



122  
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DEL MECANISMO DE RESISTENCIA MULTIPLE A  
FARMACOS MEDIADO POR GLUCOPROTEINA-P  
ASOCIADO A LEUCEMIA AGUDA

EXAMEN DE PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
MARIA DEL PILAR VILLEGAS AGUILAR



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

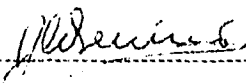
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

### **JURADO ASIGNADO**

Presidente	Prof: José Luis Domínguez Tórix
Vocal	Prof: Guillermo González Vargas
Secretario	Prof: Graciela Nava Díaz
1er Suplente	Prof: Eva Delia Calderón Garcidueñas
2do Suplente	Prof: Claudia Huesca Gómez

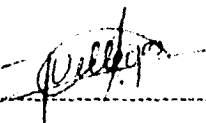
Este trabajo fue realizado en las bibliotecas de los institutos de: Investigaciones Biomédicas, Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", Nacional de Cancerología, así como en la biblioteca y hemerobiblioteca de la facultad de Medicina.

### **ASESOR DE TEMA**



Dr. José Luis Domínguez Tórix

### **SUSTENTANTE**



María del Pilar Villegas Aguilar

## **DEDICATORIAS**

**A el señor Dios**

Por que ha iluminado mi camino y  
ha llenado mi vida de grandes motivos para continuar.

**A mi Mamá**

Por habernos entregado toda una vida de trabajo y lucha constante,  
por darnos ese ejemplo de valor, con el que ha enfrentado todas las circunstancias.  
Gracias por el amor y comprensión de siempre.

**A Tita**

Por ser ejemplo de fuerza, valor, honestidad y amor.  
Gracias por el cariño, los consejos y cuidados a lo largo de mi vida.

**A Paty, Fernanda y José**

De quienes he recibido cariño, apoyo y confianza, por todos los bellos momentos  
que hemos compartido. Gracias por estar presentes en mi vida, espero que este trabajo  
sea un estímulo en su desarrollo profesional.

**A Alma**

Por estar aquí, antes y ahora, con todo lo que sólo puede brindar una gran amiga.  
Gracias por la compañía y el cariño tan verdadero.

**A Manuel Alejandro y José Alberto**

Por que han dado un nuevo toque de alegría a mi vida.

**A Fígaro**

Por ser alguien muy importante en mi vida y aún cuando ya no esté, siempre  
lo recordaré.

## **AGRADECIMIENTOS**

**Agradezco de manera muy especial al Dr. José Luis Domínguez T.  
por su dedicación y apoyo en la dirección de este trabajo.**

**A mis amigos Lore, Meche, Irma, Lupita, Paty, Ana, Lilián, Alicia, Gerardo, Javier,  
Manuel, Juan Carlos, Euclídes y Pablo, por haber hecho mi estancia en la facultad  
mucho más hermosa.**

**A Olga, Alita, Elizabeth, Lidia y Julieta, por su cariño y apoyo incondicional de siempre.**

**A Diana, Tere, Adriana, Jusy, Mariana y Caro por su amistad y apoyo  
en el alcance de este objetivo.**

**Al equipo de Integra Ingeniería y en especial a Reynaldo, Alejandro y Moisés por su grande  
y valiosa ayuda para la terminación de este trabajo.**

## CONTENIDO

	página
Índice de abreviaturas	1
Introducción	2
Objetivo	3
1.- Leucemias agudas	4
1.1 Definición	4
1.2 Etiología	5
1.3 Fisiopatología	11
1.4 Datos clínicos	13
1.5 Clasificación	14
1.5.1 Morfológica	14
1.5.2 Inmunológica	18
1.5.3 Citogenética	21
1.6 Diagnóstico	23
1.7 Diagnóstico diferencial	25
1.8 Tratamiento	26
1.8.1 Cáncer en general	26
1.8.2 Leucemia linfoblástica	31
1.8.3 Leucemia mieloblástica	36
1.9 Leucemias agudas y resistencia múltiple	40

	<b>página</b>
<b>2.- Resistencia múltiple a fármacos.</b>	<b>42</b>
2.1 Definición	43
2.2 Fenotipo de resistencia múltiple	44
2.2.1 Respuesta celular alterada para fármacos	44
2.2.2 Reducción en la acumulación de fármacos	45
2.2.3 Mecanismos propuestos en el fenotipo MDR	45
2.3 Papel del ATP en el transporte de fármacos	46
2.4 Resistencia múltiple a fármacos y expresión de glucoproteína-P	47
2.5 Amplificación genética en células resistentes a múltiples fármacos	50
2.6 Expresión y función de glucoproteína-P en tejidos normales	52
2.7 Mecanismo de acción de glucoproteína-P	53
2.8 Homología entre glucoproteína-P y proteínas bacterianas	56
2.9 Papel de la glucoproteína-P en la resistencia múltiple a fármacos	57
2.10 Agentes inhibidores del mecanismo de resistencia múltiple a fármacos	58
2.10.1 Análogos de antraciclinas	59
2.10.2 Bloqueadores de los canales de calcio	59
2.10.3 Otros agentes	61
<b>Conclusiones</b>	<b>66</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>71</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>AcMo</b>	.....	Anticuerpos monoclonales
<b>ADN</b>	.....	Acido desoxirribonucleico
<b>cADN</b>	.....	Acido desoxirribonucleico complementario
<b>Ag</b>	.....	Antígeno
<b>ARN</b>	.....	Acido ribonucleico
<b>ARNm</b>	.....	Acido ribonucleico mensajero
<b>ATP</b>	.....	Trifosfato de adenosina
<b>CID</b>	.....	Coagulación intravascular diseminada
<b>Cgy</b>	.....	Centigray
<b>DMSO</b>	.....	Dimetilsulfóxido
<b>FAB</b>	.....	French-American-British (clasificación)
<b>gp-P</b>	.....	Glucoproteína-P
<b>IMP</b>	.....	Partículas intramembranales
<b>KDa</b>	.....	Kilodalton
<b>L</b>	.....	Litro
<b>LA</b>	.....	Leucemia aguda
<b>LLA</b>	.....	Leucemia linfoblástica aguda
<b>LMA</b>	.....	Leucemia mieloblástica aguda
<b>MDR</b>	.....	Resistencia múltiple a fármacos (multidrug resistance)
<b>MIC</b>	.....	Clasificación morfológica, inmunológica y citogenética
<b>SNC</b>	.....	Sistema nervioso central



## INTRODUCCIÓN

Las leucemias agudas son un grupo de enfermedades malignas progresivas del sistema hematopoyético, caracterizadas por la presencia de un gran número de células blancas inmaduras en circulación y en médula ósea. Los leucocitos inmaduros infiltran diferentes órganos como son bazo, hígado y ganglios linfáticos principalmente, causando citopenias severas y cuadros clínicos caracterizados por anemia, hemorragias, fiebres, infecciones, etc.

El uso de fármacos quimioterapéuticos en el tratamiento de leucemia ha sido obstaculizado por el surgimiento de células resistentes a los mismos. Esta resistencia se asocia con la sobreexpresión de un gen llamado de resistencia múltiple a fármacos (MDR-1 multidrug resistance) el cual codifica para una proteína de membrana llamada glucoproteína-P, que actúa como una bomba de eflujo dependiente de ATP, transportando gran número de compuestos orgánicos aparentemente no relacionados entre sí ni funcional, ni estructuralmente.

De tal forma que el desarrollo de resistencia de las células tumorales frente a fármacos citotóxicos, es considerada una de las principales causas del fracaso de la quimioterapia clínica contra el cáncer.

### **OBJETIVO**

**El objetivo del presente trabajo, es realizar una revisión de la literatura sobre el mecanismo de resistencia múltiple a fármacos mediado por glucoproteína-P asociado a leucemia aguda.**

**LEUCEMIAS AGUDAS**

## **ANTECEDENTES**

La leucemia es reconocida como una entidad en 1845 por Craigie y Bennett y en 1846 por Virchow, quien propone el nombre de sangre blanca o leucemia en 1847, distinguiendo dos formas posteriormente, una caracterizada por esplenomegalia y otra por linfadenopatía.

La leucemia rápidamente progresiva o leucemia aguda fue reportada por primera vez por Friedreich y la primera descripción de los síntomas asociados fueron reportadas por Ebstein en 1899 y fue únicamente después del advenimiento del método de Erlich's para tinción de células sanguíneas, cuando tipos específicos de leucocitos son asociados con diferentes patrones clínicos.

La palabra leucemia significa "sangre blanca" y el término "aguda" se conserva en la actualidad por razones históricas. Antaño los pacientes con leucemias "agudas" vivían menos que aquellos que con leucemias "crónicas", situación que ha cambiado merced al empleo de tratamientos cada vez más eficaces (1,2,36).

### **1.1 DEFINICIÓN.**

Las leucemias agudas son padecimientos que se caracterizan por la proliferación neoplásica y acumulación de células hematopoyéticas inmaduras en la médula ósea, que invaden a todo el organismo (3).

## **1.2 ETIOLOGÍA.**

Las causas de leucemia aguda aún son desconocidas, no obstante se conocen algunos factores implicados en la etiología de este padecimiento :

### **\* Susceptibilidad genética**

Algunos factores hereditarios y material genético anormal tienen efecto leucemogénico importante, principalmente en niños, algunos de ellos relacionados con algunas formas de inmunodeficiencias o síndromes de inestabilidad de cromosomas.

Generalmente los desordenes neoplásicos ocurren en el sistema linfoide y se manifiestan después como leucemia linfoblástica aguda o linfoma. Se sabe que algunas personas con anormalidades genéticas relacionadas con cariotipos anormales, como ocurre en los casos de síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, síndrome de Wiskott-Aldrich y anemia de Fanconi presentan un riesgo muy elevado de desarrollar leucemia aguda (3,4).

### **\* Mutación somática**

La mutación de células somáticas es un cambio que se adquiere en el material genético de las células que no intervienen en la reproducción, por lo que el desempeño de un papel en la leucemogénesis por este proceso, puede explicar la acción de la radiación y fármacos quimioterapéuticos en leucemia aguda, dado que son capaces de producir mutaciones cromosómicas (3,4).

### **\* Oncogenes**

Se sabe que los elementos transformadores de retrovirus oncogénicos son de hecho genes normales celulares que han sido alterados y seleccionados por su habilidad para inducir tumores. El número de oncogenes secuenciados ha proliferado en más de sesenta y se ha acumulado suficiente información para realizar una clasificación razonable basada en su localización y la posible función en la célula normal.

Desde la perspectiva de la genética clásica los oncogenes pueden actuar de manera dominante, activamente influyendo sobre pasos regulatorios, o de manera recesiva apareciendo para neutralizar la acción de los inhibidores de crecimiento.

El potencial oncogénico es el resultado de cambios estructurales o cuantitativos en los productos de proteínas que son capaces de actuar más allá de los límites de las funciones normales en la célula (1).

La activación de oncogenes celulares ha sido descrita por diferentes mecanismos, incluyendo cambios en la estructura (mutaciones puntuales, deleciones e inserciones), amplificación de genes, translocación cromosomal y otros.

En leucemia mieloblástica aguda la alteración más común es la mutación puntual, que involucra predominantemente genes de la familia ras. En algunos casos Myc y myb son también amplificados en estas líneas celulares.

El papel que juegan los oncogenes en la patogénesis de leucemia está definido, pero son necesarios otros datos para el establecimiento de su evolución en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

**\* Virus**

Se sabe que los retrovirus, virus que contienen en su genoma a la enzima transcriptasa inversa que les permite producir una copia de ADN a partir del ARN viral, pueden causar leucemia aguda en animales de laboratorio, ya sean ratones y esporádicamente en gatos.

Cuando el virus oncogénico o retrovirus infecta a la célula, su genoma cifrado en ARN se convierte en ADN por acción de la enzima transcriptasa inversa, el ADN viral se integra al ADN cromosómico de la célula huésped y la información genética viral es transcrita a ARNm, con lo cual la célula sintetizará proteínas virales. Dentro de estas proteínas se encontrará la codificada por el oncogen viral.

Esta proteína es una fosfoquinasa que añade grupos fosfato a otras proteínas y por lo mismo está relacionada con los mecanismos de control metabólico, con lo cual puede ocurrir que mediante la fosforilación la quinasa del oncogén viral altere el comportamiento y el crecimiento de las células, por lo que se dice que esta situación puede conducir a un rompimiento de la regulación celular normal ejercida sobre la expresión de la información genética (3,5,6).

