

Los Polimorfismos en los genes GSTP1, GSTM1 y GSTT1 están asociados con el riesgo de sufrir recaídas en los pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda

Polymorphisms in GSTP1, GSTM1 and GSTT1 genes are associated with the risk of relapse in patients with childhood Acute Lymphoblastic Leukemia

Cotignola J¹, Leonardi DB¹, Nuñez M², De Siervi A¹, Alfonso G³, Riccheri MC⁴, Vazquez E¹.

Trabajo Premiado en el XXI Congreso Argentino de Hematología

¹Laboratorio de Inflamación y Cáncer, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Bs. As., Instituto de Química Biológica de Ciencias Exactas y Naturales, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

²Cátedra de Matemática, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Bs. As.

³Servicio de Hematología, Hospital Nacional A. Posadas

⁴Servicio de Hematología Pediátrica, Hospital Nacional A. Posadas

jcotignola@qb.fcen.uba.ar

Fecha de recepción: 17/03/2014

Fecha de aprobación: 20/04/2014



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA, Vol.18 N° 2: 111-116
Mayo - Agosto 2014

Resumen

Uno de los desafíos más importantes en oncología es poder predecir la progresión de la enfermedad. El objetivo del trabajo fue identificar polimorfismos que permitan distinguir pacientes con Leucemia Aguda (LA) con alto riesgo de presentar una recaída. Se reclutaron 194 pacientes con LA del Hospital Posadas. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética y todos los pacientes, o tutores legales, firmaron un consentimiento informado. Se extrajo ADN de linfocitos de sangre periférica y se genotipificaron 5 polimorfismos: Glutatión-S-Transferasas (*GSTP1* c.313A>G (p.Ile105Val); *GSTM1* nulo; *GSTT1* nulo), Gen de Resistencia a Múltiples Drogas 1 (*ABCB1/MDR1* c.3435T>C), y Metilentetrahidro Folato Reductasa (*MTHFR* c.665C>T). Dos de los polimorfismos (*GSTM1* y *GSTT1*) se estudiaron por PCR multiplex, y los otros tres por PCR-RFLP. Encontramos que el genotipo combinado de las tres GSTs está significativamente asociado con las recaídas ($p=0,003$). Cuando analizamos solo a los pacientes pediátricos ($n=158$) utilizando un modelo multivariado, comprobamos que el genotipo *GSTP1* c.313GG

aumenta el riesgo de recaídas (HR=5,4; 95%IC=1,7-17,2; $p=0,005$). Al estudiar solo a pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda que tuvieron remisión completa ($n=136$), encontramos un resultado similar (HR=5,6; 95%IC=1,8-17,9; $p=0,004$). Estos hallazgos indican que el genotipo de las GSTs estaría afectando la evolución de los pacientes con LA. La confirmación de estos resultados ayudará a elegir el mejor esquema de tratamiento y seguimiento para cada paciente diagnosticado con LA según su genotipo.

Palabras claves: Leucemia Aguda; Riesgo; Recaída; Genotipo; Polimorfismo

Abstract

The prediction of disease progression is one of the biggest challenges in oncology. The aim of this study was to find polymorphisms that help to identify patients diagnosed with Acute Leukemia (AL)

who are at high risk of relapse. We recruited 194 patients with AL from Hospital Posadas. The protocol was approved by the Ethic Committee and all patients, or guardians, signed an informed consent. Germline DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes and 5 polymorphisms were genotyped: Glutathion-S-Transferases (*GSTP1* c.313A>G (p.Ile105Val); *GSTM1* null; *GSTT1* null), Multiple Drug Resistance gene 1 (*ABCB1/MDR1* c.3435T>C), and Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR* c.665C>T). Two polymorphisms (*GSTM1* y *GSTT1*) were analyzed by multiplex PCR and the other three by PCR-RFLP. We found that the GSTs combined genotype is significantly associated with relapse ($p=0.003$). When we analyzed only the pediatric pa-

tients ($n=158$) using a multivariate model, we found that the *GSTP1* c.313GG genotype increases the risk of relapse ($HR=5.4$; $95\%CI=1.7-17.2$; $p=0.005$). We further restricted the analysis to pediatric patients with Acute Lymphoblastic Leukemia with complete remission ($n=136$) and found a similar result ($HR=5.6$; $95\%CI=1.8-17.9$; $p=0.004$). These results show that the genotype of the GSTs might modify the AL progression. The validation of these findings will help to choose a better treatment and follow-up schema for each patient diagnosed with AL according to their genotype.

