



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICA

**“Expresión de genes que participan en el
transporte y metabolismo del metotrexato y su
relación con respuesta al tratamiento en pacientes
con leucemia aguda”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

QBP: Rosa Jazmín Gómez Santamaría

Director de tesis: Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Codirector: Dr. Oscar del Moral Hernández



Chilpancingo, Guerrero; Enero de 2017.

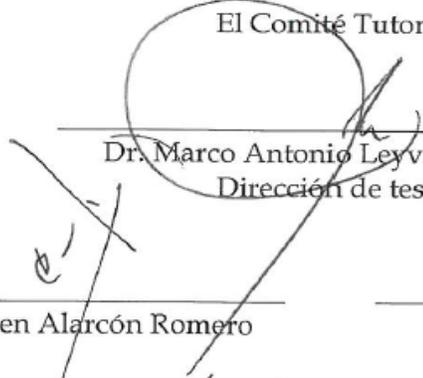


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

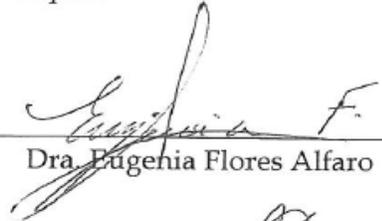
APROBACIÓN DE TESIS

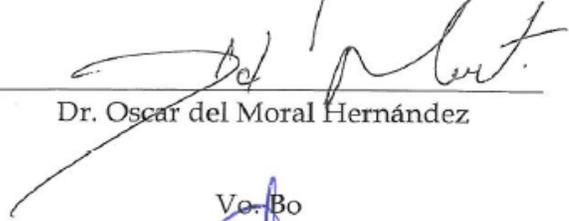
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 05 días del mes de septiembre de dos mil dieciséis, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "**Expresión de genes que participan en el transporte y metabolismo del metotrexato y su relación con respuesta al tratamiento en pacientes con leucemia aguda**", presentada por la alumna Rosa Jazmín Gómez Santamaría, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial


Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez
Dirección de tesis

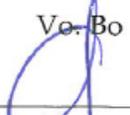

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero


Dra. Eugenia Flores Alfaro


Dr. Oscar del Moral Hernández


M en C. Jorge Organista Naya

Vo. Bo


Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado de la Facultad de
Ciencias Químico Biológicas


Dra. Amalia Vences Velázquez
Directora de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en la ciudad de Chilpancingo Gro. México.

Bajo la dirección de

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Con la asesoría de

Dr. Oscar del Moral Hernández

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Dra. Eugenia Flores Alfaro

M.C Jorge Organista Nava

Con la colaboración de

Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega”

Durante el periodo en que curso la maestría en ciencias biomédicas la C. Rosa Jazmín Gómez Santamaría recibió beca del CONACYT con número de registro CVU 630726.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el **Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez** por darme la oportunidad de ser parte de este proyecto.

A mi codirector de tesis el **Dr. Oscar del Moral Hernández** por su apoyo, tiempo, comprensión y esfuerzo para la realización de este proyecto. Gracias a sus observaciones y consejos he mejorado profesionalmente.

A mis sinodales: **Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero, Dra. Eugenia Flores Alfaro, M.C. Jorge Organista Nava**, por todos sus consejos, observaciones, aportaciones y sobre todo por el tiempo invertido durante la realización de este proyecto.

A mi coordinadora de seminario **Dra. Gloria Fernández Tilapa** por todos sus consejos y tiempo invertido durante la realización de este proyecto, he aprendido mucho de usted y le agradezco que siempre estuviera presente y al pendiente durante el desarrollo del mismo.

A mi familia, especialmente a ti mamá por siempre apoyarme en todos los momentos.

A mi esposo **Felipe Oliva** por tu apoyo incondicional, te agradezco que siempre has estado conmigo aún en los momentos más difíciles, gracias a tus consejos y palabras de aliento siempre me levantas en ánimo y me motivas para seguir adelante. Gracias por todo el amor que me das incondicionalmente. Te amo.

A mi hija **Romina Michelle** porque eres mi mayor motivación en la vida, lo más sagrado y valioso que tengo en la vida, te amo infinitamente.

A mis compañeros de maestría por todos los momentos compartidos.

A mis amigas las gorditas: **Dalia y Analy** por todo su cariño y apoyo incondicional.

ÍNDICE	Pag.
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIAL Y MÉTODOS	6
RESULTADOS	9
DISCUSIÓN	15
CONCLUSIÓN	20
SUGERENCIAS	21
REFERENCIAS	22

Resumen

Las leucemias agudas (LA) incluyen a la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y a la leucemia mieloblástica aguda (LMA). Se caracterizan por una proliferación neoplásica de células hematopoyéticas inmaduras (blastos), en las que disminuye tanto la producción de células maduras como la apoptosis y, en consecuencia, se acumulan las células blásticas. El metotrexato (MTX) es un anti folato utilizado para el tratamiento de leucemias agudas, sin embargo del 20-30% de los pacientes presenta resistencia a drogas y recaída. En este estudio analizamos los niveles de expresión del mRNA de genes que participan en el transporte y metabolismo del MTX (*GGH*, *FPGS*, *ABCC1*, *ABCB1*, *ATIC*, *TS*, *MTRR*, *MS*, *RFC1*, *MTHFD1*, *ABCG2*, *CCND1*, *MTHFR* y *ABCC2*) en pacientes con LA y en pacientes con LA que presentaron recaída durante el tratamiento. Los niveles de expresión de los genes estudiados se analizaron por RT-qPCR en pacientes con LLA (n=51) y LMA (n=19) y 65 individuos control. Encontramos disminuidos los niveles de expresión del mRNA de los genes *RFC1* ($p<0.001$), *MS* ($p=0.045$), *MTRR* ($p<0.001$), *MTHFR* ($p<0.001$) y *ABCB1* ($p<0.001$) en LA en comparación con el grupo control. Mientras que los genes *GGH* ($p<0.001$), *FPGS* ($P=0.010$), *TS* ($p<0.001$) y *MTHFD1* ($p=0.007$) se encontraron sobreexpresados en LA en comparación con el grupo control. En pacientes con recaída se encontraron sobreexpresados los niveles de *GGH* ($p=0.029$), *FPGS* ($p=0.017$), *TS* ($p=0.016$), *MS* ($p=0.023$), *ATIC* ($p=0.047$), *MTHFD1* ($p=0.003$), *MTHFR* ($p=0.012$), *ABCB1* ($p=0.038$), y *ABCC1* ($p=0.045$) comparado con los pacientes que no presentaron recaída. En conclusión los niveles de expresión disminuidos del mRNA de los genes *RFC1*, *MTRR*, *MTHFR*, *ABCB1* y los niveles sobreexpresados de *GGH*, *FPGS*, *ATIC*, *TS*, *MS*, *MTHFD1*, *MTHFR*, *ABCB1* y *ABCC1* en pacientes con LA y en pacientes con recaída podrían sugerir que estos genes están relacionados con la respuesta al tratamiento con MTX.

Palabras clave: leucemia aguda, folato, metotrexato, resistencia a MTX, recaída.

Abstract

Acute leukemias (AL) include acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloblastic leukemia (AML). They are characterized by a neoplastic proliferation of immature hematopoietic cells (blasts), in which both the production of mature cells and apoptosis are diminished and, consequently, the blast cells accumulate. Methotrexate (MTX) is an anti-folate used for the treatment of acute leukemias, however 20-30% of patients present drug resistance and relapse. In this study we analyzed mRNA expression levels of genes involved in MTX transport and metabolism (*GGH*, *FPGS*, *ABCC1*, *ABCB1*, *ATIC*, *TS*, *MTRR*, *MS*, *RFC1*, *MTHFD1*, *ABCG2*, *CCND1*, *MTHFR* and *ABCC2*) in patients with LA and in patients with LA who relapsed during treatment. The expression levels of the studied genes were analyzed by RT-qPCR in patients with ALL (n = 51) and AML (n = 19) and 65 control individuals. ($P < 0.001$), *MTRR* ($p < 0.001$), *MTHFR* ($p < 0.001$) and *ABCB1* ($p < 0.001$) in AL compared to The control group. While the *GGH* ($p < 0.001$), *FPGS* ($P = 0.010$), *TS* ($p < 0.001$) and *MTHFD1* ($p = 0.007$) genes were overexpressed in AL compared to the control group. In patients with relapse, the levels were overexpressed of *GGH* ($p = 0.029$), *FPGS* ($p = 0.017$), *TS* ($p = 0.016$), *MS* ($p = 0.023$), *ATIC* ($p = 0.047$), *MTHFD1* ($p = 0.003$), *MTHFR* ($p = 0.012$), *ABCB1* ($p = 0.038$), and *ABCC1* ($p = 0.045$) compared to patients who did not relapse. In conclusion, decreased expression levels of the mRNAs of *RFC1*, *MTRR*, *MTHFR*, *ABCB1* and overexpressed levels of *GGH*, *FPGS*, *ATIC*, *TS*, *MS*, *MTHFD1*, *MTHFR*, *ABCB1* and *ABCC1* in patients with AL and in patients with relapse It suggests that these genes are related to the response to treatment with MTX.