En el caso de las leucemias en humanos se ha demostrado la etiología viral con el conocimiento de los virus T de leucemia humana (HTLV) HTLV-I y HTLV-II que tienen algunas semejanzas con el virus del HIV, agente causal del SIDA (36).

**\* Disfunción Inmunológica**

Se sabe de una mayor frecuencia de leucemia en personas con trastornos inmunológicos ya sean congénitos o adquiridos, tales como el síndrome de Wiskott-Aldrich, agamaglobulinemia ligada a X de Bruton y ataxia-telangectasia. Así mismo se ha observado una relación entre el tratamiento prolongado en pacientes con inmunodepresores y leucemia, posiblemente porque la perturbación del sistema de autovigilancia inmunológica mediada por células y/o una producción deficiente de anticuerpos, conduzca a la producción y supervivencia de células malignas (3,5).

**\* Desordenes Hematológicos**

Pacientes con desordenes hematológicos, incluyendo anemia sideroblástica, mielofibrosis, hemoglobinuria paroxística nocturna, policitemia vera y posiblemente anemia aplásica tienen un riesgo elevado de desarrollar leucemia aguda (4).

Precisamente como la mayor frecuencia de leucemia aguda se encuentra en pacientes con estos trastornos, se ha empleado el término de preleucemia, caracterizado por citopenias múltiples y anormalidades cromosómicas.



**\* Toxinas del medio ambiente (Benceno)**

Entre los solventes relacionados con leucemia se encuentra el benceno. Desde los inicios de los años sesentas, el uso de adhesivos usados en factorías fue modificado por sus altas concentraciones en benceno. Algunos años después el benceno fue reemplazado por diferentes solventes disminuyendo las concentraciones ambientales.

El benceno es un producto natural, volátil, que se encuentra en el medio ambiente y también como producto principal solvente en muchos procesos industriales. Se absorbe completamente por los pulmones y la piel, por ser altamente lipofílico se acumula en la grasa corporal y el tejido nervioso.

Las secuelas tóxicas están relacionadas con la dosis y los niveles se asocian con un riesgo leucemogénico elevado.

La hipótesis ha sido propuesta tomando en cuenta, que la médula ósea por sí sola juega un papel de, formadora de productos leucemogénicos. El benceno es metabolizado por los citocromos en el hígado formando intermediarios como la hidroquinona, que se concentra en la grasa de médula ósea y eventualmente es convertida a agentes mutagénicos por enzimas como mieloperoxidasa, peroxidasa y prostaglandinas.

La hematotoxicidad del benceno se ha reproducido en modelos murinos diseñados para simular las condiciones de exposición ocupacional por inhalación intermitente. Se observa que el agente activo no es el benceno por sí solo pero sí uno de sus metabolitos, a través de una serie de reacciones en el hígado, formando benzoquinona y trans-trans muconaldehído los cuales son agentes tóxicos para la médula ósea de ratón.

En animales tratados con benceno se lleva a cabo la formación de derivados que predisponen mutaciones a nivel de ADN, posiblemente por su habilidad para alquilar ácidos nucleicos, estos productos activos son mutagénicos directamente en bacterias, hamster y células humanas.

Existe asociación entre leucemia aguda con la exposición a pesticidas y en algunos casos se aumenta su incidencia por riesgo ocupacional que involucra el uso de ciertos químicos orgánicos volátiles (3).

#### **\* Radiación ionizante**

Se ha establecido una relación entre la radiación ionizante y cáncer humano, es decir partículas de baja frecuencia penetran en el tejido generando ionizaciones secundarias, incluyendo neutrones, partículas alfa, rayos X y rayos gama.

Las ondas de baja frecuencia tienen ambos componentes electrónicos y magnéticos con diferente capacidad de penetración y usualmente no generan iones en la célula.

De los estudios de los efectos biológicos la radiación ionizante ha sido dividida en :

- a) Partículas con transferencia de alta energía lineal (LET), las cuales no penetran profundamente en el tejido pero producen altas concentraciones de iones y radicales.
- b) Ondas de baja LET (rayos gama y rayos x) las cuales penetran más profundamente pero transfieren menos energía.

Estos diferentes tipos de radiación inducen tumores y leucemias, de tal forma que pacientes a los cuales se aplica radioterapia anquilosante y radiólogos, así como personas expuestas a elevadas dosis de radiación han incrementado la incidencia de leucemia. En útero la exposición a radiación resulta también leucemogénica (3,7).

#### **\* Factores diversos**

Muchas otras situaciones han sido reportadas para aumentar el riesgo de leucemogénesis pero es necesario confirmarlas para juzgar su validez. Se ha encontrado una posible relación entre los hábitos de medicación, así como el uso de alcaloides de la madre durante el embarazo revelando un incremento de once veces la tendencia a tener leucemia aguda en los niños de los tres a los ocho años de vida.

Algunos casos revisados de leucemia en pacientes con colitis ulcerativa mueren por tratamientos fallidos, así como breves reportes que llaman la atención por la posibilidad de aumentar el riesgo de leucemogénesis en niños que reciben inyecciones de la hormona de crecimiento, se sabe también que el cloramfenicol puede causar leucemia aguda (3,7).

### **1.3 FISIOPATOLOGÍA.**

La leucemia aguda está caracterizada por la proliferación y acumulación de leucocitos inmaduros, acompañada de un debilitamiento de la hematopoyesis normal. Una explicación para el debilitamiento de la hematopoyesis de la médula ósea incluye una deficiencia primaria en las células stem normales y regulación anormal de la mielopoyesis por factores humorales o inhibición de las células stem normales por células leucémicas o sus productos.

Algunos datos de pacientes con leucemia aguda mieloblástica indican que existe clonalidad de precursores de células rojas y plaquetas, seguido de un evento leucemogénico en una diferenciación de células stem.

Las manifestaciones fisiopatológicas de la leucemia aguda son:

- 1.- Anormalidades que caracterizan a la célula leucémica, que incluyen, origen clonal, proliferación, citogenética, anormalidades morfológicas, falta de diferenciación, marcadores específicos y diferencias bioquímicas con respecto a las células normales.
- 2.- Cambios que ocurren en las células normales en respuesta al proceso leucémico, tales como una disminución en la hematopoyesis de células stem y de células del sistema inmune.
- 3.- El efecto del proceso leucémico en la fisiología del cuerpo, especialmente en la falta de hematopoyesis, función inmune, hemostasis, hemólisis, hiperesplenismo, hiperviscosidad y alteración del metabolismo.
- 4.- Debido a la invasión de células leucémicas, ocurre finalmente la infiltración de órganos e invasión del sistema nervioso central (1).

Se pensaba que la escasez en la producción de células normales la causaba la aglomeración, junto con la competencia por nutrientes esenciales, sin embargo estudios recientes sugieren que las células precursoras normales se pueden inhibir en su proceso de proliferación, en forma directa o indirecta por un inhibidor humoral secretado por las células leucémicas, siendo estas al parecer resistentes a esta sustancia inhibidora, propiedad que les confiere ventaja en la proliferación.

Se sabe también que alrededor de un 50% de individuos con leucemia, muestra un cariotipo anormal adquirido en sus células hematopoyéticas, en tanto que otras células somáticas son normales (5).

Se puede decir entonces que la enfermedad tiene su origen en el tejido hematopoyético de la médula ósea, pero cuando progresa es posible encontrar células malignas infiltradas en muchos órganos.

La célula blanco en la transformación maligna puede ser la célula precursora mieloide, o una célula precursora más madura, se hablará entonces de leucemia mieloblástica aguda (LMA), en cambio si la alteración ocurre en una sola célula precursora linfoide que da origen a una clona de linfocitos malignos se hablará entonces de leucemia linfoblástica aguda (LLA).

De todo lo anterior se puede decir que la leucemia aguda puede tener diversos orígenes.

#### **1.4 DATOS CLÍNICOS.**

Los signos y síntomas de presentación de leucemia aguda varían de acuerdo a la estirpe celular involucrada en el proceso, pero ambas se relacionan con la depresión de la hematopoyesis normal, lo que produce en casi todos los pacientes palidez, fatiga, debilidad por anemia, pérdida de peso, irritabilidad, anorexia, hematomas y hemorragias petequiales causadas por trombocitopenia, además de dolor óseo generalizado, que se presenta con mayor frecuencia en leucemia aguda mieloblástica y aparición de infecciones variables como consecuencia de la disminución o ausencia de leucocitos útiles (3,4).

## **1.5 CLASIFICACIÓN.**

La clasificación más útil que puede efectuarse de la leucemia aguda, es la clasificación MIC (morfológica, inmunológica y citogenética).

La leucemia se ha dividido en dos subclases; mieloide y linfoide las cuales incluyen las formas aguda y crónica. La razón para esta distinción está basada en la dualidad de líneas provenientes de células stem comunes en la médula ósea, que divergen y maduran por vías separadas.

Esta implicación de los eventos leucemogénicos ocurre primero dentro de la célula progenitora, pero sin haber disturbios en la progenie funcional. Al inicio esta nueva célula tiene capacidad limitada para madurar, desde esta perspectiva existen diferentes tipos de leucemias (3,36).

### **1.5.1 Clasificación morfológica de LLA y de LMA**

La clasificación morfológica de las leucemias agudas está dada de acuerdo a los criterios de la French-American-British (FAB) Cooperative Group, la cual se basa en la morfología y estirpe involucradas de las células.

#### **\* LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA)**

La leucemia linfoblástica aguda es la enfermedad maligna más común en niños, con una incidencia mayor entre los dos y los seis años de edad. La FAB la ha clasificado en:

- LA-L1:** Linfoblástica típica. Los linfoblastos son predominantemente pequeños, con cromatina nuclear fina y homogénea. El núcleo es redondo con hendiduras o indentaciones ocasionales, el nucleolo es pequeño y en ocasiones ausente. El citoplasma es escasamente basófilo con una relación núcleo: citoplasma, grande, existen vacuolas citoplásmicas en ocasiones presentes.
- LA-L2:** Linfoblástica atípica. Los linfoblastos son grandes y heterogéneos, con una relación núcleo: citoplasma más baja que en L1. La forma del núcleo es variable y las hendiduras o indentaciones son comunes, la cromatina es poco homogénea y es frecuente encontrar uno o más nucleolos distintos, el citoplasma es más basófilo que en L1 y las vacuolas citoplásmicas están presentes con mayor frecuencia.
- LA-L3:** Parecida a linfoma. Los linfoblastos son grandes y homogéneos, con una relación núcleo: citoplasma, elevada. La forma nuclear es regular, usualmente oval o redonda sin indentaciones o hendiduras. La cromatina nuclear es fina y homogénea con nucleolos vesiculares prominentes. El citoplasma es muy basófilo y usualmente existe un gran número de vacuolas citoplásmicas presentes.

**Linfoma linfoblástico.** Se trata de un cuarto tipo de leucemia linfoblástica que se desarrolla en pacientes con linfoma linfoblástico pobremente diferenciado. Estos pacientes son frecuentemente mujeres adolescentes, quienes presentan elevadas cuentas de blastos y masa mediastinal con alta incidencia en sistema nervioso central (SNC). Algunos pacientes desarrollan fase leucémica. Los linfoblastos son de tamaño medio con núcleo grande convolutado o cerebriforme. Para algunos investigadores se trata de una variante de L2.

Las células L1 se encuentran predominantemente en niños, mientras que en los adultos predominan tanto L1 como L2 con un pequeño predominio de L2. De tal forma que L3 representa la minoría de los casos y es considerada leucemia linfoblástica aguda tipo Burkitt.

#### \* LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA (LMA)

Las leucemias mieloblásticas agudas se han dividido en seis grupos de acuerdo a la clasificación morfológica realizada por la FAB.

Tres grupos (M1, M2 y M3) están caracterizados por su morfología granulocítica, dos formas (M4 y M5) por morfología monocítica, una forma (M6) de leucemia eritrocítica y una forma (M7) megacarioblástica.

**LA-M1:** Mieloblástica inmadura. En esta forma de leucemia existe una evidencia mínima de diferenciación granulocítica y de falta de maduración. Por medio de estudios de citoquímica se ha diferenciado este tipo de leucemia con L2, con mieloperoxidasa se encuentran presentes monocitos y granulocitos, pero no linfocitos.

**LA-M2:** Mieloblástica madura. Existe una clara evidencia de maduración dentro de los estadios de promielocítico y mielocítico. M2 representa del 20 al 30 % de los casos de leucemia mieloblástica aguda.



