

A1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA
SALUD

TRABAJO DE TESIS EN OPCIÓN AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

Alumno: Dr. Erick Crespo Solis

Tutor: Dr. Xavier López Karpovitch

FALTA DE ASOCIACIÓN ENTRE RESISTENCIA A
MÚLTIPLES FÁRMACOS Y ENFERMEDAD RESIDUAL
MÍNIMA EN PACIENTES ADULTOS CON LEUCEMIA
AGUDA *DE NOVO*

Investigadores asociados:

QFB. Josefa Piedras, Dr. Álvaro Aguayo A, QFB. Georgina Barrera Lumbreras
Clínica de Leucemia Aguda, Departamento de Hematología y Oncología del
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Ciudad de
México

Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología (Fondo Sectorial) y
Departamento de Hematología y Oncología del Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición Salvador Zubirán



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A2.

ÍNDICE

Introducción.....	3
Planteamiento del problema.....	5
Antecedentes.....	6
Objetivos.....	8
Material y métodos.....	10
Resultados.....	15
Discusión.....	19
Conclusiones.....	22
Bibliografía.....	27

Palabras clave: enfermedad residual mínima, resistencia a múltiples fármacos, leucemia aguda

A3

INTRODUCCIÓN

PREFACIO

La enfermedad residual mínima es un problema actual en pacientes con leucemia aguda. Representa una forma de resistencia a quimioterapia. Encontrar una posible asociación entre estas dos variables biológicas relevantes representaría un avance en el conocimiento de la hematología.

PRÓLOGO

Este trabajo representa un esfuerzo por evaluar mediante un método estandarizado la resistencia a múltiples fármacos, que ha sido un factor independiente relacionado con mal pronóstico en pacientes con leucemia aguda. Por otro, lado la evaluación de la enfermedad residual mínima en pacientes con leucemia aguda es otro factor de mal pronóstico que, en nuestro país, ha sido investigado de forma escasa. Intentamos probar si existían diferencias respecto de los parámetros de resistencia a múltiples fármacos entre dos grupos de pacientes: unos con enfermedad residual mínima y otros sin ésta. Encontrar diferencias significativas entre ambos grupos respecto de los parámetros de Pgp, nos permitirían establecer asociación entre resistencia y enfermedad residual y con ello ahondar en el conocimiento de la biología de la enfermedad residual mínima.

RESUMEN

La enfermedad residual mínima en pacientes con leucemia aguda puede evaluarse mediante citometría de flujo, y se expresa como el número de células con fenotipo aberrante asociado con leucemia sobre el número de células normales en la médula ósea. La enfermedad residual mínima (ERM) es una manifestación de resistencia celular a quimioterapia y en la mayoría de los casos se relaciona con recaída de la enfermedad y falla terapéutica. Uno de los mecanismos de resistencia celular en pacientes con leucemia aguda es la resistencia a múltiples fármacos (RMF). La RMF es un mecanismo de eflujo celular, es decir, la célula libera agentes quimioterapéuticos desde el espacio intracelular al extracelular a través de una bomba localizada en la membrana celular. La glucoproteína P (Pgp) es una de las proteínas celulares que condicionan RMF, y es la bomba mejor estudiada con valor pronóstico adverso en pacientes con leucemia aguda. Tanto la sobreexpresión de Pgp como la presencia de ERM en pacientes con leucemia aguda son factores adversos que se relacionan con tiempos de supervivencia más cortos y recaídas más tempranas. Por esa razón evaluamos la posible asociación entre RMF y ERM en pacientes adultos con leucemia aguda *de novo*.

A4

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos factores se han relacionado con pronóstico adverso en pacientes con leucemia aguda, siendo la citogenética el más importante. Sin embargo, se ha demostrado que la RMF y la ERM son factores independientes relacionados con periodos más cortos de supervivencia en pacientes con leucemia aguda. La RMF confiere a la célula resistencia a una variedad de agentes quimioterapéuticos; la sobreexpresión de Pgp está relacionada con esta resistencia. Por otro lado, la ERM definida como la persistencia de células de leucemia en la médula ósea, a pesar de tratamiento, representa una expresión de resistencia celular a quimioterapia. Es posible que la RMF se relacione con la presencia de ERM.

