

Revisión bibliográfica sobre la influencia de polimorfismos genéticos en la vía del metotrexato en pacientes menores de 13 años con leucemia linfoblástica aguda

Literature review about the influence of genetic polymorphisms in the methotrexate pathway in patients under 13 years of age with acute lymphoblastic leukemia

BARREZUETA RAMÓN ADRIANA Bqf.
Carrera Bioquímica y Farmacia
Universidad de Cuenca
Cuenca-Ecuador

OCHOA CASTRO MARITZA Mgt.
Docente de la Universidad de Cuenca
Carrera Bioquímica y Farmacia
Universidad de Cuenca
Cuenca-Ecuador

SACTA TACURI JÉSSICA Bqf.
Carrera Bioquímica y Farmacia
Universidad de Cuenca
Cuenca-Ecuador

Recibido: 01/03/2022. Aceptado para publicación: 03/05/2022

RESUMEN

El metotrexato (MTX) es un antimetabolito empleado en la quimioterapia para la leucemia linfoblástica aguda (LLA) en pacientes menores de edad, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de ADN y ARN, disminuyendo así las células blásticas. La variabilidad genética conlleva a la existencia de polimorfismos en distintos genes encargados en regular transportadores y enzimas, debido a ello, la respuesta frente a un fármaco difiere en cada paciente, en algunos casos, produciendo consecuencias negativas e incluso la muerte.

Objetivo: Identificar los polimorfismos genéticos en la vía metabólica del metotrexato para el tratamiento de LLA en pacientes menores de 13 años de edad.

Métodos: Se realizó una revisión bibliográfica de carácter cualitativo, empleando artículos reportados

desde el año 2011 al 2021, en las bases de datos PubMed, SciELO y Science Direct, en términos MESH y términos libres.

Resultados: Los genes con más reportes de toxicidad fueron SLC19A1 rs1051266 G> A, SLC01B1 rs4149056 T> C y rs4149081 G> A, TYMS rs151264360 D> I, MTHFR rs1801133 C> T, MTHFR rs1801131 A> C, DHFR rs442767 C> A, ABCC2 rs717620 C> T y ARID5B rs4948496 T> C. No se reportó ineficacia relevante. Las reacciones adversas mayormente reportadas fueron leucopenia, neutropenia, hepatotoxicidad, mucositis y lento aclaramiento de MTX.

Conclusiones: Los polimorfismos de mayor importancia fueron rs1051266 G> A, rs1801133 C> T, rs1801131 A> C y rs4149056 T> C. El aclaramiento reducido y hepatotoxicidad se asocia con la presencia

de estos polimorfismos, mucositis (rs1051266), leucopenia (rs1801133) así como neutropenia, mielotoxicidad y neurotoxicidad (rs1801131). De hecho, se sugieren más estudios sobre la relación entre estos SNPs y reacciones adversas, especialmente en la población latinoamericana.

PALABRAS CLAVE: Farmacogenética, Leucemia Linfoblástica Aguda, Polimorfismo genético, Metabolismo, Metotrexato, Niños, Infancia.

ABSTRACT

Methotrexate (MTX) is an antimetabolite used in chemotherapy for acute lymphoblastic leukaemia in underage patients, whose mechanism of action is the inhibition of DNA and RNA, decreasing blast cells. Genetic variability leads to the existence of polymorphisms in different genes, they are responsible for regulating transporters and enzymes, because of this, the drug response is different in each patient, in some cases it produces negative consequences and even death.

Aim: Identify genetic polymorphisms in the methotrexate pathway for the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in patients under 13 years old.

Methods: Literature review, using articles reported since 2011 to 2021, in databases as PubMed, SciELO and Science Direct.

Results: The genes that reported toxicity were SLC19A1 rs1051266 G> A, SLC01B1 rs4149056 T> C y rs4149081 G> A, TYMS rs151264360 D> I, MTHFR rs1801133 C> T, MTHFR rs1801131 A> C, DHFR rs442767 C> A, ABCC2 rs717620 C> T and ARID5B rs4948496 T> C. The adverse reactions mostly reported were leukopenia, neutropenia, hepatotoxicity, mucositis and lower MTX clearance.

Conclusions: The most important polymorphisms were, rs1051266 G> A, rs1801133 C> T, rs1801131 A> C and rs4149056 T> C. Reduced clearance and hepatotoxicity

are associated with these polymorphisms, mucositis (rs1051266), leukopenia (rs1801133) as well as neutropenia, myelotoxicity and neurotoxicity. In fact, we suggested more studies between these SNPs and adverse reactions, especially in the Latin American population.

KEYWORDS: Pharmacogenetics, Acute Lymphoblastic Leukemia, Genetics Polymorphism, Metabolism, Methotrexate, Children, Childhood.

INTRODUCCIÓN

La LLA es una enfermedad maligna caracterizada por la proliferación anormal de células progenitoras linfoides (1). En los últimos años esta neoplasia se ha reportado en el 25% del total de casos de cáncer (2). El riesgo de LLA es más frecuente en niños menores, específicamente aquellos con edades comprendidas entre los 2 a 5 años, correspondiente a un 75-80% de los casos (3). El metotrexato es el fármaco de elección en su tratamiento. Sin embargo, existen polimorfismos que afectan a los sistemas metabólicos, conduciendo a la activación o inactivación de los agentes antineoplásicos, así como a sus dianas farmacológicas, lo que conlleva a la ineficacia o toxicidad que podría causar la muerte (3,4). Además, dichos problemas de variabilidad con respecto a toxicidad en la respuesta del tratamiento, provocan reacciones adversas en un 30-40% de los pacientes. Estos cambios genéticos afectan a una parte significativa de la población (>1%) (4). El avance de la LLA se desarrolla en un corto periodo de tiempo, por ende, es necesario el oportuno tratamiento con éxito terapéutico, el cual se obtiene mediante los avances en la comprensión de su perfil genético, que incluye la respuesta propia de cada paciente a tratar (5). Se reunieron los polimorfismos de la vía metabólica del metotrexato reportados en los últimos diez años, constituyendo una base para futuras investigaciones a nivel experimental, que permitirán determinar las variaciones genéticas que pudieran ser marcadores de respuesta del metotrexato en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de estudio

El presente estudio es una revisión bibliográfica.

Recolección de datos

Se realizó la búsqueda bibliográfica conforme a la pregunta clínica realizada en base a la metodología PICO (Población, Intervención, Control, Desenlace) de “¿cuáles son los polimorfismos que generan un cambio en el efecto terapéutico del metotrexato para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda en pacientes menores de 13 años de edad?”. Los aspectos considerados para la búsqueda de artículos científicos se efectuaron de acuerdo a los términos MeSH (20 artículos) y términos libres (111 artículos) en los gestores de búsqueda como: PubMed (117 artículos), ScienceDirect (13 artículos) y SciELO (1 artículo). De dicha búsqueda se obtuvo un total de 131 artículos. Consiguientemente se llevó a cabo la selección de artículos en 3 fases:

Primera Fase: Se procedió al empleo de la plataforma Rayyan qcri (<http://rayyan.ai/>) en donde se insertaron los respectivos criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de exclusión: aquellos pacientes menores de 13 años que sufran patologías diferentes a la leucemia linfoblástica aguda a pesar de incluir dentro de su tratamiento al metotrexato, así como pacientes adultos y los polimorfismos relacionados a otros fármacos diferentes al metotrexato. Dentro de estas características resultaron 55 artículos.

Criterios de inclusión: aquellos pacientes menores de 13 años (tomando en cuenta la edad media de la población de estudio), que padecen de leucemia linfoblástica aguda y la intervención del metotrexato dentro de su tratamiento. Otro punto que se consideró fueron aquellos artículos publicados a partir del 2011 hasta el año 2021. En base a tales criterios, se obtuvieron 42 artículos.

Criterios “Discusión adicional previa inclusión”: Se presentaron 34 artículos, los cuales fueron discutidos y se resolvió mediante la eliminación de los mismos debido a la reducida relevancia con el tema.

Posteriormente se procedió a la lectura del resumen de cada artículo para verificar la relación con el tema a tratar, así mismo se eliminaron aquellos artículos que se repetían. En dicha fase se obtuvieron 36 artículos.

Segunda fase: Se determinó la calidad de la información en base a la plataforma Scimago (<https://www.scimagojr.com/>), dependiendo de la ubicación del cuartil, siendo Q1 el de mayor calidad y Q4 de baja calidad. En este caso, se escogieron aquellos artículos cuyas revistas se ubican en los cuartiles Q1 y Q2 (22 artículos), en los casos de Q3, Q4 y NA (14 artículos) se rechazaron por baja o nula confiabilidad. Tercera fase: Se seleccionaron los artículos de acuerdo al gen y polimorfismo, además se ejecutó la lectura completa de cada artículo. Se obtuvieron 22 artículos en total.