Key words: Acute Leukemia, Risk, Relapse, Genotype, Polymorphism

Introducción

En los últimos años se ha progresado mucho para lograr una buena sobrevida de los pacientes con Leucemia Aguda (LA), sin embargo, un importante número de pacientes aún presenta recaídas o progresión. Con los protocolos actuales, la posibilidad de seguir incrementando la sobrevida es limitada. Una alternativa prometedora es mejorar la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo a presentar recaídas (riesgo estándar, intermedio y alto), a fin de brindar el mejor esquema de tratamiento. A pesar de esta categorización de los pacientes en grupos de riesgo y el tratamiento diferencial ofrecido, todavía se observan recaídas en los tres grupos.

Los polimorfismos génicos son variaciones 'normales' en la secuencia de ADN que pueden causar modificaciones mínimas en la expresión génica o en la función de las proteínas. En condiciones no patológicas, estas variaciones tienen un impacto muy bajo en el fenotipo de los individuos. Sin embargo, en situaciones patológicas estas pequeñas variaciones pueden tener grandes implicancias clínicas, resultando en una progresión rápida de la enfermedad, en la resistencia a la terapia, o en el desarrollo de efectos secundarios tóxicos y letales.

Un estudio realizado en 320 pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) muestra que algunos polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en las enzimas CYP1A1 y NQO1 están asociados con un aumento en el riesgo de recaídas y una peor sobrevida luego de ajustar los modelos estadís-

ticos por otros factores de riesgo⁽¹⁾. Otro estudio que incluyó 122 pacientes adultos con LLA demostró que un SNP en la enzima MTHFR aumenta el riesgo de morir por la enfermedad⁽²⁾. El Grupo Oncológico Pediátrico (Children's Oncology Group, COG) reportó un estudio genómico realizado en 598 pacientes con LLA en el que encontraron 63 SNPs que se correlacionaban con una respuesta temprana al tratamiento, recaídas o alteración en la excreción de las drogas⁽³⁾. En otro estudio genómico se determinó que los polimorfismos en el gen SLCO1B1 estaban asociados con alteraciones en la eliminación del metotrexate y la toxicidad gastrointestinal producida por la droga⁽⁴⁾.

Estos reportes demuestran la necesidad de realizar más estudios a nivel molecular con el objetivo de encontrar algún factor de riesgo adicional que permita optimizar la estratificación de los pacientes con LA y, de esta manera, mejorar la sobrevida y calidad de vida de los pacientes. En Argentina no existen estudios publicados que analicen la asociación entre polimorfismos y el pronóstico de las LA. Por lo tanto, en el presente trabajo nos propusimos investigar si el genotipo modifica el riesgo a presentar recaídas en pacientes con LA.

Materiales y Métodos

Pacientes. Se reclutaron retrospectivamente 194 pacientes diagnosticados con leucemia en el Hospital

Nacional Prof. Alejandro Posadas de la Provincia de Buenos Aires según el protocolo aprobado por el correspondiente Comité de Ética. El estudio sigue los Principios Éticos de Investigación Médica en Humanos enunciados por la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado, y en el caso de pacientes menores de edad, el consentimiento informado fue firmado por un tutor legal del niño. El reclutamiento y la actualización de las historias clínicas fueron realizados por médicos hematólogos del Hospital. Los datos de las historias clínicas enviados al laboratorio para el análisis se guardan en un archivo protegido con contraseña para restringir el acceso a los datos y proteger la identidad de los pacientes. Los pacientes con LLA fueron tratados según los protocolos: Interfant, LLA GATLA-87, -90 y -96 y ALLIC-2002. Los pacientes con Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA) fueron tratados según los protocolos LMA GATLA-90, -95, -05 y -07.

