C)	14	138	1.21	0.5216-2.8414	0.64	
	Alelo menor (T)	10	120	0.82	0.3519-1.9172	0.64	
	Modelo Domi-nante						
	HS (CC)	2	31	0.63	0.1314-3.0421	0.56	
	HT (CT) + HM (TT)	10	98	-	-	-	
	Modelo Rece-sivo						
	HS (CC) + HT (CT)	12	107	-	-	-	
	HM (TT)	0	22	0.40	0.5098-3.5678	0.39	
	CDK9 rs1544106	HS (CC)	1	37	1	-	-
		HT (CT)	6	58	4.46	0.5277-37.7849	0.16
		HM (TT)	5	34	5.44	0.6047-48.9588	0.13
		Alelo mayor (C)	8	132	0.47	0.1973-1.1542	0.10
Alelo menor (T)		16	126	2.09	0.8664-5.0672	0.10	
Modelo Domi-nante							
HS (CC)		1	37	0.22	0.0282-1.8137	0.16	
HT (CT) + HM (TT)		11	92	-	-	-	
Modelo Rece-sivo							
HS (CC) + HT (CT)		7	95	-	-	-	
HM (TT)		5	34	1.99	0.5936-6.7107	0.26	

frecuente que en los casos, razón por la cual nuestra población está en concordancia con lo establecido anteriormente de un pronóstico favorable. Los análisis de correlación nos muestran que los SNV *CDK9* rs1544106 T/T, *CDK9* rs1544106 C/T, y *SLCO1B1* rs4149057 C/T, se relacionaron positivamente con el riesgo de muerte, además, el SNV *CDK9* rs1544106 C/T con el riesgo de recaída lo cual hace sentido con la influencia reportada anteriormente de factores genéticos y muerte en el caso de los SNVs estudiados en los pacientes, ya que en nuestro trabajo las variables relacionadas significativamente a través de los análisis multivariados con la recaída fueron el sexo masculino, y el SNV rs1544106 C/T.

La translocación t(1;19) se presentó exclusivamente en los casos, lo cual es consistente con su asociación conocida con un fenotipo de células B precursoras y un pronóstico intermedio^{35,36}. La identificación de estas translocaciones es crucial para la estratificación del riesgo y la personalización del tratamiento en LLA pediátrica.

Es importante señalar que la recaída fue de entre todas las variables, la que tuvo mayor relación con la muerte en los pacientes. Esto subraya la importancia de la detección temprana y el tratamiento agresivo de la recaída. Además, la edad entre 9 a 16 años y el sexo masculino también se asociaron con un mayor riesgo de muerte, lo cual concuerda con estudios previos que indican un peor pronóstico en pacientes más grandes y varones^{37,38}. En este sentido Litzow M, et al.³⁹, señalan que en general la supervivencia general (SG) a 5 años es del 87 % para los niños de 0 a 15 años, mientras que

para pacientes de 15 a 20 años esta se reduce al 63%. Esto sugiere la posibilidad de que la edad y el desarrollo biológico jueguen un papel importante en la respuesta al tratamiento y la recaída. Además, las diferencias observadas entre sexos enfatizan la necesidad de considerar el sexo como un factor crítico en el diseño y la administración del tratamiento^{37,38}.

Nuestros análisis mediante modelos de herencia no mostraron asociaciones significativas entre los SNV estudiados y la muerte o la recaída. Sin embargo, se observaron tendencias sugestivas en el caso del SNV *SLCO1B1* rs4149057 y *CDK9* rs1544106. Aunque los valores de p no alcanzaron significancia estadística, los OR indicaron un aumento del riesgo, sugiriendo que estos SNV podrían contribuir al pronóstico adverso y merecen una mayor investigación en estudios con tamaños muestrales más grandes.

Conclusiones

En este estudio, analizamos el impacto de algunas SNVs en la ruta del folato y un par de translocaciones cromosómicas sobre la recaída y la muerte en pacientes pediátricos con leucemia LLA bajo tratamiento en Ecuador.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la edad, el sexo y el tiempo de tratamiento entre los grupos de casos y controles. Este aspecto es importante ya que asegura que las diferencias observadas en los resultados no están influenciadas por estas variables demográficas. La translocación t(12;21), conocida por su asociación con un pronóstico favorable, mostró una alta prevalencia en ambos grupos, con dife-