Key words: acute leukemia, folate, methotrexate, resistance to MTX, relapse.

Introducción

La leucemia aguda (LA) es una proliferación neoplásicas de células hematopoyéticas inmaduras (blastos), en las que disminuye la apoptosis y, en consecuencia, se acumulan células blásticas en circulación (Espinoza *et al.*, 2015). Las leucemias agudas se clasifican en dos grupos: leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia mieloblástica aguda (LMA) (Saha & Lilleyman, 1998). En México la LLA es la más frecuente y representa el 85% de los casos, mientras que la LMA constituye solo el 15% (Pérez-Saldivar *et al.*, 2011). En el estado de Guerrero las leucemias ocuparon la tercera causa de muerte en niños menores de 15 años (Salud/INEGI., 2012).

Las quimioterapias dirigidas al metabolismo del folato desempeñan un papel fundamental en el tratamiento terapéutico del cáncer. Esta modalidad de quimioterapia altera la proliferación celular bloqueando e inhibiendo enzimas claves dependientes de folato, conduciendo a la inhibición de la metilación y la biosíntesis de nucleótidos y consecuentemente la muerte celular (Galbiatti *et al.*, 2013).

El metotrexato (MTX) es un anti-folato usado para tratar ciertos tipos de cánceres hematológicos y tumores sólidos. El uso de dosis altas de MTX ha mostrado beneficios en el tratamiento de leucemias, linfomas infantiles y osteosarcomas (Lucchesi *et al.*, 2016). Los folatos desempeñan un papel crucial como donadores de un solo carbono en múltiples vías biosintéticas incluyendo síntesis de *ново* de purinas y timidilato, metabolismo de aminoácidos, síntesis de proteínas mitocondriales y metilación del ADN. Los antifolatos, incluyendo MTX son inhibidores de varias enzimas dependientes de folato implicadas en la biosíntesis de nucleótidos, inhibiendo de este modo la replicación del ADN y conduciendo a la muerte celular (Wojtuszkiewicz *et al.*, 2016).

La principal vía de entrada del MTX a la célula es mediada por el acarreador de folato reducido (RFC1), el cual es un importante transportador de MTX (Wang *et al.*, 2014). En la célula el MTX es convertido a MTX-poliglutamado (MTXPG); una reacción catalizada por la enzima folilpoliglutamato sintetasa (FPGS), mientras que la enzima

gamma glutamil hidrolasa (GGH) realiza la reacción inversa (Cheok *et al.*, 2009). Específicamente, el MTXPG inhibe las vías del folato por inhibición competitiva de varias enzimas importantes incluyendo: dihidrofolato reductasa (DHFR), timidilato sintasa (TS), y 5-aminoimidazol-4-carboximida ribonucleótido transformilasa (AICAR). Esta inhibición conduce a la reducción o bloqueo de TS y la síntesis de *nov*o de purinas, las cuales son necesarias para la síntesis de DNA (Panetta *et al.*, 2010).

La expresión del gen *FPGS* está controlada por al menos dos mecanismos, uno está relacionado con la proliferación y el otro actúa durante la diferenciación y es tejido-especifico, *FPGS* se encuentra en el citoplasma y compartimentos mitocondriales de células mamíferas (Leclerc *et al.*, 2010a). La enzima gamma glutamil hidrolasa (GGH), es una enzima lisosomal que participa en el metabolismo de los folatos y antifolatos, actúa como una endo y/o exo-peptidasa para romper las cadenas gamma-poliglutamato que se adjuntan a los folatos y anti-folatos después de entrar a la célula. Los altos niveles de GGH se han asociado con la resistencia celular a los anti-folatos, en particular metotrexato (Kim *et al.*, 2013; Schneider & Ryan, 2006). En el sureste de México se reportó que el polimorfismo -401C / T en el gen de γ -glutamil hidrolasa (GGH) está relacionado con el riesgo de recaída en pacientes con LLA (Organista-Nava *et al.*, 2010). También se reportó que el polimorfismo G22A en *FPGS* es un factor de riesgo para LLA y juega un papel importante en la supervivencia de pacientes con leucemia (Gomez-Gomez *et al.*, 2014).

El ciclo del folato involucra varias enzimas adicionales, incluyendo metileno-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR), la cual está involucrada en la generación de 5-metil-THF. La formación de 5-metil-THF es necesaria para la síntesis de metionina a partir de homocisteína, una reacción en la que la metionina sintasa (MS) y la metionina sintasa reductasa (MTRR) juegan un papel importante (Galbiatti *et al.*, 2013; Gervasini, 2009). MTRR está involucrada en la síntesis del DNA y producción de S-adenosilmetionina (SAM), es una enzima que controla la actividad de MS en el metabolismo del folato a través de la transferencia de grupos metilo de

metiltetrahidrofolato a la homocisteína a través de la metionina sintasa (Chen *et al.*, 2015)

Finalmente el flujo de salida del MTX es mediado por transportadores de la familia ABC (ATP-binding cassette), los cuales son una causa importante de resistencia a multidrogas (MDR), en esta familia ABCB1/MDR1, ABCC1/MRP1, y ABCG2/BCRP se han evaluado en numerosos estudios, obteniendo resultados controversiales en cuanto a su papel en el desarrollo de resistencia a drogas en LLA (Rahgozar *et al.*, 2014).

En un estudio previo se encontró que los niveles de expresión incrementados del mRNA de los genes *ABCC1* y *ABCB1* están significativamente relacionados con resistencia a drogas e incrementan el riesgo de recaída en LA (Rahgozar *et al.*, 2014). En pacientes con LMA se analizó la expresión de mRNA de *ABCB1* y se encontró sobreexpresado en pacientes con LMA en comparación con el grupo control y se asoció con una pobre respuesta clínica y recaída temprana (Alyaqubi *et al.*, 2014).

El metotrexato es un fármaco utilizado para el tratamiento de leucemias agudas, sin embargo, algunas pacientes presentan diferente respuesta al tratamiento con metotrexato (MTX). La resistencia al MTX es una causa importante en la falla del tratamiento. Muchos pacientes no responde a la quimioterapia y otros presentan recaída. Las células expuestas a agentes tóxicos pueden desarrollar resistencia por un número de mecanismos incluyendo disminución de la captación, aceleraron de la desintoxicación, vías de la apoptosis defectuosas, alteración de las proteínas diana, o el aumento de flujo de salida que reduce la concentración efectiva de drogas dentro de la célula. Varias de estas vías pueden conducir a la resistencia a múltiples fármacos, lo que hace que las células se vuelvan resistentes a varios fármacos. El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión del mRNA de genes involucrados en el transporte y metabolismo del MTX en pacientes con leucemia aguda y su relación con respuesta al tratamiento.

Material y métodos

Población de estudio

Se realizó un estudio comparativo tipo casos y controles en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. Se analizaron 70 muestras de pacientes diagnosticados con leucemia aguda (LLA: 51 y LMA: 19), que asistieron al servicio de Oncología Pediátrica del Instituto Estatal del Cáncer "Dr. Arturo Beltrán Ortega" (IECAN-ABO), en la ciudad de Acapulco, Guerrero, México, entre agosto de 2005 y agosto de 2011. El diagnóstico se realizó mediante criterios morfológicos de células blásticas de French-American-British y citometría de flujo. Los protocolos quimioterapéuticos utilizados fueron 96091, 96092 o CIE-10: C9.1.0 del Instituto Estatal de Cancerología y anteriormente descritos (Gomez-Gomez *et al.*, 2014; Organista-Nava *et al.*, 2015). La recaída se definió como la reaparición de > 20% de células blásticas en la médula o la presencia de infiltrados leucémicos localizados en cualquier sitio después de completar la quimioterapia de inducción.

Los controles fueron 65 individuos sin leucemia ($4 \cdot 10^3$ leucocitos / mm^3). Los participantes fueron hombres y mujeres de 1-18 años de edad y residentes del Estado de Guerrero, México. El consentimiento informado fue firmado por los pacientes, sus padres o tutores. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de IECAM.

Muestras y extracción de RNA

Las muestras de médula ósea o sangre periférica se colocaron en tubos con anticoagulante (EDTA). Los leucocitos fueron aislados con el buffer de lisis osmótica selectiva de eritrocitos y el RNA total fue extraído por el método de fenol-cloroformo de acuerdo a lo reportado por (Chomczynski & Sacchi, 2006).

Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó utilizando 500 ng de RNA total de acuerdo a las instrucciones del fabricante, utilizando la enzima transcriptasa inversa SuperScript II y

oligo dT (Thermo Scientific, Foster City, CA, USA) en una temperatura de 65 °C durante 10 min, 22 °C durante 10 min, 42 °C durante 90 min y a 75 °C por 5 min. El cDNA obtenido fue cuantificado en el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Foster City, CA, USA) y almacenado a -20 °C.