Genotipificación. Se extrajo el ADN a partir de 2-5 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA. Se genotipificaron polimorfismos en los siguientes genes: Glutación-S-Transferasa pi 1 (*GSTP1* c.313A>G; rs1695), Glutación-S-Transferasa theta 1 (*GSTT1* nulo), Glutación-S-Transferasa mu 1 (*GSTM1* nulo), Gen de Resistencia a Múltiples Drogas 1 (*ABCB1/MDR1* c.3435T>C; rs1045642), y Metilentetrahidrofolato Reductasa (*MTHFR* c.665C>T; rs1801133). Los polimorfismos en los genes *GSTP1*, *GSTT1* y *GSTM1* se genotipificaron según se describió previamente⁽⁵⁾. La genotipificación de los SNPs en *MDR1* y *MTHFR* se realizó mediante la técnica de PCR-RFLP utilizando las enzimas de restricción Bsp143I y HinfI, respectivamente. Los productos de PCR y las digestiones enzimáticas se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1,5-2% teñidos con bromuro de etidio.

Análisis estadístico. Las variables estudiadas incluyeron: edad al diagnóstico de LA (infantes, pediátricos, adultos), tipo de LA (mieloblástica, linfoblástica), grupo de riesgo para recaída (riesgo estándar o RE, intermedio o RI, alto o RA), sobrevida y genotipo. Además, debido a que las enzimas GSTs intervienen en la misma vía metabólica, definimos una nueva variable dicotómica que contiene información sobre el genotipo combinado de *GSTP1*, *GSTT1*

y *GSTM1*. Para analizar diferencias significativas entre los grupos ($p \leq 0,05$) se realizaron tests de Fisher, Chi cuadrado y Cochran-Armitage para tendencias. Para estudiar la sobrevida libre de recaídas (SLR) se calculó el tiempo desde la fecha de diagnóstico a la fecha de recaída. Se realizaron curvas de Kaplan-Meier con el fin de analizar las diferencias entre los genotipos y la SLR; la comparación entre los grupos se hizo con el test de Log-rank. Se estimó el *Hazard Ratio* (HR) y el intervalo de confianza del 95% (95%IC) mediante el test *Cox proportional hazard model*.

Resultados

El grupo estudiado comprendió pacientes infantiles, pediátricos y adultos. La mayor parte de los casos infantiles y pediátricos correspondieron a LLA (75% y 86%, respectivamente). En el grupo de adultos, el 60% de los casos correspondieron a LMA. La Tabla 1 muestra las características clínico-patológicas. El tiempo de seguimiento promedio fue 58 meses (mediana: 41 meses).

Estudio de asociación entre los polimorfismos y las variables clínico-patológicas en todo el grupo de estudio. Al estudiar la presencia de recaídas, encontramos que el grupo de pacientes con 2 y 3 genotipos de riesgo de las GSTs presenta recaídas con mayor frecuencia que el grupo con 0 y 1 genotipo de riesgo (42% vs 17%, respectivamente; Fisher $p=0,003$). No detectamos asociaciones estadísticamente significativas entre los genotipos y el resto de las variables estudiadas.

Estudio de asociación entre los polimorfismos y las variables clínico-patológicas para el grupo de pacientes pediátricos. Debido a que la gran mayoría de los pacientes incluidos en el estudio eran pacientes pediátricos ($n=158$, 81%), analizamos a este grupo individualmente. Encontramos un mayor riesgo de tener recaídas en los pacientes con el genotipo *GSTP1* c.313 GG al compararlo con los pacientes con los otros genotipos en un modelo multivariado que incluyó al grupo de riesgo, protocolo de tratamiento y el genotipo de los otros cuatro genes (HR=5,4; 95%IC=1,7-17,2; $p=0,005$; Tabla 2). No detectamos asociaciones estadísticamente significativas entre los polimorfismos y el resto de las variables analizadas. Finalmente, restringimos el estudio a los pacientes

pediátricos con LLA que tuvieron remisión completa durante el tratamiento (n=136, 86%). La estimación del riesgo a recaer mostró un incremento de casi 6 veces para los pacientes con el genotipo *GSTP1* c.313 GG al utilizar un modelo multivariado que incluyó al grupo de riesgo, protocolo de tratamiento y el genotipo de los otros genes (HR=5,6; 95%IC=1,8-17,9; p=0,004; **Tabla 2**). También encontramos que la frecuencia de individuos con 2 y 3 genotipos de riesgo de GSTs fue mayor para el grupo RA, menor para el grupo RI, y aún más baja para el grupo RE (80% vs 51% vs 38%, respectivamente; p-trend=0,009). No detectamos asociaciones estadísticamente significativas con el resto de las variables.