A5

ANTECEDENTES

La enfermedad residual mínima (ERM) se define como la persistencia de células de leucemia, a pesar de quimioterapia intensiva, en la médula ósea de pacientes con leucemia aguda. La microscopia de luz convencional no puede detectar estas células residuales y por esta razón se utiliza la inmunofenotipificación mediante citometría de flujo así como cadenas de DNA específicas de leucemia mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés) para detectar ERM (1,2). Una limitante de la PCR es que sólo 50% de los pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) o leucemia linfocítica aguda (LLA) tienen cadenas de DNA específicas de leucemia (3,4).

Se han identificado células con fenotipos aberrantes asociados con leucemia (FAL) mediante citometría de flujo. El FAL es útil para la detección de ERM en muestras de médula ósea de pacientes con leucemia aguda después de la quimioterapia de inducción o de consolidación (2,4,5). La ERM se ha definido como la persistencia en la médula ósea de $\geq 5 \times 10^{-3}$ células FAL después de la quimioterapia de inducción o como la persistencia de $\geq 3.5 \times 10^{-4}$ células FAL después de la quimioterapia de consolidación. Sin embargo, se han establecido diferentes valores de corte por otros autores (6).

La ERM es una expresión de resistencia celular a la quimioterapia y antecede la recaída hematológica. Hasta el día de hoy, no están bien esclarecidos los mecanismos por los cuales las células de leucemia persisten en la médula ósea a pesar de quimioterapia intensiva. Uno de los mecanismos mejor estudiados en enfermedades malignas es la resistencia a múltiples fármacos

(RMF), la cual está representada por la función excesiva de la glucoproteína-P (Pgp, por sus siglas en inglés), ésta es una molécula transmembranal perteneciente a la superfamilia de los transportadores ABC (cassette de unión a ATP, por sus siglas en inglés). La Pgp es codificada por el gen *mdr 1*. La RMF confiere a la célula resistencia a una variedad de agentes quimioterapéuticos, químicamente relacionados o no (7,8).

Tanto la expresión antigénica de Pgp como su actividad funcional han sido evaluadas mediante citometría de flujo. La *French Drug Resistance Network* estandarizó los métodos para la evaluación de Pgp (9). La ERM y la RMF se han relacionado con pronóstico adverso en pacientes con leucemia aguda (3,5,10-17).

A6

OBJETIVOS

Evaluar la posible asociación entre RMF y ERM en pacientes adultos con leucemia aguda *de novo*.

HIPÓTESIS

Los pacientes con ERM presentan mayor expresión y actividad funcional de Pgp en comparación con aquellos que no tienen ERM.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de los avances en el tratamiento, los pacientes con leucemia aguda presentan una tasa de recaída cercana a 80%, lo que casi siempre resulta en una enfermedad resistente a tratamiento con mortalidad elevada. La recaída de la enfermedad está relacionada con la presencia de ERM; sin embargo, se desconoce con precisión que factores podrían estar asociados con la ERM. Si se demostrara asociación entre RMF y ERM cabría la posibilidad de utilizar moduladores de Pgp, como la ciclosporina, en aquellos casos con ERM y sobreexpresión de Pgp.

A pesar de la basta investigación en nuestros días, son necesarios los estudios que permitan identificar las características biológicas relacionadas con la enfermedad residual mínima.

ALCANCE

Conocimiento sobre la biología de la enfermedad residual mínima, y su posible modulación en caso de estar asociada con resistencia a múltiples fármacos. La enfermedad residual mínima precede la recaída hematológica y por lo regular es resistente a tratamiento, con pronóstico pobre. Una meta actual en pacientes con leucemia aguda es evitar la recaída, con lo que se mejoraría significativamente la supervivencia.

A7

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio. Cohorte prospectiva.

Debido a que se consideró el estudio como grupo piloto, no se realizó un cálculo formal de tamaño de muestra y se decidió incluir en el estudio a los pacientes que ingresaron al Departamento de Hematología y Oncología con diagnóstico de leucemia aguda durante los dos años subsecuentes al inicio del estudio.

Se incluyeron en el estudio los pacientes adultos con leucemia aguda *de novo*: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoide aguda (LLA) y leucemia híbrida (LH) que ingresaron al Departamento de Hematología y Oncología durante el periodo comprendido entre septiembre de 2003 a junio de 2005. Los criterios de inclusión fueron: a) pacientes con leucemia aguda *de novo* susceptibles de recibir tratamiento curativo y b) FAL identificado al momento del diagnóstico en la población de blastos. Se eliminaron los pacientes que no contaron con una muestra de aspirado de médula ósea después de la quimioterapia de inducción.