Las técnicas que presentaron estos 22 artículos fueron: PCR (9 artículos), qPCR-TaqMan (5 artículos), RT-PCR (3 artículos), PCR-RFLP (2 artículos), MassArray (2 artículos) y combinación de qPCR y PCR (1 artículo). En cuanto a los tipos de estudios que abarcan dichos artículos fueron: cohorte (10 artículos), observacional (3 artículos), casos y controles (3 artículos), retrospectivo (3 artículos), transversal (1 artículo), estudio farmacogenético (1 artículo), y meta-análisis (1 artículo).

La información obtenida en la selección de estudios se ubicó en tablas, tomando en cuenta los datos: gen, variante, alelo, frecuencias, población de estudio, tipo de estudio, dosis, respuesta farmacológica (eficacia o toxicidad), RAM, fuentes bibliográficas y tratamientos. En la sección de frecuencias, se empleó la plataforma NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), en donde la búsqueda se efectuó de acuerdo al SNP tanto en la población global como en Latinoamérica; en cuanto a la frecuencia latinoamericana, se realizó

en base a Latin American individuals with mostly European and Native American Ancestry.

RESULTADOS

En los 22 artículos seleccionados se identificaron los polimorfismos relacionados en la vía metabólica

del MTX en niños con LLA (Anexo 1). Los genes que reportaron algún tipo de toxicidad, eficacia u otra respuesta fueron SLC19A1, SLC01B1, TYMS, MTHFR, DHFR, ABCC2, GGH y ARID5B (Tabla 1).

TABLA 1.
Tabla resumen de polimorfismos genéticos del metotrexato en niños con leucemia linfoblástica aguda reportados entre 2011-2021.

Gen	Variante	Alelo	Población de estudio	Respuesta
SLC19A1	rs1051266	G> A	148 niños serbios y europeos (6), 74 niños iraníes (7) y 499 niños españoles (8)	Toxicidad
SLC19A1	rs4909237	C> T	167 niños españoles (9)	Toxicidad
SLC01B1	rs4149056	T> C	38 niños malayos (10) y 699 niños europeos, africanos, asiáticos, americanos nativos (11)	Toxicidad
SLC01B1	rs11045879	T> C	115 niños españoles (12)	Toxicidad
SLC01B1	rs4149081	G> A	115 niños españoles (12) y 280 niños chinos (13)	Toxicidad
TYMS	rs151264360	D> I*	64 niños jordanos (14) y (15)	Toxicidad
TYMS	rs2790	A> G	64 niños jordanos (14)	Toxicidad
TYMS	rs34489327	I> D*	148 niños serbios y europeos (6)	Toxicidad
MTHFR	rs1801133	C> T	64 niños jordanos (15), 74 niños iraníes (7) y 47 niños polacos (16)	Toxicidad
MTHFR	rs1801131	A> C	64 niños jordanos (15) y 47 niños polacos (16)	Toxicidad
DHFR	rs70991108	I> D	499 niños españoles (8) y 64 niños jordanos (15)	Toxicidad
DHFR	rs408626	A> G	70 niños hindúes (17)	Ineficacia y Toxicidad
DHFR	rs442767	C> A	70 niños hindúes (17) y 499 niños españoles (8)	Toxicidad
ABCC2	rs717620	C> T	38 niños malayos (10) y 112 niños malayos, chinos e indios (13)	Toxicidad
ABCC2	rs2273697	G> A	65 niños iraníes (18)	Toxicidad
ABCC2	rs3740066	C> T	65 niños iraníes (18)	Toxicidad
ARID5B	rs4948496	T> C	38 niños malayos, chinos e hindúes (10) y 118 niños húngaros (19)	Toxicidad
GGH	rs11545078	C> T	96 niños chinos (20)	Toxicidad
GGH	rs3758149	C> T	105 niños tailandeses (21)	Toxicidad

Nota. * I (inserción) y D (deleción).

TABLA 2.
Polimorfismos asociados a reacciones adversas debido
a la administración de metotrexato en niños con leucemia
linfoblástica aguda.

Gen	Variante	Alelo	PRAM
SLC19A1	rs4909237	C> T	Reporta lenta eliminación del MTX biliar y urinario lo que conlleva a la acumulación del fármaco en el plasma (9)
SLC19A1	rs1051266	G> A	Reporta eliminación lenta del MTX y hepatotoxicidad de grado 2 (6), aumento de la toxicidad hepática (7) y mucositis grado ≥ 2 (8)
SLC01B1	rs4149056	T> C	Reporta leucopenia, aumento de ALT y trombocitopenia (10) y aclaramiento reducido de MTX (11)
SLC01B1	rs11045879	T> C	Reporta lento aclaramiento de MTX, así como toxicidad hepática, vómitos, mucositis, renal, diarrea e hiperbilirrubinemia (12)
SLC01B1	rs4149081	G> A	Reporta retraso en el aclaramiento de MTX, conduciendo a hepatotoxicidad, vómitos, mucositis, renal, diarrea e hiperbilirrubinemia (12)
TYMS	rs151264360	D> I	Reporta mayor riesgo a desarrollar neutropenia grave (15) y toxicidad hematológica (14)
TYMS	rs2790	A> G	Reporta trombocitopenia (14)
TYMS	rs34489327	I> D	Reporta mayor probabilidad de toxicidad gastrointestinal (6)
MTHFR	rs1801133	C> T	Reporta mayor riesgo de desarrollar leucopenia grave (15), el genotipo T/T está asociado a toxicidad hematopoyética (7) y menor aclaramiento de MTX y mayor incidencia de toxicidad (hepatotoxicidad, mielotoxicidad y neurotoxicidad), portadores del haplotipo 677T, 677CT/1298AC y 677TT/1298AA son susceptibles a mayor toxicidad (16)
MTHFR	rs1801131	A> C	Reporta mayor riesgo de desarrollar neutropenia grave (15) y eliminación prolongada de MTX, hepatotoxicidad, mielotoxicidad y neurotoxicidad en portadores del haplotipo 1298C, 677CT/1298AC y 677TT/1298AA (16)
DHFR	rs70991108	I> D	Reporta trombocitopenia (8) y mayor riesgo de desarrollar leucopenia grave (15)
DHFR	rs408626	A> G	Reporta ineficacia (mayor riesgo de recaída de LLA), así como asociación con leucopenia grave (17)
DHFR	rs442767	C> A	Reporta leucopenia grave (17) y neutropenia grave (8)
ABCC2	rs717620	C> T	Reporta leucopenia grado I-IV (10)
ABCC2	rs2273697	G> A	Reporta hepatotoxicidad (18)
ABCC2	rs3740066	C> T	Reporta toxicidad gastrointestinal (18)
ARID5B	rs4948496	T> C	Reporta leucopenia, aumento de ALT y trombocitopenia (10) y se asocia significativa con los niveles séricos de MTX (acumulación de 7-OH-MTX) (19)
GGH	rs11545078	C> T	Reporta hepatotoxicidad y mucositis grado ≥ 2 (20)
GGH	rs3758149	C> T	Reporta leucopenia grado III-IV y trombocitopenia de grado II-IV y III-IV (21)
Nota. I (inserción) y D (delección). 7-OH-MTX (7-hidroximetotrexato).			



La mayor parte de polimorfismos identificados reportaron asociación a algún tipo de toxicidad y dentro de este grupo, los de mayor enfoque fueron SLC19A1 rs1051266 G> A, SLC01B1 rs4149056 T> C y rs4149081 G> A, TYMS rs151264360 D> I, MTHFR rs1801133 C> T, MTHFR rs1801131 A> C, DHFR rs442767 C> A, ABCC2 rs717620 C> T y ARID5B rs4948496 T> C (Anexo 1).

Las reacciones adversas reportadas fueron leucopenia, hepatotoxicidad, mucositis, lento aclaramiento del MTX, neutropenia, aumento de alanina aminotransferasa (ALT), trombocitopenia, toxicidad gastrointestinal, mielotoxicidad, toxicidad hematopoyética, neurotoxicidad, vómitos, mucositis, erupción cutánea, toxicidad renal, diarrea e hiperbilirrubinemia, siendo las cinco primeras de mayor mención (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Asociación de polimorfismos relacionados a la respuesta del MTX

El gen SLC19A1 codifica uno de los principales transportadores de entrada del MTX, por lo que se identificó el SNP rs1051266 G> A. Los estudios de Esmaili et al., Kotur et al., Salazar et al. (6-8), indicaron toxicidad, reportando entre las reacciones adversas a la hepatotoxicidad, lento aclaramiento del MTX y mucositis. Al igual que en otro estudio de 500 niños, en donde se identificó el aumento de hepatotoxicidad relacionada a la misma variante, específicamente relacionado con el genotipo homocigoto G/G (22).

En un estudio en donde estuvieron involucrados 356 pacientes, se evidenció que la acumulación de MTXPG, significativamente mayor en la LLA-B, debido a que posee una mayor expresión de RFC (SLC19A1) (23). De la misma manera en otro estudio se muestra que el grado de poliglutamación por MTX que aparece más en LLA tipo B, así como la presencia de polimorfismos en SLC19A1, que provee

una disminución del transporte de MTX y conlleva a un lento aclaramiento (24). De igual manera se señala que el polimorfismo rs1051266 puede afectar la gravedad de las toxicidades, incluso alude que el alelo A genera mayor toxicidad (25).

