

Polimorfismos genéticos y hemopatías malignas

COORDINADORES: A. URBANO. *Barcelona*
D. GALLARDO. *Girona*

VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS A SUSCEPTIBILIDAD A HEMOPATÍAS MALIGNAS

E. BARRAGÁN¹, P. BOLUFER¹,
M. COLLADO¹, M. SANZ²

¹Laboratorio de Biología Molecular. Servicio Análisis Clínicos. ²Servicio de Hematología. Hospital Universitario La Fe. Valencia

Introducción

Las leucemias constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias que se asocian frecuentemente con inestabilidad genética caracterizada por cambios cromosómicos y moleculares que afectan a un 60-80% de los pacientes. Estas alteraciones adquiridas afectan a genes implicados en la diferenciación y proliferación de las células sanguíneas (RARA, MLL, CBF, FLT3) y han sido extensamente asociadas, tanto con la leucemogénesis como con el pronóstico de la enfermedad¹. Sin embargo, poco se conoce respecto a las alteraciones hereditarias y la susceptibilidad genética a leucemia. Al igual que ocurre en otros cánceres, parece que el riesgo de desarrollar leucemia es una compleja interacción entre múltiples variantes genéticas de baja penetrancia, la exposición ambiental a determinados carcinógenos, la dieta y las características individuales del sistema inmunitario.

Los genes que con mayor frecuencia han sido relacionados con la susceptibilidad a desarrollar leucemia pueden ser englobados en tres grandes grupos: genes implicados en el metabolismo de carcinógenos, genes implicados en el metabolismo del folato y genes reparadores del ADN. En la Tabla 1 se detallan estos genes, así como la nomenclatura del polimorfismo, su frecuencia y posible efecto biológico.

Genes implicados en el metabolismo de carcinógenos

Las enzimas metabolizadoras de drogas, carcinógenos y tóxicos ambientales son capaces de degradar sustancias químicas exógenas (xenobióticos) a las cuales se exponen los seres vivos. Constituyen la primera línea de defensa para evitar el ingreso de sustancias potencialmente nocivas al interior del organismo y se caracterizan por su amplia especificidad de sustrato, son fácilmente inducibles o inhibibles por los propios xenobióticos y presentan un alto grado de polimorfismo genético. Estas variaciones genéticas en combinación con la exposición a tóxicos podrían conferir un ma-

yor riesgo de desarrollar leucemia, especialmente en los niños, debido a la exposición diferencial y/o inmadurez fisiológica, o en pacientes con cáncer sometidos a tratamiento citotóxico intensivo.

Se han descrito polimorfismos en los genes que codifican la superfamilia de citocromos implicados en la fase I del metabolismo, la quinona óxido-reductasa, que actúa en el metabolismo de los radicales libres, y la familia de enzimas glutatión-S-transferasas, que están implicadas en la fase II del metabolismo.

Citocromos

Una de las principales enzimas implicadas en el metabolismo de drogas es el citocromo P450 (CYP). Aunque la principal función del CYP es participar en reacciones de detoxificación transformando un compuesto farmacológicamente activo en inactivo, excretándolo por la orina, también participa en procesos de activación metabólica, de manera que compuestos inertes y poco reactivos son convertidos en otros de gran reactividad química que son tóxicos para el organismo.

Los polimorfismos en los citocromos *CYP1A1*, *CYP3A4* y *CYP3A5* se han estudiado en relación con su posible participación en el desarrollo de la leucemia.

En el gen *CYP1A1* se han estudiado los polimorfismos: *CYP1A1*2A*, localizado en la región 3' no traducida (UTR) que aumenta la expresión CYP, y *CYP1A1*2B*, que da lugar a una sustitución I462V localizada en el sitio de unión de *CYP1A1* y aumenta la actividad de la enzima. El alelo *CYP1A1*4* causa una sustitución T461N aunque su efecto biológico es desconocido.

La enzima *CYP3A4* es la isoforma más abundante en el hígado humano adulto. Para *CYP3A4*, existen 38 polimorfismos conocidos diferentes. El polimorfismo *CYP3A4*1B* consiste en un cambio A290G en la región del promotor. El papel de este polimorfismo es controvertido; inicialmente se propuso que podía disminuir la transcripción, pero estudios más recientes indican que el alelo *CYP3A4*1B* muestra una transcripción más elevada que el alelo normal. El *CYP3A5* se expresa fundamentalmente en el hígado y tiene 22 variantes polimórficas descritas. Las variantes *CYP3A5*3* y *CYP3A5*6* inducen un sitio de *splicing* que disminuye sustancialmente el contenido hepático de *CYP3A*.

Polimorfismos CYP y leucemia

Un estudio realizado en leucemia mieloblástica aguda (LMA) y leucemia secundaria (LS) muestra que el alelo *CYP3A4*1B* tiene una frecuencia más baja en pacientes con LS que en pacientes con LMA *de novo*².

Tabla 1. Polimorfismos genéticos relacionados con la leucemia

Papel biológico	GEN (locus)	OMIN	Polimorfismo	Efecto	dbSNP ID / SNP500Cancer ID	Frecuencia polimorfismo (%)	Efecto biológico	
Fase I del metabolismo	CYP1A1 (15q22-q24)	108330	CYP1A1*2A T6235C		rs4646903	12-16	Aumenta expresión	
			CYP1A1*2B A4889G	I462V	rs1048943	8-9	Aumenta expresión	
			CYP1A1*4 C4887A	T461N	rs1799814	10	?	
	CYP3A4 (7q22.1)	124010	CYP3A4*1B/V -A290G	Promotor	rs2740574	22	¿Reduce expresión?	
	CYP3A5 (7q22.1)	605325	CYP3A5*3 A-J	Variantes splicing				Reduce act. enzimática
			CYP3A5*6 14690G>A	Variantes splicing			1-17	Sin efecto o reduce expresión
Fase II del metabolismo	GSTM1 (1p13.3)	138350	delGSTM1	Delección	----/ GSTM1-02	50	Suprime expresión	
	GSTT1 (22q11.2)	600436	delGSTT1	Delección	----/ GSTT1-02	41	Suprime expresión	
	GSTP1 (11q13)	134660	GSTP1*B Ex5-24A>G	I105V	rs947894	54	Reduce act. enzimática	
Radicales libres	NQO1 (11q22.1)	125860	NQO1*2 C609T	P187S	rs1800566	48	Suprime act. enzimática	
			NQO1*3 C465T	R139W	rs4986998	4	Disminuye expresión	
Metabolismo del ácido fólico	MTHFR (1p36.3)	236250	A1298C	E429A	rs1801131	49	Disminuye act. enzimática	
			C667T	A222V	rs1801133	51	Disminuye act. enzimática	
	TYMS (18p11.32)	188350	repeticiones tándem 2R/3R			38-54 (3R)	Aumenta expresión	
Genes Reparadores ADN	RAD51 (15q15.1)	602774	-135C			11	Altera HRC	
	hMSH2 (2p22-p21)	609309	IVS12-6C>T		rs2303428	15	MMR	
	XRCC3 (14q32.3)	600675	Ex8-53C>T	T241M	rs861539	35	HR	
	XPD (19q13.2-q13-3)	278730	Ex23+61A>C	K751Q	rs13181/ ERCC2-03	39	NER	

HR: recombinación homóloga; MMR: reparación de errores de apareamiento; NER: reparación de errores por excisión.

La hipótesis de los autores es que el genotipo normal podría facilitar la producción de ADN dañado por los metabolitos intermedios reactivos. Sin embargo, en posteriores estudios no se ha podido confirmar esta conclusión.

Un estudio de casos y controles realizado en adultos con LMA da cuenta del predominio superior del

alelo *CYP1A1*4* en pacientes que en controles³, lo que confiere un mayor riesgo de leucemia, que es más evidente cuando el genotipo *CYP1A1*4* está combinado con los alelos *CYP1A1*2B* y *delGSTT1*. El polimorfismo *CYP1A1*2B* tiene una incidencia mayor en pacientes con LMA que presentan la mutación NRAS comparado con los que no la presentan.

Krajinovic *et al.*⁴ dan cuenta de una mayor incidencia del alelo *CYP1A1*2A* en niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA) en comparación con los controles. El mayor riesgo conferido por el alelo *CYP1A1*2A* en el desarrollo de LLA se confirma en un reciente metaanálisis⁵.

Quinona óxido-reductasa

La quinona óxido-reductasa (NQO1) es una proteína flavina que convierte las quinonas derivadas del benceno en hidroquinonas y ha sido asociada con hematotoxicidad por benceno y resistencia a la mitomicina C. Se han descrito dos polimorfismos, *NQO1*2* (C609T) y *NQO1*3* (C465T), que producen el cambio de los aminoácidos P187S y R139W, respectivamente. Ambas variantes afectan a la función de la enzima: *NQO1*3* causa una disminución de la actividad enzimática, mientras que *NQO1*2* causa una pérdida completa de la actividad enzimática.

Polimorfismos NQO1 y leucemia

La enzima NQO1 protege contra el envenenamiento por benceno. Así, un estudio de casos y controles realizado en trabajadores expuestos a benceno mostró un riesgo aumentado de hematotoxicidad y leucemia en personas portadoras del alelo *NQO1*2*. La homocigosidad para *NQO1*2* en combinación con el humo del tabaco o el consumo de alcohol aumenta el riesgo de envenenamiento por benceno 8,15 veces en portadores heterocigotos y 21,5 veces en homocigotos⁶.

Varios estudios realizados en adultos en diversos grupos étnicos muestran una asociación del polimorfismo *NQO1*2* con LS. Así, los individuos homocigotos para *NQO1*2* presentan un riesgo de LS 2,6 veces superior al de los individuos que presentaban el alelo normal⁷. Contrariamente a los resultados obtenidos en adultos, un estudio en niños con LLA publicado por Blanco *et al.*⁸ no encuentra diferencias en la incidencia de *NQO1*2* entre pacientes con LS y controles. Las discrepancias observadas entre adultos y niños pueden ser atribuibles a muchos factores, particularmente la terapia empleada para tratar el primer tumor.

En la leucemia aguda (LA) *de novo* también se ha encontrado que el alelo *NQO1*2* es más prevalente en adultos y en niños. La presencia de al menos un alelo *NQO1*2* incrementaba 2,7 veces el riesgo de LLA/*MLL*-positivo. Este resultado fue confirmado en un metaanálisis en el que se analizaba la asociación entre *NQO1* y la LLA en niños⁹.