Se determinó la cantidad de ERM en dos ocasiones de acuerdo con los FAL detectados al diagnóstico en la población de blastos. Denominamos ERM-1 a las células de leucemia presentes en la médula ósea después de la quimioterapia de inducción una vez obtenidos los criterios de remisión completa (18) y ERM-2 a las células de leucemia presentes en la médula ósea después de quimioterapia de consolidación una vez que el paciente hubiera logrado recuperación en las cuentas de sangre periférica. Con la finalidad de definir

presencia o ausencia de ERM en estos dos momentos de la evolución de los pacientes, utilizamos un valor de corte de $\geq 5 \times 10^{-3}$ para ERM-1 y $\geq 3.5 \times 10^{-4}$ para ERM-2 (2,5). Se registraron los datos clínicos y de laboratorio al momento del diagnóstico.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Investigación Biomédica en Humanos del Instituto y se firmó consentimiento informado en todos los casos.

Análisis de ERM

Mediante citometría de flujo se analizaron muestras de médula ósea o de sangre periférica al momento del diagnóstico, empleando un panel amplio de anticuerpos monoclonales para identificar las aberraciones fenotípicas que pudieran posteriormente ser utilizadas para la detección de ERM. La expresión antigénica de los blastos se analizó mediante la tinción triple [isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) y el complejo peridínina-clorofila-proteína (PerCP)] con los siguientes anticuerpos monoclonales: CD2, CD5, CD7, CD10, CD13, CD14, CD15, CD19, CD20, CD22, CD33, CD34, CD45, CD56, CD64, CD117, y glicoforina A. La expresión citoplásmica de CD3, CD79a y mieloperoxidasa se analizó en células fijadas y permeabilizadas. La adquisición de datos se realizó mediante un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). La identificación de la población de blastos se hizo a través citogramas de intensidad de CD45 contra dispersión lateral de la luz (SSC).

La adquisición de datos de ERM en el citómetro de flujo se realizó mediante dos pasos consecutivos de acuerdo al protocolo publicado por San Miguel *et al.* (17). Brevemente, en el primer paso se adquirieron todas las células y se

midieron 15000 eventos por tubo. En el segundo paso se empleó una “ventana viva” multiparamétrica para adquirir mayor número de eventos sólo de las células “en ventana”, presentes en un número reducido en la muestra original de MO. El análisis de datos se hizo con base en la identificación de células con características fenotípicas aberrantes idénticas a aquellas presentes en las células leucémicas al diagnóstico. Para éste propósito la adquisición, mediante “ventana viva SSC/antígeno”, se realizó en aproximadamente 10^6 células nucleadas de MO. Para el análisis de datos se utilizó el programa Cell Quest (Becton Dickinson).

Análisis de RMF

Se siguió un método de referencia para detectar la expresión antigénica de Pgp y su actividad funcional (9) en la población de blastos; brevemente, se aislaron las células mononucleares (CMN) por gradiente de densidad, se lavaron y se ajustaron en buffer PBS a una concentración de 5×10^6 células/mL. Cien μ L de suspensión celular se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal MRK16 y CD34 o el marcador de linaje (Becton Dickinson), conjugados con FITC/PE o FITC/PerCP, respectivamente. Se utilizó IgG2 de ratón como control de isotipo. Las células se lavaron con PBS, se diluyeron en 500 μ L de PBS y se leyeron en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson) adquiriendo 15000 eventos. La expresión de Pgp en la población de blastos se determinó como la relación entre la media aritmética de la intensidad de fluorescencia del antígeno MRK16/media aritmética de la intensidad de fluorescencia del control de isotipo. El valor de corte fue 3.