- LA-M3:** Promielocítica hipergranular. Esta variante está caracterizada por promielocitos hipergranulares y está asociada con un incremento en la incidencia de coagulación intravascular diseminada (CID), por lo que se requiere de heparinización profiláctica antes del inicio de la quimioterapia citotóxica. Representa el 5% de los casos de leucemia mieloblástica aguda.
- LA-M4:** Mielomonoblástica. Este subtipo presenta blastos heterogéneos, principalmente de granulocitos y monocitos, con predominancia de monocitos en sangre periférica y de granulocitos en médula ósea. Representa del 30 al 40 % de los casos de leucemia mieloblástica.
- LA-M5:** Monoblástica pura. Se han distinguido dos formas de leucemia monoblástica, una de ellas caracterizada por la proliferación homogénea de monoblastos y la otra por que muchas de estas células presentan un grado de maduración menor al de promonocito. Esta leucemia monoblástica se ha distinguido de leucemia granulocítica por la presencia de esterasa no específica.
- LA-M6:** Eritroleucemia. En la eritroleucemia existe predominancia de eritroblastos en médula ósea. Es necesario distinguir entre eritroleucemia y síndromes mielodisplásicos, tal es el caso de anemia sideroblástica refractaria idiopática. El 30% de células no eritroides de médula ósea son blastos.
- LA-M7:** Megacarioblástica. La médula ósea presenta más del 30% de blastos que son identificados como megacarioblastos por su reactividad con peroxidasa de plaquetas o anticuerpos plaqueta-específicos (2,3).

### 1.5.2 Clasificación inmunológica de LLA y LMA

Los marcadores inmunológicos, al identificar las células a través de sus características antigénicas, han permitido en el estudio de células hematopoyéticas:

- a) Reconocer estirpes mediante métodos morfológicos y citoquímicos convencionales.
- b) Establecer subgrupos inmunológicos en poblaciones celulares normales y en su contraparte leucémicas.
- c) Definir poblaciones celulares con propiedades biológicas específicas.

Por lo tanto, mediante los métodos inmunológicos es posible reconocer antígenos (Ag) en la membrana celular, algunos de los cuales son específicos para diferentes poblaciones de células (36).

De tal forma que la leucemia aguda se clasifica inmunológicamente en:

#### 1) leucemia linfoblástica aguda de células T.

Los perfiles de los marcadores inmunoglobulínicos pueden corresponder a los hallados en los estadios precoces o tardíos del proceso tímico de las células T.

#### 2) Leucemia de células con signos crecientes de diferenciación hacia células B.

- i.- Leucemia de células jóvenes destinadas a la línea B
- ii.- Leucemia linfoblástica común
- iii.- Leucemia de células pre-B

De tal forma que se han diseñado técnicas sofisticadas para subclasificar estos fenotipos inmunológicos más precisamente, de esta forma se han elaborado anticuerpos monoclonales para subdividir los tipos de LLA, los cuales son; los marcadores para células T y los marcadores para las células B.

### I.- Marcadores de las células T

1.- Para antígenos que aparecen precozmente en la diferenciación tímica de las células T.

**CD1** Señala una molécula superficial que aparece más tarde en el procesado tímico en forma de reordenamiento de genes, para el comienzo de las cadenas de los receptores antigénicos de las células T. Ausente en las células T maduras.

**CD2** Señala el receptor para las células de carnero, que se sabe funciona fisiológicamente como receptor independiente del antígeno, necesario para iniciar la activación y la división de las células durante las primeras etapas de la diferenciación tímica.

2.- Para los componentes del complejo receptor antigénico de las células T.

**CD3** Señala un componente del receptor antigénico de las células T formado en una fase más tardía del procesado tímico y está presente en las células T maduras.

**CD4** Señala un componente del receptor antigénico de las células T que permite a estas reconocer los determinantes MHC clase II, hallado habitualmente en las células T cooperadoras.

**CD8** Señala un componente del receptor antigénico de las células T que permite a estas reconocer los determinantes MHC clase I, hallados en las células T citotóxicas.

## **II.- Marcadores de las células B**

1.- Para la identificación de células en diferentes estadios de la diferenciación celular B.

**CD10 (CALLA)** Reconoce un antígeno de superficie hallado en la forma común de LLA.

**CD24** Reconoce un segundo antígeno superficial hallado en la forma común de LLA.

**CD19** Reconoce un antígeno hallado en las células B, tanto en las formas jóvenes como en las diferenciadas.

**CD20** Reconoce un segundo antígeno hallado en las formas jóvenes y diferenciadas.

2.- Para identificar la presencia de inmunoglobulina en las células B o sobre ellas.

**ANTI SIG** Anticuerpo que reconoce la inmunoglobulina policlonal de superficie y que por lo tanto tiñe todas las células B, independientemente del tipo de cadena de la inmunoglobulina superficial.

**ANTICADENA K** Anticuerpo que reconoce solo las cadenas ligeras Kappa de la inmunoglobulina, útil por consiguiente para reconocer una proliferación monoclonal.

**ANTICADENA U** Anticuerpo que reconoce la cadena pesada de la IgM, útil para reconocer el comienzo de la formación de inmunoglobulina en el citoplasma de las células B en diferenciación (8,9,36).

Para LAM existen también una serie de marcadores celulares útiles, entre los que se encuentran CD13, CD14, CD15, CD33, CD41. Con la utilización de combinaciones de anticuerpos monoclonales ha sido posible distinguir entre uno y otro tipo de leucemias en más de un 95% de los casos (7).

### 1.5.3 Clasificación citogenética de LLA y LMA

En muchos casos de LA se encuentran alteraciones cromosómicas, en LMA ocurren en más del 50% de los pacientes. Se han encontrado algunas correlaciones entre las anomalías cromosómicas y el tipo de leucemia aguda.

De las alteraciones únicas en LMA, pueden señalarse: t(4:11)(q21;23) en LA-M4, t(8;21)(q22.1;-q22.3) en LA-M2, t(15;17)(q22;q11.2) en LA-M3.

Se sabe que la respuesta al tratamiento es mejor en sujetos que no presentan alteraciones cromosómicas e incluso se ha definido una clasificación de LMA por riesgos, a partir de los trastornos genéticos, lo que permite predecir la posibilidad de lograr remisión completa del padecimiento, duración de la misma y supervivencia.

En LLA, la alteración cromosómica más frecuente, es el cromosoma Filadelfia: t(9q+;22q-) (q34.1;q11.2), que produce un gen quimérico llamado BCR/ABL (breakpoint cluster region/ A belson) que codifica la síntesis de proteínas p190 de LLA y p210 de leucemia mieloide crónica, ambas con función de cinasa de tirosina. El cromosoma Filadelfia aparece en 2% de los enfermos de LLA infantil, e incluso en el 25% de los casos de adultos; su presencia se ha asociado con pronóstico sombrío (36).

## 1.6 DIAGNÓSTICO.

Es importante distinguir entre LMA y LLA por las diferencias en el pronóstico y la terapia, por estudios morfológicos e histoquímicos se han llegado a diagnósticos correctos, sin embargo, la distinción entre variantes inmaduras de leucemias mieloides y linfoides es un tanto difícil.

Para la realización de un diagnóstico preciso se toman en cuenta:

- a) Hallazgos clínicos
- b) Hallazgos de laboratorio

### a).- Hallazgos clínicos

Los hallazgos clínicos resultan de la infiltración de tejidos normales por las células leucémicas y por la falta de hematopoyesis normal. El sitio más importante de infiltración por leucemia es la médula ósea. Los hallazgos clínicos encontrados son:

- \* Se presenta dolor óseo generalizado y principalmente en articulaciones, debido a un incremento en la presión intramedular y ocasionalmente se presenta desmineralización, osteoclerosis y lesiones osteolíticas.
- \* Hepatomegalia, esplenomegalia y crecimiento de ganglios linfáticos han sido reportados en el 10-60 % de los pacientes. En LLA con frecuencia se genera crecimiento del timo.

- \* Daño renal provocado por la infiltración de células leucémica al parénquima, además de infecciones o hemorragias debido a la obstrucción mecánica por crecimiento de los ganglios linfáticos.
- \* Síntomas gastrointestinales como distensión, saciedad y constipación debidos principalmente a compresión por organomegalia.
- \* Sistema nervioso central involucrado causando dolor de cabeza, cambios en el estatus mental, diplopía y papiledema.
- \* Petequias secundarias a trombocitopenia es la causa más común de lesiones en la piel. La infiltración de células leucémicas en piel ocurre en pacientes con leucemia recurrente.

#### **b).- Hallazgos de laboratorio**

Se realiza aspirado de médula ósea empleando tinciones del tipo MayGrünwald-Giemsa, Wright o Romanowsky; el cual típicamente presenta hiper celularidad, destrucción de los espacios ocupados normalmente por tejido graso y reducción marcada de los elementos hematopoyéticos normales. Los espacios medulares son infiltrados por blastos leucémicos que en la mayoría de los casos son proplamente identificados por sus características morfológicas y citoquímicas.



**Observaciones en leucemia mieloblástica aguda**

Las células en LMA son usualmente grandes con relación núcleo: citoplasma baja, discreta cromatina nuclear y núcleos prominentes y bilobulados. Presentan cuerpos de Auer en menos del 10 % de los casos.

**Observaciones en leucemia linfoblástica aguda**

Los linfoblastos leucémicos varían en tamaño y forma, presentan una relación núcleo: citoplasma alta, uno o dos núcleos y no presentan cuerpos de Auer en su citoplasma (7).

**1.7 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.**

El diagnóstico diferencial de leucemia aguda, rara vez es difícil, se pueden encontrar reacciones denominadas leucemoides e incluso presencia de células inmaduras en sangre periférica en neoplasias de otro tipo, simulando LAM.

En ocasiones puede presentarse neutropenia inducida por fármacos tóxicos e infecciones, dando lugar a la desviación de formas celulares jóvenes.

Algunas enfermedades virales como la mononucleosis infecciosa y otras, pueden simular leucemia y más cuando se acompañan de púrpura trombocitopénica o de anemia hemolítica autoinmune. Deben tenerse en cuenta algunos casos de leucemia aguda hipocelular diferenciándola de la anemia aplásica (27).

## **1.8 TRATAMIENTO.**

El tratamiento del cáncer se ha basado en la idea de que debe ser una quimioterapia dirigida contra las células cancerosas, en la cual se pueden presentar efectos contra las células normales, pero estos deben ser tolerables y reversibles.

Las diferencias entre los tejidos normales y los cancerosos pueden ser pequeñas, ya que muchos tejidos normales en ciertos estados poseen gran capacidad de proliferación que compite y en algunos casos excede a la de los tejidos malignos, entre estos tejidos se encuentran elementos de médula ósea, epitelio gastrointestinal y folículos pilosos que son los que reciben el impacto de los efectos tóxicos de los fármacos durante el tratamiento.

### **1.8.1 Tratamiento del cáncer en general**

Los fármacos más usados en la quimioterapia contra los diferentes tipos de cánceres pueden ser clasificados de la siguiente manera:

- a.- Agentes antimetabolitos
- b.- Agentes alquilantes
- c.- Antibióticos antitumorales
- d.- Alcaloides antitumorales
- e.- Otros agentes antitumorales

Las dos clases principales de compuestos citotóxicos que han probado ser útiles en el tratamiento contra el cáncer son:

- 1.- Aquellos que interfieren en la síntesis de precursores de ADN.
- 2.- Aquellos que interactúan químicamente con el ADN.

#### **a.- Agentes antimetabolitos**

Los antimetabolitos son compuestos que poseen una estructura molecular similar a aquella que presentan los metabolitos normales de la célula con los cuales compiten, así estos compuestos son aceptados como sustratos a análogos que intervienen en reacciones bioquímicas vitales y de este modo interfieren con los procesos celulares.

Estos compuestos fueron introducidos por Feber y col. quienes demostraron en 1948 que el análogo del ácido fólico denominado aminopterina era útil, en el tratamiento de leucemias agudas.

Dentro de estos compuestos el más utilizado en LA es el metotrexato, el cual es un análogo del ácido fólico que es transportado al interior de la célula, por medio de un acarreador membranal encargado de la captación y transporte de los folatos reducidos con actividad fisiológica.

El metotrexato ejerce su efecto citotóxico al inhibir a la enzima dihidrofolato reductasa, la cual es la enzima responsable del mantenimiento de la reserva intracelular de folatos en estado reducido (forma activa) y a su vez, los tetrahidrofolatos funcionan como acarreadores de grupos de un átomo de carbono para la síntesis de purina y timidilato. De este modo se produce una acumulación de folatos en estado oxidado (forma inactiva) y con ello cesa la síntesis de ADN.

El metotrexato sufre una transformación en las células cancerosas convirtiéndose en poliglutamato de metotrexato el cual se une a la dihidrofolato reductasa con igual o mayor afinidad que el metotrexato.