La actual revisión identificó toxicidad debido a polimorfismos como SLC01B1 rs4149056 T> C y rs4149081 G> A (10-13). En otra revisión, se identificó que el polimorfismo rs4149056 T> C incrementó la toxicidad del MTX en un estudio realizado a 499 pacientes pediátricos; mientras que el polimorfismo rs4149081 G> A aumentó los niveles plasmáticos de MTX en una población de 280 niños con LLA (22). Las variantes de rs4149081 y rs4149056 influyen en el aclaramiento de MTX (26). En un estudio de cohorte con suficiente poder estadístico de 499 infantes, se observó la asociación del aclaramiento lento y el polimorfismo rs4149056 (27).

En el gen TYMS, los polimorfismos rs34743033 y rs2790 están asociados con una exposición disminuida y menor al MTX (28). Se observó en una población de 53 niños que el SNP rs34743033 se vincula estrechamente con la estomatitis en la administración de HDMTX (29). Los resultados manifiestan una significancia del polimorfismo rs151264360 D> I (14,15), aunque no lo mencionan en otras revisiones, siendo el presente trabajo el primero en citar su relación con MTX en niños con LLA.

Dentro de los diferentes genes que codifican proteínas claves en el metabolismo del MTX, el MTHFR ha involucrado una alta gama de estudios y de los cuales se destacan dos variantes: rs1801133 C> T (7,15,16,30) y rs1801131 A> C (15,16,30). En un análisis de 93 pacientes que portaban rs1801133 C> T se observó mayor vulnerabilidad a la mucositis oral, leucopenia y trombocitopenia, de aquellos que portaban rs1801131 A> C, quienes tenían mayor riesgo para desarrollar anemia y leucopenia (30).

En otra revisión bibliográfica, una de las variantes más estudiadas en la farmacogenética del MTX fue rs1801133 en el gen MTHFR, en donde el alelo

T está asociado con toxicidad, aunque en algunos de los estudios recopilados no especificaron dicha correlación (26), así mismo en un metaanálisis estadístico no se mostró correlación significativa entre rs1801133 C> T / rs1801131 A> C y la toxicidad de los pacientes, recaídas y/o supervivencia en la quimioterapia con MTX, aunque se observó un mayor riesgo de hepatotoxicidad (31). Un caso particular fue el de un estudio cohorte, en el cual participaron 198 niños eslavos, en donde se identificó toxicidad en presencia de dos variantes en un mismo paciente: la presencia del SNP rs1801133 C> T del gen MTHFR y rs34743033 2R> 3R del gen TYMS se asociaron a leucopenia grado ≥ 2 , mientras que la coexistencia de rs1801133 C> T del gen MTHFR junto con rs2236225 G> A del gen MTHFD1 se relaciona con hepatotoxicidad grado ≥ 2 (32).

En el análisis de Kodidela et al. (17), se reporta ineficacia al tratamiento debido al polimorfismo rs408626 A> G del gen DHFR, específicamente en portadores del genotipo homocigoto para guanina, así como la asociación con leucopenia grave; esto se corrobora con otro estudio de casos y controles (70 y 100 pacientes respectivamente) (33), en donde el polimorfismo rs408626, posee una fuerte asociación con el riesgo de recaída de LLA, presentando un mayor riesgo en portadores con los genotipos homocigotos G/G y T/T; así como mayor probabilidad de mortalidad, también esta asociación se relaciona con DHFR rs34764978, a diferencia de la presente revisión que no reporta alguna relación con el MTX (21). Otro SNP involucrado con el gen DHFR, es el rs442767 C> A, siendo identificado por dos estudios que emplearon una población entre 70 y 499 pacientes pediátricos (8,17), debido a la magnitud de la población puede existir una mayor probabilidad de asociación a toxicidad por MTX. Al contrario de una revisión del año 2018 (22) que no reporta toxicidad relacionada a dicho polimorfismo, aunque su investigación se aplicó a una población de 31 pacientes pediátricos.

A nivel del gen ABCC2 se reportó toxicidad debido al polimorfismo rs717620 C> T dando lugar a leucopenia grave (10), sin embargo, en el estudio realizado en 65

niños (18), este polimorfismo no reportó RAM. En el caso del polimorfismo rs4948496 T> C del gen ARID5B se reportó toxicidad (10,19), no obstante, en otro estudio de cohorte de 406 niños, ha asociado este SNP a recaída (34), por lo que es necesario que los estudios de este polimorfismo abarquen poblaciones mayores con el fin de identificar la variabilidad individual de infantes con LLA expuestos a MTX.

Reacciones adversas relacionadas con polimorfismos en la vía del MTX

Las principales adversidades en el tratamiento con MTX incluyen citopenias, mucositis, toxicidad hepática, toxicidad renal y toxicidad cutánea (35). Otros autores consideran a la nefrotoxicidad, como principal efecto adverso en HDMTX, ya que su metabolito 7-OH-MTX precipita en los túbulos renales provocando disfunción renal (8,36). Sin embargo, en esta revisión no se ha evidenciado dicha nefrotoxicidad, enfatizando otras reacciones adversas previamente mencionadas.

En un estudio de 55 niños se evidenció distintos grados de supresión de la médula ósea y daño en la función hepática, aunque algunos pacientes presentaban daño hepático previo al tratamiento (36). La deposición significativa de MTXPG dentro de los eritrocitos (Ery-MTXPG) de la médula ósea, produce el aumento en Ery-MTXPG por encima del umbral causando mielosupresión y mayores posibilidades de recaída de la enfermedad (37). No obstante, se notifica a la hepatotoxicidad como una de las principales RAMs aunque se desconoce el mecanismo de la lesión hepática inducida por MTX (38). En un estudio de 93 pacientes pediátricos se registran mucositis, nefrotoxicidad y toxicidad cutánea durante la administración de HDMTX (35).

Asociación de toxicidad con protocolos de tratamiento para la LLA

Como se conoce el MTX es un fármaco esencial

durante el tratamiento profiláctico o curativo de LLA (39,40). Este antimetabolito se administra por vía intratecal, intramuscular e intravenosa, además en el régimen terapéutico incluye medidas como hidratación, alcalinización y profilaxis con leucovorina (35,40); en varias guías terapéuticas de la presente revisión incluía estas medidas, al igual que dichas vías de administración previamente mencionadas (Anexo 2).

La importancia de los protocolos terapéuticos señala la implicación del MTX en la fase de consolidación y/o mantenimiento durante el tratamiento para la LLA, administrando en la mayor parte de los casos HDMTX (5 g/m²) (Anexo 2). Huang et al. (36), alude que la principal causa de la retirada del tratamiento, no es la falta de eficacia sino la toxicidad producida por altas dosis, aunque la exposición a HDMTX también puede inducir resistencia adquirida (39). Además, en un estudio de 51 niños japoneses expuestos a dichas dosis, se ha determinado que la corta duración de la prehidratación es un factor de riesgo importante en las concentraciones altas y prolongadas de MTX, así como la disfunción renal; determinando qué el alelo T en MTHFR rs1801133 fue el factor de riesgo de la alta y prolongada concentración del MTX, aunque no responsable de la disfunción renal (40).

Polimorfismos relacionados con el MTX en la población de niños con LLA en Latinoamérica

En un estudio de casos y controles los autores refieren que las variantes de los genes GGH (rs1800909, rs3758149), MTHFR (rs1801133), MTHFD1 (rs2236225), ATIC (rs4673993), ARID5B (rs10821936) y CEBPE (rs2239633) se relacionan con el riesgo a desarrollar LLA-B en una población de la región amazónica brasileña (41). Cabe resaltar que en el estudio de De Carvalho et al. (42), muestran que los polimorfismos MTHFR (rs1801133), MTHFD1 (rs2236225) y MTRR (rs1801394) se han asociado con recaídas y toxicidad debida al MTX, así también el alelo G de la variante rs2306283 del gen SLC01B1, produce el incremento de casi tres veces el riesgo de toxicidad grave en el

SNC durante la fase de consolidación del tratamiento de LLA; incluso los niños hispanos presentan peores resultados a diferencia de los niños europeos, debido al incremento de la frecuencia de variantes en el linaje germinativo, a pesar de ello, se encontró que el perfil genético latinoamericano es más similar a las poblaciones estadounidenses y del sur de Asia, debido a las migraciones humanas.

Por otro lado, en la población pediátrica mexicana se determinó que los polimorfismos como COL18A1 rs2274808, SLC19A1 rs2838956, ABCB1 rs1045642 y ABCC5 rs3792585 se asimilan a un mayor riesgo de LLA (43), de igual manera se identificó la asociación con el SNP XO rs17011368 (44). En otro estudio que involucra a 35 niños mexicanos, refiere que los SNPs rs1128503 de ABCB1 y rs3792585 de ABCC5 no se asocian con el desarrollo de RAM debido al MTX, incluso indican un posible efecto protector frente a la mielosupresión (leucopenia, trombocitopenia y anemia) y en cuanto al SNP del gen XO no involucra toxicidad durante el tratamiento con este antimetabolito, cabe resaltar que las dosis empleadas fueron bajas y moderadas (45).