Para el análisis funcional de Pgp, las CMN se ajustaron 2×10^6 células/mL en suero libre de RPMI. Se distribuyeron 250 μ L de suspensión en 6 tubos: 2 para evaluar la captación de autofluorescencia (AU) y el eflujo de autofluorescencia (AE); 2 tubos para evaluar la captación de Rhodamina 123 (Rh123) (U) y el eflujo de Rh123 (E), y dos tubos para evaluar el efecto de ciclosporina (como modulador de Pgp) sobre la captación de Rh123 (UC) y sobre el eflujo de Rh123 (EC). Se agregaron los anticuerpos monoclonales CD34/PE o marcadores de linaje conjugados con PE o PerCP a los tubos U, E, UC, y EC, y la ciclosporina se agregó a los tubos UC y EC. Los tubos fueron incubados a 37°C durante una hora. Al final de la incubación se mantuvieron en hielo los tubos destinados a evaluar la captación. De manera concomitante, los tubos que contenían CMN para evaluar eflujo fueron lavados con RPMI frío y se agregó ciclosporina al tubo EC. Los tubos se incubaron una hora a 37°C y posteriormente se leyeron en el citómetro de flujo. De forma simultánea con las muestras de los pacientes, se procesó un control comercial de células MDR+ (PMG-Y, BD Pharmingen). La captación de Rh123 se evaluó mediante el detector de fluorescencia verde y los datos fueron obtenidos a modo de lista y analizados con el programa Cell Quest (Becton Dickinson). Antes de realizar el análisis estadístico, los valores logarítmicamente amplificadas fueron convertidos a valores lineares. Para definir si la población de blastos presentaba actividad funcional (de bomba) de Pgp, se calcularon dos diferentes relaciones: la primera: *captación de Rh123/eflujo de Rh123*, se expresó como el cociente entre la media aritmética de la intensidad de fluorescencia del tubo U/media aritmética de intensidad de fluorescencia del tubo E. La segunda: *eflujo de Rh123 modificado por ciclosporina/eflujo de Rh123*, evaluó el efecto

de ciclosporina sobre el eflujo de Rh123, y fue expresado como el cociente de la media aritmética de la intensidad de fluorescencia del tubo EC/media aritmética de la intensidad de fluorescencia del tubo E. En ambos casos el valor de corte fue de 3.

Método estadístico.

Las variables continuas se describieron como medianas e intervalo debido a la distribución no paramétrica de los datos y las variables categóricas en frecuencias y proporciones. Los valores de enfermedad residual mínima se describieron en su valor numérico y las diferencias entre ERM-1 y ERM-2 se compararon mediante la prueba de Wilcoxon. Los valores de Pgp antigénico y funcional se describieron en su valor numérico y se compararon entre los diferentes subtipos de leucemia aguda con las pruebas de *U* de Mann Whitney o Kruskal Wallis según se compararan dos o más grupos, respectivamente. Con la finalidad de demostrar asociación entre RMF y ERM se compararon las medianas de los valores de Pgp antigénico y funcional mediante la prueba de *U* de Mann-Whitney entre los grupos con y sin ERM. Se utilizó la prueba Exacta de Fisher cuando fue necesario evaluar diferencia de proporciones entre grupos.

A8

RESULTADOS

De septiembre de 2003 a junio de 2005 se incluyeron 18 pacientes adultos con leucemia aguda *de novo*. Los datos clínicos y de laboratorio se muestran en la tabla 1.

De 8 pacientes con LLA, 4 fueron tratados con el esquema de quimioterapia H-CVAD (19), 3 recibieron el protocolo de tratamiento 0195 y un paciente recibió un esquema de quimioterapia para leucemia de Burkitt. Los dos últimos esquemas son protocolos institucionales similares a los publicados por el *German Multicenter Study Group for Adult ALL (GGMALL)* (20). Todos los pacientes con LMA recibieron inducción a la remisión con el esquema 7+3 y posteriormente 3 consolidaciones con dosis altas de citarabina. Ambos pacientes con LH fueron tratados con 7+3, posteriormente 3 consolidaciones con dosis altas de citarabina y finalmente dos años de tratamiento con el protocolo 0195.

Citogenética

Se obtuvieron muestras de aspirado de médula ósea en 15 pacientes para análisis cromosómico. Debido a dificultades técnicas, el análisis citogenético fue exitoso únicamente en 3 casos, 2 con cariotipo complejo y uno con $t(8;21)$.

FAL y ERM

De acuerdo con el FAL (6), los fenotipos identificados en LLA-B fueron: expresión de antígenos de linaje cruzado CD19+/CD33+, CD15+/CD34+/CD19+, CD10+/CD33+/CD34+, CD19+/CD56+/CD34+, CD19+/CD13+/CD34+ (2 casos), expresión asincrónica de antígenos CD19+/CD22+/CD45 neg; fenotipo infrecuente CD19+/CD22+/CD34 neg. En los pacientes con LMA se observaron: antígeno de linaje cruzado CD19+/CD13+/CD34+, CD7+/CD13+/CD34 neg, CD7+/CD33+/CD34neg, CD7+/CD33+/CD34+, expresión asincrónica de antígenos CD56+/CD34+ (2 casos); CD56+/CD33+/CD34+; CD56+/glicoforina A+/CD34+. En LH, antígeno de linaje cruzado CD7+/CD33+ y expresión asincrónica HLA-DR neg/CD34+.