Después de eliminar el fármaco libre (metotrexato) los poliglutamatos son retenidos, por lo que la formación de estos puede ser determinante para la duración del efecto del fármaco en las células malignas, ya que la muerte celular es proporcional a tiempo de exposición del fármaco, así como a la dosis aplicada.

El grupo de los antimetabolitos está constituído por los siguientes fármacos: metotrexato, 5-fluorouracilo, citidinarabinósido, 6-mercaptopurina, arabinofuranosiladenina.

#### **b.- Agentes alquilantes**

Entre los más notables agentes que interactúan con el ADN se encuentran los fármacos conocidos como agentes alquilantes, denominados así por su capacidad para formar enlaces covalentes con los ácidos nucleicos.

Los grupos alquilo se unen al ADN, interfiriendo así con su integridad y función.

La alquilación trae como consecuencias la lectura incorrecta del código genético durante la síntesis de proteínas, así como también una ruptura de cadenas simples de ADN que se dan como consecuencia de los procesos enzimáticos de reparación, ya que durante la reparación las bases alquiladas son escindidas por endonucleasas que abren específicamente el sitio de alquilación, la cual trae como consecuencia la inhibición de la síntesis de ADN, ARN y proteínas.

Aunque los agentes alquilantes muestran un mecanismo de acción común, se presentan grandes diferencias en sus características de reactividad química, liposolubilidad y transporte a través de la membrana por lo que no es posible observar una resistencia cruzada uniforme entre estos fármacos al ser utilizados en la quimioterapia.

Dentro del grupo de los agentes alquilantes se encuentran los siguientes fármacos: mostaza nitrogenada, ciclofosfamida, melfalan, clorambusil, busulfan, nitrosourea, cis-platino.

#### **c.-Antibióticos antitumorales**

Este grupo está constituido por sustancias antimicrobianas que poseen actividad antitumoral, las cuales han sido aisladas de algunos microorganismos que existen en la naturaleza.

El mecanismo de acción propuesto para los antibióticos antitumorales, es la unión del fármaco al ADN al intercalarse en las bases nitrogenadas. Al unirse el fármaco al ADN no puede llevarse a cabo su replicación a partir del lugar en que se halla presente el fármaco, afectando a las células cancerosas dado que se están multiplicando.

El grupo de los antibióticos antitumorales lo constituyen: bleomicina, antraciclinas (daunorubicina, doxorubicina), mitomicina C, mitramicina y adriamicina.

#### **d.- Alcaloides antitumorales**

Los alcaloides antitumorales son sustancias extraídas de la Vinca rosea los cuales presentan estructuras estrechamente relacionadas entre sí pero con acciones clínicas y tóxicas con diferencias significativas.

La actividad citotóxica de los alcaloides de la vinca se debe a su capacidad para unirse a la tubulina, cuya polimerización forma la proteína microtubular que forma el huso a lo largo del cual los cromosomas migran durante la mitosis.

Al unirse los alcaloides a la tubulina, inhiben el proceso de ensamblaje de los microtúbulos con lo que no se logra la formación del huso y se inhibe la división celular.

Adicionalmente los microtúbulos juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura celular, ya que forman el citoesqueleto el cual confiere a las células su configuración y forma características.

El grupo de los alcaloides antitumorales está constituido por vincristina, vinblastina, vindesina, epipodofilotoxinas VM26 y VP16.

#### **e.- Otros agentes antitumorales**

Existen otros compuestos que son utilizados como agentes antitumorales, entre ellos se encuentra la asparaginasa, que produce una carencia de asparagina necesaria para la síntesis de proteínas en LLA, la cual origina la muerte de las células leucémicas, sin embargo, este producto ha revelado ser hepato y neurotóxico.

Así mismo existen otros compuestos que presentan un mecanismo de acción poco conocido, tal es el caso de la procarbina la cual lleva a cabo la despolimerización del ADN siendo un efecto que aún no está esclarecido (10).

#### **1.8.2 Tratamiento para leucemia linfoblástica aguda (LLA)**

El tratamiento para LLA se ha dividido en tres fases principalmente, las cuales son:

- a.- Inducción de la remisión
- b.- Profilaxis de sistema nervioso central
- c.- Terapia post-remisión o de mantenimiento

##### **a.- Inducción de la remisión**

La inducción de la remisión representa la primera y más importante de las fases del tratamiento, dado que está relacionada con el rápido restablecimiento normal de la médula ósea y las funciones del cuerpo. Se sabe que es necesaria una remisión completa durante las primeras ocho semanas del tratamiento para prolongar una sobrevida significativa.

La quimioterapia de inducción de la remisión tiene como primer objetivo, lograr una reducción rápida de la masa celular leucémica y el restablecimiento de la hematopoyesis normal.

Un segundo objetivo es reducir esta masa en la menor fracción posible, tomando en cuenta que la enfermedad se ve influenciada por lo grave del tumor corporal.

El criterio para el estado de remisión incluye :

- 1.- En médula ósea menos del 5% de linfoblastos.
- 2.- La ausencia de linfoblastos en sangre periférica y la presencia de más del  $0.5 \times 10^9$  granulocitos / L y  $75 \times 10^9$  plaquetas / L.
- 3.- La ausencia de hallazgos físicos atribuibles a LLA.

En niños con LLA los primeros estudios presentaron que una remisión completa se realizaba en un gran número de pacientes con agentes únicos. Poco después se demostró que la combinación de dos agentes ocasionaba una relación alta de remisión completa, específicamente con una combinación de vincristina semanal y prednisona diaria, se ha alcanzado la remisión completa en el 85-95% de niños con LLA.

La adición de un tercer fármaco ya sea daunorubicina o L-asparaginasa incrementaron un poco la relación ya alta de remisión completa.



La remisión completa es usualmente alcanzada en cuatro semanas, los pacientes adultos con LLA tienen en general un pronóstico malo y la relación de respuesta a un agente único es consistentemente más baja que la observada en niños, una relación de respuesta alta se ha observado con la utilización de un agente único sea vincristina o prednisona con una relación de remisión completa del 10-40%.

Combinaciones de quimioterapia con vincristina y prednisona en adultos, dan como resultado relaciones de remisión completa de sólo el 50-60 % a diferencia de los casos de LLA en niños, que con un tercer fármaco alcanzaron rangos del 70-90% de remisión, sin embargo, la duración de remisión es más corta en adultos que en niños, usualmente tiene una duración de 12-24 meses.

#### **b.- Profilaxis de sistema nervioso central (SNC).**

La relación de recaída de SNC (desarrollo clínico aparente de leucemia en SNC) como primer sitio de recaída va del 33-67 % de los pacientes que no reciben terapia específica para SNC.

El SNC es un santuario farmacológico en el cual los linfoblastos pueden infiltrar, la barrera sangre-cerebro previene efectivamente de los niveles de fármacos alcanzados en el organismo, por lo que se ha hecho necesaria una terapia efectiva y directa contra la leucemia de SNC.

Estudios iniciales con bajas dosis de radiación craneo-espinal (500-1200 cgy) no resultaron para prevenir la recaída de SNC, sin embargo, altas dosis de radiación craneo-espinal ( 2400 cgy) o radiación craneo-espinal y metotrexato intratecal mostraron una reducción marcada de recaída de SNC de menos del 5% de los pacientes.

Por otro lado, los efectos de las formas agresivas de profilaxis de SNC pueden ser muy severas, tales como parálisis transitoria, mielitis transversa, diacnoiditis química, síndrome de somnolencia, vasculopatía desmineralizante y leucoencefalopatía progresiva.

La combinación de altas dosis de metotrexato semanal 140 mg / m<sup>2</sup> o más y radiación craneal están asociadas con la elevada incidencia de encefalopatía, a largo plazo se ha observado que los pacientes desarrollan calcificaciones intracerebrales además de que en los niños se ven afectadas las funciones intelectuales, presentando una declinación del valor del coeficiente intelectual comparado con niños con otros cánceres los cuales no reciben terapia de SNC, de tal forma que algunos estudios sugieren que el efecto es más pronunciado en niños irradiados después de los 5 años de edad.

Debido a tales efectos se ha buscado la posibilidad de disminuirlos, es decir hacer una reducción de la toxicidad de la profilaxis sin comprometer la eficacia. De tal forma que el uso de dosis intermedias o elevadas de metotrexato sistémico sugiere que es la forma de terapia efectiva de profilaxis de SNC en niños, mientras que en adultos se aplica metotrexato intracraneal con o sin radiación. Alternativamente quimioterapia intraventricular y altas dosis sistémicas de metotrexato han sido utilizadas para prevenir la recaída de SNC.

#### **c.- Terapia post-remisión o de consolidación**

Agentes farmacológicos únicos son utilizados para la continuación de la terapia, 6-mercaptopurina y metotrexato han sido utilizados, con duración de remisión media de 7 y 10 meses respectivamente.

Se ha demostrado que la adición de un tercer fármaco como ciclofosfamida y un cuarto fármaco como citarabina no aumentan el tiempo de recaída, en adultos la sobrevida media con quimioterapia de mantenimiento es aproximadamente de 18-27 meses.

Algunos estudios usando fármacos adicionales durante el tratamiento de mantenimiento, indican que se alcanza en el 20-35 % de los pacientes una sobrevida libre de leucemia en un período de 3-5 años.

### **Suspensión de la terapia**

La duración óptima de la terapia de mantenimiento es poco conocida en niños, se ha observado que tanto 24 como 36 meses de tratamiento son igualmente efectivos. En adultos la longitud de la terapia de mantenimiento es menos clara, un estudio sugiere que un tratamiento intensivo por 6 meses resulta tan efectivo como 2 o 3 años de terapia, sin embargo, otros estudios sugieren 3 años de terapia de mantenimiento.

### **Tratamiento de enfermedad recurrente**

La leucemia recurre principalmente en médula ósea, en ella se ha visto que aproximadamente la mitad de los casos está asociada con un mal pronóstico y ocurre principalmente en pacientes que reciben profilaxis inadecuada de SNC .

La recaída gonadal se ha prevenido con radiación profiláctica, pero este tratamiento no afecta la sobrevida del paciente y sí puede causar esterilidad permanente. La recaída primaria de testículo es un signo de enfermedad resistente a fármacos con resultados clínicos muy pobres.

### **Terapias biológicas**

Recientemente el uso de seroterapia con anticuerpos anti-LLA ha llevado a un decremento transitorio en la cuenta de blastos. Anticuerpos monoclonales han sido conjugados con toxinas o con radioisótopos para mejorar su respuesta terapéutica. Estudios utilizando interferón de leucocitos humanos seguido de trasplante de médula ósea en pacientes con LLA sugiere un decremento en la recaída leucémica pero no representa una mejoría en la supervivencia.

#### **1.8.3 Tratamiento de leucemia mieloblástica aguda (LMA)**

El tratamiento de LMA se ha dividido en dos fases :

- a.- Inducción de la remisión
- b.- Terapia post-remisión

Las cuales incluyen terapias de consolidación, intensificación y mantenimiento.

##### **a- Inducción de la remisión**

Muchos regímenes de inducción de la remisión combinan citarabina y antraciclinas, en otros casos se utilizan citarabina 100-200 mg/m<sup>2</sup> por día durante 7 días combinada con daunorubicina en dosis de 30-70 mg/m<sup>2</sup> por día.

Los pacientes en quienes uno o dos cursos de quimioterapia de inducción fallan para alcanzar una remisión completa tienen un mal pronóstico. Aproximadamente la mitad de los pacientes que no responden al tratamiento presentan leucemia residual resistente y la otra mitad del fallo de tratamiento puede ser debida a infecciones o toxicidad a la quimioterapia.

Daunorubicina es preferida a doxorubicina en la inducción debido a que está asociada con menos toxicidad. Algunos grupos de pacientes requieren de atención específica durante el tratamiento de inducción tal es el caso de pacientes mayores de 60 años de edad, los cuales presentan una relación de remisión baja pareciendo estar relacionada a presentar un alto riesgo de infecciones y toxicidad. La terapia de inducción produce respuesta en más del 60% de adultos y más del 75% en niños con LMA.

#### **b.- Quimioterapia post-remisión.**

##### **1.- Consolidación o Intensificación primaria.**

Se refiere a uno o más cursos de terapia administrados después de alcanzar la remisión y muy frecuentemente esto produce mielosupresión severa.

##### **2.- Intensificación tardía.**

Involucra uno o más cursos de quimioterapia intensiva administrada de 6-12 meses o más después de haber alcanzado la remisión.