Glutatión-S-transferasas

Las glutatión-S-transferasas (GST) constituyen una familia de enzimas implicadas en el metabolismo de fase II involucradas en la detoxificación de varios compuestos, incluyendo xenobióticos, agentes cancerígenos ambientales y alguna droga quimioterápica. Catalizan el ataque nucleofílico del glutatión reducido o GSH sobre el centro electrófilo de un gran número de estructuras tóxicas. Se han observado polimorfismos en al menos tres genes de la familia GST: *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1*. Los genes *GSTM1* y *GSTT1* presentan un polimorfismo que consiste en la supresión completa del gen que causa la pérdida de la actividad enzimática. El polimorfismo *GSTP1*B* causa la sustitución de una isoleucina por una valina en el sitio activo de unión electrofílico del péptido GST- π y afecta a la actividad catalítica y la estabilidad térmica de la enzima.

Polimorfismos GST y leucemia

El polimorfismo *GSTP1*B* se ha asociado con LS, pero no con LA *de novo*. Un estudio de casos y controles demuestra que el alelo *GSTP1*B* está significativamente sobrerrepresentado entre los pacientes con LS en relación con los controles¹⁰.

Varios estudios han investigado la influencia de *delGSTM1* y *delGSTT1* en el riesgo de LS, y la mayoría no han encontrado asociación.

En la leucemia *de novo* se ha descrito una débil asociación entre los genotipos *delGSTM1* o *delGSTT1* y el riesgo de LMA y LLA, aunque este riesgo aumenta si *delGSTM1* se combina con *delGSTT1* debido a la ausencia total de actividad de las dos enzimas¹¹.

Genes implicados en el metabolismo de los folatos

El folato está implicado en reacciones que incluyen la síntesis de purinas y pirimidinas, así como la provisión de grupos metilo para la metilación de ADN, ARN y proteínas. Se han propuesto dos mecanismos por los que la deficiencia de folato podría causar malignidad: la hipometilación del ADN, que provocaría la activación de protooncogenes, o bien induciendo la incorporación de uracilo durante la síntesis de ADN.

La metilentetrahidrofolato-reductasa (*MTHFR*) convierte el 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metilentetrahidrofolato, el cual dona un grupo metilo a la homocisteína para que se transforme en metionina durante la síntesis de proteínas. La timidilato-sintetasa (*TS*) cataliza la conversión de uracilo a timina, en la síntesis de ADN.

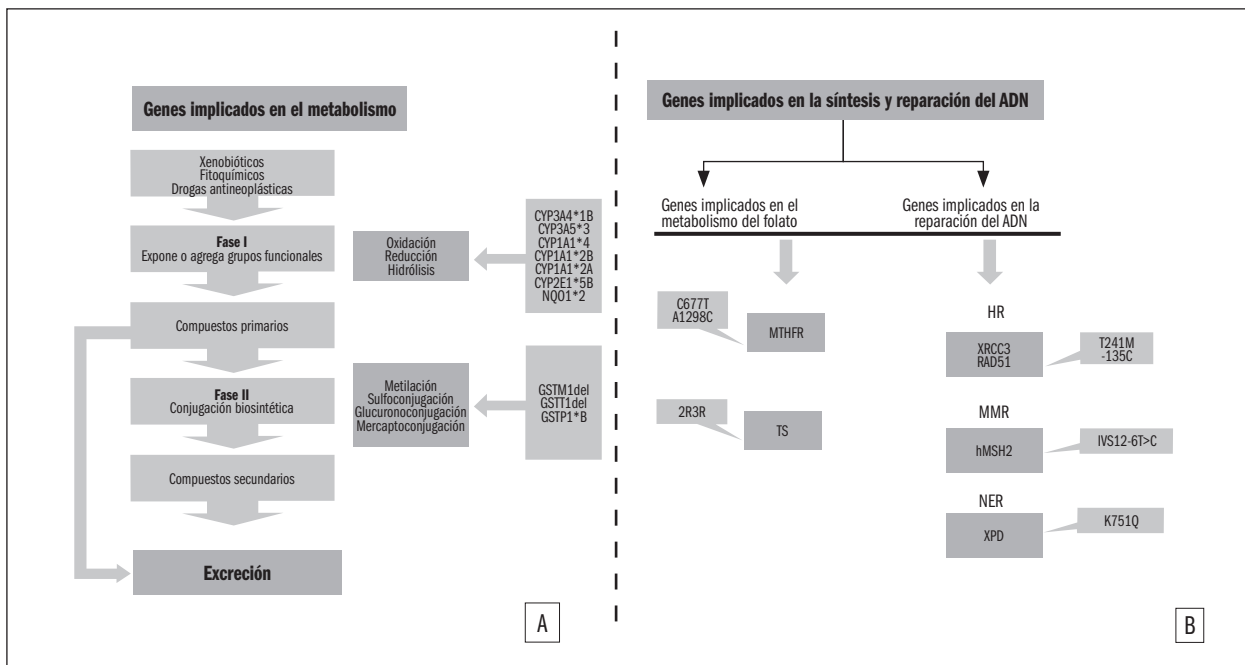


Figura 1. A: genes implicados en el metabolismo de drogas, carcinógenos y xenobióticos; B: genes implicados en la síntesis y reparación del ADN.

En el gen *MTHFR*, el polimorfismo *C677T* supone la sustitución *A222V* que produce una enzima termolábil que causa hiperhomocisteinemia en portadores con bajos niveles plasmáticos de ácido fólico. Un segundo polimorfismo en *A1298C* conduce a una sustitución *E439A*.

Los homocigotos para este polimorfismo muestran una reducción del 61% en la actividad de *MTHFR*. Los dobles heterocigotos (*A1298C* y *C677T*) se han asociado con una reducción de actividad de la enzima en un 50-61%. La *TS* posee un único sitio de repetición interna en tándem en 5' UTR. Este polimorfismo consta de repeticiones en tándem de 28pb en múltiplos de dos (2R) o tres (3R). El polimorfismo 3R aumenta la expresión del gen. Esta hiperexpresión aumentaría la conversión de dUMP en dTMP, disminuyendo los niveles de uracilo.

Polimorfismos *MTHFR*, *TS* y leucemia

En los estudios realizados en LMA no se han visto diferencias significativas de los polimorfismos *MTHFR C677T* y *A1298C*¹². Sin embargo, en la LLA varios estudios han descrito una menor incidencia de estos polimorfismos en los pacientes que en los controles, confiriendo una reducción en el riesgo de LLA¹². Estos mismos resultados se han reportado en diferentes trabajos en la LLA pediátrica, en los que se muestra que el polimorfismo *MTHFR C677T* o su combinación con el polimorfismo *A1298C* confiere un papel

protector contra el desarrollo de LLA¹³. El polimorfismo *TS 3R* también ha sido asociado con la disminución del riesgo de LLA¹⁴.

Genes reparadores del ADN

La maquinaria de reparación del ADN corrige los daños producidos por carcinógenos y otros agentes tóxicos. El primer paso en la reparación es el reconocimiento de los bucles distorsionados en la doble hélice, mediante el mecanismo de reparación de errores de apareamiento (MMR). Cuando sólo una de las dos cadenas del ADN ha sido dañada y la alteración afecta a una sola base, se repara mediante el mecanismo de reparación por excisión de base (BER); si afecta a varias bases, se corrige mediante reparación por excisión de nucleótido (NER). Cuando la rotura afecta a ambas cadenas de ADN, se repara mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la reparación por recombinación homóloga (HR).

Se conocen más de 150 genes reparadores y en éstos son muy frecuentes los polimorfismos. El gen *hMSH2* que interviene en el mecanismo de MMR presenta una variante *IVS12-6 T>C* que afecta al *splicing* del exón 13. En los genes *XRCC3* y *RAD51* que intervienen en la reparación por HR se presentan las variantes *T241M* y *-135C*, respectivamente, que se asocian con la formación de aductos de ADN. El gen *XPD* que interviene en el mecanismo NER presenta el polimorfismo *K751Q*.

Polimorfismos, genes reparadores y leucemia

Muchas de estas variantes producen alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN, de manera que la célula no puede corregir adecuadamente los daños producidos por distintos agentes. Este hecho es especialmente relevante en los pacientes con cáncer sometidos a quimioterapia y radioterapia. Así, se ha descrito un mayor riesgo de LS en pacientes que presentaban los polimorfismos IVS12-6 *MSH2*, T421M *XRCC3*, -135C *RAD51* y K751Q *XPB*¹⁵⁻¹⁷.

Conclusiones y perspectivas futuras

Aunque los datos revisados parecen sugerir que ciertas variantes genéticas están implicadas en la susceptibilidad individual a desarrollar algún tipo particular de leucemia, como *NQO1* en la LA *de novo*, los genes reparadores (*MSH2*, *XRCC3*, *RAD51*, *XPB*) en la LS y los genes del metabolismo del folato (*MTHFR*, *TS*) en la disminución del riesgo de LLA.

Estos resultados deben ser tomados con cautela, ya que muchos han sido realizados sobre un tamaño muestral pequeño y se han analizado un número limitado de polimorfismos. Hoy en día, las técnicas de genotipado masivo de SNP mediante *microarray* permiten realizar estudios de asociación alélica a lo largo de todo el genoma (GWA).

Recientemente, se han publicado dos estudios GWA en los que se analizan miles de polimorfismos en la LLA de niños y la LS^{18,19}. Los resultados confirman que existen variantes genéticas heredadas que contribuyen al riesgo de estas leucemias, aunque no se confirma ninguna de las que se habían reportado en estudios previos individuales. Alguno de los polimorfismos detectados en estos estudios GWA afecta a genes relevantes en el desarrollo hematopoyético, como *IKZF1* en la LLA, pero muchos otros son genes desconocidos o hasta ahora no relacionados con la leucemia.