Se evidenció a nivel de Ecuador en una población de 160 pacientes pediátricos del Instituto Oncológico de SOLCA Cuenca y Loja-Ecuador, una frecuencia genotípica del 75% (C/T) en MTHFR 677C> T (rs1801133) y 82% del genotipo (C/C) en MTHFR 1298 A> C (rs1801131), así mismo la frecuencia alélica del 38% para el alelo mutado T para MTHFR 677C> T y 90% para el alelo mutado C de MTHFR 1298 A> C (46).

Relacionado a lo anterior en comparación con la población caucásica, la frecuencia del alelo MTHFR 677T es de 32,62% y el alelo MTHFR 1298C de 38,41% siendo ésta última mayormente reportada (47). Se puede observar una evidente diferencia de porcentajes entre las poblaciones latinoamericanas y europeas, en el caso de los infantes hispanos existe mayor probabilidad de presentar dichos polimorfismos que conducirán a recaídas o toxicidad durante el tratamiento con MTX.

CONCLUSIONES

Se identificó a los polimorfismos SLC19A1 rs1051266 G> A, SLC01B1 rs4149056 T> C, MTHFR rs1801133 C> T y MTHFR rs1801131 A> C de mayor evidencia, siendo los mismos necesarios en la vía metabólica del metotrexato, lo que conlleva a que pacientes que poseen dichos SNPs, tengan una alta probabilidad de toxicidad, particularmente aquellos tratados con altas dosis, de igual manera interviene la variabilidad entre las distintas poblaciones. Por otra parte, en cuanto a la eficacia, no se identificó algún tipo de polimorfismo relacionado con la misma.

El aclaramiento reducido se asocia con la presencia de polimorfismos rs1051266 G> A, rs1801133 C> T y rs4149056 T> C; así mismo reacciones adversas como hepatotoxicidad y mucositis se relacionan con rs1051266, mientras que rs1801133 se asocia a hepatotoxicidad y rs4149056 se vincula con leucopenia y hepatotoxicidad. En el caso de rs1801131 A> C se manifiesta neutropenia, hepatotoxicidad, mielotoxicidad y neurotoxicidad. Aunque se sugieren más estudios para la relación de estos polimorfismos

con las RAM anteriormente mencionadas en el tratamiento con metotrexato. De este modo, se incentiva la investigación a nivel de la población ecuatoriana hacia una terapia personalizada con metotrexato en niños con leucemia linfoblástica aguda. Se recomienda la realización de estudios de frecuencias alélicas a nivel global y latinoamericano de polimorfismos como: rs1801133 C> T, rs1801131 A> C, rs3737966 G> A, rs34743033 2R> 3R, rs34489327 I> D, rs408626 A> G, rs442767 C> A, rs34764978 C> T, rs2231142 C> A, rs3758149 C> T y rs1544105 G> A, ya que algunos de ellos están asociados con la toxicidad del MTX. Es necesario la elaboración de estudios que identifiquen polimorfismos en pacientes latinoamericanos y su asociación con el metotrexato debido a que los reportes recientes denominan a dicha población mayormente vulnerable. Se recomienda que los estudios abarquen una población suficientemente mayor para comprobación de algún tipo de asociación con las reacciones adversas del MTX especialmente aquellos que aún no han tenido relevancia por la falta de estudios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Jacuinde A. Leucemia linfoblástica aguda: una revisión para la atención primaria. *Revista Ocronos*. 2020; 3(8). ISSN: 2603-8358
- Jiménez S, Hidalgo A, Ramírez J. Leucemia linfoblástica aguda infantil: una aproximación genómica. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 2017; 74(1). <https://doi.org/10.1016/j.bmhmx.2016.07.007>
- Lassaletta A. Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatría Integral*. 2016; 2(6). <https://www.pediatriaintegral.es/wp-content/uploads/2012/xvi06/03/453-462%20Leucemia.pdf>
- Puentes Y, Amariles P, Aristizábal B, Pinto L, Calleja M. Farmacogenómica de etanercept, infliximab, adalimumab y metotrexato en artritis reumatoide. Revisión estructurada. *Revista Colombiana de Reumatología*. 2017; 25(1). <https://doi.org/10.1016/j.rcreu.2017.08.004>
- López G. Leucemia linfoblástica aguda: mecanismos genéticos. *Revista Hematología Mexico*. 2019; 20(4). <https://doi.org/10.24245/rhematolxv20i4.3516>
- Kotur N, Lazic J, Ristivojevic B, Stankovic B, Gasic V, Dokmanovic L, et al. Pharmacogenomic Markers of Methotrexate Response in the Consolidation Phase of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment. *Genes*. 2020; 11(4). <https://doi.org/10.3390/genes11040468>
- Esmaili M, Kazemi A, Faranoush , Mellstedt H, Farhad Z, Safa M, et al. Polymorphisms within methotrexate pathway genes: Relationship between plasma methotrexate levels, toxicity experienced and outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2020; 23(6). doi: 10.22038/IJBMS.2020.41754.9858
- Salazar J, Altes A, Del Rio E, Estella J, Rives S, Tasso M, et al. Methotrexate consolidation treatment according to pharmacogenetics of MTHFR ameliorates event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *The Pharmacogenomics Journal*. 2012; 12. <https://doi.org/10.1038/tpj.2011.25>
- Iparraguirre L, Gutierrez A, Umerez M, Martin I, Astigarraga I, Navajas A, et al. MiR-pharmacogenetics of methotrexate in childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenetics and genomics*. 2016; 26(11). doi: 10.1097/FPC.0000000000000245
- Razali R, Noorizhab M, Jamari H, James R, Teh K, Ibrahim H, et al. Association of ABCC2 with levels and toxicity of methotrexate in Malaysian Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Pediatric hematology and oncology*. 2020; 37(3). <https://doi.org/10.1080/0888018.2019.1705949>
- Ramsey L, Bruun G, Yang W, Treviño L, Vattali S, Scheet P, et al. Rare versus common variants in pharmacogenetics: SLCO1B1 variation and methotrexate disposition. *Genome Research*. 2012; 22(1). doi: 10.1101/gr.129668.111
- López E, Martín I, Ballesteros J, Piñan MA, García P, Navajas A, et al. Polymorphisms of the SLCO1B1 gene predict methotrexate-related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2011; 57(4). <https://doi.org/10.1002/pbc.23074>
- Li J, Wang XR, Zhai XW, Wang HS, Qian XW, Miao H, et al. Association of SLCO1B1 gene polymorphisms with toxicity response of high dose methotrexate chemotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015; 8(4). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26131212/>
- Al-Sheikh, Yousef AM, Alshamaseen D, Farhad R. Effects of thymidylate synthase polymorphisms on toxicities associated with high-dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2021; 87(3). <https://doi.org/10.1007/s00280-020-04197-8>
- Yousef AM, Farhad R, Alshamaseen D, Alsheikh A, Zawiah M, Taha K. Folate pathway genetic polymorphisms modulate methotrexate-induced toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2019; 83(4). <https://doi.org/10.1007/s00280-019-03776-8>
- Kaluźna , Strauss E, Zająć-Spychała O, Gowin E, Świątek-Kościelna B, Nowak J, et al. Functional variants of gene encoding folate metabolizing enzyme and methotrexate-related toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *European Journal of Pharmacology*. 2015; 769. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.10.058>
- Kodidela S, Pradhan S, Dubashi B, Basu D. Influence of dihydrofolate reductase gene polymorphisms rs408626 (-317A>G) and rs442767 (-680C>A) on the outcome of methotrexate-based maintenance therapy in South Indian patients with acute lymphoblastic leukemia. *European journal of clinical pharmacology*. 2015; 71(11). <https://doi.org/10.1007/s00228-015-1930-z>
- Sharifi, Bahoush G, Zaker F, Ansari S, Rafsanjani K, Sharafi H. Association of -24CT, 1249GA, and 3972CT ABCC2 Gene Polymorphisms with Methotrexate Serum Levels and Toxic Side Effects in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatric hematology and oncology*. 2014; 31(2). <https://doi.org/10.3109/08880018.2013.870625>
- Csordas K, Lautner-Csorba O, Semsei A, Harnos A, Hegyi M, Erdelyi D, et al. Associations of novel genetic variations in the folate-related and ARID5B genes with the pharmacokinetics and toxicity of high-

dose methotrexate in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology*. 2014; 166(3). <https://doi.org/10.1111/bjh.12886>

20. Chen X, Wen F, Yue L, Li C. Genetic Polymorphism of γ -Glutamyl Hydrolase in Chinese Acute Leukemia Children and Identification of a Novel Double Nonsynonymous Mutation. *Pediatric hematology and oncology*. 2012; 29(4). <https://doi.org/10.3109/08880018.2012.657767>