Discusión

Actualmente, al momento del diagnóstico y durante la fase de inducción, los pacientes con LLA son estratificados en grupos de riesgo de recaídas según parámetros bioquímicos, citogenéticos y de respuesta temprana al tratamiento. De acuerdo a esta clasificación, se brinda un tratamiento diferencial a cada grupo con el objetivo de disminuir al mínimo el riesgo de sufrir una recaída o un desenlace fatal. Estos protocolos han logrado que la mayoría de los pacientes tengan una buena perspectiva de vida. Sin embargo, todavía hay un porcentaje bajo de pacientes que sufren recaídas en todos los grupos de riesgo. Un área prometedora para el estudio, es la inclusión del genotipo como un parámetro más en la categorización para mejorar la individualización de la terapia. En este trabajo encontramos que el genotipo de las GSTs estaría asociado con el riesgo de recaídas; por lo tanto, en un futuro, podría utilizarse como un factor de riesgo adicional en los protocolos de tratamiento de las LA.

En los últimos 15-20 años, se han publicado muchos trabajos en los que se discute la utilización de los polimorfismos genéticos como factores de riesgo para, por ejemplo, desarrollar enfermedades, aparición de efectos secundarios o resistencia a la quimioterapia, etc. Pero todavía los resultados son, en su mayoría, no concluyentes y/o específicos para una población particular. Un trabajo reciente mostró que el genotipo de las GSTs, y en particular *GSTT1*, podrían modificar el riesgo de desarrollar LMA (*Odds Ratio* (OR)=3,39; 95%IC=1,26-9,26; p<0,05)⁽⁶⁾. Otro estudio en LMA demostró que los pacientes con el genotipo *GSTT1* y/o *GSTM1* nulo tienen una menor

sobrevivida libre de enfermedad⁽⁷⁾.

El grupo BFM reportó un trabajo que incluyó 64 pacientes con recaída y 64 pacientes sin recaída (controles). El estudio sugiere que los genotipos de las enzimas de la familia de las GSTs confieren una disminución del riesgo de recaídas en las LLA pediátricas⁽⁸⁾. Sin embargo, la modificación del riesgo no fue estadísticamente significativa: OR=0,33 (95%IC=0,09-1,23; p=0,10) para *GSTP1* c.313 GG, OR=0,50 (95%IC=0,23-1,07; p=0,08) para *GSTM1* nulo, OR=0,36 (95%IC=0,13-0,99; p=0,05) para *GSTT1* nulo, y OR=0,29 (95%IC=0,06-1,37; p=0,12) para el genotipo combinado de las tres GSTs⁽⁸⁾. Kratinovic y col. no observaron diferencias estadísticamente significativas en la supervivida según los genotipos de *GSTT1*, *GSTM1* y *GSTP1*⁽¹⁾.

Los resultados presentados en este trabajo y los encontrados por otros grupos son dispares y no concluyentes. Esto podría explicarse por las diferentes etnias estudiadas, ya que el contexto genético es distinto para cada una y en estas investigaciones se analizan un número muy limitado de polimorfismos. Por otro lado, la baja actividad de GSTs podría estar jugando dos roles contrapuestos en la progresión de la enfermedad. Por un lado la eliminación de las drogas antineoplásicas se vería disminuida, con la consecuente mayor eficacia de la terapia. Pero, por otro lado, la menor eliminación de compuestos carcinógenos, especies reactivas de oxígeno (ROS) y las mismas drogas antineoplásicas podría transformar a las células normales provocando el desarrollo o progresión de la enfermedad. Probablemente estén pasando ambas cosas y por eso se encuentran resultados contradictorios entre los trabajos.

Es interesante resaltar que estos resultados son similares a otros reportados por nuestro grupo para cáncer de próstata⁽⁵⁾.

Estos hallazgos sugieren que el genotipo de las GSTs representaría un factor de riesgo para la población Argentina, ya sea por el contexto genético de la población o por los factores ambientales a los que está expuesta.