Cuantificación de la expresión de genes por PCR en tiempo real

La expresión de mRNA fue evaluada por el método de SYBR Green (Thermo Scientific, Foster City, CA, USA). Todas las reacciones de los genes *GGH*, *FPGS*, *ABCC1*, *ABCB1*, *ATIC*, *TS* y *MTRR* se llevaron a cabo en el equipo de Pikoreal Real Time systems (Thermo Scientific, Foster City, CA, USA) y en el equipo Real Time System CFX95 (BIO RAD, Foster City, California, USA) se llevaron a cabo las reacciones de los genes *MS*, *RFC1*, *MTHFD1*, *ABCG2*, *CCND1*, *MTHFR* Y *ABCC2*. El volumen total de 10 µL consistió de 5 µL de SYBR Green, 1 µL de cDNA, 0.5 µL a 10 mM de primers sentido y antisentido y 3 µL de agua libre de nucleasa. La PCR- Tiempo Real fue realizada utilizando el siguiente protocolo: etapa inicial a 95 °C por 10 min, 40 ciclos: 95 °C por 15 s y 60 °C (*GGH*, *FPGS*, *ABCB1*, *ABCC1*, *ATIC*, *TS* y *MTRR*) o 61°C (*MS*, *RFC1*, *MTHFD1*, *ABCG2*, *CCND1*, *MTHFR* y *ABCG2*) por 1 min para el alineamiento.

Los niveles de expresión relativa fueron calculados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de acuerdo a (Nolan *et al.*, 2006). Para la cuantificación del mRNA, los valores de Ct se normalizaron con los niveles de expresión mRNA de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT). Los primers utilizados se describen en la tabla 1.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con los programas STATA 11.1 y GraphPad Prism 5. La prueba de Mann–Whitney fue utilizada para comparar los niveles de expresión de mRNA de cada gen entre los diferentes grupos. Las pruebas que se realizaron incluyen frecuencias simples y relativas de las variables cualitativas para cada uno de los

grupos, prueba de Chi cuadrada (X^2) para establecer diferencias en las frecuencias. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.05$.

Tabla 1. Primers que se utilizaron en este estudio.

Gen	Secuencia de los iniciadores	Tm (°c)	Producto	Referencia
MTHFD1	F- 5' CGTGGGCAGCGGACTAA3' R-5' CCTTATTTGCGCGGAGATCT3'	61	76 pb	(Kawakami <i>et al.</i> , 2008)
FPGS	F-5' GGCTGGAGGAGACCAAGGAT3' R-5' CATGAGTGTCCAGGAAGCGGA3'	60	94 pb	(Ogawa <i>et al.</i> , 2014)
GGH	F-5' AACCTCTGACTGCCAATTTCCATAA3' R-5' TCTCTGGATGCCACTGGACAC3'	60	86 pb	(Obata <i>et al.</i> , 2013)
ABCC1	F-5' TACCTCCTGTGGCTGAATCTGG3' R-5' CCGATTGTCTTTGCTCTTCATG3'	60	138 pb	(Yoshida <i>et al.</i> , 2001)
ABCC2	F-5' ACGGACAGCTATCATGGCTTCT3' R-5' TGGTCACATCCATGAGCTTCT3'	61	131 pb	(Nishimura <i>et al.</i> , 2002)
ABCB1	F-5' GCTCAGACAGGATGTGAGTTGG3' R-5' ATAGCCCCTTTAACTTGAGCAGC3'	60	99 pb	(Yoshida <i>et al.</i> , 2001)
ABCG2	F-5' AGATGGGTTTCCAAGCGTTCAT3' R-5' CCAGTCCCAGTACGACTGTGACA3'	61	91 pb	(Steinbach <i>et al.</i> , 2002)
CCND1	F-5' ACAAACAGATCATCCGCAAACAC3' R-5' TGTTGGGGCTCCTCAGTTTC3'	61	144 pb	(Yoshida <i>et al.</i> , 2001)
ATIC	F-5' TCTGATGCCTTCTTCCCTTT3' R-5' AGGTTTCGTATGAGCGAGGAT3'	60	149 pb	Gen Bank: KR710127.1
TS (TYMS)	F-5' GCAAAGAGTGATTGACACCATCAA3' R-5' CAGAGGAAGATCTCTTGGATTCAA3'	60	85 pb	(Seitz <i>et al.</i> , 2002)
MS	F-5' TAAGATTTGCAAAGGTTGGGTCTGA3' R-5' CTGGACATACAGGTGGGAGTTGG3'	60	76 pb	(Huang <i>et al.</i> , 2012)
MTRR	F-5' GCCCGGCATTCTATGACAC3' R-5' GCCAGAGTCCAGCAATCCAC3'	60	85 pb	(Zhao <i>et al.</i> , 2012)
MTHFR	F-5' GGCCATCTGCACAAAGCTAAG3' R-5' AACTCACTTCGGATGTGCTTCAC3'	61	140 pb	(Liu <i>et al.</i> , 2012)
RFC1	F-5' CCTCGTGTGCTACCTTTGCTT3' R-5' TGATCTCGTTCGTGACCTGCT3'	61	125 pb	(Abdel-Haleem <i>et al.</i> , 2011)
HPRT	F-5' AAGCTTGCTGGTGAAAAGG3' R-5' AAACATGATTCAAATCCCTGA3'	60	86 pb	(Kawakami <i>et al.</i> , 2008)

Resultados

Características generales de la población

Se analizaron 135 muestras; 65 controles y 70 casos. En pacientes con LLA se observó mayor frecuencia del género masculino (72.73%) en comparación con los pacientes que tuvieron LMA (27.27%). El 70.59% de los pacientes con LLA y el 29.41% de pacientes con LMA presentaron recaída. No se encontraron diferencias significativas en las características generales y clínicas de los pacientes en ambos tipos de leucemia (Tabla 2).

Tabla 2. Características generales y datos clínicos de pacientes con LA.

Características	LLA n=51 (%)	LMA n=19 (%)	Valor de p+
Genero			
Masculino	32 (72.73)	12(27.27)	0.975
Femenino	19 (73.08)	7(26.92)	
Edad (años)			
1-4	19(79.17)	5(20.83)	0.406
5-11	11(61.11)	7(38.89)	
12-18	21(75)	7(25)	
No. leucocitos/mm ³			
1000-11000	20(68.97)	9(31.03)	0.351
11300-20000	5(100)	0(0)	
210000-290000	26(72.22)	10(27.78)	
Inmunofenotipo			
B	47(92.16)	ND	-
B/T	3(5.88)		
T	1(1.96)		
Tiempo con leucemia (meses)			
1-7	20(83.33)	4(16.67)	0.298
8-42	15(62.50)	9(37.50)	
47-115	16(72.73)	6(27.27)	
Recaída durante el tratamiento			
Si	36(70.59)	15(29.41)	0.484
No	15(78.95)	4(21.05)	
Estado del paciente			
Vivo	15(78.95)	4(21.04)	0.484
Finado	36(70.59)	15(29.41)	

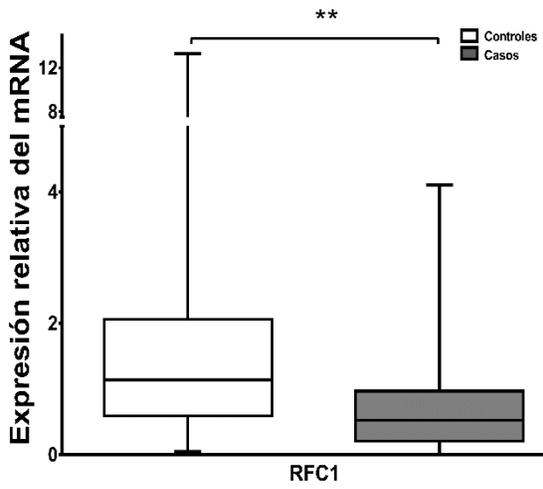
LLA: leucemia linfoblástica aguda, LMA: leucemia mieloide aguda, ND: no determinado, + prueba de χ^2

Perfil de expresión de genes de la vía del folato/MTX en pacientes con LA.