##### **3.- Quimioterapia de mantenimiento.**

Generalmente consiste en cursos frecuentes de bajas dosis de quimioterapia, administrada durante algunos meses o años.

#### **4.- Quimioterapia de mantenimiento intensiva.**

Involucra la aplicación intermitente de cursos repetidos de quimioterapia intensiva.

La eficacia de estas terapias se refleja en duraciones de remisión prolongadas y prevención de recaídas, la duración media de la remisión va de 1-2 años con una proporción de 5 años de sobrevida libre de leucemia y las respuestas han variado en el 15-35% en adultos y del 35-75% en niños.

#### **Agentes de diferenciación**

Un tratamiento innovador consiste en inducir la maduración de células leucémicas. Diversos agentes pueden inducir a estas células para diferenciarse *in vitro*, los cuales incluyen ésteres de forbol, dimetilsulfóxido (DMSO) y retinoides, bajas dosis de fármacos quimioterapéuticos son buenos inductores de diferenciación celular tal es el caso de la citarabina, sin embargo, en muchos pacientes también actúa por medio de un efecto citotóxico produciendo una médula ósea hipocelular después de 2 o 3 semanas de tratamiento.

#### **Inmunoterapia y modificadores de respuesta biológicos**

En algunos estudios se han utilizado adyuvantes inmunes no específicos, como es el caso del bacilo de Calmette-Guerin (BCG), Corynebacterium parvum u otros solos o combinados, con irradiación o modificadores químicos autólogos o células de leucemia allogénica. Estas formas de inmunoterapia con o sin quimioterapia de mantenimiento han fallado generalmente para prolongar la remisión.

De la misma forma se han probado interferón alfa de leucocitos humanos e interferón alfa recombinante sin presentar una actividad convincente. Anticuerpos monoclonales han sido utilizados con reducción transitoria de células leucémicas en circulación causando un efecto muy pequeño en médula ósea, sin notar una remisión completa.

#### **Tratamiento de sistema nervioso central (SNC)**

El SNC se involucra en LMA debido a la infiltración de células leucémicas en las meninges causando masas tumorales intracerebrales (cloromas) en el 5-10% de los pacientes por lo que la terapia profiláctica para SNC generalmente no está indicada, solamente en aquellos casos de pacientes con cuentas leucocitarias muy altas.

#### **Tratamiento en la recaída de LMA**

El tratamiento en la recaída de SNC usualmente emplea citarabina Intratecal y/o metotrexato solo o combinado con radiación intracraneal. La quimioterapia con múltiples agentes ha sido evaluada en pacientes con LMA avanzada, estos regímenes incluyen altas dosis de citarabina combinada con amsacrina, doxorubicina, 5-azacitidina o mitoxantrona (7).

### 1.9 LEUCEMIAS AGUDAS Y RESISTENCIA MÚLTIPLE.

En estudios con células leucémicas colectadas antes y después del tratamiento se encontró alteración en la expresión de genes a) *mdr-1* (*gp-P*), b) *mrp* (resistencia a múltiples fármacos relacionado a proteínas) y c) isoformas de topoisomerasa II alfa y beta. Los cuales están asociados directamente con la resistencia celular a múltiples fármacos, por lo que se dice que existen por lo menos estos tres mecanismos diferentes como responsables de la falta de respuesta a la quimioterapia en leucemias linfoblástica aguda y leucemia mielocítica crónica (34).

Sin embargo, de los mecanismos de resistencia a múltiples fármacos el único que se ha involucrado especialmente en el desarrollo de resistencia en enfermedades hematológicas malignas como son leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, linfoma Non-Hodgkin y mielomas múltiples, es el mecanismo relacionado con la sobreexpresión del gen *MDR-1* que codifica para una glucoproteína de superficie celular denominada glucoproteína-P, dado que en la mayoría de los casos estudiados de este tipo de padecimientos, particularmente las leucemias agudas, se encuentran elevados los niveles de esta glucoproteína después de ser tratadas con quimioterapia, en especial con los fármacos involucrados en el fenotipo *mdr*, probablemente por selección o preexistencia de células malignas que expresan glucoproteína-P (35).

En las leucemias agudas los regímenes de inducción y algunos protocolos de quimioterapia utilizan frecuentemente agentes antitumorales que comprenden el fenotipo de resistencia múltiple a fármacos, por lo que se hace importante el análisis de pacientes con leucemia, antes y después de su tratamiento para observar si se presenta la sobreexpresión o amplificación del gen capaz de conferir resistencia, debido a la posibilidad de desarrollar por estos mecanismos resistencia clínica a estos agentes.



Estudios recientes en pacientes con leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloblástica aguda han presentado que la expresión del gen MDR-1 fue detectada en el 19% de los pacientes con leucemia aguda de novo y el 50% de los pacientes después de la recaída, siendo la relación de remisión completa del 67% en pacientes con expresión del gen MDR-1 no detectable o mínima, contra el 29% en pacientes con elevados niveles de expresión (32).

Además de que se ha observado que los pacientes que expresan el gen MDR-1 presentan una supervivencia significativamente más corta comparada con aquellos pacientes quienes no presentan este fenotipo, de igual forma que se ve incrementado el riesgo de recaída primaria en tiempos muy breves de tratamiento. Por lo que se dice que la expresión de este gen también está asociado con un pobre pronóstico (33).

**RESISTENCIA MULTIPLE A FARMACOS**

## **2.- RESISTENCIA MÚLTIPLE A FÁRMACOS (MDR multidrug resistance).**

Aunque el cáncer es más antiguo que el conocimiento que se tiene sobre su origen y desarrollo mucho se ha avanzado en el descubrimiento de los mecanismos involucrados en su formación, así como de los factores que lo predisponen y de algunos de los genes que participan en el proceso, sin embargo, gran parte del comportamiento de la célula tumoral aún permanece oscuro y las estrategias terapéuticas utilizadas para combatirlo en ocasiones resultan poco eficaces.

En el tratamiento contra el cáncer, la quimioterapia es una de las formas más utilizadas y desafortunadamente no ha alcanzado grandes éxitos en algunos tumores. De tal forma, que existen algunos tumores en los que generalmente se obtiene una buena respuesta al inicio de la quimioterapia, sin embargo, cuando recurren comúnmente se vuelven resistentes a los agentes antineoplásicos al tal grado, que causan irremediablemente la muerte de los pacientes. Es así, que uno de los principales problemas a los que se enfrenta el médico con la aplicación de los fármacos antineoplásicos es la resistencia clínica.

La falla en la respuesta a la quimioterapia puede estar relacionada con diversos factores que deben tomarse en cuenta, antes de escoger o cambiar la estrategia terapéutica. Algunos de estos factores son:

- a.- Eventos farmacocinéticos.
- b.- Biología y el tipo de tumor.
- c.- Respuesta intrínseca del paciente.
- d.- Ubicación del tumor en sitios inaccesibles a los fármacos.
- e.- Resistencia celular a los fármacos.

Aparentemente, la resistencia celular es el obstáculo más importante para un tratamiento exitoso contra el cáncer.

## **2.1 DEFINICIÓN.**

Se define como resistencia múltiple a fármacos o MDR ( multidrug resistance) a la capacidad que presentan las células tumorales, después de haber sido expuestas a un solo fármaco, de desarrollar resistencia a un amplio rango de fármacos no relacionados ni funcional, ni estructuralmente.

La resistencia celular a fármacos puede considerarse desde dos puntos de vista: el primero es la resistencia de novo o primaria que describe a una célula neoplásica que intrínsecamente es refractaria a la quimioterapia, mientras que en el segundo la resistencia se desarrolla como resultado de una exposición previa al agente citotóxico, lo que se considera como una resistencia adquirida.

En cuanto a la resistencia adquirida se sabe que la célula tumoral desarrolla distintos mecanismos como resultado de una continua exposición al fármaco. Algunos de estos mecanismos incluyen: alteraciones en el transporte de fármacos (hacia el exterior o hacia el interior de la célula), alteraciones en la permeabilidad de la membrana, cambios en la cinética de enzimas blanco, amplificación génica de las enzimas y sustratos y cambios en la susceptibilidad al daño producido por los fármacos (16).

## **2.2 FENOTIPO DE RESISTENCIA MÚLTIPLE.**

### **2.2.1 Respuesta celular alterada para fármacos.**

El distintivo del fenotipo de resistencia múltiple es la resistencia cruzada para múltiples compuestos no relacionados entre sí, ya sea en estructura, blanco celular o modo de acción.

Los compuestos involucrados en este fenotipo son típicamente plantas alcaloides y antibióticos de origen bacteriano o de origen fungal, siendo que sus mecanismos de acción citotóxicos varían. También se ha reportado este fenotipo para agentes alquilantes y antimetabolitos en algunos casos.

Se ha observado que este fenotipo está presente en líneas celulares de hamster, ratón y humano, principalmente, seleccionadas por presentar resistencia para colchicina, vincristina, vinblastina, daunorubicina, adriamicina y actinomicina D.

En algunas líneas celulares la resistencia múltiple está asociada con un incremento en la sensibilidad para otros compuestos (sensibilidad colateral). De esta forma se encontró que en la línea celular CHO (CHRC5), la cual es resistente a colchicina se incrementó de dos a diez veces la sensibilidad para diversos anestésicos locales, hormonas, esteroides y algunos detergentes no iónicos y a bajos niveles de resistencia a colchicina, el grado de sensibilidad colateral es correspondientemente bajo y todos ellos afectan la función de la membrana plasmática.

Se ha notado que los anestésicos locales, los detergentes no iónicos y el verapamil tienen efectos duales en las células con resistencia múltiple dependiendo de las condiciones de exposición. Cuando estos agentes son adicionados en combinación de compuestos citotóxicos como son vinblastina o adriamicina, se aumenta la citotoxicidad de estos fármacos por interferencia con el mecanismo de reducción en la acumulación de los mismos, lo que caracteriza a las células con resistencia múltiple (10).

### **2.2.2 Reducción en la acumulación de fármacos en las células con resistencia múltiple.**

El fenotipo de resistencia múltiple ha presentado asociación con la reducción y acumulación de fármacos en diferentes líneas celulares, en las cuales el incremento del eflujo de fármacos y/o el decremento del influjo de fármaco han sido frecuentemente observados. Así mismo, la reducción de la unión del fármaco y la distribución intracelular alterada ha sido reportada en algunos sistemas (17).

### **2.2.3 Mecanismos propuestos en el fenotipo MDR.**

Dos diferentes mecanismos, ambos dependientes de energía metabólica han sido propuestos para explicar la reducción de la acumulación de fármacos observada en células con resistencia múltiple.

- 1.- Los fármacos entran a las células y una proporción normal de estos es removida por una bomba de eflujo dependiente de energía, que opera con una gran capacidad.
- 2.- Una barrera permeable dependiente de energía controla la entrada de fármacos a la célula y opera con gran eficiencia en células resistentes a los mismos.

Las determinantes de la acumulación celular de los diferentes fármacos involucrados en el fenotipo de resistencia múltiple parecen ser complejas y variables de acuerdo a los fármacos invocados.

Datos experimentales en el transporte de fármacos sugieren que los dos mecanismos propuestos anteriormente no son mutuamente exclusivos pero representan diferentes aspectos de alteraciones pleiotrópicas en función de la membrana que da como resultado una reducción en la acumulación de fármacos (10).

### **2.3 PAPEL DEL ATP EN EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS.**

Para investigar el efecto que ejerce el ATP sobre la modulación de la captación y excreción de fármacos, se han realizado múltiples experimentos, en los cuales se han medido estos procesos en función de la concentración de ATP, al usar un inhibidor metabólico.

En presencia de 2,4-dinitrofenol, aumenta la captación de daunorubicina, si adicionalmente se agrega glucosa, se observa la excreción del fármaco de las células resistentes, alcanzándose una concentración muy cercana a la observada en la ausencia del inhibidor, sugiriendo que la adición de glucosa disminuye la captación de los fármacos, probablemente debido a la producción de energía necesaria para el funcionamiento del mecanismo que remueve al fármaco, de lo que se deriva que los cambios en el nivel de captación del fármaco están mediados a través de los cambios en la concentración del ATP celular (10).

## **2.4 RESISTENCIA MÚLTIPLE A FÁRMACOS Y EXPRESIÓN DE GLUCOPROTEÍNA-P (gp-P).**

Estudios bioquímicos de las células con resistencia múltiple se han enfocado en la membrana plasmática debido a que respuestas alteradas hacia diversos compuestos son evidentes por cambios en estructura y función de la misma. La alteración que se encuentra con más frecuencia, es el aumento en la expresión de una proteína asociada a la membrana plasmática de alto peso molecular denominada glucoproteína-P (gp-P).