Referencias bibliográficas

- Gilliland DG. Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. *Semin Hematol.* 2002; 39: 6-11.
- Felix CA, Walker AH, Lange BJ, Williams TM, Winicki NJ, Cheung NKV, et al. Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 13176-81.
- D'Alò F, Voso MT, Guidi F, Massini G, Scardocci A, Sica S, et al. Polymorphisms of CYP1A1 and glutathione S-transferase and susceptibility to adult acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2004; 89: 664-70.
- Krajcinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnett D. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: Influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood.* 1999; 93: 1496-501.
- Vijayakrishnan J, Houlston RS. Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Haematologica.* 2010; 95: 1405-14.
- Wan J, Shi J, Hui L, Wu D, Jin X, Zhao N, et al. Association of genetic polymorphisms in CYP2E1, MPO, NQO1, GSTM1, and GSTT1 genes with benzene poisoning. *Envir Health Pers.* 2002; 110: 1213-8.
- Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T, Kiyoi H, Seto M, Uike N, et al. Analysis of genetic polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 4091-5.
- Blanco JG, Edick MJ, Hancock ML, Winick NJ, Dervieux T, Amylon MD, et al. Genetic polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4 and NQO1 in children who developed therapy-related myeloid malignancies. *Pharmacogenetics.* 2002; 12: 605-11.
- Guha N, Chang JS, Chokkalingam AP, Wiemels JL, Smith MT, Buffler PA. NQO1 Polymorphisms and de novo childhood leukemia: a huge review and meta-analysis. *Am J Epidemiology.* 2008; 168: 1221-32.
- Allan JM, Wild ChP, Rollinson S, Willett EV, Moorman AV, Dovey GJ, et al. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy induced leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 11592-7.
- Rollinson S, Roddam P, Kane E, Roman E, Cartwright R, Jack A, et al. Polymorphic variation within the glutathione S-transferase genes and risk of adult acute leukaemia. *Carcinogenesis.* 2000; 21: 43-7.
- Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Raymond A, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1999; 96: 12810-5.
- Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexanderi FE, Greaves MF; United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2001; 98: 4004-9.
- Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, Shane B, Roberts AC, Law GR, et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002; 99: 3786-91.
- Worrillow LJ, Travis LB, Smith AG, Rollinson S, Smith AJ, Wild ChP, et al. An intron splice acceptor polymorphism in *hMSH2* and risk of leukemia after treatment with chemotherapeutic alkylating agents. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 3012-20.
- Seedhouse C, Faulkner R, Ashraf N, Das-Gupta E, Russell N. Polymorphisms in genes involved in homologous recombination repair interact to increase the risk of developing acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 2675-80.
- Mehta PA, Alonzo TA, Gerbing RB, Elliott JS, Wilke TA, Kennedy RJ, et al. *XPB* Lys751Gln polymorphism: etiology and outcome of childhood acute myeloid leukemia. A Children's Oncology Group report. *Blood.* 2006; 107: 39-45.
- Knight JA, Skol AD, Shinde A, Hastings D, Walgren RA, Shao J, et al. Genome-wide association study to identify novel loci associated with therapy-related myeloid leukemia susceptibility. *Blood.* 2009; 113: 5575-82.
- Treviño LR, Yang W, French D, Hunger SP, Carroll WL, Devadas M, et al. Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2009; 41: 1001-5.

IMPORTANCIA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL SISTEMA INMUNITARIO INNATO EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO

B. MARTÍN-ANTONIO¹, I. ÁLVAREZ-LADERAS², R. CARDESA², F. MÁRQUEZ-MALAVER², D. RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ¹, D. ROMERO¹, A. BÁEZ², M. CARMONA², J. FALANTES², M. SUÁREZ¹, F. FERNÁNDEZ-ÁVILÉS¹, C. MARTÍNEZ¹, M. ROVIRA¹, I. ESPIGADO², Á. URBANO-ISPIZUA¹

¹ Hospital Clínic. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Barcelona. ² Servicio de Hematología. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS)

A pesar del considerable avance en el manejo de complicaciones tras el alo-TPH, la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) y las infecciones siguen siendo una importante causa de morbilidad y mortalidad. Tras el alo-TPH ocurre una respuesta inflamatoria en la que el sistema inmunitario innato (SII) juega un papel clave. Esta respuesta inflamatoria conlleva un efecto perjudicial pero también un efecto beneficioso debido a la actividad antileucémica ejercida por las células del donante. Mantener un balance entre ambos procesos determinará el éxito del alo-TPH. Además de los factores de riesgo conocidos que afectan al pronóstico del alo-TPH, la variabilidad genética constitucional de ambos, donante y receptor, en polimorfismos de un único nucleótido (SNP) en genes del SII, está mostrando resultados prometedores que permitirán en un futuro determinar haplotipos de alto riesgo como un criterio adicional a la compatibilidad HLA entre donante y receptor y poder llevar a cabo las medidas necesarias en el manejo del alo-TPH. Entre los genes del SII, polimorfismos en los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), péptidos antimicrobianos (PAM) y factores reguladores de interferón (IRF) no se han estudiado tanto como genes que codifican para citocinas, a pesar de su importancia en la regulación de la respuesta inflamatoria. Son necesarios estudios de variabilidad genética para determinar haplotipos de alto riesgo y establecer posteriormente el efecto final de un SNP en la proteína producida.

Reacciones biológicas que llevan al desarrollo de la EICH y al efecto antileucémico

Tras el alo-TPH, y debido a los regímenes de acondicionamiento, los tejidos se dañan, permitiendo a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP)

y elementos celulares necróticos penetrar en los tejidos adyacentes y en el torrente sanguíneo para activar los receptores *toll-like* (TLR) en las células del SII y liberar citocinas inflamatorias causando un daño mayor. Las células dendríticas (DC), que contienen antígenos capturados de las células de los tejidos de la mucosa intestinal dañados, se activan por los TLR y migran a los tejidos linfoides, donde maduran, y presentan péptidos a las células T del donante induciendo una respuesta aloantigénica que conlleva la proliferación de células T del donante. En esta proliferación, la interacción de TGF- β con distintas citocinas permitirá la diferenciación a células Th1, Th2 o Th17 pudiendo causar una respuesta inflamatoria o antiinflamatoria^{1,2}. Además, la diferenciación a células T citotóxicas promoverá el efecto antileucémico. Todas estas respuestas incrementan la inflamación, pero también el efecto antileucémico.

La variabilidad genética en las citocinas y otros genes del SII, y su papel en el pronóstico del alo-TPH

Las variaciones genéticas constitucionales pueden ser responsables de un cambio en la producción final de la proteína, pudiendo este cambio servir como posible biomarcador para predecir la EICH aguda (EICHa) y la EICH crónica (EICHc). Cada vez mayor número de estudios de asociación de SNP en citocinas con la EICH muestran la influencia de la variabilidad genética en el pronóstico alo-TPH. Sin embargo, para poder demostrar la asociación de un SNP con el pronóstico alo-TPH es necesario que ésta se valide en otra población de características similares, ya que esta asociación podría estar reflejando las distintas modalidades y protocolos clínicos usados entre distintos grupos. En un análisis apropiado, deben considerarse los factores de riesgo, el tipo de población y los protocolos usados, y los resultados deben validarse en otras poblaciones para poder concluir que un determinado SNP puede conferir una ventaja o desventaja.

En los últimos años se han publicado muchos estudios de asociación de SNP en citocinas con el pronóstico del alo-TPH. Algunos de estos estudios han mostrado un efecto funcional, pero a veces la asociación encontrada ha sido opuesta. Así, en TGF- β , un polimorfismo en el codón 10 que altera la estructura proteica y otro en el receptor se han asociado con el desarrollo de la EICHa en trasplantes de hermano HLA-idéntico; en otra población de diferente edad no influyó en la EICHa. En el receptor, SNP en la *IL-6* e *IFN- γ* que causan una mayor y menor producción de IL-6 y IFN- γ , se asocian con mayor incidencia de EICHa y EICHc y con el riesgo de reactivación de virus de Epstein-Barr tras alo-TPH. Sin embargo, otra

variante (alelo 2) en el *IFN- γ* que lleva a una producción mayor de *IFN- γ* se asocia con menor EICHa. En el receptor antagonista de la IL-1 (*IL-1Ra*), hay una variante que disminuye la producción de la IL-1 e induce menor EICHa severa y menor EICHc cuando está presente en el donante o receptor, respectivamente. En la IL-2, un SNP (T-330-G) en el receptor que aumenta la producción de IL-2 se asocia con mayor frecuencia de EICHa y EICHc en trasplantes de médula ósea no emparentados. Otros estudios en SNP han mostrado la importancia de cómo determinadas variantes en dos citocinas influyen en la interacción entre éstas; así, en la *IL-10*, una variante (IL-10-592A) que aumenta la producción de la IL-10 disminuye la incidencia de EICH y la mortalidad relacionada con el procedimiento (MRT) en trasplantes de hermano HLA-idéntico y donantes con una variante en el receptor de la *IL-10* (IL10RB/c238) confieren protección en pacientes que presentan la variante IL-10-592A reduciendo el riesgo de EICHa, en trasplantes de hermano HLA-idéntico pero no en donantes no emparentados³. Todos estos estudios de SNP en citocinas ponen de manifiesto la importancia de cómo un cambio de un nucleótido puede influir en la producción final de citocinas, o en la interacción entre éstas que finalmente se reflejará en sus funciones. Y, también, cómo el mismo efecto en la producción de la proteína puede llevar a distintas asociaciones en el alo-TPH, indicando la necesidad de tener en cuenta el resto de interacciones y citocinas secretadas por otras células que impactarán en la respuesta final.

Otra citocina del SII cuya variabilidad genética está ganando importancia es el factor inhibidor de la migración de macrófagos (*MIF*). *MIF* es una citocina antigua altamente conservada que actúa como mediador clave del sistema inmunitario promoviendo funciones proinflamatorias; está implicada en la patogenia de la sepsis, en enfermedades inflamatorias y autoinmunes; y contribuye a la progresión de enfermedades malignas y a la formación tumoral^{4,5}. Esto se debe a su interacción con CXCR2 y CXCR4 que proveen a *MIF* de los mecanismos moleculares para la angiogénesis. *MIF* juega un papel importante regulando la producción de TNF- α , y en pacientes con EICHa severa y EICHc los niveles de *MIF* están aumentados. La importancia de la variabilidad genética de *MIF*, se muestra en un SNP (*MIF*-173C) que influye en el pronóstico de pacientes con sepsis severa⁶. Nuestro grupo ha encontrado esta variante asociada con una menor supervivencia global (SG) y libre de enfermedad (SLE) en pacientes de leucemia mieloide aguda que recibieron un alo-TPH y con mayor producción de IL-12 tras infección por CMV en donantes sanos. También hemos detectado un SNP en el receptor de *MIF* (*CXCR2*) (G-149A) en pacientes asociado con menor incidencia de EICHc tras alo-TPH de hermano HLA-idéntico y que causa

mayor producción de la citocina antiinflamatoria IL-13 (datos no publicados). Estos resultados apuntan a *MIF* como un marcador pronóstico para el alo-TPH, siendo necesarios más estudios.

La variabilidad genética en los PRR y su papel en el pronóstico del alo-TPH

Los PRR son claves en la respuesta inmunitaria innata tras el alo-TPH ya que reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) encontrados en la mayoría de microorganismos. Éstos se dividen en distintas clases; muchos de ellos presentan variantes asociadas con el alo-TPH y otros que se han estudiado en otras patologías aún no se han estudiado en el contexto del alo-TPH. En la Tabla 1 se muestran algunas de las asociaciones encontradas en variantes de estos genes con el pronóstico alo-TPH.

Las colectinas, ficolinas y pentraxinas pertenecen a la clase secretada de PRR; se unen a superficies celulares microbianas y activan el sistema del complemento. La lectina de unión a manosa (MBL) es una colectina y su deficiencia es un factor de riesgo para infecciones. En *MBL2* hay tres mutaciones codificantes que dan lugar a una rotura de la unión de los péptidos de la MBL causando una reducción en los niveles séricos de MBL y se han descrito dos SNP en la región promotora, que confieren tres haplotipos, que producen niveles bajos, intermedios o altos de MBL. Estas variantes, que se asocian con menores niveles de MBL en suero, causan mayor riesgo de infecciones tras alo-TPH⁷. Conocer la presencia del haplotipo que produce bajos niveles de MBL podría ayudar a predecir infecciones fúngicas para iniciar con antelación terapias preventivas.