Una vez lograda la remisión completa, detectamos ERM-1 ($\geq 5 \times 10^{-3}$) en una proporción de 5/18 pacientes (28%), la cual se incrementó a 13/15 casos (87%) cuando evaluamos ERM-2 ($\geq 3.5 \times 10^{-4}$). La mediana del número de células de leucemia residuales en las muestras de médula ósea obtenidas después de la quimioterapia de inducción (ERM-1) fue de 0.84×10^{-3} , con un intervalo de 0.1×10^{-3} a 20×10^{-3} . La mediana del número de células de leucemia residuales en las muestras de médula ósea después de la quimioterapia de consolidación (ERM-2) fue de 12×10^{-4} con un intervalo de 0.47×10^{-4} a 85×10^{-4} . Las diferencias entre ERM-1 y ERM-2 no fueron estadísticamente significativas, (Figura 1).

Encontramos diferencias estadísticamente significativas respecto de los valores de ERM-1 entre pacientes con LMA y LLA ($p=.046$), (Tabla 2).

RMF

En la totalidad de la cohorte, cuando se clasificó la expresión antigénica de Pgp como positiva o negativa utilizando un valor de corte de 3 (*material y métodos*), éste fue positivo en 33% de casos. De acuerdo con el subtipo de leucemia, la expresión de Pgp fue positiva en 50% de los casos de LLA, 13% de casos de LMA y en uno de dos pacientes con LH. Cuando se evaluó la actividad de bomba de Pgp mediante la relación *captación de Rh123/eflujo de Rh123* y la relación *eflujo de Rh123 modificado por ciclosporina/eflujo de Rh123*, se encontró que ambos parámetros fueron positivos en 13% de los casos con LMA y en 25% y 0% de los casos con LLA, respectivamente. Solamente uno de los dos pacientes con LH mostró estos dos parámetros positivos. Estas diferencias de frecuencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas (datos no mostrados). Encontramos que los blastos de pacientes con LLA tuvieron mayor expresión de Pgp que los blastos de LMA o LH, esta diferencia fue estadísticamente significativa (Tabla 2). Tanto la relación *captación de Rh123/eflujo* como la relación *eflujo de Rh123 modificado por ciclosporina/eflujo de Rh123* no difirieron significativamente entre los subtipos de leucemia (Tabla 2).

No observamos correlación entre expresión antigénica y actividad funcional de Pgp (datos no mostrados)

Asociación entre RMF y ERM

Ninguno de los parámetros de RMF fue diferente entre los pacientes con o sin ERM-1 ($p > 0.05$). La figura 2 muestra la mediana de los parámetros de Pgp al momento del diagnóstico en pacientes con y sin ERM-1. Debido a que sólo un paciente no presentó ERM después de la primera consolidación, no pudimos comparar los parámetros de RMF entre los grupos con y sin ERM-2. Debido a que el valor de corte para ERM-1 y ERM-2 no ha sido previamente determinado en nuestra población, tratamos de demostrar correlación entre cualquiera de los parámetros de Pgp y ERM mediante r de Spearman, conservando el valor numérico de ambas variables; sin embargo, no observamos correlación.

DISCUSIÓN

El conocimiento de las características biológicas de las células de leucemia residuales es una meta de la investigación en hematología. La enfermedad residual es una expresión de resistencia celular a la quimioterapia, y en la mayoría de los casos, representa el origen de la recaída y falla al tratamiento. Una estrategia terapéutica en algunas neoplasias hematológicas malignas es evitar la progresión de la enfermedad una vez que se ha detectado ERM. Un problema importante en leucemia aguda resulta de la falta de conocimiento respecto de los factores que condicionan la persistencia de células residuales. El conocimiento de la biología de la ERM permitiría el desarrollo de nuevos fármacos con blancos específicos, y potencialmente, podría prevenir o retrasar la recaída. Está bien documentada la relevancia clínica de la ERM y de la expresión de Pgp en pacientes con leucemia aguda; sin embargo, sólo algunos autores han tratado de probar asociación entre estos dos marcadores biológicos.