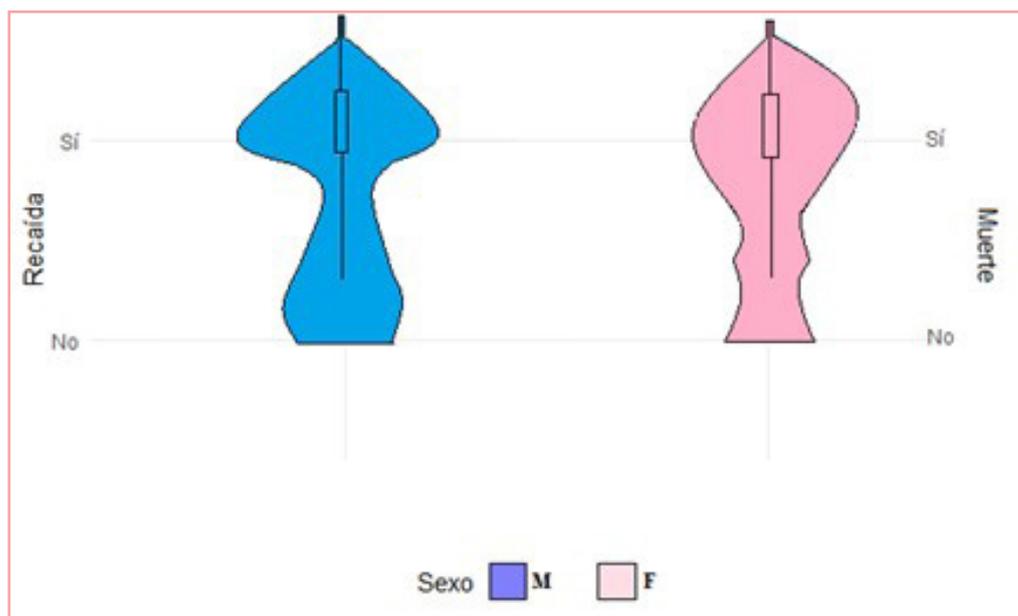


Figura 4. El gráfico de violín muestra la distribución la incidencia de muerte y recaída en los pacientes separados por sexo. Los colores rosa y azul representan la distribución masculina y femenina respectivamente. Se observa que la mayor densidad de pacientes está presente y concuerda cuando se asocia la muerte con la presencia de recaída.

rencias significativas en las frecuencias y coincidiendo como un factor favorable. Por otro lado, la translocación t(1;19) se presentó exclusivamente en los casos, lo cual es consistente con su asociación con un fenotipo de células B precursoras y un pronóstico intermedio.

La recaída se identificó como la variable mayormente asociada con la muerte en los pacientes, y se calculó un riesgo significativo al ocurrir (OR: 3.67, IC95%: 1.5643-16.9282, p:0.039), subrayando la importancia de su detección temprana y tratamiento agresivo. Además, los SNVs rs1544106 T/T, rs1544106 C/T y rs4149057 C/T se relacionaron positivamente con el riesgo de muerte. La edad mayor (en los grupos 9 a 16 años y 17 años en adelante) y el sexo masculino también se asociaron con un mayor riesgo de muerte, lo cual concuerda con estudios previos que indican un peor pronóstico en pacientes más grandes y varones. Esto sugiere la necesidad de considerar la edad y el sexo como factores críticos en el diseño y administración del tratamiento.

En relación con la recaída, las variables mayormente asociadas fueron el sexo masculino y el SNV rs1544106 C/T. Aunque el análisis mediante modelos de herencia no mostró asociaciones significativas entre los SNVs estudiados y la muerte o la recaída, se observaron tendencias sugestivas. En particular, los SNV *SLC01B1* rs4149057 y *CDK9* rs1544106 mostraron un aumento del riesgo, sugiriendo que podrían contribuir al pronóstico adverso y merecen una mayor investigación en estudios con tamaños muestrales más grandes.

Finalmente, la relación significativa de la recaída con la muerte subraya la importancia de la detección temprana y el tratamiento agresivo de la recaída en pacientes con LLA. Las diferencias observadas entre sexos y la asociación de la edad con el riesgo de muerte indican que estos factores deben ser considerados críticos en el diseño y administración del tratamiento.

Declaraciones de autoría

Zaruma – Torres y Ochoa Castro concibieron el estudio y supervisaron todos los aspectos de su realización. Guerrero y Andrade obtuvieron las muestras para el estudio. Orellana, Acurio y Jiménez realizaron los análisis estadísticos. Caroca interpretó los hallazgos y contribuyó a la redacción del primer borrador del manuscrito. Todos los autores aportaron ideas, interpretaron los hallazgos y revisaron los borradores del manuscrito. Todos los autores aprobaron la versión final. Zaruma – Torres es el responsable y autor de correspondencia del artículo.