La proteína C-reactiva (PCR) y el componente P de suero amiloide (SAP) son las pentraxinas cortas. En respuesta a mediadores inflamatorios, los tejidos inflamados producen PCR, pero la concentración de SAP se mantiene relativamente estable. Tras el alo-TPH, altos niveles de PCR se asocian con una alta incidencia de infecciones, EICH y MRT⁸ y pacientes que no recaen presentan altos niveles de PCR⁹, sugiriendo un efecto antileucémico mediado por la PCR. Aunque niveles elevados de PCR en plasma se asocian con un riesgo elevado de cáncer, SNP en *PCR* que causan niveles mayores de PCR no se asocian con un riesgo mayor de malignidad¹⁰. En el alo-TPH no hay estudios de asociaciones génicas en *PCR*. *PTX3* es la pentraxina larga. Se libera por neutrófilos, DC y monocitos en respuesta al reconocimiento de patógenos y a la activación de los TLR, y se une a determinados patógenos promoviendo la fagocitosis¹¹. En alo-TPH, la *PTX3* se une a CMV reduciendo la entrada viral y la infectividad, y protege de la infección por *Aspergillus*¹². Nues-

Tabla 1. Polimorfismos en genes de la inmunidad innata en donante y receptor asociados con el pronóstico del alo-TPH

Gen	Polimorfismo	Efecto descrito del polimorfismo/ Comentario sobre el artículo	Efecto del polimorfismo en alo-TPH
MBL2	Codón 52 (alelo D) Codón 54 (alelo B) Codón 57 (alelo C) Promotor 550g/c (alelos H/L) Promotor 221 c/g (alelos X/Y)	Mutaciones codificantes: la que confiere el haplotipo "O" separa los péptidos de la MBL y reduce los niveles de MBL en suero. "A" es el haplotipo beneficioso. Mutaciones promotoras: haplotipos HY, LX y LY Mutaciones promotoras y codificantes: haplotipos HYA, LYA, LXA confieren niveles altos, medios y bajos de MBL	Haplotipo HYA en donante y receptor: menor riesgo de infecciones Mutaciones codificantes en donante y receptor: mayor riesgo de infecciones Mutaciones codificantes en receptores con irradiación corporal total: mayor riesgo de infecciones Haplotipo LXA en donante: mayor riesgo de infecciones fúngicas invasivas
	PTX3	rs1840680: intrón (alelo A)	En receptor: mayor ocurrencia de infecciones
TLR1	G239C (secuencia codificante) A473G (secuencia codificante)	Necesita ser validado en otra población	En receptor: mayor ocurrencia de aspergilosis invasiva
TLR6	C745T (secuencia codificante)		En receptor: mayor ocurrencia de aspergilosis invasiva
TLR4	Haplotipo S4	Validado en una segunda cohorte. Se consideró el estado CMV en el análisis del pronóstico alo-TPH	En donantes no emparentados: aspergilosis invasiva
	Thr399Ile (secuencia codificante)	Necesita ser validado en otra población	En donante y receptor: mayor riesgo de EICHa severa
TLR9	T1486C	Resultados de un estudio prospectivo se confirmaron en uno prospectivo y se apoyaron por una menor expresión de TLR9 en el genotipo CC y por una reconstitución inmunitaria más lenta en pacientes con el genotipo CC	En receptor: mayor MRT, SG y menor recaída
CARD15	SNP8: R702W SNP12: G908R SNP13: L1007fs	Inhibición de la actividad de NOD2 llevando a mayor producción de IL-12 SNP13 en el donante causa casi pérdida completa de función de NOD2/CARD15	En donante y receptor: mayor MRT y de incidencia de EICHa severa, menor SLE y SG En el receptor: mayor recaída y menor SG
NLRP3	rs10925027: T/C (promotor)	El fuerte impacto de este SNP en el multivariado apoya la importancia de estos SNPs en la recaída y en la MRT	Genotipo TT en donante: mayor incidencia de recaída
NLRP2	rs1043684: G/A (3'UTR)		Genotipo GG en donante: mayor incidencia de MRT y menor SG
NLRP1	rs5862 G/A (3'UTR)		Genotipo AA en paciente: mayor incidencia de MRT y menor SG
HAMP	A582G (promotor)	SNP asociado con mayor concentración de hierro en el hígado y niveles de ferritina en suero, pero estos efectos se contrarrestan con una terapia quelante de hierro, lo que indica que son necesarios más estudios	Genotipo GG en pacientes β -talasémicos: mayor concentración de hierro hepático y de niveles de ferritina en suero
	A7032G (intrón)		Genotipo GG en donante: mayor incidencia de infecciones y MRT y menor SG
IRF-3	A-153C (promotor)	El genotipo CC se asocia con menor expresión de IRF-3	Genotipo AA en paciente: mayor incidencia de recaída, que redundará en menor SLE
	Ser427Thr (secuencia codificante)		Genotipo CC en donante: mayor incidencia de EICHC, que redundará en menor SLE y SG

EICHa: enfermedad del injerto contra el huésped aguda; EICHC: enfermedad del injerto contra el huésped crónica; MRT: mortalidad relacionada con el procedimiento; SLE: supervivencia libre de enfermedad; SG: supervivencia global.

tro grupo ha descrito una variante intrónica en la *PTX3* en donante que se asocia con una mayor producción de IL-13 tras un estímulo mitogénico y menor MRT en alo-TPH de hermano HLA-idéntico¹³.

Los TLR pertenecen a la clase transmembrana de los PRR. Los TLR activan las respuestas inmunitarias adaptativas de varias clases de efectores celulares, incluyendo respuestas de anticuerpo de inmu-

noglobulina (Ig)M, IgG y IgA; respuestas celulares de Th1, Th17 y de linfocitos T CD8+. Numerosos estudios han mostrado que la variabilidad genética en los TLR influye en el pronóstico alo-TPH. En *TLR1*, la presencia de un SNP (G239C), o la presencia de ambos (A743G) en *TLR1* y (C745T) en *TLR6*, en donante y paciente se asocia con la aspergilosis invasiva tras alo-TPH¹⁴. En *TLR4*, hay un haplotipo (*S4*) asociado con aspergilosis invasiva en donantes no emparentados y un SNP (Thr399Ile), que en donante y receptor aumenta el riesgo de EICHa severa; y en *TLR9*, una variante (T1486C) en paciente que causa menor expresión de *TLR9*, se asocia con mejor MRT, SG y menor recaída³. El alto número de estudios de variabilidad genética en los TLR confirma la importancia de éstos en el alo-TPH en términos de MRT y también en recaída. La asociación de SNP en TLR con aspergilosis podría ayudar a determinar un haplotipo de alto riesgo para esta infección.

Los receptores similares al gen I inducible de ácido retinoico (RLR) y los receptores que contienen dominios de unión a nucleótido rico en repeticiones de leucina (NLR) forman la tercera clase de PRR. *RLR* reconocen distintos virus activando NF- κ B e IRF-3, y los NLR son sensores intracelulares que detectan patógenos y señales de estrés. NOD1 y NOD2 forman el dominio central, y los dominios CARD o pirinas forman el dominio efector N-terminal. Los NLR con un dominio pirina forman la subfamilia NALP y son los iniciadores de la formación del inflamosoma. La variabilidad en genes del inflamosoma es un factor pronóstico en el alo-TPH de hermano HLA-idéntico. En los NALP una variante en *NLRP3* en el donante influye enormemente en la recaída y variantes en el donante en *NLRP2* y en el paciente en *NLRP1* influyen en la MRT y en la SG¹⁵. En *NOD2/CARD15* existen tres variantes en *CARD15* (R702W, G908R y L1007fs), que inhiben la actividad de NOD2 aumentando la activación de NF- κ B y a la producción de IL-12. En alo-TPH emparentado y no emparentado, estos SNP en donante o en paciente son críticos para la respuesta de macrófagos e impactan negativamente en la SLE y SG, en la MRT, recaída y en la EICHa y, además, se da un efecto aditivo cuando estos SNP están presentes en donante y en receptor³.

Los péptidos antimicrobianos (PAM), un tipo particular de PRR no explorado en el alo-TPH

Los PAM constituyen una primera línea de defensa contra patógenos. Presentan una gran diversidad y están ampliamente distribuidos entre los seres vivos. Actúan desestabilizando la membrana bacteriana llevando a la lisis de patógenos; pero, además de su función antimicrobiana original, la mayoría de PAM pre-

senta otras funciones, como la actividad antitumoral y la transducción de señales. Los PAM se consideran un enlace entre la inmunidad innata y la adaptativa. Las defensinas son un grupo de PAM que se producen por una variedad de células epiteliales y de la mucosa y en el tracto intestinal, y presentan actividad antimicrobiana para proteger el epitelio y las células madre de patógenos virulentos. Una expresión disminuida de las defensinas compromete la inmunidad y puede inducir inflamación. El subgrupo de las β -defensinas (*DEFB1* y *DEFB2*) inhibe la angiogénesis indicando un complejo papel en el desarrollo tumoral. Estudios de variabilidad genética en las β -defensinas han mostrado SNP en *DEFB1* asociados con enfermedades infecciosas^{16,17} y con el fenotipo de enfermedades inflamatorias crónicas¹⁸; aunque hasta la fecha no hay estudios de asociación de SNP en estos genes con el alo-TPH, *NOD2* mediante NF- κ B está implicado en la inducción de *DEFB2* existiendo un SNP en *NOD2* que afecta a su expresión¹⁹.

Entre las β -defensinas encontramos el péptido antimicrobiano hepcidina (*HAMP*), que actúa como una hormona reguladora de hierro disminuyendo la absorción de hierro intestinal y la liberación de hierro de macrófagos y hepatocitos. Durante la infección, los niveles de hepcidina aumentan reduciendo la cantidad de hierro disponible para los patógenos. Una desregulación de hepcidina causa una elevada absorción de hierro intestinal clave en un grupo frecuente de desórdenes de sobrecarga de hierro. Estudios de variabilidad genética en *HAMP* muestran una variante (A582G) que causa sobrecarga en la concentración de hierro en el hígado y de niveles de ferritina en suero en pacientes β -talasémicos en preparación para el alo-TPH²⁰. Nuestro grupo ha encontrado un SNP intrónico (A7032G) en el donante que se asocia con mayor incidencia de infecciones y MRT influyendo en una menor SG en alo-TPH de hermano HLA-idéntico³. Debido a la alta diversidad de PAM descrita con actividad antimicrobiana y antitumoral, éstos se presentan como un nuevo campo de investigación en el alo-TPH.