Este trabajo es el primer estudio de polimorfismos en las GSTs como factores de riesgo de recaídas realizado en la población Argentina con LA. Los resultados obtenidos se corroborarán en una población más grande, en un proyecto de investigación incluido en el protocolo multicéntrico y multinacional GATLA-ALLIC 2010.

Tabla 1. Características clínico-patológicas del grupo estudiado.

	Infantes (<1año)	Pediátricos (1-19 años)	Adultos (≥20 años)	Total ^a
	n=4	n=158	n=28	n=194
Características clínico-patológicas				
Edad al diagnóstico				
Rango	1-5 meses	1-19 años	20-68 años	
Mediana	4 meses	6 años	26 años	
Promedio	3,5 meses	7 años	36 años	
Sexo				
Hombres	3 (75%)	79 (50%)	11 (39%)	93 (48%)
Mujeres	1 (25%)	79 (50%)	17 (61%)	101 (52%)
Tipo de leucemia				
LLA	3 (75%)	136 (86%)	11 (39%)	153 (79%)
LMA	1 (25%)	22 (14%)	17 (61%)	41 (21%)
Grupo de riesgo				
RE	-	45 (34%)	5 (50%)	50 (35%)
RI	-	70 (53%)	3 (30%)	76 (52%)
RA	-	17 (13%)	2 (20%)	19 (13%)
Sin datos	4	26	18	49
Remisión completa				
Si	4 (100%)	143 (97%)	21 (78%)	170 (94%)
No	0 (0%)	4 (3%)	6 (22%)	10 (6%)
Sin datos	-	11	1	14
Recaída				
No	1 (25%)	125 (81%)	15 (68%)	145 (79%)
Si	3 (75%)	29 (19%)	7 (31%)	39 (21%)
Sin datos	-	4	6	10

^a cuatro pacientes no tenían datos sobre la edad al diagnóstico al momento del análisis. Estos pacientes están incluidos en el total de individuos pero no se incluyeron en los grupos por edad.

Tabla 2. Estimación de riesgo de recaídas en los pacientes pediátricos.

	HR ^a	95%IC	
GSTP1 c.313A>G ^b			
AA + AG (p.105 Ile/Ile + Ile/Val)	1,0 (referencia)		
GG (p.105 Val/Val)	5,4	1,7 – 17,2	p=0,005 ^d
GSTP1 c.313A>G ^c			
AA + AG (p.105 Ile/Ile + Ile/Val)	1,0 (referencia)		
GG (p.105 Val/Val)	5,6	1,8 – 17,9	p=0,004 ^d

^a HR para un modelo multivariado que incluye al grupo de riesgo, protocolo de tratamiento, genotipos de GSTT1, GSTM1, MDR1 y MTHFR. ^b análisis para todos pacientes pediátricos. ^c análisis para los pacientes pediátricos con LLA que tuvieron remisión completa de la enfermedad. ^d Cox proportional hazard model.

Agradecimiento: Este trabajo fue financiado por subsidios otorgados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Bibliografía

1. Krajcinovic M, Labuda D, Mathonnet G, y col. Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2002; 8(3): p. 802-10.
2. Ongaro A, De Mattei M, Della Porta MG, y col. Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: effects on methotrexate-related toxicity and survival. *Haematologica* 2009; 94(10): p. 1391-8.
3. Yang JJ, Cheng C, Yang W, y col. Genome-wide interrogation of germline genetic variation associated with treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA* 2009; 301(4): p. 393-403.
4. Trevino LR, Shimasaki N, Yang W, y col. Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J Clin Oncol* 2009; 27(35): p. 5972-8.
5. Cotignola J, Leonardi DB, Shahabi A, y col. Glutathione-S-transferase (GST) polymorphisms are associated with relapse after radical prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2013; 16(1): p. 28-34.
6. Zhou L, Zhu YY, Zhang XD, Li Y, and Liu ZG. Risk effects of GST gene polymorphisms in patients with acute myeloid leukemia: a prospective study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(6): p. 3861-4.
7. Barragan E, Collado M, Cervera J, y col. The GST deletions and NQO1*2 polymorphism confers interindividual variability of response to treatment in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2007; 31(7): p. 947-53.
8. Stanulla M, Schrappe M, Brechlin AM, Zimmermann M, and Welte K. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood* 2000; 95(4): p. 1222-8.