21. Koomdee N, Hongeng S, Apibal S, Pakakasama S. Association Between Polymorphisms of Dihydrofolate Reductase and Gamma Glutamyl Hydrolase Genes and Toxicity of High Dose Methotrexate in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012; 13(7). <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.7.3461>

22. Giletti, A; Esperon, P. Genetic markers in methotrexate treatments. *Pharmacogenomics*. 2018; 18. <https://doi.org/10.1038/s41397-018-0047-z>

23. Panetta , Sparreboom A, Pui CH, Relling M, Evans W. Modeling Mechanisms of In Vivo Variability in Methotrexate Accumulation and Folate Pathway Inhibition in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Plos Computational Biology*. 2010; 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001019>

24. Wu C, Li W. Genomics and pharmacogenomics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2018; 126. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.04.002>

25. Kroll M, Kaupat-Bleckmann K, Möricke A, Altenl J, Schewel D, Stanullal M, et al. Methotrexate-associated toxicity in children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia during consolidation therapy with high dose methotrexate according to ALL-BFM treatment regimen. *Haematologica*. 2020; 105(4). <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.224774>

26. Pavlovic S, Kotur N, Stankovic B, Zukic B, Gasic V, Dokmanovic L. Pharmacogenomic and Pharmacotranscriptomic Profiling of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Paving the Way to Personalized Treatment. *Genes*. 2019; 10(3). <https://doi.org/10.3390/genes10030191>

27. Radtke S, Zolk O, Renner B, Paulides M, Zimmermann M, Möricke A, et al. Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2013; 121(26). <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-480335>

28. Taylor Z, Vang J, Lopez E, Oosterom N, Mikkelsen T, Ramsey L. Systematic Review of Pharmacogenetic Factors That Influence High-

Dose Methotrexate Pharmacokinetics in Pediatric Malignancies. *Cancers*. 2021; 13. <https://doi.org/10.3390/cancers13112837>

29. Suzuki R, Fukushima H, Noguchi E, Tsuchida M, Kiyokawa N, Koike K, et al. Influence of SLC01B1 polymorphism on maintenance therapy for childhood leukemia. *Pediatrics international: official journal of the Japan Pediatric Society*. 2015; 57(4). <https://doi.org/10.1111/ped.12682>

30. Erčulj N, Faganel B, Debeljak , Jazbec J, Dolžan V. Influence of folate pathway polymorphisms on high-dose methotrexate-related toxicity and survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2012; 53(6). <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.639880>

31. Lu S, Zhu X, Li W, Chen H, Zhou D, Zhen Z, et al. Influence of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphism on High-Dose Methotrexate-Related Toxicities in Pediatric Non-Hodgkin Lymphoma Patients. *Frontiers in oncology*. 2021; 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.598226>

32. Yao P, Xia H, Zhang R, Tong R, Xiao H. The influence of MTHFR genetic polymorphisms on adverse reactions after methotrexate in patients with hematological malignancies: a meta-analysis. *Hematology*. 2019; 24(1). <https://doi.org/10.1080/10245332.2018.1500750>

33. Gómez Y, Organista J, Saavedra M, Rivera A, Teran M, Alarcon L, et al. Survival and risk of relapse of acute lymphoblastic leukemia in a Mexican population is affected by dihydrofolate reductase gene polymorphisms. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2012; 3(4). <https://doi.org/10.3892/etm.2012.447>

34. Xu H, Zhao X, Bhojwani D, E S, Goodings C, Zhang H, et al. ARID5B Influences Antimetabolite Drug Sensitivity and Prognosis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2020; 26(1). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0190>

35. Mandal P, Samaddar S, Chandra J, Parakh N, Goel M. Adverse effects with intravenous methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia/lymphoma: a retrospective study. *Indian journal of hematology & blood transfusion: an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion*. 2020; 36(3). <https://doi.org/10.1007/s12288-019-01245-z>

36. Bedoui Y, Guillot X, Selambarom J, Guiraud P, Giry C, Jaffar-Bandjee M, et al. Methotrexate an Old Drug with New Tricks. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20(20). <https://doi.org/10.3390/ijms20205023>

37. Huang Z, Tong HF, Qian JC, Wang JX, Li Y, Min C, et al. Association of folypolyglutamate synthetase (FPGS) gene polymorphism with blood drug concentration as well as adverse reactions of methotrexate in children with acute leukaemia. *Biomedical Research*. 2017; 28(1). ISSN: 0976-1683
38. Wu C, Li W. Genomics and pharmacogenomics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2018; 126. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.04.002>
39. Howard S, McCormick J, Pui CH, Buddington R, Harvey D. Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. *The Oncologist*. 2016; 21(12). <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0164>
40. Levêque D, Becker G, Toussaint E, Fornecker LM, Paillard C. Clinical pharmacokinetics of methotrexate in oncology. *International Journal of Pharmacokinetics*. 2017; 2(2). <https://doi.org/10.4155/ipk-2016-0022>
41. Xue Y, Rong L, Tong N, Wang M, Zhang Z, Fang Y. CCND1 G870A polymorphism is associated with toxicity of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015; 8(9). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26617896/>
42. Yanagimachi , Goto H, Kaneko T, Takuya N, Sasaki K, Takeuchi M, et al. Influence of pre-hydration and pharmacogenetics on plasma methotrexate concentration and renal dysfunction following high-dose methotrexate therapy. *International Journal of Hematology*. 2013; 98(6). <https://doi.org/10.1007/s12185-013-1464-z>
43. Carvalho DC, Wanderley A, Rodrigues F, Ribeiro A, Colares L, Piedade de Souza T, et al. Association of genes ARID5B, CEBPE and folate pathway with acute lymphoblastic leukemia in a population from the Brazilian Amazon region. *Leukemia Research Reports*. 2019; 13. doi: 10.1016/j.lrr.2019.100188
44. De Carvalho D, Wanderley A, Ribeiro dos Santos A, Cordeiro F, Borges Andrade de Sa R, Rodrigues M, et al. Characterization of pharmacogenetic markers related to Acute Lymphoblastic Leukemia toxicity in Amazonian native Americans population. *Scientific reports*. 2020; 10(1). <https://doi.org/10.1016/j.lrr.2019.100188>
45. Zaruma F, Lares I, Lima A, Reyes A, Loera V, Sosa M, et al. Genetic Polymorphisms Associated to Folate Transport as Predictors of Increased Risk for Acute Lymphoblastic Leukemia in Mexican Children. *Frontiers in pharmacology*. 2016; 7(238). <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00238>
46. Zaruma F, Lares I, Reyes A, Loera V, Almanza H, Arias M. Impacto de polimorfismos genéticos de la vía metabólica del metotrexato sobre la sobrevida de niños mexicanos con leucemia linfoblástica aguda (LLA). *Vitae*. 2015; 22(3). doi: <http://dx.doi.org/10.17533/udea.vitae.v22n3a02>
47. Zaruma F, Lares I, Reyes A, Loera V, Chairez I, Sosa M, et al. Association of ABCB1, ABCC5 and xanthine oxidase genetic polymorphisms with methotrexate adverse reactions in Mexican pediatric patients with ALL. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*. 2015; 30(3). <https://doi.org/10.1515/dmpt-2015-0011>
48. Murillo J, Ochoa M, Zaruma F. Frecuencias genotípicas en Niños con Leucemia Linfoblástica Aguda en dos centros Oncológicos. *Oncología (Ecuador)*. 2020; 30(1). <https://doi.org/10.33821/473>
49. Nefic H, Mackic-Djurovic M, Eminovic I. The Frequency of the 677C>T and 1298A>C Polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene in the Population. *Archivos médicos (Sarajevo, Bosnia y Herzegovina)*. 2018; 72(3). doi: 10.5455/medarh.2018.72.164-169
50. Liu SG, Gao C, Zhang RD, Zhao XX, Cui L, Li WJ, et al. Polymorphisms in methotrexate transporters and their relationship to plasma methotrexate levels, toxicity of high-dose methotrexate, and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2017; 8(23). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17781>
51. Oosterom N, Berrevoets M, den Hoed M, Zolk O, Hoerning S, Pluijm S, et al. The role of genetic polymorphisms in the thymidylate synthase (TYMS) gene in methotrexate-induced oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenetics and genomics*. 2018; 28(10). doi: 10.1097/FPC.0000000000000352
52. Wang SM, Zeng WX, Wu WS, Sun LL, Yan D. Association between MTHFR microRNA binding site polymorphisms and methotrexate concentrations in Chinese pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *The journal of gene medicine*. 2017; 19(11). <https://doi.org/10.1002/jgm.2990>
53. Den Hoed , Lopez E, te Winkel M, Tissing W, de Rooij J, Gutierrez A, et al. Genetic and metabolic determinants of methotrexate-induced mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *The pharmacogenomics journal*. 2015; 15(3). <https://doi.org/10.1038/tj.2014.63>
54. Wang Sm, Sun Li, Zeng Wx, Wu Ws, Zhang Gl. Influence of genetic polymorphisms of FPGS, GGH, and MTHFR on serum methotrexate levels in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2014; 74(2). <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2507-8>

Tabla general de polimorfismos genéticos del metotrexato en niños con Leucemia Linfoblástica Aguda reportados desde 2011-2021.