Los factores reguladores de interferón (IRF): una importante respuesta antiviral y efecto antileucémico

Los IRF constituyen una familia de nueve factores de transcripción que regulan la expresión de *IFN* y de genes estimulados por IFN (*ISG*). También presentan otras funciones como control y regulación de las DC, jugando un papel importante en la respuesta inmunitaria a patógenos y reconocimiento y supresión de tumores. El reconocimiento inmunitario de PAMP por los TLR y/o RLR activa cascadas de señalización intracelulares que convergen en la activación de IRF; particularmente *IRF3* e *IRF7*, llevando a la inducción de

la transcripción de genes de *IFN* tipo I. En particular, *IRF3* juega un papel importante en el pronóstico del alo-TPH debido a su importancia en la infección por CMV regulando la producción de ISG. Hasta la fecha no hay estudios de variabilidad genética en *IRF-3* asociados con el pronóstico alo-TPH, pero nuestro grupo ha encontrado un SNP en *IRF3* (A-154C) en la región 5'UTR que en el donante se asocia con menor SLE, y en el paciente, con mayor recaída; además, esta variante presenta menor expresión de *IRF-3*, *MIF*, genes implicados en el ciclo celular (*AURKB* y *CCNA2*), y menor producción de la citocina antitumoral IL-15. Curiosamente *IRF-3* interacciona con *EP300* y hemos encontrado una variante en *EP300* que presenta un efecto beneficioso en el alo-TPH y mayor expresión de *IRF-3*, *MIF*, *AURKB* y *CCNA2* (datos no publicados). Tras infección viral, *IRF-3* se asocia con *EP300* para translocarse al núcleo y activar la transcripción de *IFN* y genes estimulados por *IFN*. Además, *EP300* juega un papel importante en la regulación del ciclo celular; estos resultados podrían indicar la importancia de variantes génicas en la interacción entre genes. Hasta la fecha no hay estudios de variabilidad genética en el alo-TPH de otros miembros de esta familia; sin embargo, la existencia de polimorfismos en *IRF7*, *IRF5* e *IRF1* asociados con mayores niveles en suero de *IFN-α* y con distinta estabilidad de RNAm y diferente expresión en células cancerosas da una clave para buscar un posible papel de estos SNP en el pronóstico alo-TPH³.

En conclusión, la inmunidad innata juega un papel clave en las reacciones que promueven la inflamación y el efecto antileucémico tras el alo-TPH. El impacto clínico de la variabilidad genética en genes de la inmunidad innata es cada vez más estudiado. Entre los genes del SII, polimorfismos en los PRR, PAM y *IRF* se han estudiado menos que genes que codifican para citocinas, y debido a la importancia de la variabilidad genética de algunos de estos genes se presenta un nuevo campo a estudiar en el pronóstico del alo-TPH.

Agradecimientos

Este trabajo se ha financiado con los fondos de los proyectos: PI08/1137, del Instituto de Salud Carlos III; RD06/0020/0012, de la Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer; y PI0079, de la Consejería de Salud, Junta de Andalucía.

Referencias bibliográficas

- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24: 99-146.
- Betelli E, Korn T, Mohamed Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of Th 17 cells. *Nature*. 2008; 453: 1051-7.
- Martín-Antonio B, Granell M, Urbano-Ispizua A. Genomic polymorphisms of the innate immune system and allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol*. 2010; 3 (4): 411-27.
- Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 791-800.
- Rendon BE, Willer SS, Zundel W, Mitchell RA. Mechanisms of macrophage migration inhibitory factor (MIF)-dependent tumor microenvironmental adaptation. *Exp Mol Pathol*. 2009; 86: 180-5.
- Lehmann LE, Book M, Hartmann W, et al. A MIF haplotype is associated with the outcome of patients with severe sepsis: a case control study. *J Transl Med*. 2009; 26: 100.
- Granell M, Urbano-Ispizua A, Suárez B, Rovira M, Fernández-Avilés F, Martínez C, et al. Mannan-binding lectin pathway deficiencies and invasive fungal infections following allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol*. 2006; 34 (10): 1435-41.
- Fuji S, Kim SW, Fukuda T, et al. Preengraftment serum C-reactive protein (CRP) value may predict acute graft-versus-host disease and nonrelapse mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008; 14: 510-7.
- Min CK, Kim SY, Eom KS. Patterns of C-reactive protein release following allogeneic stem cell transplantation are correlated with leukemic relapse. *Bone Marrow Transplant*. 2006; 37: 493-8.
- Allin KH, Nordestgaard BG, Zacho J, Tybjaerg-Hansen A, Bojesen SE. C-reactive protein and the risk of cancer: a mendelian randomization study. *J Natl Cancer Inst*. 2010; 102: 202-6.
- Bottazzi B, Garlanda C, Cotena A, et al. The long pentraxin PTX3 as a prototypic humoral pattern recognition receptor: interplay with cellular innate immunity. *Immunol Rev*. 2009; 227: 9-18.
- Bozza S, Bistoni F, Gaziano R, et al. Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to *IRF3* activation. *Blood*. 2006; 108: 3387-96.
- Martín-Antonio B, Álvarez I, Márquez-Malaver F, Trujillo P, Carmona M, Falantes J, et al. Constitutional variability in genes involved in innate immunity (*IRF-3*, *HAMP*, *PTX3*) and in cell proliferation (*ATBF1* and *NFAT5*) influences disease free survival after allogeneic stem cell transplantation (Allo-SCT). 36th annual meeting of the european group for blood and marrow transplantation ed. Vienna: nature publishing group 2010: S69.
- Kesh S, Mensah NY, Peterlongo P, et al. TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1062: 95-103.
- Granell M, Urbano-Ispizua A, Pons A, et al. Common variants in *NLRP2* and *NLRP3* genes are strong prognostic factors for the outcome of HLA-identical sibling allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2008; 15: 4337-42.
- Kocsis AK, Kiss ZF, Tiszlavicz L, Tiszlavicz Z, Mándi Y. Potential role of human beta-defensin 1 in *Helicobacter pylori*-induced gastritis. *Scand J Gastroenterol*. 2009; 44: 289-95.
- Prado-Montes de Oca E, Velarde-Félix JS, Ríos-Tostado JJ, Picos-Cárdenas VJ, Figuera LE. SNP 668C (-44) alters a NF-kappaB1 putative binding site in non-coding strand of human beta-defensin 1 (*DEFB1*) and is associated with lepromatous leprosy. *Infect Genet Evol*. 2009; 9: 617-25.
- Kocsis AK, Lakatos PL, Somogyvári F, et al. Association of beta-defensin 1 single nucleotide polymorphisms with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 2008; 43: 299-307.
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, et al. NOD2 (*CARD15*) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*. 2004; 53: 1658-64.
- Andreani M, Radio FC, Testi M, et al. Association of hepcidin promoter c.-582 A>G variant and iron overload in thalassemia major. *Haematologica*. 2009; 94: 1293-6.

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL SISTEMA INMUNITARIO ADAPTATIVO Y TRASPLANTE ALOGÉNICO

D. GALLARDO, A. BOSCH-VIZCAYA, E. TUSET, N. LLOVERAS, R. COLL, L. ELÍCEGUI, Y. GONZÁLEZ, J.M.^a RONCERO, A. BUSTINS, S. GARDELLA, C. FERNÁNDEZ, J. BUCH, G. FERRET, N. KELLEHER, R. GUARDIA
Servicio de Hematología. Institut Català d'Oncologia, Hospital Josep Trueta. Girona

"No es el más fuerte de las especies el que sobrevive; tampoco el más inteligente. El que sobrevive es aquel que se adapta mejor al cambio."

Charles DARWIN.

Sistema inmunitario innato y adaptativo

El sistema inmunitario es la maquinaria desarrollada por los seres vivos a lo largo de años de evolución para defender al organismo de los patógenos externos. Existen dos tipos de inmunidad: mientras que el sistema inmunitario *innato* actúa como primera línea de defensa, usando para ello células constitutivas e inespecíficas, el sistema inmunitario *adaptativo* es aquel que permite una respuesta de alta especificidad antigénica, facilitando además una eficaz protección contra reexposiciones al mismo patógeno, mediante un mecanismo de memoria inmunitaria.

Los mediadores de la respuesta innata son las barreras cutáneo-mucosas, el sistema del complemento y células con función fagocítica (polimorfonucleares y macrófagos) o citotóxica (células NK). Todos estos mediadores van a dar lugar a una respuesta rápida frente a cualquier patógeno. Por el contrario, la inmunidad adaptativa vendrá mediada por linfocitos B y T, que reaccionarán ante la presencia de un determinado antígeno de una manera más lenta pero más específica.

Así, la activación de los linfocitos T citotóxicos requiere la presentación del antígeno por parte de una célula especializada, como son las células dendríticas o los macrófagos tisulares. Esta interacción entre célula presentadora de antígeno y linfocito T se produce en lo que llamamos la *sinapsis inmunológica*¹. En esta sinapsis, la célula presentadora de antígeno expresa en superficie una serie de péptidos procedentes de la degradación de proteínas endógenas. Este sistema de presentación de antígenos endógenos forma parte del "control de calidad" del organismo, de

manera que aquellas células que expresen péptidos que no son reconocidos como propios por el sistema inmunitario sean eliminadas. Éste es el mecanismo que ayudará a eliminar células infectadas por virus o incluso células que hayan sufrido una transformación tumoral y presenten antígenos tumorales en superficie.

Sinapsis inmunológica

El proceso de presentación antigénica requiere que los péptidos lleguen a la superficie celular. Para ello, y tras la degradación de las proteínas en el proteasoma, los péptidos son translocados al retículo endoplasmático a través de proteínas transportadoras (como es el caso de TAP) y cargadas en la zona de unión peptídica de las moléculas HLA de clase I (HLA-A, B o C) estabilizadas tras la unión a β -2 microglobulina. Una vez cargados los péptidos en la molécula HLA, este complejo es transportado hasta la membrana citoplasmática. En el otro lado de la sinapsis, el linfocito T citotóxico expresa en superficie el receptor de célula T, que será el encargado de reconocer al complejo péptido-HLA. En caso de que el antígeno no sea reconocido como propio, se desencadena una señal de activación del linfocito T. Sin embargo, es necesaria la presencia de una segunda señal para que la activación del linfocito T sea efectiva. Esta segunda señal (o *señal de coestimulación*) vendrá dada por la unión de la molécula CD28, expresada en la superficie del linfocito T con las moléculas CD80 o CD86 de la superficie de la célula presentadora de antígeno. Otras moléculas coestimuladoras presentes en el reconocimiento antigénico son CD40 y su ligando CD154 (Figura 1).

Una vez activado el linfocito T, se liberará interleucina 2, así como enzimas responsables de permeabilizar la membrana de la célula presentadora de antígeno (perforina) y de estimular la apoptosis de dicha célula (granzima). Debido al fenómeno de amplificación de la respuesta, serán reclutadas más células efectoras y los linfocitos T CD4 activarán la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B.