Los estudios realizados con líneas celulares muestran que el incremento en la expresión de gp-P se relaciona directamente con un decremento en la acumulación y retención de los fármacos en el interior de las células (17,18).

Debido a que gp-P se encuentra presente tanto en células de origen humano, hamster y ratón, se sugiere que esta molécula se conserva en cuanto a tamaño y características a través de las especies, por lo que se sugiere que se trata de un componente importante de las células (10).

El genoma humano contiene dos genes que codifican para gp-P, estos genes presentan una alta homología entre ellos y han sido denominados MDR-1 y MDR-2, siendo el primero el único que codifica para la proteína capaz de conferir resistencia a fármacos, por lo que el gen MDR-2 parece desempeñar una función distinta, sin embargo, se ha encontrado que en el dominio transmembranal de la gp-P aproximadamente el 80% de los aminoácidos son conservados entre los productos de los dos genes.

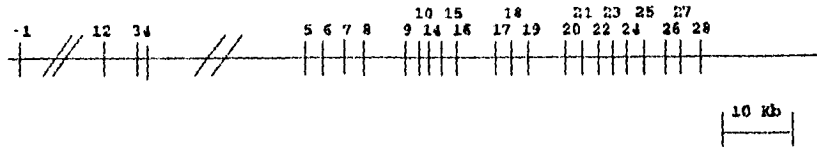
Ambos genes se encuentran adyacentes en el cromosoma siete humano y frecuentemente se amplifican juntos en células altamente resistentes. El gen MDR-1 comprende 28 exones que codifican para un ARNm de 4.5 kilobases (18,37). Figura 1



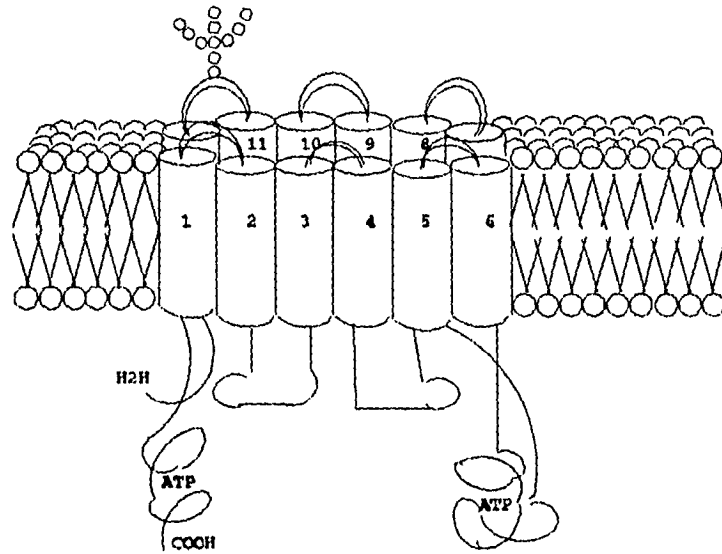
La proteína sintetizada (gp-P) ha sido caracterizada bioquímicamente como una proteína integrante de la membrana plasmática.

Para conocer su estructura, se llevó a cabo el análisis de la porción peptídica de esta molécula, de esta manera se encontró que está constituida por 1280 aminoácidos y que tiene un peso molecular de 170 Kilodaltones (KDa) y su estructura terciaria contiene doce dominios transmembranales y dos sitios citoplásmicos que forman un poro a través de la membrana plasmática y que pueden unir trifosfato de adenosina (ATP), cuya hidrólisis provee de energía para el transporte de fármacos. Figura 2

En conjunto toda la molécula puede dividirse en dos fragmentos homólogos de la misma longitud, lo que sugiere que a nivel genómico son el resultado de la unión de dos genes independientes pero relacionados entre sí.



**Figura 1.** Estructura completa del gen MDR-1



**Figura 2.** A nivel estructural la gp-P está compuesta por dos porciones homólogas cada una con un sitio de unión a ATP, la estructura completa contiene 12 dominios transmembranales los cuales forman un poro a través de la membrana plasmática.

## **2.5 AMPLIFICACIÓN GENÉTICA EN CÉLULAS RESISTENTES A MÚLTIPLES FÁRMACOS.**

El desarrollo de resistencia simultánea para múltiples fármacos no relacionados es el principal impedimento para la quimioterapia contra el cáncer, de tal forma que el estudio de los mecanismos involucrados en el proceso han demostrado que la resistencia múltiple está mediada por la sobreexpresión de genes específicos o amplificación de secuencias de ADN específicas.

Generalmente los fármacos se unen irreversiblemente a enzimas constitutivas y la resistencia es alcanzada por la sobreproducción de estas enzimas debido a la amplificación de los genes que las codifican. Así mismo se sabe que algunas células resistentes sobreproducen proteínas citosólicas como es V19 en adición a las glucoproteínas de membrana (21).

También se sabe que al inicio la resistencia es acompañada por la expresión elevada de ARN mensajero (ARNm) de 4.5 Kilobases (Kb) sin amplificación de las correspondientes secuencias genómicas, por lo que se sugiere que el incremento en la expresión de ARNm es un mecanismo común para la resistencia a múltiples fármacos en células humanas (22).

Mediante estudios citogenéticos se ha encontrado que en las células de hamster la resistencia a múltiples fármacos está asociada a la amplificación genética manifestada citológicamente, mediante la presencia de regiones cromosómicas teñidas homogéneamente y de cromosomas dobles pequeños. Estos últimos aparecen como pequeñas estructuras esféricas en pares.

Presumiblemente las condiciones de cultivo seleccionan a las células tumorales para presentar cromosomas dobles o regiones cromosómicas teñidas homogéneamente ya que los trabajos realizados en células resistentes han demostrado que en ausencia del fármaco los cromosomas dobles se pierden, mientras que las regiones cromosómicas son retenidas en las células.

Debido a que durante el crecimiento del tejido tumoral en ausencia del fármaco los cromosomas dobles frecuentemente desaparecen con la aparición de las regiones teñidas homogéneamente se sugiere que las dos manifestaciones citológicas pueden ser formas alternas de la expresión de la amplificación genética. No obstante que los cromosomas dobles y las regiones teñidas homogéneamente son detectadas predominantemente en células cancerosas que presentan resistencia, en algunas ocasiones también se presentan en células cancerosas antes de iniciar la quimioterapia.

Sin embargo, la presencia o ausencia de anomalías citológicas debe tomarse con reserva, ya que muchas células resistentes presentan regiones teñidas homogéneamente o cromosomas dobles identificables, probablemente debido a que la longitud total de las secuencias amplificadas no es suficiente para producir una anomalía citológica observable (10,23).

De tal forma que la variabilidad y complejidad del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos sugiere, que es una forma relevante de resistencia clínica que puede involucrar cambios en la expresión de genes en más de un locus genético.

## **2.6 EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE GLUCOPROTEÍNA-P EN TEJIDOS NORMALES.**

La expresión de gp-P no es exclusiva de tumores, ya que también se ha encontrado en distintos órganos y tejidos normales. La gp-P se expresa altamente en hígado (vías biliares), riñones (túbulos proximales), intestino delgado, en algunos casos se expresa en la superficie luminal, de este modo transporta sustancias en la bilis y en la orina o funciona también como una barrera en el tracto gastrointestinal.

Las células endoteliales del SNC, testículos y placenta también expresan gp-P donde se sospecha que contribuye para las barreras sangre-cerebro y sangre-testicular (capilares) (19).

También se ha detectado la expresión de gp-P en otros sitios específicos, incluyendo células stem CD34+ de médula ósea, células mononucleares de sangre periférica, incluyendo linfocitos, trofoblasto de humano y placenta de ratón y en glándulas endometriales de úteros fértiles.

En base a los estudios de localización se puede especular que la gp-P está probablemente involucrada en el transporte trans-epitelial de metabolitos tóxicos y xenobióticos.

La localización de la gp-P en los capilares de cerebro, placenta y testículos es útil para la captación de compuestos tóxicos para el cerebro, el feto y células germinales respectivamente.

Dada la distribución tisular de gp-P en órganos normalmente involucrados en la detoxificación, así como su localización polarizada en la superficie luminal sugiere que esta molécula desempeña un papel fisiológico normal en el transporte de compuestos tóxicos o metabolitos que pueden ser perjudiciales para el organismo (20).

## **2.7 MECANISMO DE ACCIÓN DE gp-P.**

En base a los datos experimentales acerca del transporte de fármacos y de la información obtenida en la secuencia de aminoácidos de la gp-P de células de ratón, hamster y humanas resistentes a múltiples fármacos se han propuesto dos modelos para el funcionamiento de esta molécula:

En el primer modelo se propone que la gp-P forma un canal en la membrana plasmática a través del cual los fármacos son transportados hacia el exterior de la célula usando energía de la hidrólisis del ATP.

En este modelo la gp-P se une directamente a los fármacos y después los remueve de la célula, en este punto existen dos consideraciones que hay que tomar en cuenta:

- a.- La unión entre la gp-P y el fármaco debe ser reversible ya que las moléculas del fármaco tienen que ser liberadas en la superficie celular.
- b.- Debido a que en las células resistentes a múltiples fármacos se presenta resistencia cruzada a fármacos no relacionados estructuralmente, la molécula de gp-P debe tener sitios de unión diferentes, para los diversos grupos de fármacos hacia los que se presenta esta resistencia cruzada.

Apoyando el modelo anterior, existen evidencias experimentales que apoyan la función de la gp-P como un captador de fármacos, entre los que se encuentran los siguientes:

- 1.- En las células humanas y de hamster resistentes a múltiples fármacos se presentan vesículas membranales que muestran expresión aumentada de una proteína de 150 - 180 KDa, la cual presenta sitios para la unión de vinblastina.

La identidad entre la proteína de 150 - 180 KDa, capaz de unir vinblastina y la gp-P, fue probada por inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la gp-P, encontrándose que se trata de la misma molécula.

- 2.- En 1986, los experimentos realizados por Pastan y col. demostraron que la unión de (<sup>3</sup>H)-vinblastina a las vesículas membranales de células resistentes a múltiples fármacos es mayor que la observada en células sensibles.

En las vesículas mencionadas anteriormente, se observa competencia en la captación de vinblastina al estar presente otro fármaco, tal como la vincristina y en menor grado por la presencia de daunorubicina, por lo que existe la posibilidad de que estos fármacos puedan estar compitiendo por el mismo sitio de unión o por sitios de unión adyacentes. Sin embargo, al probar con colchicina y actinomicina- D no se observa competencia por los sitios de unión de la vinblastina a las vesículas membranales de las células resistentes a múltiples fármacos, apoyándose de esta manera la posible existencia de sitios de unión para los diferentes fármacos a los que se presenta resistencia.

En un segundo modelo propuesto para el funcionamiento de la gp-P, una proteína que une al fármaco es transportada hacia el exterior de la célula por medio del mecanismo de transporte de esta glucoproteína.

La proteína hipotética (proteína de unión diferente a la gp-P) puede ser un constituyente normal de la célula, sin embargo debe ser producida en cantidades suficientes ya que es removida de manera continua.

En este modelo el fármaco puede unirse irreversiblemente a esta proteína y posteriormente el complejo fármaco-proteína de unión requiere de energía. Se estudió este aspecto, encontrándose que la gp-P presenta cierta actividad de ATPasa, existiendo la posibilidad de que la hidrólisis de ATP realizada por la gp-P esté acoplada al transporte del fármaco.

Este modelo concuerda con los estudios realizados con alcaloides de la vinca y antraciclinas, en los cuales se detectó la presencia de un mecanismo de transporte de fármacos dependientes de ATP.

Para correlacionar los aspectos bioquímicos y los morfológicos encontrados en las células resistentes a múltiples fármacos se cuenta con el estudio de la ultraestructura de la membrana plasmática realizado por Arsenault y col. en 1988, en el cual se observa una gran densidad de partículas intramembranales (IMP) en el extremo protoplásmico de la membrana de células resistentes.

El contenido de partículas intramembranales se correlaciona con el contenido de la gp-P y con el grado de resistencia que se presenta en células resistentes de hamster y células leucémicas humanas.

Datos experimentales recientes, sugieren que la gp-P además de actuar como un sistema de transporte activo para fármacos, también puede funcionar como un canal de cloro, funciones independientes entre sí que parecen estar reguladas por cambios en la tonicidad celular (10, 18, 22).



## 2.8 HOMOLOGÍA ENTRE GLUCOPROTEÍNA-P Y PROTEÍNAS BACTERIANAS.

La porción citoplasmática de la gp-P se asemeja a ciertas proteínas bacterianas de transporte capaces de fijar fármacos.