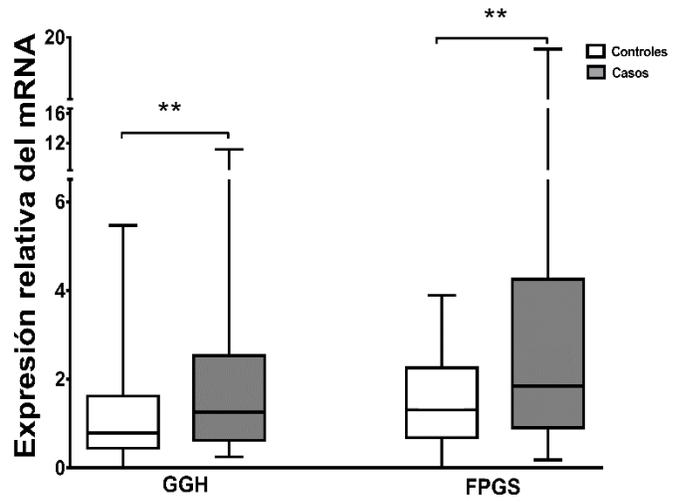
Para evaluar los niveles de expresión de mRNA de genes de la vía del folato/MTX en pacientes sin leucemia, LLA y LMA se realizó una PCR en tiempo real (RT-qPCR) por duplicado. Se analizaron 70 muestras de pacientes con LA (LLA=51 y LMA=19). No se encontraron diferencias significativas entre ambos tipos de leucemia aguda en los datos clínicos y características generales por lo cual los resultados se presentan en conjunto como leucemia aguda (LA). Los datos sobre los niveles de expresión de genes se dividieron en cuatro grupos de acuerdo a su función: sistema de transporte de flujo del folato (*RFC1*; n=63), enzimas metabolizantes del folato (*FPGS* y *GGH*; n=70), enzimas dependientes del folato (*ATIC*, n=70; *TS*, n=70; *MS*, n=70; *MTHFD1*, n=67; *MTRR*, n=67 y *MTHFR*, n=64) y transportadores del eflujo del folato (*ABCB1*, n=70; *ABCC1*, n=70; *ABCC2*, n=39 y *ABCG2*, n=49). También se analizó la expresión del mRNA de ciclina D1 (*CCND1*), pero no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (datos no mostrados).

Los niveles de expresión del mRNA de los genes *RFC1* ($p < 0.001$), *MS* ($p = 0.045$), *MTRR* ($p < 0.001$), *MTHFR* ($p < 0.001$) y *ABCB1* ($p < 0.001$) se encuentran disminuidos en LA en comparación con el grupo control, mientras que los niveles de expresión del mRNA de *FPGS* ($p = 0.010$), *GGH* ($p = 0.009$), *TS* ($p < 0.001$), y *MTHFD1* ($p = 0.007$) se encontraron elevados en LA en comparación con el grupo control. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de mRNA de los genes *ATIC*, *ABCC1*, *ABCC2* y *ABCG2* (Figura 1).

A Transportador de influjo del folato

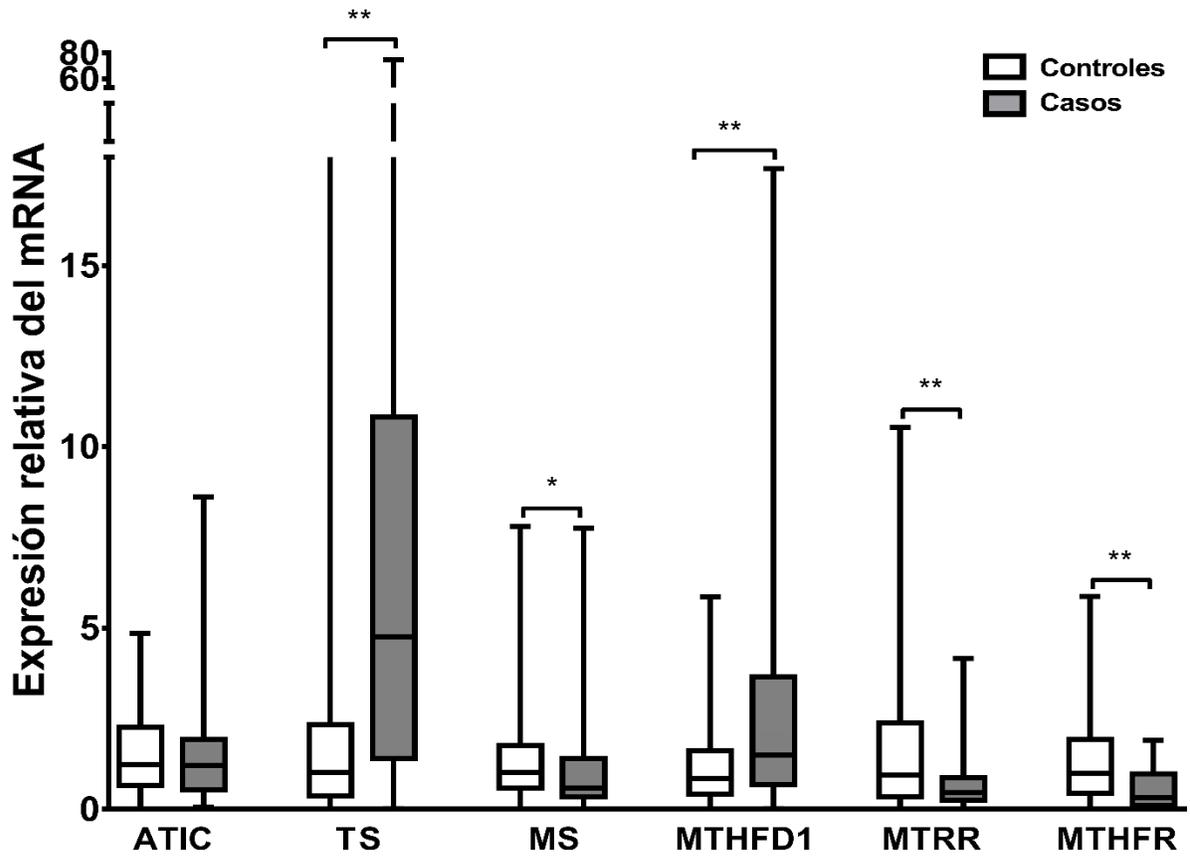


B Enzimas metabolizantes del folato



C

Enzimas dependientes de folato



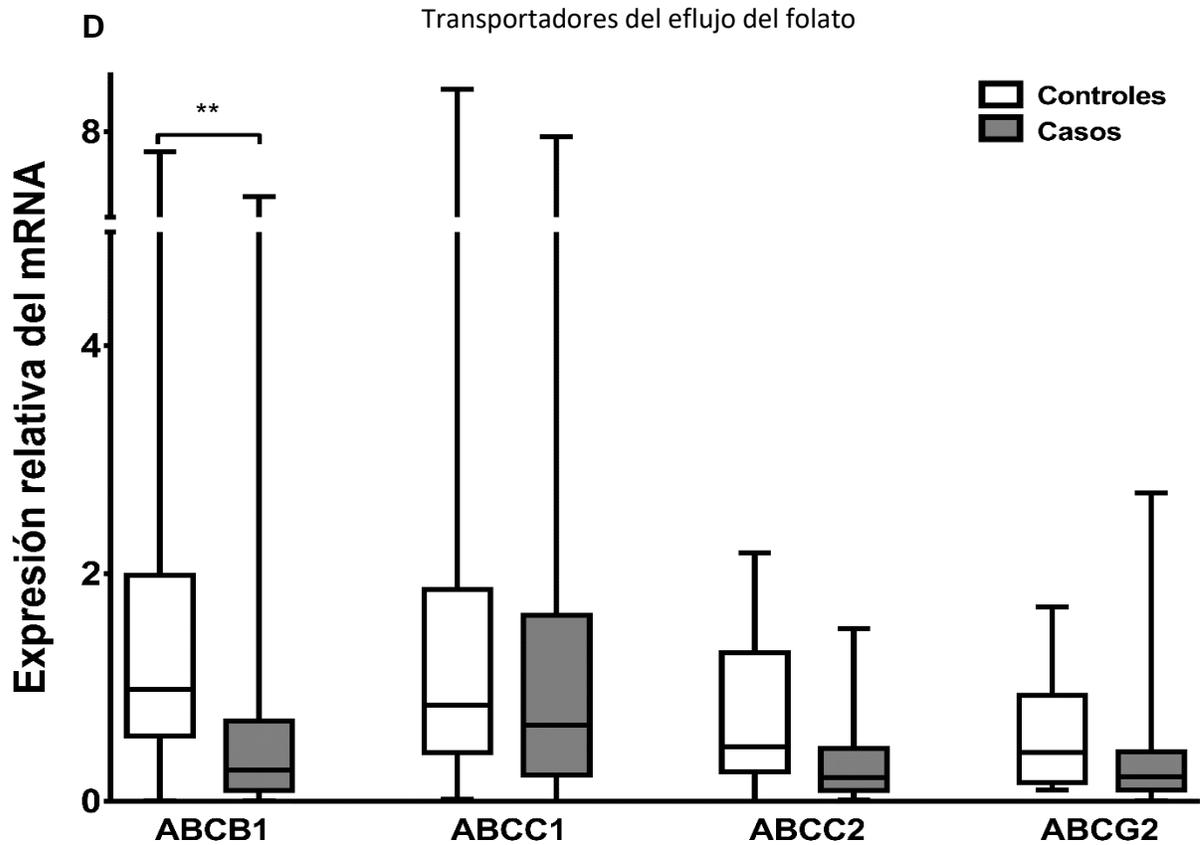
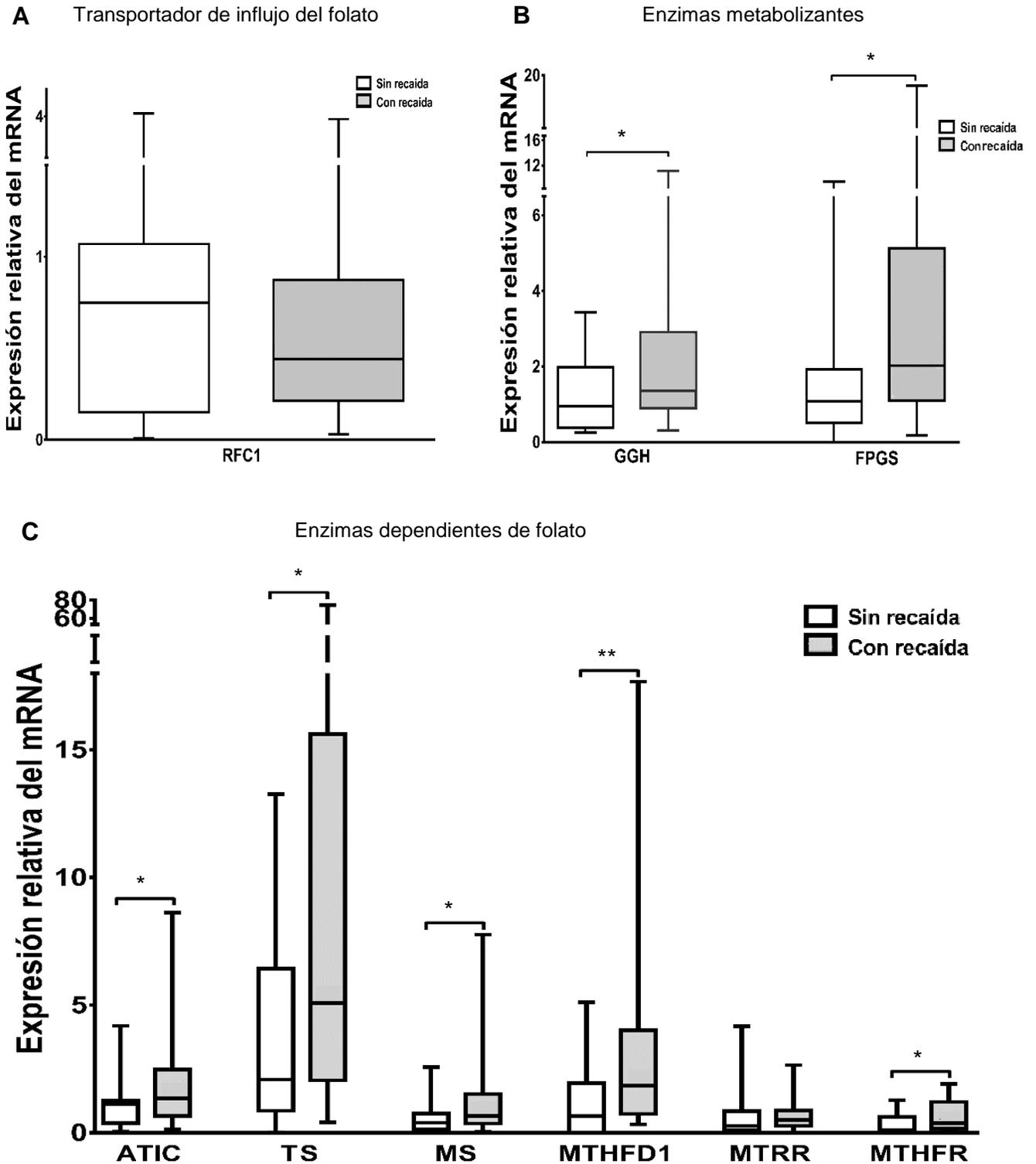