El mecanismo por el que la activación linfocitaria cesa está relacionado con la inhibición de la señal de coestimulación: transcurridas unas horas desde la activación, se empieza a expresar en superficie del linfocito T la molécula CTLA-4, una molécula que compete con CD28 para su unión a CD80 y CD86, pero con mayor afinidad. Así, CTLA-4 desplaza a CD28 y esto genera una segunda señal que ya no es activadora, sino inhibidora. De esta manera, el sistema inmunitario consigue que la activación no sea perpetua y que la amplificación de la respuesta no llegue a producir daños tisulares en células vecinas o fenómenos de autoinmunidad.

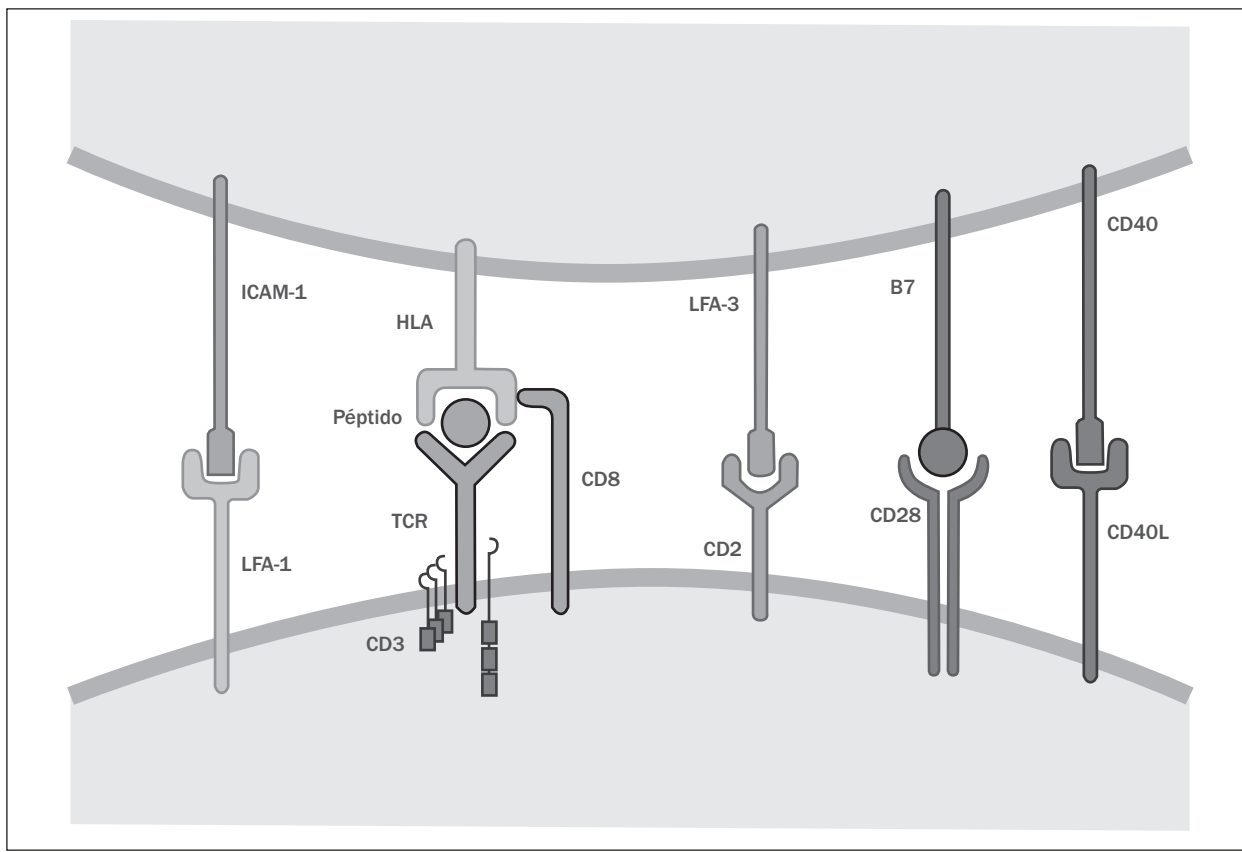


Figura 1. Representación esquemática de la sinapsis inmunológica.

Polimorfismos en genes del sistema inmunitario adaptativo: relevancia clínica

Si hablamos de polimorfismos en genes del sistema inmunitario adaptativo, deberemos considerar a todos aquellos genes que codifiquen para los principales actores del reconocimiento antigénico: las moléculas HLA, los péptidos presentados y las moléculas coestimuladoras.

Polimorfismos de la molécula HLA

El complejo mayor de histocompatibilidad humano (HLA) es el sistema genético más polimórfico que existe. Consta de moléculas de clase I (HLA-A, B y C) y de clase II (HLA-DRB1, DQB1 y DPB1)². Cada individuo expresará dos moléculas distintas de cada uno de los loci de clase I en todas sus células nucleadas en caso de heterocigosidad, añadiendo la expresión de dos moléculas de cada uno de los loci de clase II en aquellas células con capacidad de presentación de antígeno. En total, en la superficie celular se expresan entre 100.000 y 300.000 moléculas de HLA, cada una de ellas unida a un péptido, por lo que en ausencia de infección cada célula está presentando cientos de miles de pép-

tidos procedentes de la degradación de proteínas endógenas.

Actualmente, hay descritos 1.193 alelos de HLA-A, 1.800 de HLA-B, 829 de HLA-C, 902 de HLA-DRB1, 112 de HLA-DQB1 y 141 de HLA-DPB1, en base al número de secuencias descritas.

Como ya hemos visto, la función de estas moléculas es presentar péptidos para permitir el reconocimiento de lo que es propio y lo que no lo es, permitiendo así la respuesta inmunitaria ante la presencia de patógenos. Lamentablemente, miles de años de evolución no tuvieron en cuenta que el ser humano empezaría a realizar trasplantes de órganos, y especialmente de progenitores hematopoyéticos, por lo que la barrera HLA se convirtió en uno de los principales obstáculos para el éxito de estos procedimientos. Para poder superar dicha barrera hubo que profundizar en el conocimiento del sistema HLA mejorando las técnicas de tipificación, y así pasamos de la tipificación serológica a la tipificación molecular de alta resolución, de las técnicas de linfocitotoxicidad y el cultivo mixto linfocitario a la secuenciación directa. Tras etapas más o menos dubitativas, actualmente se acepta que para realizar un trasplante de donante no emparentado se requiere un donante con identidad HLA de alta resolución en los loci HLA-A, B, C, DRB1 y DQB1. Aun así, la inciden-

Tabla 1. Antígenos menores de histocompatibilidad humanos

Nombre	Péptido inmunogénico	Restricción HLA	Cromosoma	Proteína	Expresión
HA-1	VLHDDLLEA	HLA-A*0201	19p13.3	HA-1	Tejido hematopoyético
HA-1 / B60	KECVLHDDL	HLA-B60	19p13.3	HA-1	Tejido hematopoyético
HA-2	YIGEVLSV	HLA-A*0201	7p12-p13	Miosina 1G	Tejido hematopoyético
HA-3	VTEPGTAQY	HLA-A*0101	15q24-q25	Lymphoid Blast Crisis Oncogene	Ubicua
HA-8	RTLDKVLEV	HLA-A*0201	9p24.2	KIAA0020	Ubicua
HB-1	EEKRGLSHVW	HLA-B*44	5q32	desconocida	Linfocitos B
ACC-1	DYLQYVLQI	HLA-A*24	15q24.3	BCL2A1	Tejido hematopoyético
ACC-2	KEFEDIINW	HLA-B*44	15q24.3	BCL2A1	Tejido hematopoyético
SP110	SLPRGTSTPK	HLA-A*0301	2q37	SP110 nuclear body protein	Tejido hematopoyético
PANE1	RVWDLPGVLK	HLA-A*0301	22q13	PANE1	Células linfoides
UGT2B17/A29	AELLNIPFLY	HLA-A*2902	4q13	UGT2B17	Cél. dendríticas y linfocitos B
UGT2B17/B44	AELLNIPFLY	HLA-B*44	4q13	UGT2B17	Cél. dendríticas y linfocitos B
LRH-1	TPNQRQNVK	HLA-B*0702	17p13.2	P2X5	Tejido hematopoyético
LB-ECGF-1H	RPHAIRRLAL	HLA-B*07	22q13	ECGF-1	Tejido hematopoyético
CTSH/A31	ATLPLLCAR	HLA-A*31	15q24-q25	Catepsina H	Linfocitos B
CTSH/A33	WATLPLLCAR	HLA-A*33	15q24-q25	Catepsina H	Linfocitos B
LB-ADIR-1F	SVAPALALFPA	HLA-A*02	1q25.2	TOR3A	Desconocida
ACC-6	MEIFIEVFSHF	HLA-B*44	18q21.33	HMSD	Desconocida
A1/HY	IVDCLTEMY	HLA-A*01	Yq11	USP9Y	Ubicua
A2/HY	FIDSYICQV	HLA-A*02	Yq11.1	SMCY	Ubicua
A33/HY	EVLLRPGLHFR	HLA-A*33	Yq11	TMSB4Y	Ubicua
B7/HY	SPSVDKARAE	HLA-B*07	Yq11.1	SMCY	Ubicua
B8/HY	LPHNHTDL	HLA-B*08	Yq11	UTY	Ubicua
B52/HY	TIRYPDPVI	HLA-B*52	Yq11.3	RPS4Y1	Ubicua
B60/HY	RESEESVSL	HLA-B60	Yq11.1	UTY	Ubicua

cia de enfermedad del injerto contra el huésped sigue siendo un problema frecuente. De hecho, no se busca rutinariamente una identidad en HLA-DPB1, que es el locus de clase II que no hemos mencionado, y esto se debe a que hasta un 80% de los donantes considerados HLA-idénticos presentarán disparidad a este nivel, debido a la alta tasa de recombinación de HLA-DPB1 con respecto al resto del haplotipo. Tampoco tenemos datos respecto a la relevancia clínica de disparidades en otros *loci* HLA “no clásicos”. Probablemente, a efectos prácticos no debemos hablar de donantes no emparentados HLA-idénticos, sino de donantes con perfil adecuado de histocompatibilidad.

Antígenos menores de histocompatibilidad

No todos los péptidos que se presentan en superficie celular son capaces de generar una respuesta alérgica en el contexto de un trasplante de progenitores he-

matopoyéticos: la mayoría de los péptidos corresponden a proteínas que serán idénticas en el donante y el receptor. Ahora bien, en algunos casos pueden derivar de proteínas con cierto grado de polimorfismo genético, dando lugar a péptidos distintos al ser procesadas: así, el cambio en un único aminoácido supondrá que el péptido presentado por células del receptor puede ser reconocido como extraño por los linfocitos T del donante.