Financiación

Este trabajo se realizó en el marco del financiamiento brindado por la Universidad de Cuenca (UCuenca). Reconocemos la participación y apoyo de SOLCA – Cuenca, SOLCA – Machala, SOLCA – Loja.

Conflictos de intereses

Los autores manifiestan que no existen conflictos de intereses que pudieran haber sesgado los resultados reportados en este trabajo.

Bibliografía

1. Greaves Mel. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2018;18(8):471-484.
2. Whiteley AE, Price TT, Cantelli G, Sipkins DA. Leukaemia: a model metastatic disease. *Nat Rev Cancer* 2021;21(7):461-475.
3. Leukaemia. (s/f). Worldhealthorganization.int. Recuperado el 7 de junio de 2023, de <https://platform.who.int/mortality/themes/theme-details/topics/indicator-groups/indicator-group-details/MDB/leukaemia>.
4. Bunay, J., Juca Córdova, M. and Loza Penalzoza, D. Frecuencia de Leucemias y Linfomas Diagnosticados Ene Le Hospital de La Sociedad de Lucha Contra El Cáncer (SOLCA) de La Ciudad de Cuenca Durante El Periodo. 1996.
5. Sampaio MM, Santos MLC, Marques HS, Gonçalves VLS, Araújo GRL, Lopes LW, et al. Chronic myeloid leukemia-from the Philadelphia chromosome to specific target drugs: A literature review. *World J Clin Oncol.* 2021;12(2):69-94.
6. Cools J. Improvements in the survival of children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2012;97(5):635.
7. Yalçın B, Kremer LC, Caron HN, van Dalen EC. High-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell rescue for children with high-risk neuroblastoma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;(8):CD006301.
8. Ganzel C, Wang XV, Rowe JM, Richards SM, Buck G, Marks DI, et al. At three years, patients with acute lymphoblastic leukaemia are still at risk for relapse. Results of the international MRC UKALLXII/ECOG E2993 trial. *Br J Haematol.* 2020;191(1):37-43.
9. Inaba H, Pei D, Wolf J, Howard SC, Hayden RT, Go M, et al. Infection-related complications during treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Oncol.* 2017;28(2):386-392.
10. Prieto-Callejero B, Rivera F, Fagundo-Rivera J, Romero A, Romero-Martín M, Gómez-Salgado J, Relationship between chemotherapy-induced adverse reactions and health-related quality of life in patients with breast cancer. *Medicine (Baltimore).* 2020;99(33):e21695.
11. Bedoui Y, Guillot X, Sélambarom J, Guiraud P, Giry C, Jaffar-Bandjee MC, et al. Methotrexate an Old Drug with New Tricks. *Int J Mol Sci.* 2019;20(20):5023.
12. Xu M, Wu S, Wang Y, Zhao Y, Wang X, Wei C, et al. Association between high-dose methotrexate-induced toxicity and polymorphisms within methotrexate pathway genes in acute lymphoblastic leukemia. *Front Pharmacol.* 2022;13:1003812.
13. Wang SM, Sun LL, Zeng WX, Wu WS, Zhang GL. Influence of genetic polymorphisms of FPGS, GGH, and MTHFR on serum methotrexate le-