Gen	Variante	Alelo	Frecuencias		# (estudios)	Población de estudio
			Global	Latinoamericana		
SLC46A1	rs56292801	G>A	G=72,45% A=27,55 %	G=54,6% A=45,4 %	1	167 pacientes españoles Edad media: 5 años
SLC19A1	rs4909237	C>T	C=84,67% T=15,33%	C=70,9% T=29,1%	4	167 pacientes españoles Edad media: 5.2 años
SLC19A1	rs1051266	G> A	NA	NA	4	148 pacientes serbios y europeos Edad media: 5.5 años
SLC19A1	rs1051266	G> A	NA	NA	4	74 pacientes iraníes Edad media: 8 años
SLC19A1	rs1051266	G> A	NA	NA	4	322 pacientes chinos Edad media: 4 años
SLC19A1	rs1051266	G> A	NA	NA	4	499 pacientes españoles Edad media: 5 años
SLC01A2	rs78790512	G>A	G=85,55% A=14,45%	G=87,4% A=12,6%	1	167 pacientes españoles Edad media: 5.2 años
SLC01B1	rs4149056	T> C	T=85,05% C=14,95%	T=87,73% C=12,27%	3	38 pacientes malayos, chinos e hindúes Edad media: 2.5 años
SLC01B1	rs4149056	T> C	T=85,05% C=14,95%	T=87,73% C=12,27%	3	322 pacientes chinos. Edad media: 4 años
SLC01B1	rs4149056	T>C	T=85,05% C=14,95%	T=87,73% C=12,27%	3	699 pacientes europeos, africanos, asiáticos, americanos nativos. Edad media: 5.6 años
SLC01B1	rs11045879	T> C	T=82,91% C=17,09%	T=85,13% C=14,87%	1	115 pacientes españoles Edad media: 6 años.
SLC01B1	rs10841753	T> C	T=80,61% C=19,39%	T=75,42% C=24,58%	1	322 pacientes chinos. Edad media: 4 años
SLC01B1	rs2306283	T> C	*A=56,86 G=43,14% T=0%	*A=56,51% G=43,49% T=0%	1	322 pacientes chinos. Edad media: 4 años
SLC01B1	rs4149081	G> A	G=83,14% A=16,86%	G=86,30% A=13,70%	1	115 pacientes españoles Edad media: 6 años
TYMS	rs151264360	bD>I*	NA	NA	3	64 pacientes jordanos Edad media: 7.7 años
TYMS	rs151264360	bD>I*	NA	NA	3	64 pacientes jordanos Edad media: 7.7 años
TYMS	rs151264360	bD>I*	NA	NA	3	117 pacientes holandeses. Edad media: 6 años

Tipo de estudio	Respuesta	Dosis	RAM	QSJR	Referencia
Retrospectivo	No reporta toxicidad o eficacia.	3 y 5 g/m ²	No reporta RAM.****	Q2	(9)
Retrospectivo.	Toxicidad	3 y 5 g/m ²	Reporta lenta eliminación del MTX biliar y urinario lo que conlleva a la acumulación del fármaco en el plasma	Q2	(9)
Casos y controles	Toxicidad	2 y 5 g/m ²	Reporta eliminación lenta del MTX y hepatotoxicidad de grado 2	Q2	(6)
Cohorte	Toxicidad	2 y 4 g/m ²	Reporta aumento de la toxicidad hepática	Q2	(7)
Cohorte retrospectivo	No determina toxicidad o eficacia	2, 3 y 5 g/m ²	No reporta RAM	Q2	(48)
Ensayo clínico	Toxicidad	3 y 5 g/m ²	Reporta que el genotipo G/G se relaciona con mucositis grado ≥ 2	Q1	(8)
Retrospectivo	No determina toxicidad o eficacia	3 o 5 g/m ²	No reporta RAM	Q2	(9)
Cohorte	Toxicidad	5 g/m ²	Reporta leucopenia, aumento de ALT y trombocitopenia	Q2	(10)
Cohorte retrospectivo	No determina toxicidad o eficacia	2,3 y 5 g/m ²	No reporta RAM	Q2	(48)
Cohorte	Toxicidad	2, 2.5, y 5 g/m ²	Asociación con un aclaramiento reducido de MTX	Q1	(11)
Retrospectivo.	Toxicidad	3 o 5 g/m ²	Reporta lento aclaramiento de MTX, así como toxicidad hepática, vómitos, mucositis, renal, diarrea e hiperbilirrubinemia.	Q1	(12)
Cohorte retrospectivo	No determina toxicidad o eficacia	2,3 y 5 g/m ²	No reporta RAM.	Q2	(48)
Cohorte retrospectivo	No determina toxicidad o eficacia	2,3 y 5 g/m ²	No reporta RAM.	Q2	(48)
Retrospectivo	Toxicidad	3 o 5 g/m ²	Asociación en el retardo del aclaramiento de MTX, conduciendo a hepatotoxicidad, vómitos, mucositis, renal, diarrea e hiperbilirrubinemia	Q1	(12)
Observacional transversal, retrospectivo y prospectivo.	Toxicidad	2,5 y 5 g/m ²	Reporta mayor riesgo de desarrollar neutropenia grave	Q1	(15)
Observacional transversal retrospectivo y prospectivo.	Toxicidad	2,5 y 5 g/m ²	Reporta riesgo de toxicidad hematológica (neutropenia y leucopenia de grado 3 y 4) en portadores del alelo dominante (Del).	Q1	(14)
Cohorte prospectivo y retrospectivo	No reporta toxicidad o eficacia	5 g/m ²	No reporta RAM	Q2	(49)

Gen	Variante	Alelo	Frecuencias			Población de estudio
			Global	Latinoamericana	# (estudios)	
TYMS	rs2790	A>G	A=78,40% G=21,60% NA	A=76,82% G=23,18%	1	64 pacientes jordanos Edad media: 7.7 años
TYMS	rs34743033	2R> 3R		NA	2	198 pacientes eslovenos Edad media: 5 años
TYMS	rs34743033	2R> 3R	NA	NA	2	117 pacientes holandeses Edad media: 6 años
TYMS	rs34489327	I>D*	NA	NA	1	148 pacientes serbios y europeos Edad media:5.5 años
MTHFR	rs1801133	C> T	NA	NA	4	64 pacientes jordanos. Edad media: 7.7 años
MTHFR	rs1801133	C> T	NA	NA	4	74 pacientes iraníes. Edad media:8 años.
MTHFR	rs1801133	C> T	NA	NA	4	47 pacientes polacos Edad media: 5 años
MTHFR	rs1801133	C> T	NA	NA	4	198 pacientes eslovenos Edad media: 5 años
MTHFR	rs1801133	A> C	NA	NA	3	64 pacientes jordanos Edad media: 7.7 años
MTHFR	rs1801131	A>C	NA	NA	3	47 pacientes polacos Edad media: 5 años
MTHFR	rs1801131	A>C	NA	NA	3	198 pacientes eslovenos Edad media: 5 años
MTHFR	rs3737966	G> A	NA	NA	1	44 pacientes chinos Edad media: 8 años
MTHFR	rs35134728	DEL/TTC	NA	NA	1	44 pacientes chinos Edad media: 8 años
MTHFD1	rs2236225	G> A	G=56,11% A=43,89%	G=44,52%A=55,48%	1	198 pacientes eslovenos Edad media: 5 años

Tipo de estudio	Respuesta	Dosis	RAM	QSJR	Referencia
Observacional transversal retrospectivo y prospectivo	Toxicidad	2,5 y 5 g/m ²	Reporta trombocitopenia.	Q1	(14)
Cohorte	No reporta toxicidad o eficacia	2 y 5 g/m ²	No reporta RAM**	Q2	(32)
Cohorte prospectivo y retrospectivo	No reporta toxicidad o eficacia	5 g/m ²	No reporta RAM***	Q2	(49)
Casos y controles	Toxicidad	2 y 5 g/m ²	Reporta mayor probabilidad de toxicidad gastrointestinal	Q2	(6)
Observacional transversal retrospectivo y prospectivo	Toxicidad	2,5 y 5 g/m ²	Reporta mayor riesgo de desarrollar leucopenia grave	Q1	(15)
Cohorte.	Toxicidad	2 y 4 g/m ²	Reporta que el genotipo T/T está asociado a toxicidad hematopoyética	Q2	(7)
Cohorte	Toxicidad	5 g/m ²	Reporta menor aclaramiento de MTX y mayor incidencia de hepatotoxicidad, mielotoxicidad y neurotoxicidad, en portadores del haplotipo 677T, 677CT/1298AC y 677TT/1298AA	Q1	(16)
Cohorte	No reporta toxicidad o eficacia	2 y 5 g/m ²	No reporta RAM	Q2	(32)
Observacional transversal, retrospectivo y prospectivo	Toxicidad	2,5 y 5 g/m ²	Reporta mayor riesgo de desarrollar neutropenia grave	Q1	(15)
Cohorte	Toxicidad	5 g/m ²	Reporta la eliminación prolongada de MTX, hepatotoxicidad, mielotoxicidad y neurotoxicidad; en portadores del haplotipo 1298C, 677CT/1298AC y 677TT/1298AA	Q1	(16)
Cohorte	No reporta toxicidad o eficacia	2 y 5 g/m ²	No reporta RAM	Q2	(32)
Cohorte	No reporta toxicidad o eficacia	1-5 g/m ²	No reporta RAM	Q1	(50)
Cohorte	No reporta toxicidad o eficacia	1-5 g/m ²	No reporta RAM	Q1	(50)
Cohorte	No reporta toxicidad o eficacia	2 y 5 g/m ²	Reporta que el alelo MTHFD1 1958A redujo significativamente las probabilidades de hepatotoxicidad	Q2	(32)