Figura.1 Expresión relativa de genes que participan en el transporte y metabolismo del MTX en pacientes con LLA y LMA en comparación con el grupo control. **A)** Expresión relativa del mRNA del gen RFC1. **B)** Niveles de expresión de enzimas que metabolizan MTX/folato. **C)** Expresión relativa del mRNA de enzimas dependientes de folato. **D)** Expresión relativa del mRNA de transportadores del MTX/folato. La barra horizontal representa la mediana de la expresión.

Expresión diferencial de genes de la vía del folato/MTX entre pacientes con LA con y sin recaída.

Debido a que un alto porcentaje de pacientes con LA presentaron recaída (Tabla1) se realizó un análisis del perfil de expresión del mRNA de genes de la vía del folato/MTX en paciente con LA que presentaron recaída durante el tratamiento con MTX. El análisis muestra diferencias significativas en la expresión de los genes *GGH* ($p=0.029$), *FPGS* ($p=0.017$), *TS* ($p=0.016$), *MS* ($p=0.023$), *ATIC* ($p=0.047$), *MTHFD1* ($p=0.003$), *MTHFR* ($p=0.012$), *ABCB1* ($p=0.038$), y *ABCC1* ($p=0.045$) los cuales se encuentran

elevados en pacientes que presentaron recaída durante el tratamiento en comparación con los pacientes que no (Figura 2).



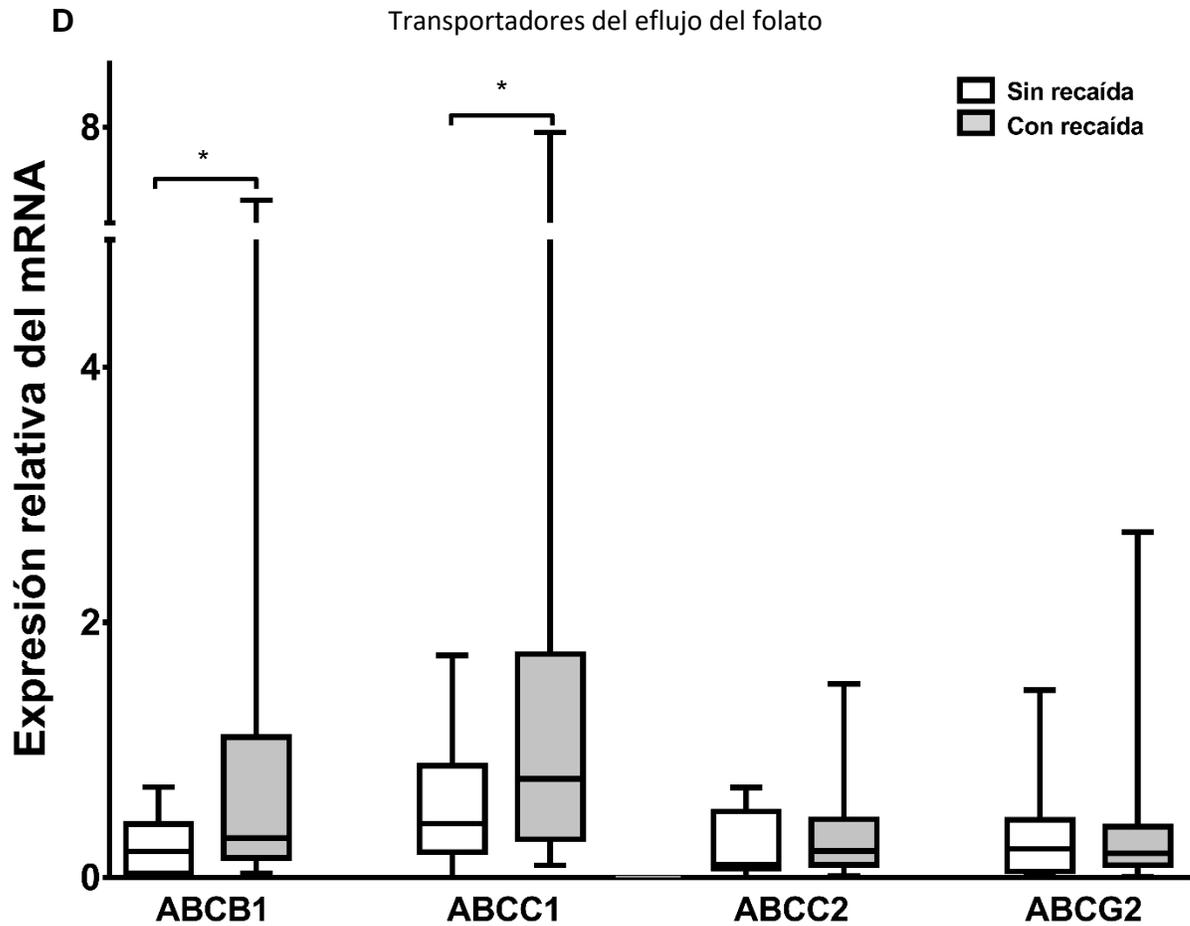


Figura.2 Expresión relativa de genes que participan en el transporte y metabolismo del MTX en pacientes con leucemia aguda con y sin recaída. **A)** Niveles de expresión de RFC1. **B)** Sobreexpresión de enzimas que metabolizan MTX/folato en pacientes con recaída. **C)** Niveles de expresión de enzimas dependientes de folato en pacientes con recaída. **D)** Expresión de transportadores del MTX/folato en pacientes con recaída. La barra horizontal representa la mediana de la expresión.