Para que podamos hablar de “antígeno menor de histocompatibilidad” se deberán cumplir varios requisitos³:

1. Debe haber diferencias en el genotipo de paciente y donante en el gen que codifica la proteína que dará lugar a ese péptido en cuestión.

2. Si la presencia de dos alelos distintos codifica dos péptidos distintos, uno debe ser antigénico y el otro no.

3. La condición de disparidad sólo se dará cuando el receptor exprese el péptido antigénico y el donan-

te no, en presencia del elemento de restricción adecuado.

La referencia al “elemento de restricción adecuado” alude a que cada antígeno menor de histocompatibilidad se presenta exclusivamente por un tipo concreto de molécula HLA: o sea que, aun en presencia de disparidad genética entre paciente y receptor, si el paciente no dispone de la molécula HLA “correcta”, ese péptido potencialmente inmunogénico jamás llegará a la superficie celular y, por tanto, no será capaz de generar respuestas inmunitarias⁴.

Hasta hoy se han descrito 28 antígenos menores de histocompatibilidad humanos, según figura en la Tabla 1.

A pesar de la pronta identificación de que los antígenos menores de histocompatibilidad podrían tener relevancia clínica de en el trasplante alogénico⁵, la dificultad para tipificarlos ha limitado clásicamente la realización de estudios clínicos.

HA-1 es posiblemente el antígeno menor de histocompatibilidad mejor estudiado: se trata de un nonapéptido con 2 alelos (HA-1H y HA-1R) que procede de la degradación de una proteína codificada por el cromosoma 19. Se expresa sólo en tejido hematopoyético, restringido por la molécula HLA-A*0201. Hasta ahora, dos estudios independientes^{6,7} han demostrado la correlación de una disparidad en HA-1 con un aumento de incidencia de EICH aguda en trasplante alogénico de donante familiar HLA-idéntico. Su expresión restringida a tejido hematopoyético hace que se haya investigado el uso de linfocitos T citotóxicos dirigidos contra HA-1 como inmunoterapia.

Otro antígeno menor de histocompatibilidad restringido por HLA-A*0201 es HA-8, el cual se expresa en todas las células del organismo. Al igual que para HA-1, se ha descrito una correlación entre la disparidad en este antígeno con la aparición de EICH aguda^{8,9}. También son antígenos menores de histocompatibilidad los péptidos procedentes de proteínas codificadas por genes del cromosoma Y, que serán los responsables de la mayor incidencia de EICH aguda cuando el receptor es varón y el donante es mujer.

También se ha relacionado a la disparidad en los antígenos menores ACC-1 y UGT2B17 con la aparición de EICH aguda^{10,11}. En cambio, no hay actualmente estudios clínicos fiables que nos indiquen la relevancia clínica de otros antígenos menores como HA-2, HA-3, HB-1, ACC-2, SP110 o PANE1.

Polimorfismos en genes que codifican para moléculas coestimuladoras

CTLA-4 es una molécula que se expresa en linfocitos T en condiciones de activación. Su función bioló-

gica es la de desplazar al antígeno CD28 de su ligando en la célula presentadora de antígeno, interrumpiendo la señal de coestimulación y generando una inhibición del linfocito T, facilitando así el carácter temporal de la activación inmunológica ante un antígeno. Existen polimorfismos en el gen de CTLA-4 consistentes en un único cambio de base (SNP), que dan lugar a una mayor o menor capacidad de expresión del gen, y, por tanto, suponen una mayor o menor duración de la activación de los linfocitos T ante una activación antigénica. Así, diversos estudios han correlacionado la existencia de polimorfismos que condicionan una menor expresión de CTLA-4 con enfermedades autoinmunes¹². Nuestro grupo identificó también la implicación del genotipo CT60 del gen de CTLA-4 del donante con la incidencia de EICH aguda, recaída y supervivencia global tras trasplante de progenitores hematopoyéticos, trasladando al modelo alogénico las observaciones realizadas en procesos autoinmunes¹³.

Conclusiones

El proceso mediante el cual nuestro sistema inmunitario adaptativo es capaz de reconocer un antígeno como extraño es un proceso complejo y que requiere la intervención de distintas moléculas que se expresan en los linfocitos T y en las células presentadoras de antígeno. Los polimorfismos en los genes que codifican para estas moléculas, así como las posibles variantes de los péptidos presentados, serán especialmente relevantes en la capacidad de desarrollar enfermedad del injerto contra el huésped y de controlar enfermedad mínima residual tras un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

La pregunta obvia es: ¿tiene aplicabilidad clínica real el conocimiento de la existencia de estas disparidades o polimorfismos? Es decir: podemos identificar una serie de disparidades en antígenos menores de histocompatibilidad o en otras moléculas que se asocian a enfermedad del injerto contra el huésped, pero eso no nos sirve de nada si no se van a determinar en la práctica clínica diaria. La respuesta es que debemos aprender del pasado: los primeros estudios que correlacionan enfermedad del injerto contra el huésped con disparidades HLA sólo detectables mediante técnicas basadas en biología molecular datan de 1995, pero no es hasta una década después cuando se aceptó que la realización de una tipificación HLA de alta resolución en 5 loci era imprescindible para la realización de un trasplante de donante no emparentado. Del mismo modo, es preciso profundizar en el estudio de los polimorfismos asociados con el reconocimiento inmunitario para identificar aquellos que formarán parte de la tipificación rutinaria en los próximos años.

Agradecimientos

Trabajo realizado gracias a la financiación de la beca FIS080413, del Fondo de Investigaciones Sanitarias, y a una beca Mutua Madrileña 2008. Los autores también agradecen el soporte económico de la Asociación Llavaneres contra el Càncer.

Referencias bibliográficas

1. Sharpe AH. Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev.* 2009; 229 (1): 5-11.
2. Mackay I, Rosen FS. The HLA System. *N Eng J Med.* 2000; 343: 702-9.
3. Chao NJ. Minors come of age: minor histocompatibility antigens and graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004; 10 (4): 215-23.
4. Brickner AG. Mechanisms of minor histocompatibility antigen immunogenicity. *Immunol Res.* 2006; 35: 1-9.
5. Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, Gratwohl A, et al. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Eng J Med.* 1996; 334: 281-5.
6. Tseng LH, Lin MT, Hansen JA, Gooley T, Pei J, Smith AG, et al. Correlation between disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 and the development of acute graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation. *Blood.* 1999; 94 (8): 2911-4.
7. Gallardo D, Aróstegui JI, Balas A, Torres A, Caballero D, Carreras E, et al. Disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 is associated with an increased risk of acute graft-versus-host disease (GvHD) but it does not affect chronic GvHD incidence, disease-free survival or overall survival after allogeneic human leucocyte antigen-identical sibling donor transplantation. *Br J Haematol.* 2001; 114 (4): 931-6.
8. Akatsuka Y, Warren EH, Gooley TA, Brickner AG, Lin MT, Hansen JA, et al. Disparity for a newly identified minor histocompatibility antigen, HA-8, correlates with acute graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling. *Br J Haematol.* 2003; 123 (4): 671-5.
9. Pérez-García A, De la Cámara R, Torres A, González M, Jiménez A, Gallardo D. Minor histocompatibility antigen HA-8 mismatch and clinical outcome after HLA-identical sibling donor allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2005; 90 (12): 1723-4.
10. Nishida T, Akatsuka Y, Morishima Y, Hamajima N, Tsujimura K, Kuzushima K, et al. Clinical relevance of a newly identified HLA-A24-restricted minor histocompatibility antigen epitope derived from BCL2A1, ACC-1, in patients receiving HLA genotypically matched unrelated bone marrow transplant. *Br J Haematol.* 2004; 124: 629-35.
11. McCarroll SA, Bradner JE, Turpeinen H, Volin L, Martin PJ, et al. Donor-recipient mismatch for common gene deletion polymorphisms in graft-versus-host disease. *Nat Genet.* 2009; 41 (12): 1341-4.
12. Ueda H, Howson JM, Esposito L, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature.* 2003; 423: 506-11.
13. Pérez-García A, De la Cámara R, Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Encuentra M, Nieto JB, et al. CTLA-4 polymorphisms and clinical outcome after allogeneic stem cell transplantation from HLA-identical sibling donors. *Blood.* 2007; 110 (1): 461-7.

PHARMACOGENOMICS IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

D. BHOJWANI

Department of Oncology. St Jude Children's Research Hospital. Memphis (Estados Unidos)

Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood cancer with approximately 3000 new cases diagnosed each year in the United States. Fortunately, advances in the past five decades have made it possible to attain cure in more than 80% of children with ALL¹. However, prognosis is dismal for the 20% of children who relapse, thus it is important to identify high risk groups upfront and tailor therapy to the risk of relapse. Additionally, cure often is accompanied by significant short and long term adverse events necessitating strategies to predict, prevent and reduce the burden of treatment related toxicities. The majority of children in developed countries are treated with protocol based therapy, thus patient and disease characteristics, response and toxicities are usually well documented. Uniform treatment, well characterized cytogenetic subtypes and the relative ease in obtaining tumor tissue render this disease amenable to informative biologic studies. Response to treatment can also be assessed at early time points based on minimal residual disease (MRD) measurements.

Individual responses to pharmacologic agents vary based on characteristics of the host as well as the tumor. Pharmacogenomics is the science of defining and characterizing the influence of genomic variability on pharmacokinetics and pharmacodynamics, and using this information to individualize and optimize drug therapy². The term *pharmacogenetics* often refers to the study of selected genomic loci while pharmacogenomics to global genome-wide studies. Certain pharmacogenetics-based tests have already made a significant impact in clinical care and are incorporated in the United States Food and Drug Administration (FDA) mandated boxed warning for prescription of specific drugs³. Examples include individualization of warfarin therapy based on CYP2C9 and VCORC1 polymorphisms, CYP2C19 variants for clopidogrel, UGT1A1 for irinotecan and TPMT for thiopurines.

Tools for pharmacogenetic and pharmacogenomic studies

Genetic variants are either inherited (germline) or acquired (somatic). Single nucleotide polymorphisms

(SNPs) are the most common inherited genetic variants and occur every 100 to 300 base pairs across the human genome.

Others include genomic insertions, deletions and copy number variations (CNV). Genetic changes in the tumor are extremely diverse, including sequence mutations, gene deletions/amplifications, and chromosomal translocations. Polymerase chain reaction coupled with restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis is traditionally used for genotyping of candidate genes.

The use of fluorescent labeled probes is less cumbersome. High throughput genome wide interrogations rely on modern array based (e.g. Affymetrix Human SNP array 6.0 features 1.8 million genetic markers) or bead based (e.g. Illumina Human IM BeadChip interrogates 1.2 million genomic loci) technologies. Analyses require strong computational and bioinformatic tools. The International Hapmap Project (www.hapmap.org) and the 1,000 Genome Project (www.1000genomes.org) are developing comprehensive catalogs of human genetic variations and provide researchers with freely available excellent resources for studies of genomic variability.