Gen	Variante	Alelo	Frecuencias			Población de estudio
			Global	Latinoamericana	# (estudios)	
DHFR	rs70991108	A> D*	=66,82% TCG CGC GTC CCG CCC AGG T=0 TGG CGC GTC CCG CCC AGG T=33,18%	=100% TCGC GCGT CCCC CCCA GGT=0 TGCG GCGT CCCC CCCA GGT=0	2	499 pacientes españoles Edad media: 5 años
DHFR	rs70991108	A> D*	=66,82% TCG CGC GTC CCG CCC AGG T=0 TGG CGC GTC CCG CCC AGG T=33,18%	=100% TCGC GCGT CCCC CCCA GGT=0 TGCG GCGT CCCC CCCA GGT=0	2	64 pacientes jordanos Edad media: 7.7 años
DHFR	rs408626	A> G	NA	NA	2	70 pacientes hindúes Edad media: 9 años
DHFR	rs408626	A> G	NA	NA	2	499 pacientes españoles Edad media 5 años
DHFR	rs442767	C> A	NA	NA	2	70 pacientes de hindúes Edad media: 9 años
DHFR	rs442767	C>A	NA	NA	2	499 pacientes españoles Edad media: 5 años
DHFR	rs1650694	C>G	G=84,56% A=5,39% C=10,06% T=0%	G=100% A=0% C=0% T=0%	1	499 pacientes españoles Edad media: 5 años
DHFR	rs34764978	C>T	NA	NA	1	105 pacientes tailandeses Edad media: 5.4 años (Controles: 100 pacientes)
ABCB1	rs1128503	T> C	NA	NA	1	35 pacientes mexicanos Edad media: 6.3 años
ABCC2	rs717620	C>T	C=80,88% T=19,12%	C=85,13% T=14,87%	2	38 pacientes malayos, chinos e hindúes. Edad media: 6 años
ABCC2	rs717620	C>T	C=80,88% T=19,12%	C=85,13% T=14,87%	2	65 pacientes iraníes Edad media: 6 años
ABCC2	rs2273697	G>A	G=80,15% A=19,85%	G=83,85% A=16,15%	1	65 pacientes iraníes Edad media: 6 años
ABCC2	rs3740066	C>T	C= 66,77% T=33,23%	C=92,1 % T=7,9%	1	65 pacientes iraníes Edad media: 6 años

Tipo de estudio	Respuesta	Dosis	RAM	QSJR	Referencia
Ensayo clínico	Toxicidad	3 y 5 g/m ²	Reporta trombocitopenia	Q1	(8)
Observacional transversal, retrospectivo y prospectivo	Toxicidad	2,5 y 5 g/m ²	Reporta mayor riesgo de desarrollar leucopenia grave	Q1	(15)
Cohorte prospectivo	Ineficacia y Toxicidad	15-20 mg/m ²	Reporta para el genotipo G/G ineficacia (mayor riesgo de recaída de LLA), y el genotipo A/A se asocia con leucopenia grave	Q2	(17)
Estudio farmacogenético	No indica toxicidad o eficacia	3 y 5 g/m ²	No reporta RAM	Q1	(8)
Cohorte prospectivo	Toxicidad	15-20 mg/m ²	Reporta leucopenia grave en portadores de genotipo C/A	Q2	(17)
Estudio farmacogenético	Toxicidad	3 y 5 g/m ²	Reporta neutropenia grave	Q1	(8)
Estudio farmacogenético	No indica toxicidad o eficacia	3 y 5 g/m ²	No reporta RAM	Q1	(8)
Casos y Controles	No se determina toxicidad o eficacia	2,5 o 5 g/m ²	No reporta RAM	Q2	(21)
Observacional prospectivo	No se determina toxicidad o eficacia	25-50 mg/m ²	No reporta RAM*****	Q1	(45)
Cohorte	Toxicidad	5 g/m ²	Reporta leucopenia grado I-IV	Q2	(10)
Transversal	No se determina toxicidad o eficacia	2 g/m ²	No reporta RAM	Q2	(18)
Transversal	Toxicidad	2 g/m ²	Hepatotoxicidad	Q2	(18)
Transversal	Toxicidad	2 g/m ²	Toxicidad gastrointestinal	Q2	(18)

Gen	Variante	Alelo	Frecuencias			Población de estudio
			Global	Latinoamericana	# (estudios)	
ABCG2	rs2231142	C>A	NA	NA	1	74 pacientes iraníes Edad media: 8 años
ABCC4	rs7317112	A> G	A=71,37% G=28,63%	A=70,41% G=29,59%	1	134 pacientes holandeses Edad media: 5.3 años
ABCC5	rs9838667	A> C	NA	NA	1	35 pacientes mexicanos Edad media: 6.3 años
ABCC5	rs379258503	T> C	NA	NA	1	35 pacientes mexicanos Edad media: 6.3 años
ARID5B	rs4948496	T> C	T=51,58% C=48,42%	T=34,82 % C=65,18%	2	38 pacientes malayos, chinos e hindúes. Edad media: 6.3 años
ARID5B	rs4948496	T> C	T=51,58% C=48,42%	T=34,82 % C=65,18%	2	118 pacientes húngaros Edad media: 6.4 años
GGH	rs11545078	C>T	C=71,28% T=28,72%	C= 71,4 % T= 28.6 %	1	96 pacientes chinos Edad media: 4.3 años Grupo control: 132 niños sanos
GGH	rs3758149	C> T	NA	NA	2	105 pacientes tailandeses Edad media: 5.4 años Controles: 100 niños sanos
GGH	rs3758149	C> T	NA	NA	2	91 pacientes chinos Edad media: 7.12 años
FPGS	rs1544105	G> A	NA	NA	1	91 pacientes chinos Edad media: 7.12 años
XO	rs17323235	A> G	NA	NA	1	35 pacientes mexicanos Edad media: 6.3 años
XO	rs1701368	A> G	NA	NA	1	35 pacientes mexicanos Edad media: 6.3 años

Nota.

*I (inserción) y D (delección), XO (xantina oxidasa)

^a (alelo dominante es la inserción),

^b (alelo dominante es la delección).

2R (Dos repeticiones en tándem,

3R (tres repeticiones en tándem).

** Reporta que el alelo TYMS 3R redujo significativamente las probabilidades de leucocitopenia y trombocitopenia.

*** Reporta una nula asociación con respecto a Mucositis oral inducida por MTX.

**** No reporta RAM, en este caso el Alelo A reporta un papel protector y a su vez facilita el aclaramiento del MTX

***** Posible protección de mielosupresión

Tipo de estudio	Respuesta	Dosis	RAM	QSJR	Referencia
Cohorte	No se determina toxicidad o eficacia	2 y 4 g/m ²	No reporta RAM	Q2	(7)
Cohorte prospectivo	No se determina toxicidad	5 g/m ²	Mucositis, leucopenia neutropenia	Q1	(51)
Observacional prospectivo	No se determina toxicidad o eficacia	25-50 g/m ²	No reporta RAM	Q1	(45)
Observacional prospectivo	No se determina toxicidad o eficacia	25-50 mg/m ²	No reporta RAM*****	Q1	(45)
Cohorte	Toxicidad	5 g/m ²	Reporta leucopenia, aumento de ALT y trombocitopenia	Q2	(10)
Retrospectivo	Toxicidad	5 o 2 g/m ²	Reporta asociación significativa con los niveles séricos de MTX (Acumulación de 7-OH-MTX)	Q1	(19)
Casos y Controles	Toxicidad	2, 3 o 5 g/m ²	Reporta hepatotoxicidad y mucositis grado ≥2	Q2	(20)
Casos y Controles	Toxicidad	2,5 o 5 g/m ²	Reporta leucopenia grado III-IV y trombocitopenia de grado II-IV y III-IV.	Q2	(21)
Meta-análisis.	No se determina toxicidad o eficacia	1.5, 3 g/m ²	No reporta RAM	Q1	(52)
Meta-análisis.	No se determina toxicidad o eficacia	1.5 y 3 g/m ²	No reporta RAM	Q1	(52)
Observacional prospectivo	No se determina toxicidad o eficacia	25-50 mg/m ²	No reporta RAM	Q1	(45)
Observacional prospectivo	No se determina toxicidad o eficacia	25-50 mg/m ²	No reporta RAM	Q1	(45)

ANEXO 2.