Discusión

El metabolismo del folato está involucrado en la síntesis y metilación del DNA. La síntesis del DNA es esencial para la división celular y la metilación del DNA es responsable del control de expresión de genes, estabilidad estructural de la cromatina y el mantenimiento de la estabilidad genómica. Se sabe que el MTX actúa inhibiendo enzimas dependientes del folato, bloqueando de esta manera la síntesis del DNA en la fase S del ciclo celular (Galbiatti *et al.*, 2013). El metotrexato (MTX) es reconocido como uno de los primeros agentes terapéuticos anticáncer para el tratamiento de leucemia infantil (Piwkham *et al.*, 2015).

En este estudio se analizaron los niveles de expresión del mRNA de genes que participan en la vía del folato/MTX (*FPGS, GGH, TS, ABCC1, ABCB1, ATIC, RFC1, MS, MTHFD1, MTRR, MTHFR, ABCG2, ABCC2*) en pacientes con LA y en un grupo control. También se hizo una comparación entre individuos con LA con y sin recaída. Encontramos disminuidos los niveles de expresión del mRNA de *RFC1, MS, MTRR, MTHFR* y *ABCB1* en LA en comparación con el grupo control. Mientras que los niveles de expresión de *GGH, FPGS, TS* y *MTHFD1* se encontraron elevados en pacientes con LA en comparación con el grupo control. Los niveles de expresión de *GGH, FPGS, ATIC, TS, MS, MTHFD1, MTHFR, ABCB1* y *ABCC1* se encontraron sobreexpresados en pacientes que presentaron recaída en comparación con los que no presentaron recaída.

En este estudio la expresión de *RFC1* se encontró significativamente baja ($p < 0.001$) en pacientes con LA en comparación con el grupo control. En estudios realizados previamente se encontró que los niveles de expresión de mRNA de *RFC1* disminuyen en células HEP-2 tratadas con bajas concentraciones de MTX, resultando en una falla en el transporte de MTX al interior de la célula por *RFC1*. La disminución en la expresión de *RFC1* conduce a la disminución intracelular de MTX y puede estar involucrada en la resistencia a MTX (Obuchi *et al.*, 2013; Galbiatti *et al.*, 2013). Sin embargo, en este mismo estudio se encontró que al tratar a las células HEP-2 con altas concentraciones de MTX la expresión de *RFC1* incrementaba. Es posible que las

altas concentraciones de MTX durante la quimioterapia estén relacionadas con una mayor producción de *RFC1* que es el responsable del transporte del MTX, sin embargo no hay estudios que demuestren la asociación entre altas dosis de MTX e incremento en la expresión de *RFC1*. Se ha reportado que un incremento en la expresión de *RFC1* podría conducir a la inactivación de varios genes supresores de tumor como p16, p15 y/o p53, resultando en una sensibilidad incrementada a MTX (Galbiatti *et al.*, 2013).

Se sabe que niveles disminuidos de expresión de *RFC1* en líneas celulares de leucemia (CCRF-CEM y CCRF-CEM-7^a) están asociados con alteraciones en la expresión de factores de transcripción como Sp1 y CREB-1 resultando en una disminución en la unión a elementos inducibles y constitutivos del promotor de *RFC*. Esto sugiere un nuevo mecanismo de resistencia a MTX basado en la alteración en la expresión de factores de transcripción y su unión al promotor de *RFC1* (Rothem *et al.*, 2003). La disminución en la expresión de *RFC1* da como resultado una absorción menos eficiente de antifolatos por las células tumorales y se ha asociado con resistencia a MTX (Wojtuszkiewicz *et al.*, 2015).

Por otro lado, los niveles de expresión de las enzimas metabolizantes del MTX; *FPGS* y *GGH* se encontraron elevados en pacientes con LA así como en pacientes que presentaron recaída durante el tratamiento con MTX. Se ha demostrado que la baja actividad de *FPGS* tiene como resultado la disminución de antifolatos en las células y esto conduce a resistencia a drogas en leucemia (Piwkhram *et al.*, 2015). También se ha descrito que el polimorfismo *FPGS* rs1544105 puede alterar la expresión de *FPGS* en LLA, específicamente el genotipo CC se asoció con una mayor expresión de *FPGS* en comparación con los genotipos CT y TT y que el genotipo CC se relacionó a una peor supervivencia libre de recaída en comparación con los genotipos CT +TT (Liu *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha reportado que en pacientes con B-LLA (LLA- de células B) los niveles de mRNA, proteína y actividad enzimática de *FPGS* se encuentran elevados en comparación con T-LLA y estas diferencias se correlacionan con su sensibilidad a antifolatos tales como MTX (Leclerc *et al.*, 2010b). Estos resultados coinciden con los nuestros ya que el 92.16% de los pacientes con LA son de linaje B y los niveles de expresión de *FPGS* se encuentran elevados.

Se ha demostrado que la deacetilasa de histona 1 (HDAC1) es reclutada por los factores de transcripción NFY y Sp1 en el promotor de *FPGS* para regular su expresión en líneas celulares de LLA, lo cual pudiera explicar la alteración de la expresión de *FPGS* en los pacientes analizados en este estudio. Sin embargo, los niveles de expresión del mRNA de *FPGS* no son necesariamente indicativos de la actividad catalítica de *FPGS* ya que está sujeta a aberraciones en el *splicing* alternativo (Leclerc *et al.*, 2010a).

La enzima GGH se encarga de eliminar los grupos glutamil del MTX, favoreciendo el eflujo de la célula. Se ha reportado que la sobreexpresión de *GGH* está asociada con resistencia a MTX. Un incremento en la actividad de *GGH* fue identificado como un mecanismo de resistencia a antifolatos en células de hepatoma de rata y en células de sarcoma humano (Li *et al.*, 1993). Nuestros resultados coinciden con los reportados por Kim donde encontró que la sobreexpresión de *GGH* se asocia con resistencia a MTX en células HCT116 y MDA-MB-435, los resultados obtenidos sugieren que *GGH* está relacionada con resistencia a MTX en pacientes con LA, ya que su sobreexpresión podría favorecer la salida del MTX impidiendo que ejerza su actividad antiapoptótica (Kim *et al.*, 2013).

En cuanto a las enzimas dependientes de folato se observó una alteración en los niveles de expresión de los genes *MS*, *MTRR*, *MTHFR*, *TS*, *MTHFD1* y *ATIC*. Donde la metionina transferasa reductasa (*MTRR*) está involucrada en la síntesis del DNA y producción de S-adenosilmetionina (*SAM*) y juega un papel importante en la carcinogénesis. (Chen *et al.*, 2015). Se han descrito polimorfismos en el gen *MTRR* relacionados con el desarrollo de leucemia linfoblástica aguda, sin embargo, no se han realizado estudios donde se analice la expresión del mRNA de *MTRR* en pacientes con leucemia aguda. Nosotros encontramos niveles de expresión disminuidos de *MTRR* en LA en comparación con el grupo control. Sin embargo, en células de cáncer de ovario se reportó que la expresión incrementada de *MTRR* está relacionada con resistencia a cisplatino, al silenciar a *MTRR* se inhibió el crecimiento celular, resistencia a cisplatino y autofagia, también se indujo la apoptosis de células de cáncer

de ovario a través de la regulación de la expresión de caspasas y de la vía mTor (Chen *et al.*, 2015).

La Metionina sintasa (MS) cataliza la remetilación de homocisteína a metionina, deficiencias en la actividad de MS resulta en hiperhomocisteinemia, homocistinuria y anemia megaloblástica (Leclerc *et al.*, 1996). Nuestros resultados muestran niveles disminuidos de MS en pacientes con LA en comparación con el grupo control. Una disminución en la actividad de MS conduce al incremento de homocisteína y reducción en los procesos de metilación del DNA (Niedzielska & Węclawek-Tompol, 2013). Nuestros resultados sugieren que en pacientes con LA que presentaron recaída durante el tratamiento los niveles de mRNA de MS se encontraron incrementados en comparación con los pacientes con LA que no presentaron recaída ($p=0.023$).

Otra enzima importante involucrada en la remetilación de homocisteína es metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es una enzima que cataliza la conversión de 5,10-CH₃-THF a 5-CH₃-THF, para la remetilación de homocisteína a metionina (Bahari *et al.*, 2016). En este estudio, los niveles de mRNA de *MTHFR* se encontraron disminuidos en pacientes con LA en comparación con el grupo control, mientras que en paciente que presentaron recaída durante el tratamiento los niveles de mRNA se encontraron sobreexpresado en comparación con los pacientes que no presentaron recaída. El efecto biológico de la sobreexpresión de *MTHFR* no está completamente definido, pero, los datos muestran que hay dos polimorfismos genéticos en el gen *MTHFR* (C677T y A1298C) que podrían estar asociados con alteraciones en los niveles de expresión de *MTHFR* y pueden interferir en la actividad antitumoral de la quimioterapia (Galbiatti *et al.*, 2013). Alteraciones en la expresión de *MTHFR* pueden afectar la concentración celular de folatos, la cual puede afectar la sensibilidad a MTX (Kremer, 2004; Chiusolo *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha observado que el polimorfismo *MTHFR* C677T está asociado con riesgo de recaída en pacientes con LLA (Aplenc *et al.*, 2005).