Genetic variations affecting toxicity from drugs

The classic TPMT story

The clinical application of thiopurine pharmacogenetics is an excellent example of treatment individualization guided by genetics. Thiopurines (6-mercaptopurine and 6-thioguanine) are integral components of all childhood ALL regimens. They are converted to thioguanine nucleotides which are incorporated into DNA during replication and consequently lead to futile mismatch repair and apoptosis. Thiopurines as well as thioguanine nucleotides are inactivated by the enzyme thiopurine S-methyltransferase (TPMT). Ninety percent of patients exhibit normal TPMT activity while TPMT deficiency is seen in 5-10% of patients. Due to deficiency in enzyme activity, there is excessive accumulation of active thioguanine nucleotides in the cell (example up to 10-fold in erythrocytes) and therefore increased hematopoietic toxicity.

Myelosuppression and its consequences such as increased risk of infections and requirement for transfusions necessitates dose reduction or temporary discontinuation of the drug thus compromising optimal therapy. Inherited germline polymorphisms in 3 most frequent inactivating variant alleles of the *TPMT* gene account for >95% of the variability in enzyme activity⁴. In a study of 180 children with ALL receiving therapy that included 75 mg/m²/day of 6-

mercaptopurine, the cumulative incidence of dose reductions due to toxicity were 100%, 35% and 7% for TPMT homozygous, heterozygous and wild type patients respectively⁵. This genotype phenotype correlation is very valuable in clinical care and guidelines are available for its implementation while prescribing thiopurines⁶.

Other toxicities

The link of TPMT polymorphisms with myelosuppression has been validated in multiple studies. Germline polymorphisms in additional genes with potential clinical relevance have also been identified though many of them remain to be validated in independent cohorts. It is also important to keep in mind that the significance of the polymorphism is dependent on the dose and schedule of the drug and may not be applicable in all patient groups and in all studies. Kishi *et al.* determined the relationship of 16 candidate germline polymorphisms to toxicities in various phases of childhood ALL therapy at St Jude Children's Research Hospital⁷.

During the induction phase, when steroids are an important component of therapy, polymorphisms in the vitamin D receptor were associated with gastrointestinal toxicities and polymorphisms in cytochrome P450 with infection.

During the consolidation and continuation phases which are anti-metabolite based, reduced folate carrier polymorphisms predicted gastrointestinal toxicity. In a recent genome-wide study from the same institution, significant associations were identified between SNPs in *SLCO1B1*, methotrexate clearance and gastrointestinal toxicity⁸.

Osteonecrosis is a frequent disabling toxicity from steroid use, especially in children greater than 10 years of age. Polymorphisms of acid phosphatase-1 (*ACP1*) identified by a genome wide association study were linked to an increased risk of developing symptomatic osteonecrosis in a cohort of 364 uniformly treated children with ALL after adjusting for clinical features⁹.

ACP1 regulates osteoblastic differentiation and is associated with altered blood lipid levels. Multiple long-term complications are often seen after completion of therapy for childhood ALL and the identification of patients at risk and possible early intervention may be beneficial. Impairments in neurocognition have been associated with germline polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase¹⁰. Anthracycline induced late cardiotoxicity may be linked to germline polymorphisms in the carbonyl reductase 3 gene possibly by modulating anthracycline pharmacodynamics¹¹.

Genetic variations affecting response to drugs

The host

Germline polymorphisms are frequently noted in enzymes involved in drug transport, disposition and clearance. Thus inter-individual variability in responses to specific drugs is expected. Multiple antileukemic agents (vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin, etoposide) are metabolized by cytochrome P450 enzymes and polymorphisms in CYP3A4/3A5 have occasionally been linked to response in ALL therapy¹². In addition, steroids are potent inducers of CYP3A enzymes and can increase clearance of the other agents¹³.

The ethnic diversity in drug response or “pharmacoethnicity” results from the interaction of socio-economic and environmental factors, and importantly genetic variability. Ethnic differences in ALL survival have been reported by multiple groups; black and Hispanic children often demonstrate poorer outcomes than whites and Asians¹⁴. Genome-wide germline SNPs were interrogated in a large cohort (N = 2534) of children with ALL and it was found that Native American genetic ancestry was associated with a higher risk of relapse¹⁵. It was possible to abrogate this increased relapse risk in Hispanic patients by administration of an additional delayed intensification course of chemotherapy. A SNP in *PDE4B* was significantly associated with the development of a hematologic relapse.

In addition to correlation with relapse risk, drug response phenotypes can be assessed by measuring *in vitro* sensitivity of chemotherapeutic agents (either single agent or combinations) to primary ALL cells and to *in vivo* drug response (i.e. MRD measurements during therapy). Germline SNPs in genes from the aspartate metabolism pathway correlated with *in vitro* sensitivity of ALL cells to asparaginase¹⁶. High levels of MRD were significantly associated with 102 SNPs in a cohort of 487 children with ALL¹⁷. Interestingly, 21 of these SNPs significantly correlated with risk of relapse and 21 SNPs to decreased exposure to methotrexate and etoposide either due to increased clearance of these agents or decreased intracellular accumulation of methotrexate polyglutamates. Thus decreased exposure to these agents is a plausible explanation for poor MRD clearance.

The tumor

Chemotherapy response is dependant in large part on the inherent genetic characteristics of the leukemic cells. For example, ALL with t(9;22) or rearrangements involving the *MLL* gene are relatively resistant to standard chemotherapeutic drugs when compared to ALL

harboring the *ETV6-RUNX1* fusion or hyperdiploid ALL. Genome-wide scans of tumor RNA or DNA have revealed alterations of genes (changes in expression, copy number variations) that may be responsible or may be markers of inferior responses to chemotherapeutic agents. Global gene expression studies of primary leukemic cells identified specific profiles that associated with *in vitro* sensitivity to four commonly used antileukemic agents (prednisone, vincristine, asparaginase and daunorubicine)¹⁸. A combined gene expression score significantly correlated with long term outcome. Studies comparing gene expression profiles of matched diagnosis and relapse pairs have the potential to provide insights into therapy resistance and identify potential new therapeutic targets (example, the anti-apoptotic gene *survivin*)¹⁹. High resolution DNA copy number profiling of matched diagnosis-relapse samples has suggested that the mismatch repair gene *MSH6* which is implicated in resistance to thio-purines may be frequently deleted in a subset of patients at the time of relapse²⁰.

Conclusions

Childhood ALL has served as a paradigm for the integration of pharmacogenomics in cancer care. Modern high throughput genome wide studies have identified genomic alterations in the host as well as the tumor that are potential avenues for personalized therapy. Some of the challenges that are faced in the routine implementation of pharmacogenomic tests include difficulties in interpreting the data and limited guidelines for modification of drug dose available to the prescribing physician²¹. The establishment of concise guidelines by experts in the field as well as linking of actionable results to the patient’s electronic medical records are ongoing initiatives²².

References

1. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2006; 354 (2): 166-78.
2. Cheok MH, Pottier N, Kager L, Evans WE. Pharmacogenetics in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* 2009; 46 (1): 39-51.
3. Wang L, McLeod HL, Weinshilboum RM. Genomics and drug response. *N Engl J Med.* 2011; 364 (12): 1144-53.
4. McLeod HL, Lin JS, Scott EP, Pui CH, Evans WE. Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 1994; 55 (1): 15-20.
5. Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, et al. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91 (23): 2001-8.
6. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase

- genotype and thiopurine dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2011; 89 (3): 387-91.
7. Kishi S, Cheng C, French D, Pei D, Das S, Cook EH, et al. Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood.* 2007; 109 (10): 4151-7.
 8. Trevino LR, Shimasaki N, Yang W, Panetta JC, Cheng C, Pei D, et al. Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J Clin Oncol.* 2009; 27(35): 5972-8.
 9. Kawedia JD, Kaste SC, Pei D, Panetta JC, Cai X, Cheng C, et al. Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and pharmacogenetic determinants of osteonecrosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2011; 117 (8): 2340-7; quiz 556.
 10. Kamdar KY, Krull KR, El-Zein RA, Brouwers P, Potter BS, Harris LL, et al. Folate pathway polymorphisms predict deficits in attention and processing speed after childhood leukemia therapy. *Pediatr Blood Cancer.* 2011; 57 (3): 454-60.
 11. Blanco JG, Leisenring WM, González-Covarrubias VM, Kawashima TI, Davies SM, Relling MV, et al. Genetic polymorphisms in the carbonyl reductase 3 gene CBR3 and the NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 gene NQO1 in patients who developed anthracycline-related congestive heart failure after childhood cancer. *Cancer.* 2008; 112 (12): 2789-95.
 12. Borst L, Wallerek S, Dalhoff K, Rasmussen KK, Wesenberg F, Wehner PS, et al. The impact of CYP3A5*3 on risk and prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol.* 2011; 86 (6): 477-83.
 13. Kishi S, Yang W, Boureau B, Morand S, Das S, Chen P, et al. Effects of prednisone and genetic polymorphisms on etoposide disposition in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2004; 103 (1): 67-72.
 14. Bhatia S, Sather HN, Heerema NA, Trigg ME, Gaynon PS, Robison LL. Racial and ethnic differences in survival of children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2002; 100 (6): 1957-64.
 15. Yang JJ, Cheng C, Devidas M, Cao X, Fan Y, Campana D, et al. Ancestry and pharmacogenomics of relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2011; 43 (3): 237-41.
 16. Chen SH, Yang W, Fan Y, Stocco G, Crews KR, Yang JJ, et al. A genome-wide approach identifies that the aspartate metabolism pathway contributes to asparaginase sensitivity. *Leukemia.* 2011; 25 (1): 66-74.
 17. Yang JJ, Cheng C, Yang W, Pei D, Cao X, Fan Y, et al. Genome-wide interrogation of germline genetic variation associated with treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Jama.* 2009; 301 (4): 393-403.
 18. Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Veerman AJ, Kazemier KM, et al. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med.* 2004; 351 (6): 533-42.
 19. Bhojwani D, Kang H, Moskowitz NP, Min DJ, Lee H, Potter JW, et al. Biologic pathways associated with relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood.* 2006; 108 (2): 711-7.
 20. Yang JJ, Bhojwani D, Yang W, Cai X, Stocco G, Crews K, et al. Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2008; 112 (10): 4178-83.
 21. Relling MV, Klein TE. CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium of the Pharmacogenomics Research Network. *Clin Pharmacol Ther.* 2011; 89 (3): 464-7.
 22. Wilke RA, Xu H, Denny JC, Roden DM, Krauss RM, McCarty CA, et al. The emerging role of electronic medical records in pharmacogenomics. *Clin Pharmacol Ther.* 2011; 89 (3): 379-86.