- vels in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014;74(2):283-289.
14. aruma-Torres F, Lares-Asseff I, Lima A, Reyes-Espinoza A, Loera-Castañeda V, Sosa-Macías M, et al. Genetic Polymorphisms Associated to Folate Transport as Predictors of Increased Risk for Acute Lymphoblastic Leukemia in Mexican Children. *Front Pharmacol*. 2016;7:238.
 15. Xu M, Wu S, Wang Y, Zhao Y, Wang X, Wei C, et al. Association between high-dose methotrexate-induced toxicity and polymorphisms within methotrexate pathway genes in acute lymphoblastic leukemia. *Front Pharmacol*. 2022;13:1003812.
 16. Hamed KM, Dighriri IM, Baomar AF, Alharthy BT, Alenazi FE, Alali GH, et al. Overview of Methotrexate Toxicity: A Comprehensive Literature Review. *Cureus*. 2022;14(9):e29518.
 17. Kang H, Chen IM, Wilson CS, Bedrick EJ, Harvey RC, Atlas SR, et al. Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115(7):1394-1405.
 18. Vujkovic M, Kershenbaum A, Wray L, McWilliams T, Cannon S, Devidas M, et al. Associations between genetic variants in folate and drug metabolizing pathways and relapse risk in pediatric acute lymphoid leukemia on CCG-1952. *Leuk Res Rep*. 2015;4(2):47-50.
 19. Gómez-Gómez Y, Organista-Nava J, Saavedra-Herrera MV, Rivera-Ramírez AB, Terán-Porcayo MA, Del Carmen Alarcón-Romero L, et al. Survival and risk of relapse of acute lymphoblastic leukemia in a Mexican population is affected by dihydrofolate reductase gene polymorphisms. *Exp Ther Med*. 2012;3(4):665-672.
 20. Dai W, Liu H, Liu Y, Xu X, Qian D, Luo S, et al. Genetic variants in the folate metabolic pathway genes predict cutaneous melanoma-specific survival. *Br J Dermatol*. 2020;183(4):719-728.
 21. Nickoloff JA, De Haro LP, Wray J, Hromas R. Mechanisms of leukemia translocations. *Curr Opin Hematol*. 2008;15(4):338-345.
 22. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-458.
 23. Pui CH, Pei D, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, et al. Long-term results of St Jude Total Therapy Studies 11, 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2010;24(2):371-382.
 24. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928-1929.
 25. McHugh, L. M. The odds ratio calculation, usage, and interpretation. *Biochem. Med*. 2009;19, 120-126.
 26. Santos-Rebouças CB, Corrêa JC, Bonomo A, Fintelman-Rodrigues N, Moura KC, Rodrigues CS, et al. The impact of folate pathway polymorphisms combined to nutritional deficiency as a maternal predisposition factor for Down syndrome. *Dis Markers*. 2008;25(3):149-157.
 27. Organista-Nava J, Gómez-Gómez Y, Del Moral-Hernandez O, Illades-Aguiar B, Gómez-Santamaria J, Rivera-Ramírez AB, et al. Dereglulation of folate pathway gene expression correlates with poor prognosis in acute leukemia. *Oncol Lett*. 2019;18(3):3115-3127.
 28. Li B, Leal SM. Deviations from hardy-weinberg equilibrium in parental and unaffected sibling genotype data. *Hum Hered*. 2009;67(2):104-115.
 29. Yang JJ, Cheng C, Devidas M, Cao X, Fan Y, Campana D, et al. Ancestry and pharmacogenomics of relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2011;43(3):237-241.
 30. Megías-Vericat JE, Rojas L, Herrero MJ, Bosó V, Montesinos P, Moscardó F, et al. Influence of ABCB1 polymorphisms upon the effectiveness of standard treatment for acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Pharmacogenomics J*. 2015;15(2):109-118.
 31. Huang WL, Abudureheman T, Xia J, Chu L, Zhou H, Zheng WW, et al. CDK9 Inhibitor Induces the Apoptosis of B-Cell Acute Lymphocytic Leukemia by Inhibiting c-Myc-Mediated Glycolytic Metabolism. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:641271.
 32. Ramsey LB, Moncrieffe H, Smith CN, Sudman M, Marion MC, Langefeld CD, et al. Association of SLC01B1 *14 Allele with Poor Response to Methotrexate in Juvenile Idiopathic Arthritis Patients. *ACR Open Rheumatol*. 2019;1(1):58-62.
 33. Aydin C, Cetin Z, Manguoglu AE, Tayfun F, Clark OA, Kupesiz A, et al. Evaluation of ETV6/RUNX1 Fusion and Additional Abnormalities Involving ETV6 and/or RUNX1 Genes Using FISH Technique in Patients with Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2016;32(2):154-161.
 34. Pagliuca S, Gurnari C, Hercus C, Hergalant S, Hong S, Dhuyser A, et al. Leukemia relapse via genetic immune escape after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Preprint. *Res Sq*. 2023;rs.3.rs-2773498.
 35. Woo JS, Alberti MO, Tirado CA. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update. *Exp Hematol Oncol*. 2014;3:16.
 36. Yilmaz M, Kantarjian HM, Toruner G, Yin CC, Kanagal-Shamanna R, Cortes JE, et al. Translocation t(1;19)(q23;p13) in adult acute lymphoblastic leukemia - a distinct subtype with favorable

- prognosis. *Leuk Lymphoma*. 2021;62(1):224-228.
37. Vlassoff C. Gender differences in determinants and consequences of health and illness. *J Health Popul Nutr*. 2007;25(1):47-61.
38. Amini M, Sharma R, Jani C. Gender differences in leukemia outcomes based on health care expenditures using estimates from the GLOBOCAN 2020. *Arch Public Health*. 2023;81(1):151.
39. Litzow M., Kenderian S. Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults—from genomics to the clinics. *Clin. Oncol. Adolesc. Young Adults*. 2013;3:49-62.