TS es una enzima dependiente de folato, que cataliza la conversión de deoxiuridilato (dUMP) a deoxitimidilato (dTMP) que resulta en la acumulación de dihidrofolato (DHF) y disminución de folatos celulares, TS juega un papel central en la síntesis y

reparación del DNA al servir como la principal fuente intracelular de dUTM (Erculij *et al.*, 2012). *TS* es una enzima blanco del MTX-PG, pero al encontrarse sobreexpresada en LA y en pacientes con recaída se podría especular que el MTX no está ejerciendo su actividad inhibitoria sobre esta enzima, al no inhibirse *TS* se favorece la síntesis de DNA y con ello que las células continúen proliferando descontroladamente.

En cuanto a la familia de transportadores ABC, encontramos disminuidos los niveles de expresión del mRNA de *ABCB1* en LA en comparación con el grupo control, mientras que en pacientes con LA que presentaron recaída durante el tratamiento con MTX se observó una expresión incrementada de *ABCB1* y *ABCC1* ($p=0.038$, $p=0.046$ respectivamente). Similar a lo reportado por (Ho *et al.*, 2008) donde observó que la sobreexpresión de los transportadores ABC (*ABCB1*, *ABCC1* y *ABCG2*) están implicados en la resistencia a multidrogas (MDR). Nuestros resultados son controversiales con los encontrados por (Rahgozar *et al.*, 2014) debido a que ellos no encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con LLA. Diversos estudios han analizado la expresión de *ABCB1* con resultados controversiales, algunos investigadores sugieren una falta de relación entre la expresión de este gen y el pronóstico de LA, mientras que otros sugieren que este gen puede estar relacionado con el pronóstico de la enfermedad (Rahgozar *et al.*, 2014).

La respuesta al tratamiento de LA se ve afectada por diversos factores como son las características morfológicas, los criterios genéticos y la edad. Evidencias acumuladas muestran que la mayor expresión del gen *ABCB1* puede ser un marcador de peor pronóstico en pacientes con LMA (Alyaqubi *et al.*, 2014).

Al encontrarse sobreexpresados los genes *ABCB1* y *ABCC1* en pacientes que presentaron recaída se podría pensar que estos genes están participando en la resistencia al tratamiento con MTX al favorecer su eflujo de la célula. Al encontrarse los niveles elevados de mRNA de *GGH* podrían estar favoreciendo la despoliglutamación del MTX impidiendo que ejerza su actividad apoptótica, por lo cual los niveles de ATIC y *TS* también se encuentran sobreexpresados ya que al no encontrarse el MTX-PG no inhibe a estas enzimas blanco, favoreciendo de esta manera la proliferación celular.

Se sabe que la resistencia puede ser consecuencia, en primer lugar, de la menor concentración intracelular del agente terapéutico, debido a menor influjo, a un eflujo intenso o al secuestro de dicho agente; en segundo lugar a una detoxificación celular; en tercer lugar, la alteración del objetivo celular y en cuarto lugar, una mayor función reparadora del DNA. Muchos de estos genes son constitutivos y se encuentran de manera natural en las células, mientras que otros pueden aparecer *de novo* durante la progresión y tratamiento de la enfermedad (Angosto, 2001).

Tal vez los genes estudiados podrían estar involucrados en el desarrollo de resistencia a multidrogas durante el tratamiento. Esto sugiere que el tratamiento puede cambiar el perfil de expresión y actividad de estos genes, a través de la eliminación de las células susceptibles a drogas y dejar solamente a clonas de células resistentes, cambiando la expresión de genes en la médula ósea (Rahgozar *et al.*, 2014).

En conclusión, nuestros resultados sugieren que los genes analizados en este estudio podrían estar involucrados en el desarrollo de resistencia a MTX, ya que se observó un incremento en los niveles de expresión de *GGH*, *FPGS*, *TS* y *MTHFD1* y niveles disminuidos de los genes *RFC1*, *MTRR*, *MTHFR* y *ABCB1* en pacientes con LA en comparación con el grupo control. Además en pacientes que presentaron recaída se observó un incremento en los niveles de expresión de *GGH*, *FPGS*, *ATIC*, *TS*, *MS*, *MTHFD1*, *MTHFR*, *ABCB1* y *ABCC1* en comparación con los pacientes que no presentaron recaída, esto podría sugerir que el tratamiento puede cambiar el perfil de expresión y actividad de los genes analizados.

Sugerencias

- Hacer un análisis del perfil de expresión de genes que participan en la vía del folato utilizando muestras recientes.
- Realizar un estudio completo donde se analice el perfil de expresión del mRNA y a nivel de proteína, para obtener resultados más concluyentes.
- Hacer una comparación entre el perfil de expresión de pacientes con leucemia que aún no reciben el tratamiento y pacientes con LA que ya recibieron un tratamiento.
- Aumentar el tamaño de la muestra.
- Obtener todos los datos clínicos de los pacientes para realizar un análisis estadístico completo.

Referencias

- Abdel-Haleem, A. M., El-Zeiry, M. I., Mahran, L. G., Abou-Aisha, K., Rady, M. H., Rohde, J., Mostageer, M. & Spahn-Langguth, H. (2011). Expression of RFC/SLC19A1 is associated with tumor type in bladder cancer patients. *PLoS One*, 6, e21820.
- Alyaqubi, K. J., Al-Faisal, A. H. M., Al-Mudahafar, A. M. J. & Tobal, K. (2014). Assessment of Multidrug Resistance Gene (MDR1) Expression in Iraqi Acute Myeloid Leukemic patients. *International Journal*, 2, 375-383.
- Angosto, M. C. (2001). Mecanismos moleculares de la multiresistencia. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- Aplenc, R., Thompson, J., Han, P., La, M., Zhao, H., Lange, B. & Rebbeck, T. (2005). Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*, 65, 2482-7.
- Bahari, G., Hashemi, M., Naderi, M. & Taheri, M. (2016). Association between Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene Polymorphisms and Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in an Iranian Population. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 10, 130-7.
- Chen, J., Wang, Q., Yin, F. Q., Zhang, W., Yan, L. H. & Li, L. (2015). MTRR silencing inhibits growth and cisplatin resistance of ovarian carcinoma via inducing apoptosis and reducing autophagy. *Am J Transl Res*, 7, 1510-27.
- Cheok, M. H., Pottier, N., Kager, L. & Evans, W. E. (2009). Pharmacogenetics in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*, 46, 39-51.
- Chiusolo, P., Reddicono, G., Farina, G., Mannocci, A., Fiorini, A., Palladino, M., La Torre, G., Fianchi, L., Sora, F., Laurenti, L., Leone, G. & Sica, S. (2007). MTHFR polymorphisms' influence on outcome and toxicity in acute lymphoblastic leukemia patients. *Leuk Res*, 31, 1669-74.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, 1, 581-5.
- Erculj, N., Kotnik, B. F., Debeljak, M., Jazbec, J. & Dolzan, V. (2012). Influence of folate pathway polymorphisms on high-dose methotrexate-related toxicity and survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 53, 1096-104.
- Espinoza, B. G., Faustina, R. C. & Rosario, C. G. M. 2015. *Técnicas de análisis hematológico*
- Galbiatti, A. L., Castro, R., Caldas, H. C., Padovani, J. A., Jr., Pavarino, E. C. & Goloni-Bertollo, E. M. (2013). Alterations in the expression pattern of MTHFR, DHFR, TYMS, and SLC19A1 genes after treatment of laryngeal cancer cells with high and low doses of methotrexate. *Tumour Biol*, 34, 3765-71.
- Gervasini, G. (2009). Polymorphisms in methotrexate pathways: what is clinically relevant, what is not, and what is promising. *Curr Drug Metab*, 10, 547-66.
- Gomez-Gomez, Y., Organista-Nava, J., Rangel-Rodriguez, C. A., Illades-Aguiar, B., Moreno-Godinez, M. E., Alarcon-Romero, L. D. & Leyva-Vazquez, M. A. (2014). Effect of folylpolyglutamate synthase A22G polymorphism on the risk and survival of patients with acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett*, 8, 731-735.
- Ho, M. M., Hogge, D. E. & Ling, V. (2008). MDR1 and BCRP1 expression in leukemic progenitors correlates with chemotherapy response in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*, 36, 433-42.
- Huang, T., Wahlqvist, M. L. & Li, D. (2012). Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid on gene expression of the critical enzymes involved in homocysteine metabolism. *Nutr J*, 11, 6.