Tabla de protocolos o guías terapéuticas para el tratamiento de la LLA.

Protocolo M	Se basa en 4 infusiones HDMTX (5g/m ² /24h) c/ 2 semanas. Incluye 6-MP oral y ácido folínico 42, 48 y 54 h después del inicio de la administración de HDMTX. Cada administración de HDMTX fue combinada con quimioterapia triple intratecal, (49).
Protocolos LAL-SHOP 94/99 y 2005	Fase de consolidación: 3 dosis de MTX por infusión (3 o 5 g/m ² /24h) con rescate de ácido folínico, 6-MP, citarabina y 4 dosis de triple terapia intratecal (9, 12).
Protocolos IC-BFM 2002 y IC-BFM 2009	Fase de consolidación: 4 dosis puede ser MDMTX o HDMTX (2 o 5 g/m ²). Los pacientes HR reciben HDMTX (protocolo M), los demás MDMTX (protocolo mM) (6).
ALL IC BFM 2009	Fase de consolidación: HD MTX (5 g/m ²) a todos los pacientes, 4 veces en intervalos de 2 semanas (16).
Protocolo St. Jude modificado	Fase de consolidación: MTX 4 veces por perfusión/24 horas con intervalos de 2 semanas durante 8 semanas, donde alto riesgo recibió HD MTX (5g/m ²) y bajo riesgo recibió MD MTX (2,5 g/m ²). Más leucovorina (rescate) y 6-MP. Mantenimiento: MTX + 6-MP + vincristina y prednisona durante dos años (14).
Protocolos BFM90, BFM95 o ICBFM02.	Los pacientes estables y sin afecciones entran en consolidación y reciben infusión de HDMTX. De lo contrario, se retrasa. SR y MR/IR reciben 4 ciclos de HDMTX (5 g/m ²) y 2 g/m ² según ICBFM02 SR/IR protocolo. Los pacientes de los grupos de recursos humanos reciben cuatro (BFM90), tres (BFM95) o dos (ICBFM02) ciclos de HDMTX (5 g/m ²) en la fase de consolidación. Adicional los pacientes reciben terapia de rescate con leucovorina (32)

Protocolo de Berlin Frankfurt Münster (BFM) 2009	Consolidación: administrar ciclofosfamida, 6-MP, MTX en dosis altas (2000-4000 mg/m ² /día), citarabina, y leucovorina. Todos los pacientes reciben cuatro cursos de HDMTX cada 2 semanas durante la consolidación. 2000 mg/m ² /día para bajo riesgo y 4000 mg/m ² /día para pacientes con LLA de células T y de alto riesgo (7)
Protocolo de tratamiento BCH-2003 y CCLG-2008	Fase de consolidación: 4 ciclos de HDMTX cada 2 semanas. El 10% por infusión IV durante 0,5 horas y el 90% restante durante 23,5 horas. Más rescate de leucovorina 15 mg/m ² a las 42 h del inicio de la infusión de HDMTX, y dos veces más, a las 48 y 54 h después de la infusión (48)
Protocolos Total XIIIB y Total XV del St. Jude Children's Research Hospital	Los pacientes de bajo riesgo reciben MTX (2,5 g/m ²) y (5 g/m ²) los grupos estándar y de alto riesgo, para 5 dosis cada 2 semanas durante la fase de consolidación 4 cursos (11, 21). Total, XIIIB: dosis de MTX 2 g/m ² /h en 10 cursos (11)
Protocolo St. Jude modificado	Los pacientes se estratifican según el método St. Jude modificado. protocolo en dos grupos: en la consolidación, los pacientes HR reciben 5 g/m ² de MTX y los pacientes SR reciben 2,5 g/m ² . Durante 8 semanas; MTX 4 veces con 2 semanas intervalos más 6-MP 50 mg/m ² /24h (15)
Protocolo ALL-Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) 2000 y CCLG-ALL-2008	4 ciclos de MTX en dosis altas de 5000 mg/m ² . La décima parte de la dosis se aplica por infusión rápida durante 30 min y el resto mediante infusión continua durante 24 h. Más rescate con leucovorina (15 mg/m ²) e hidratación intravenosa y bicarbonato de (13)
Multicentric protocol-841 (MCP) I2A	La fase de mantenimiento consiste en 6 ciclos MTX y cada ciclo posee una duración de 3 meses. Dosis 15-20 mg/m ² /semana durante terapia de mantenimiento por 2 a 3 años (17)
Protocolo de tratamiento de ALL / SHOP-2005	El protocolo consta de una inducción y consolidación con profilaxis de enfermedades del SNC. Se administra una fase de intensificación temprana en pacientes MR/IR y 5 bloques de intensificación en pacientes HR. El mantenimiento fue de 2 años para todos los pacientes excepto HR. Consolidación bajo riesgo: HDMTX 5 g/m ² (24 horas) x 3 ciclos, citarabina, 6-MP, más 4 ITT y la fase de mantenimiento (2 años), con 6 ciclos: MTX. 20 g/m ² /semana, MP +4 ITT. Las reinducciones (primeros 6 meses) incluye: prednisona (PDN), vincristina (VCR), MTX. 5 g/m ² (24 horas) x 3 ciclos, ARA-C y MP +4 ITT. Consolidación de medio y alto riesgo: MTX. 5 g/m ² (24 horas) x 3 ciclos, ARA-C, MP +4 ITT. La fase de intensificación incluye: MTX g/m ² (24 h) x 1 ciclo, ADR, VCR, DEXA +3 ITT, ASP, CY y ARA-C (8)
Protocolo de Sociedad Pediátrica de la Asociación Médica China 2006	MTX en una dosis alta de 5 g/m ² (para HR y MR-IR) o 3 g/m ² (para SR), duración de 24 horas. Más hidratación y alcalinización al mismo tiempo. Tratamiento de rescate con leucovorina en las 48 horas posteriores al tratamiento con MTX (39)
Protocolo ALLIC BFM 2002 modificado	Los pacientes en estado general satisfactorio, pueden entrar en la consolidación fase y recibir una infusión de 3 ciclos de HD-MTX (3 g/m ²). En pacientes con SR y MR/IR son 4 ciclos de HDMTX (2 g/m ²), y los pacientes en los grupos de HR 2 ciclos de HDMTX (5 g/m ²), (20)
Protocolo Infantil ALL-10	El protocolo M, es un período de tratamiento de 56 días e incluye cuatro ciclos de HDMTX (5 g/m ²). En el día 1, se inicia 6-MP oral durante 56 días. Cada administración de HDMTX se combina con ITT en una dosis estándar ajustada por edad (8-12 mg MTX; arabinósido de citosina y Diadreson F aquosum). El rescate de leucovorina (ácido folínico: 15 g/m ²) cada 6 h, a partir de las 42 h posteriores al inicio de la administración de HDMTX con un mínimo de tres dosis. Se incluye hiperhidratación y el uso de bicarbonato de sodio (51)
Protocolo de ALL-BFM 95 y (IC) -BFM 2002	ALL-BFM 95 involucra (HDMTX 5 g/ m ²) o (IC) -BFM 2002 (MTX 5 g/ m ² y 2 g/ m ²). Consolidación: HDMTX en infusión continua 24 h/ 4 veces. Prehidratación previa HDMTX e hidratación después. Rescate de calcio-leucovorina inicial con dosis de 15 mg/m ² a las 42 h del inicio de la infusión y se administra 2 veces más, 48 y 54 h luego de la infusión (18,19)
Protocolo reportado por (Wang et al., 2017)	Se empleó MTX 1-3 g/m ² (SR y MR/IR) o 3-5 g/m ² (HR). La primera dosis se transfunde por vía intravenosa en 30 minutos. La dosis restante se infunde durante las siguientes 23,5 h. El rescate de leucovorina (15 mg/m ²) se inicia 36 h después de HDMTX y continúa durante al menos seis dosis cada 6 h hasta concentración por debajo de 0,1 μmol/L. Más hidratación y alcalinización intravenosa (50)
Protocolo para LLA riesgo bajo e intermedio según la Asociación Británica Franco-americana	Mantenimiento de 120 semanas. Etapa 1: dosis única MTX (25-50 mg/ m ²) + 6-MP oral 75 mg/ m ² + vincristina (2 mg/m ² /dosis) y dexametasona (8 mg/m ² /día) durante 5 días. Etapa 2: dosis única MTX (25-50 mg/m ²) por la mañana y 6-MP 75 mg/m ² /dosis por la noche (45)
Nota. HDMTX (metotrexato en altas dosis) MDMTX (metotrexato en dosis media) 6-MP (6-mercaptopurina) IIT (terapia triple intratecal) SR (paciente riesgo bajo) MR/IR (paciente riesgo medio / intermedio) HR (paciente alto riesgo)	