Este es el caso de la gran homología que se presenta entre la secuencia que codifica para la gp-P y la secuencia que codifica para la proteína hlyB, que es una proteína bacteriana de membrana presente en las cepas de E.coli, la cual es necesaria para el transporte de hemolisina alfa (proteína de 107 KDa ) que efectúa la hemólisis.

Se observa una homología máxima en la región que circunda al sitio de unión para ATP. Por otra parte, los sitios de unión para ATP en la molécula de gp-P, se derivan de la homología que se presenta en esta región (sitio de unión para ATP) al compararla con otras proteínas bacterianas de transporte que pueden unir ATP tales como hisP, malk, oppD, pstB y rbsA.

La primera deducción de la presencia de sitios de unión para ATP en la molécula de gp-P proviene del análisis de la secuencia de la molécula misma.

Otro hallazgo importante es el hecho de que el grado de homología entre la gp-P y las proteínas bacterianas de transporte es tal, que puede compararse con la homología que se presenta entre sí en las proteínas bacterianas. De hecho, la proteína hlyB se asemeja más a la gp-P que el resto de las proteínas hisP, malk, oppD y pstB, de tal forma que la gp-P está involucrada en el transporte de fármacos aprovechando la energía proveniente de la hidrólisis del ATP (10).

## **2.9 PAPEL DE LA GLUCOPROTEÍNA-P EN LA RESISTENCIA MÚLTIPLE A FÁRMACOS.**

La complejidad del fenotipo expresado por líneas celulares MDR basado en saber si están o no involucrados múltiples cambios genéticos, ha llevado a la realización de estudios de clonación y secuenciación de cADN de gp-P y análisis genéticos subsecuentes muestran evidencias convincentes acerca de que gp-P es la causa de las características básicas del fenotipo MDR, por ejemplo la resistencia celular a fármacos no relacionados ( resistencia cruzada).

Algunas evidencias que apoyan esta aseveración son :

- 1.- Un incremento en los niveles de gp-P es observado consistentemente en líneas celulares MDR. El nivel expresado de gp-P se correlaciona con el grado relativo de resistencia.
- 2.- Los genes que codifican para la gp-P están frecuentemente amplificados en líneas celulares MDR.
- 3.- La transfección de genes de gp-P y cADN con expresión incrementada concomitantemente de gp-P dan como resultado células receptoras MDR, es decir, con fenotipo de resistencia.
- 4.- Las características estructurales de gp-P son características de una membrana transportadora de proteínas dependiente de energía (16,24,26).

## **2.10 AGENTES INHIBIDORES DEL MECANISMO DE RESISTENCIA MÚLTIPLE A FÁRMACOS.**

Se han encontrado diversos agentes con los que se logra aumentar la concentración intracelular de los agentes antineoplásicos en las células resistentes a múltiples fármacos.

Mediante el uso de estos agentes se ha logrado disminuir el grado de resistencia en dichas células; es decir que el fenotipo MDR mediado por gp-P puede ser revertido o modulado por medio de otros compuestos.

La mayoría de estos agentes muestran algunas de las características de los compuestos transportados por la gp-P, las cuales incluyen: propiedades lipofílicas, estereoquímica policíclica planar y su débil basicidad (28).

El mecanismo de modulación en la mayoría de los casos es llevar a cabo la inhibición competitiva del eflujo de fármacos.

Estos compuestos pueden clasificarse en:

- 2.10.1 Análogos de antraciclinas y alcaloides de la vinca
- 2.10.2 Bloqueadores de los canales de calcio e inhibidores de la calmodulina.
- 2.10.3 Otros agentes.

### **2.10.1 Análogos de antraciclinas y alcaloides de la vinca.**

Se ha observado que el efecto citotóxico de daunorubicina, adriamicina, vinblastina y vincristina se potencia en células resistentes al administrar simultáneamente sus análogos estructurales.

Estos análogos no tienen efectos citotóxicos por sí mismos, sin embargo mejoran la citotoxicidad del fármaco al inhibir su excreción, con lo que se logra una mayor acumulación intracelular del mismo.

Esta observación lleva a pensar que el mecanismo de excreción característico de las células resistentes a múltiples fármacos podría contener un sitio de unión al menos para dos grupos de fármacos, a saber antraciclinas y alcaloides de la vinca; que son los que han sido probados. Estos compuestos incluyen a N-acetildaunorubicina y vindolina.

### **2.10.2 Bloqueadores de los canales de calcio e inhibidores de la calmodulina.**

Son un grupo de compuestos que inhiben la entrada de calcio a la célula y con ello el efecto del calcio en las funciones de la misma, de un modo específico en la resistencia a múltiples fármacos, debido a que el calcio es requerido para la formación del complejo calcio-calmodulina, necesario para la activación de muchos sistemas enzimáticos dependientes de calcio tales como ATPasa y proteíncinasas.

Entre los bloqueadores de los canales de calcio se encuentran: verapamil, trifluoperacina y diltazem.

El análisis de la información muestra que el verapamil es un agente usado con frecuencia en la disminución de la resistencia a múltiples fármacos, observándose que logra antagonizar los efectos de dicha resistencia causada por los alcaloides de la vinca.

El incremento en la acumulación y retención de fármacos dentro de la célula por medio del verapamil sugiere que este agente compite con los fármacos por los sitios de unión a la gp-P, debido a que al estar presente el verapamil, se inhibe la unión de la vinblastina a la membrana plasmática de las células resistentes a múltiples fármacos, que es donde también se localiza la gp-P.

De este modo se logra incrementar la concentración intracelular del fármaco y con ello se observa una mayor toxicidad. Este hallazgo está apoyado por experimentos en los cuales se observa que las células resistentes a múltiples fármacos acumulan y retienen una menor cantidad de verapamil en comparación con las células sensibles.

También se observa que los inhibidores de la calmodulina tal como la trifluoperacina, pueden incrementar la acumulación y retención de varios fármacos entre ellos vincristina y adriamicina en las células resistentes de ratón, hamster y humanas, resultando esto en una reversión de la resistencia (10).

Otro bloqueador de los canales de calcio es el bepridil que revierte la resistencia a doxorubicina *in vitro*; además inhibe significativamente la unión de análogos de verapamil a gp-P y se ha utilizado principalmente en pacientes con cáncer colorectal.

En otros estudios se ha encontrado que los niveles de bepridil capaces de revertir la resistencia en combinación con vinblastina, pueden ser alcanzados en todos los pacientes y además queda un remanente suficientemente alto por un período prolongado de tiempo, siendo los rangos de toxicidad tolerables (29).

A medida que han avanzado los estudios metabólicos con células cancerosas, se sospecha que, el mecanismo de acción de algunos agentes que incrementan la acumulación intracelular de los agentes citotóxicos también involucra alteraciones en el estado de fosforilación de la gp-P, lo que podría ayudar a la evasión de la resistencia de la célula tumoral (10).

### **2.10.3 Otros agentes**

Además de los compuestos mencionados anteriormente, se han encontrado otros agentes moduladores del transporte a nivel membranar que revierten la resistencia a múltiples fármacos e incluyen: Quinidina, tamoxifén, propanolol, cloroquina, antibióticos, ciclosporina A y anticuerpos monoclonales.

Estos agentes han sido estudiados en diferentes líneas celulares, encontrándose que todos ellos logran disminuir la resistencia a un gran número de agentes citotóxicos, utilizados en la quimioterapia del cáncer.

#### \* Antibióticos

En la investigación de moduladores más seguros se encontró que la eritromicina es otro agente que logra disminuir significativamente la resistencia a múltiples fármacos.

Este antibiótico lleva a cabo su acción al saturar los sitios de unión que se forman entre los fármacos y la gp-P, con lo que se reduce la capacidad de esta glucoproteína para transportar estos fármacos hacia el exterior celular.

Las cefalosporinas son otro grupo de antibióticos efectivos en la disminución de la resistencia, muchos de los cuales presentan características similares a las de los compuestos transportados por la gp-P (10).

Dentro de este grupo la cefoperazona es la que presenta una mayor efectividad en la modulación de la resistencia a múltiples fármacos *in vitro* reduciendo la resistencia en células de 30 a 1.8 veces en estudios realizados por Golstrand y cols; encontrando que su eficacia como modulador puede estar relacionada al grupo N-acetilpiperazina.

Se observó además que la cefoperazona presenta una menor toxicidad para el organismo al compararla con el verapamil y trifluoperazina, ya que estos últimos presentan toxicidad severa a una concentración plasmática inferior a la necesaria para disminuir dicha resistencia.

Así mismo ceftriazona resultó capaz de modular la resistencia a múltiples fármacos pero en menor grado que cefoperazona y además se sabe que estos dos agentes poseen propiedades fisicoquímicas de alta unión a proteínas y gran liposolubilidad comparadas con otros antibióticos (10,28).

**\* Ciclosporina A**

Se ha observado un incremento en la acumulación intracelular de daunorubicina al adicionar ciclosporina A en células provenientes de pacientes con LAM que presentan una expresión aumentada de gp-P (10).

En estudios celulares la ciclosporina A resultó ser el inhibidor más efectivo contra el flujo de fármacos dependiente de ATP, se encontró que la inhibición con 1 micromolar de ciclosporina A fue comparable con la inhibición observada con los controles negativos (30).

Algunos de los agentes utilizados para revertir el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos utilizados en ensayos clínicos presentan efectos no relacionados con la inhibición de gp-P como son toxicidad cardíaca por verapamil o inmunosupresión por ciclosporina A lo que limita su utilidad clínica.

**\* Anticuerpos monoclonales (AcMo)**

La utilidad potencial de anticuerpos que reconocen gp-P de células intactas, como agentes específicos para revertir la resistencia a múltiples fármacos fue sugerido primero en los trabajos de Hamada y Tsuruo. Estos investigadores han fundamentado el tratamiento de algunas líneas celulares resistentes a múltiples fármacos con AcMo MRK16 observando un incremento en la acumulación intracelular y citotoxicidad de vincristina y actinomicina D *in vitro*, así también como el incremento de la toxicidad celular *in vivo* de vincristina en líneas celulares humanas. Esta potenciación de toxicidad celular *in vivo* por MRK16 está aparentemente limitada para únicamente algunos de los sustratos para gp-P.



Un incremento en la acumulación de vincristina y actinomicina D se ha observado también con otros dos AcMo anti gp-P los cuales son: HYB-241 y HYB-612.

Recientemente se ha reportado el aislamiento y caracterización de AcMo UCI2 que reconoce gp-P humana en la superficie de células intactas, UCI2 inhibe fuertemente el eflujo de fármacos de la célula y por lo tanto la resistencia de células resistentes a múltiples fármacos para varios fármacos transportados por gp-P.

La inhibición de resistencia a múltiples fármacos por los anticuerpos UCI2 es muy fuerte y cualitativamente diferente a los anticuerpos mencionados anteriormente.

MRK16 así como HYB-241 y HYB-612 incrementan selectivamente la acumulación de vincristina y actinomicina D pero no de doxorubicina. En contraste el efecto inhibitorio de UCI2 resulta aparentemente para todos los sustratos de gp-P.

Los AcMo han sido utilizados para destruir a las células que expresan gp-P con ayuda de conjugados inmunotóxicos por lo que también son utilizados para aumentar la acumulación intracelular de fármacos quimioterapéuticos que son tóxicos para las células tumorales pero también para todas aquellas células normales que expresan gp-P .

De acuerdo a lo anterior se dice que los AcMo tienen ventajas sobre los agentes químicos utilizados para revertir la resistencia a múltiples fármacos; como es que la acumulación de fármacos citotóxicos en células normales que expresan gp-P es menos pronunciada con AcMo que con los agentes químicos, además de que todos los agentes químicos son transportados fuera de la célula, por lo que causan inhibición transitoria del eflujo de fármacos, mientras que los AcMo causan una inhibición más prolongada debido a la naturaleza relativamente estable de sus uniones a gp-P.

A partir de estos hallazgos se dice que los AcMo son altamente específicos y potentes inhibidores de la resistencia a múltiples fármacos mediada por gp-P y por lo tanto pueden ser utilizados como una alternativa para revertir el fenotipo de resistencia en el cáncer (31).

A partir del hallazgo de los agentes que logran disminuir la resistencia a un gran número de agentes citotóxicos, se ha estimulado la formación de protocolos de tratamiento en los que pueden ser combinados estos agentes junto con el fármaco citotóxico adecuado, para de este modo disminuir la resistencia frente a múltiples fármacos.