- Kawakami, K., Ooyama, A., Ruskiewicz, A., Jin, M., Watanabe, G., Moore, J., Oka, T., Iacopetta, B. & Minamoto, T. (2008). Low expression of gamma-glutamyl hydrolase mRNA in primary colorectal cancer with the CpG island methylator phenotype. *Br J Cancer*, 98, 1555-61.
- Kim, S. E., Cole, P. D., Cho, R. C., Ly, A., Ishiguro, L., Sohn, K. J., Croxford, R., Kamen, B. A. & Kim, Y. I. (2013). gamma-Glutamyl hydrolase modulation and folate influence chemosensitivity of cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *Br J Cancer*, 109, 2175-88.
- Kremer, J. M. (2004). Toward a better understanding of methotrexate. *Arthritis & Rheumatism*, 50, 1370-1382.
- Leclerc, D., Campeau, E., Goyette, P., Adjalla, C. E., Christensen, B., Ross, M., Eydoux, P., Rosenblatt, D. S., Rozen, R. & Gravel, R. A. (1996). Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet*, 5, 1867-74.
- Leclerc, G. J., Mou, C., Leclerc, G. M., Mian, A. M. & Barredo, J. C. (2010a). Histone deacetylase inhibitors induce FPGS mRNA expression and intracellular accumulation of long-chain methotrexate polyglutamates in childhood acute lymphoblastic leukemia: implications for combination therapy. *Leukemia*, 24, 552-62.
- Leclerc, G. J., Sanderson, C., Hunger, S., Devidas, M. & Barredo, J. C. (2010b). Folylpolyglutamate synthetase gene transcription is regulated by a multiprotein complex that binds the TEL-AML1 fusion in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 34, 1601-9.
- Li, W. W., Waltham, M., Tong, W., Schweitzer, B. I. & Bertino, J. R. (1993). Increased activity of gamma-glutamyl hydrolase in human sarcoma cell lines: a novel mechanism of intrinsic resistance to methotrexate (MTX). *Adv Exp Med Biol*, 338, 635-8.
- Liu, R., Yin, L. & Pu, Y. (2012). Association between gene expression of metabolizing enzymes and esophageal squamous cell carcinomas in China. *Genet Test Mol Biomarkers*, 16, 1211-7.
- Liu, S.-G., Gao, C., Zhang, R.-D., Jiao, Y., Cui, L., Li, W.-J., Chen, Z.-P., Wu, M.-Y., Zheng, H.-Y. & Zhao, X.-X. (2013). FPGS rs1544105 polymorphism is associated with treatment outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell Int*, 13, 107.
- Lucchesi, M., Guidi, M., Fonte, C., Farina, S., Fiorini, P., Favre, C., De Martino, M. & Sardi, I. (2016). Pharmacokinetics of high-dose methotrexate in infants aged less than 12 months treated for aggressive brain tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 77, 857-64.
- Niedzielska, E. & Węclawek-Tompol, J. (2013). The Influence of Genetic RFC1, MS and MTRR Polymorphisms on the Risk of Acute Lymphoblastic Leukemia Relapse in Children and the Adverse Effects of Methotrexate. *Clin Exp Med*, 22, 579-584.
- Nishimura, M., Yoshitsugu, H., Naito, S. & Hiraoka, I. (2002). Evaluation of gene induction of drug-metabolizing enzymes and transporters in primary culture of human hepatocytes using high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi*, 122, 339-61.
- Nolan, T., Hands, R. E. & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*, 1, 1559-82.
- Obata, T., Tanaka, M., Suzuki, Y. & Sasaki, T. (2013). The Role of Thymidylate Synthase in Pemetrexed-Resistant Malignant Pleural Mesothelioma Cells. *Journal of Cancer Therapy*, 4, 1052.
- Obuchi, W., Ohtsuki, S., Uchida, Y., Ohmine, K., Yamori, T. & Terasaki, T. (2013). Identification of transporters associated with Etoposide sensitivity of stomach cancer cell lines and methotrexate sensitivity of breast cancer cell lines by quantitative targeted absolute proteomics. *Mol Pharmacol*, 83, 490-500.
- Ogawa, M., Watanabe, M., Mitsuyama, Y., Anan, T., Ohkuma, M., Kobayashi, T., Eto, K. & Yanaga, K. (2014). Thymidine phosphorylase mRNA expression may be a predictor of response to post-operative adjuvant chemotherapy with S-1 in patients with stage III colorectal cancer. *Oncol Lett*, 8, 2463-2468.

- Organista-Nava, J., Gomez-Gomez, Y., Illades-Aguiar, B., Del Carmen Alarcon-Romero, L., Saavedra-Herrera, M. V., Rivera-Ramirez, A. B., Garzon-Barrientos, V. H. & Leyva-Vazquez, M. A. (2015). High miR-24 expression is associated with risk of relapse and poor survival in acute leukemia. *Oncol Rep*, 33, 1639-49.
- Organista-Nava, J., Gomez-Gomez, Y., Saavedra-Herrera, M. V., Rivera-Ramirez, A. B., Teran-Porcayo, M. A., Alarcon-Romero Ldel, C., Illades-Aguiar, B. & Leyva-Vazquez, M. A. (2010). Polymorphisms of the gamma-glutamyl hydrolase gene and risk of relapse to acute lymphoblastic leukemia in Mexico. *Leuk Res*, 34, 728-32.
- Panetta, J. C., Sparreboom, A., Pui, C. H., Relling, M. V. & Evans, W. E. (2010). Modeling mechanisms of in vivo variability in methotrexate accumulation and folate pathway inhibition in acute lymphoblastic leukemia cells. *PLoS Comput Biol*, 6, e1001019.
- Pérez-Saldivar, M. L., Fajardo-Gutiérrez, A., Bernáldez-Ríos, R., Martínez-Avalos, A., Medina-Sanson, A., Espinosa-Hernández, L., De Diego Flores-Chapa, J., Amador-Sánchez, R., Peñaloza-González, J. G. & Álvarez-Rodríguez, F. J. (2011). Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC cancer*, 11, 355.
- Piwkham, D., Siriboonpiputtana, T., Beuten, J., Pakakasama, S., Gelfond, J. A., Paisooksantivatana, K., Tomlinson, G. E. & Rerkamnuaychoke, B. (2015). Mutation Screening and Association Study of the Folylpolylglutamate Synthetase (FPGS) Gene with Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16, 4727-32.
- Rahgozar, S., Moafi, A., Abedi, M., Entezar, E. G. M., Moshtaghian, J., Ghaedi, K., Esmaili, A. & Montazeri, F. (2014). mRNA expression profile of multidrug-resistant genes in acute lymphoblastic leukemia of children, a prognostic value for ABCA3 and ABCA2. *Cancer Biol Ther*, 15, 35-41.
- Rothem, L., Aronheim, A. & Assaraf, Y. G. (2003). Alterations in the expression of transcription factors and the reduced folate carrier as a novel mechanism of antifolate resistance in human leukemia cells. *J Biol Chem*, 278, 8935-41.
- Saha, V. & Lilleyman, J. (1998). Leukaemia. *Current Paediatrics*, 8, 73-77.
- Salud/Inegi., S. D. (2012). Fuente: Elaborado a partir de la base de datos de defunciones INEGI/Secretaria de Salud, Dirección General de Información en Salud, Mexico.
- Schneider, E. & Ryan, T. J. (2006). Gamma-glutamyl hydrolase and drug resistance. *Clin Chim Acta*, 374, 25-32.
- Seitz, U., Wagner, M., Neumaier, B., Wawra, E., Glatting, G., Leder, G., Schmid, R. M. & Reske, S. N. (2002). Evaluation of pyrimidine metabolising enzymes and in vitro uptake of 3'-[[18F]fluoro-3'-deoxythymidine ([[18F]FLT) in pancreatic cancer cell lines. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 29, 1174-81.
- Steinbach, D., Sell, W., Voigt, A., Hermann, J., Zintl, F. & Sauerbrey, A. (2002). BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 16, 1443-7.
- Wang, S. M., Sun, L. L., Zeng, W. X., Wu, W. S. & Zhang, G. L. (2014). Influence of genetic polymorphisms of FPGS, GGH, and MTHFR on serum methotrexate levels in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*, 74, 283-9.
- 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., Assaraf, Y. G., Kaspers, G. J. & Cloos, J. (2015). Methotrexate resistance in relation to treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol*, 8, 61.
- Wojtuszkiewicz, A., Raz, S., Stark, M., Assaraf, Y. G., Jansen, G., Peters, G. J., Sonneveld, E., Kaspers, G. J. & Cloos, J. (2016). Folylpolylglutamate synthetase splicing alterations in acute lymphoblastic

- leukemia are provoked by methotrexate and other chemotherapeutics and mediate chemoresistance. *International Journal of Cancer*, 138, 1645-1656.
- Yoshida, M., Suzuki, T., Komiya, T., Hatashita, E., Nishio, K., Kazuhiko, N. & Fukuoka, M. (2001). Induction of MRP5 and SMRP mRNA by adriamycin exposure and its overexpression in human lung cancer cells resistant to adriamycin. *Int J Cancer*, 94, 432-7.
- Zhao, J. Y., Yang, X. Y., Gong, X. H., Gu, Z. Y., Duan, W. Y., Wang, J., Ye, Z. Z., Shen, H. B., Shi, K. H., Hou, J., Huang, G. Y., Jin, L., Qiao, B. & Wang, H. Y. (2012). Functional variant in methionine synthase reductase intron-1 significantly increases the risk of congenital heart disease in the Han Chinese population. *Circulation*, 125, 482-90.