## CONCLUSIONES

Las leucemias agudas forman parte de las enfermedades hematológicas malignas más frecuentes en la actualidad, tratándose de trastornos de las células precursoras hematopoyéticas, caracterizadas por la acumulación de células inmaduras en la médula ósea que se extienden a sangre y otros tejidos, causando alteraciones severas en el organismo relacionadas con la depresión de la hematopoyesis normal originando en los pacientes signos y síntomas asociados como son, palidez, fatiga, debilidad, pérdida de peso, anorexia, hematomas, hemorragias y visceromegalias importantes entre otras alteraciones.

Se ha clasificado a las leucemias agudas de acuerdo a los criterios de la French-American-British (FAB) Cooperative Group, en dos subclases principales: mieloide y linfoide, basadas principalmente en una clasificación morfológica de las células de acuerdo a la estirpe celular involucrada; de esta forma existen diferentes tipos de leucemia linfoblástica aguda que va de L1 a L3 y mielobástica aguda de M1 a M7.

Debe considerarse también que para ambas existe una clasificación inmunológica de acuerdo a los antígenos expresados en la superficie celular de cada tipo de leucemia; así como también una clasificación citogenética.

La importancia de distinguir entre los diferentes tipos de leucemia aguda radica en el interés que debe tenerse para la realización de un buen diagnóstico y de esta manera saber acerca del pronóstico así como la terapia más adecuada para alcanzar la remisión completa del paciente.

En cuanto al tratamiento de la leucemia aguda se puede decir que se divide de manera muy general en dos etapas, las cuales son: terapia de inducción de la remisión y terapia post-remisión, refiriéndose al rápido restablecimiento normal de la médula ósea y las funciones del cuerpo en la primera etapa y el logro de una sobrevida máxima de leucemia en la segunda etapa.

Para el tratamiento se llevan a cabo diferentes esquemas de dosificación, así como de los fármacos utilizados, dependiendo del tipo de paciente, estado de salud del mismo, lugar de atención, así como la facilidad para la obtención de los fármacos.

Los fármacos más utilizados en el tratamiento de las leucemias agudas son metotrexato, daunorubicina, vincristina y prednisona entre otros que son análogos de los anteriores.

Algunos estudios han demostrado la existencia de terapias diferentes a los fármacos, como es el uso de los anticuerpos monoclonales que han demostrado reducciones transitorias de células leucémicas en circulación, produciendo un efecto minoritario en médula ósea sin notar una remisión completa.

De acuerdo a lo anterior se dice que en el tratamiento de las leucemias agudas la quimioterapia es la forma más utilizada para combatir este tipo de enfermedades, sin embargo, esta no ha alcanzado grandes éxitos, debido a la falta de respuesta celular frente a los fármacos, es decir a la resistencia que presentan las células leucémicas al ser tratadas con fármacos antineoplásicos, siendo este el principal obstáculo para un tratamiento exitoso.

En cuanto a esto se han realizado varios estudios que demuestran la existencia de un mecanismo denominado de resistencia múltiple a fármacos o MDR (multidrug resistance), el cual se define como la capacidad que presentan las células tumorales, después de haber sido expuestas a un sólo fármaco, de desarrollar resistencia a un amplio rango de fármacos no relacionados ni funcional, ni estructuralmente.

Considerando que se ha observado, que al administrar un fármaco determinado al paciente leucémico responde favorablemente, pero los tratamientos siguientes resultan menos favorables, es decir que las células presentan resistencia no sólo al fármaco utilizado en el tratamiento inicial, si no también a una gran variedad de fármacos cuyos mecanismos de acción, así como su estructura, son diferentes entre sí.

El mecanismo de resistencia a múltiples fármacos asociado típicamente a las enfermedades hematológicas malignas, es el mecanismo de resistencia mediado por glucoproteína-P (gp-P), pues en la mayoría de estos padecimientos se ha encontrado un aumento en los niveles de expresión de esta glucoproteína, después de ser tratadas con quimioterapia, probablemente por selección o preexistencia de células malignas que expresen gp-P.

La gp-P es una proteína de alto peso molecular, asociada a la membrana plasmática, constituida por 1280 aminoácidos, conteniendo en su estructura terciaria 12 dominios transmembranales, los cuales forman un poro a través de la membrana plasmática y 2 sitios de unión para ATP cuya hidrólisis provee de energía para el transporte de fármacos.

De acuerdo a lo anterior, el fenotipo clásico MDR es causado por el aumento celular del eflujo de fármacos debido al incremento de la actividad de la gp-P con lo que se disminuye la concentración de fármacos a niveles subletales, siendo este el mecanismo principal de acción de la gp-P.

Algunas evidencias que apoyan el hecho de que la gp-P es la causa de las características básicas del fenotipo MDR son:

- a) El incremento en los niveles de gp-P observado frecuentemente en líneas celulares MDR, correlacionando el nivel expresado con el grado relativo de resistencia.
- b) Los genes que codifican para la gp-P están frecuentemente amplificados en líneas celulares MDR.
- c) Las características estructurales de gp-P son las correspondientes a una membrana transportadora dependiente de energía.

Es importante mencionar que la expresión de la gp-P no es exclusiva de tumores o padecimientos malignos, dado que se expresa de manera normal en varios tejidos del cuerpo humano y también se ha observado que se encuentra ubicada clásicamente en las superficies celulares, por lo que se asocia como un mecanismo detoxificador celular normal.

De lo anterior se observa la importancia en investigar los factores que inducen una forma alterada como la que se presenta en las células resistentes.

Diversos estudios han llevado al descubrimiento de varios agentes con los que se logra aumentar la concentración intracelular de los fármacos antineoplásicos en las células resistentes, siendo el mecanismo de modulación en la mayoría de estos, el de llevar a cabo la inhibición competitiva del eflujo de fármacos; así también se han elaborado anticuerpos monoclonales solos o conjugados con tóxicos dirigidos contra las células tumorales que expresen gp-P.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Sin embargo se han encontrado ciertas ventajas con los anticuerpos monoclonales sobre los agentes químicos, dado que en los estudios realizados, las concentraciones utilizadas de agentes químicos sobrepasan los niveles de toxicidad que soporta el organismo humano; mientras que los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y debido a la unión que presentan a gp-P son relativamente muy estables, causando inhibición más prolongada de la función de gp-P con respecto a los agentes químicos que son removidos fuera de la célula causando inhibición transitoria de gp-P.

Esto puede dar lugar a la formación de protocolos de quimioterapia para los pacientes leucémicos en los que se administre el fármaco antitumoral más adecuado, además de un inhibidor de la gp-P que puede contribuir a la obtención de un tratamiento exitoso.

Es importante mencionar que la observación de la expresión del gen de resistencia a múltiples fármacos que codifica para gp-P en los pacientes leucémicos antes y después del tratamiento puede ser útil para poder determinar hasta cierto punto el pronóstico del paciente y como consecuencia de esto proporcionar la terapia más adecuada en cada caso.

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- Edwards Henderson. Leukemia. 5ª edition. Saunders Company 1990, cap 1.
- 2.- Williams J. Williams. Hematología. 2ª edición. Editorial Salvat 1983. Tomo 2 1055-1085.
- 3.- Wintrob's. Clinical hematology. 9ª edition USA 1993. vol 2, cap. 7.
- 4.- William G. Figeroa. Hematology. A Wiley medical publication USA 1983. Cap.2.
- 5.- S. B. Mackenzie. Hematología clínica. Ed. El Manual Moderno. México 1991, cap 28.
- 6.- F. Salamanca. G. Citogenética humana. 1ª ed. Editorial Medica Panamericana 1990. pp 235-237.
- 7.- Haskell Charles M; M. D. Cancer treatment. 3ª ed. Saunders Company USA 1990. Cap. 56-57.
- 8.- D. Hoelzer. M. D. Baillere's-Clinical hematology international practice and research. Vol. 7/ No. 2. Guest ed.1994.
- 9.- Rapaport. Introducción a la hematología. 2ª ed. Editorial Salvat 1993. pp 286-289.



- 10.- Fernando Alcántar M. Estudio del mecanismo de resistencia múltiple a fármacos en la célula tumoral. Trabajo monográfico 1990.
- 11.- Chabner, A.B. "Foundation think tank on multidrug resistance in cancer chemotherapy". J. Natl. Cancer Inst; 1988, 80: 391-394.
- 12.- Bevan A. J. Fundamentos de farmacología. 2ª ed. Editorial Hula harper 1984. pp 694-705.
- 13.- Curt A. G. "Drug resistance in cancer". Cancer Treat Rep., 1984, 68: 87-99.
- 14.- Bertino, R. J. "Gene amplification and altered enzymes as mechanism for the development drug resistance". Cancer Treat. Rep., 1983, 67: 901-904.
- 15.- Avers, J. CH. Biología celular. 2ª edición. Editorial Interamericana 1988. pp 498-506.
- 16.- Victor Ling, PhD. "P-glycoprotein and resistance to anticancer drugs". Cancer; 1992, 69 (10) 2603-2609.
- 17.- Grace Bradley. "Mechanism of multidrug resistance". Biochim. Biophys. Acta; 1988, 948: 87-128.
- 18.- Marcela Lizano S. "Resistencia múltiple a drogas: Un problema en la quimioterapia del cáncer". Rev Invest Clin., 1993, 45: 481-492.

- 19.- Hinda Rosental. "Modulation of multidrug resistance at the threshold". *Journal of clinical oncology*; 1993, 11: 1624-1635.
- 20.- Michael M. Gottesman. "How cancer cells evade chemotherapy". *Foundation Award Lecture. Cancer Research*; 1993, 53: 747-754.
- 21.- Alexander M. Van der Bliek. "Overexpression and amplification of five genes in a multidrug-resistant chinese hamster ovari cell line". *Molecular and cellular biology*; 1986, 6 (5) 1671-1678.
- 22.- D. W. Shen. "Human multidrug-resistant cell lines: Increased mdr 1 expresion can precede gene amplification". *Science.*, 1986, 232: 643-645.
- 23.- Igor B. Roninson. "Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells". *Proc. Natl. Acad.Sci., USA* 1986, 83: 4538-4542.
- 24.- Daniel A. Haber. "Multidrug resistance (MDR-1) in leukemia: Is it to Test?". *Blood*; 1992, 79 (2) 295-298.
- 25.- Kathieen W. S. "Amplification and expression of genes asociated whit multidrug resistance in mamalian cells". *Science*; 1986, 23: 751-755.
- 26.- H. Sato. "MDR transcript levels as an indication of resistant disease in acute myelogenous leukaemia". *Brithis Journal of Haematology.*, 1990, 75: 340-345.

- 27.- Dr. Pedro H. Uribe G. Leucemia aguda. Pronóstico y tratamiento. Tesis de posgrado. Medicina interna. 1986
- 28.- Michael P. Gosland. "Reversal by cefoperazone of resistance to etoposide, doxorubicin, and vinblastine in multidrug resistant human sarcoma cells". *Cancer Research*; 1989, 49: 6901-6905.
- 29.- Sabine C. Linn. "Clinical and pharmacology study of multidrug resistance reversal with vinblastine and bepridil". *J. Clin. Oncol*; 1994, 12 (4) 812-819.
- 30.- Paul W. Wigler. "Reversal agent inhibition of the multidrug resistance pump in human leukemic lymphoblast". *Biochim. Biophys. Acta*; 1994, 1189: 1-6.
- 31.- Eugene B. Mechetner. "Efficient inhibition of p-glycoprotein-mediated multidrug resistance monoclonal antibody". *Proc. Natl. Acad. Sci*; 1992, 89: 5824-5829.
- 32.- Elin Berman. "Comparative cellular pharmacology of daunorubicin and idarubicin in human multidrug resistant leukemia cells". *Blood*; 1992, 79 (12): 3267-3273.
- 33.- Pellegrino Musto. "High risk of early resistant relapse for leukaemic patients with presence of multidrug resistance associated p-glycoprotein positive cells in complete remission". *British Journal of Haematology*; 1991, 77: 50-53.

- 34.- Gekeler V. "Drug-induced changes in the expression of MDR-associated genes: investigations on cultured cell lines and chemotherapeutically treated leukemias". *Ann. Hematol*; 1994, suppl. 1: 19-24.
- 35.- Nooter K. "Clinical relevance of P-glycoprotein expression in haematological malignancies". *Leuk. Res*; 1994, 18 (4) 233-243.
- 36.- G. J. Ruiz Argüelles. *Fundamentos de hematología*, 1ª ed. Editorial Médica Panamericana. 1994, cap. 12.
- 37.- A. M. Van der Bliek. "Secuence of mdr3 cDNA encoding a human P-glycoprotein". *Gene*; 1988, 71: 401-41.