En el presente estudio, detectamos ERM-1 en 28% de los casos y ERM-2 en 87% de los casos. En un estudio de pacientes con LMA, Venditti (5), encontró una frecuencia aproximada de ERM de 41% y 43%, después de inducción y consolidación, respectivamente. En contraste, Ciudad (6), reportó que 8/53 pacientes (15%) con LLA nunca desarrollaron ERM de acuerdo con un valor de corte de $<1 \times 10^{-4}$. Con base en las definiciones que utilizamos en nuestro estudio para ERM-1 y ERM-2, sólo 13% de nuestros pacientes nunca desarrolló ERM en un periodo corto de tiempo (no mayor de 4 meses).

La carga de ERM-1 fue diferente entre pacientes con LMA y LLA, esto podría ser explicado por diferencias entre los protocolos de tratamiento.

Identificamos 16 FAL en los 18 pacientes. Debido a razones técnicas, el anticuerpo monoclonal anti CD34 se utilizó en 63% de los casos (10 de 16 FAL), lo cual es inferior a lo recomendado por otros autores (21). Otra limitante del estudio es que no utilizamos el anti-CD117 como parte de las combinaciones presentes en los FAL.

La expresión de Pgp en pacientes con LMA *de novo* varía entre los diversos reportes (22), en promedio es de 53%, con una oscilación entre 19% y 75%. Este margen amplio puede deberse a diferentes métodos de evaluación de Pgp. Independientemente de los métodos empleados, nosotros detectamos una proporción más baja de casos positivos para RMF en la población con LMA; una explicación para este hecho puede ser la edad menor de nuestra población (mediana 28 años), ya que se ha descrito que la expresión de Pgp está relacionada con edad avanzada (7, 23).

De manera interesante, encontramos que los blastos de los pacientes con LLA presentaron mayor expresión de Pgp en comparación con las células de los pacientes con LMA, no tenemos explicación para este hecho.

No observamos correlación entre la expresión antigénica y funcional de Pgp. Algunos ensayos *in vitro* realizados en líneas celulares de leucemia mieloide han demostrado falta de correlación entre la expresión y la función de Pgp. También se ha descrito que las células de leucemia con fenotipos más inmaduros presentan actividad significativa de Pgp y puede ser inhibida por moduladores de Pgp tales como verapamil o PSC833. En contraste, las células

con un fenotipo más maduro no muestran capacidad de eflujo de Rh123 a pesar de la expresión antigénica importante de Pgp en su superficie (24).

En el presente estudio utilizamos un método que permite la identificación simultánea de células de leucemia y la evaluación de la expresión de Pgp, así como su función de bomba. San Miguel (2) empleó un método similar y reportó que los pacientes con $\geq 5 \times 10^{-3}$ células residuales después de la quimioterapia de inducción tenían un eflujo de Rh123 significativamente mayor. Sin embargo, nosotros no encontramos tal diferencia, ya fuera en la expresión antigénica o en la actividad funcional de Pgp.

A9

CONCLUSIONES

Los linfoblastos expresan más Pgp que los mieloblastos.

Los datos de nuestro estudio pueden interpretarse como falta de asociación entre RMF y ERM en pacientes adultos con leucemia aguda *de novo*.

Sugerencias: Se sugiere seguir el método estandarizado (9) en casos en los que se desee evaluar RMF. Se sugieren estudios con una N mayor, con base en los resultados de este estudio piloto.

A10. ANEXOS O APÉNDICES

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Datos clínicos y de laboratorio de los pacientes

	n	(%)
Género		
Masculino	10	(56)
femenino	8	(44)
Total	18	(100)
LMA	8	(44)
LLA	8	(44)
LH	2	(11)
Edad, mediana (intervalo)	28	(17-69)
Hb, (g/dL)	8.85	(3.90-14)
Leucocitos, ($\times 10^9/L$)	7.75	(0.60-97.50)
PLQ, ($\times 10^9/L$)	25	(10-356)
Blastos SP, (%)	25	(2-78)
Blastos MO, (%)	73	(20-94)
DHL, (UI/L)	476	(132-1505)

Hb=hemoglobina. PLQ=cuenta plaquetaria. SP=sangre periférica. MO=médula ósea. DHL=dehidrogenasa láctica. LMA=leucemia mieloide aguda. LLA=leucemia linfocítica aguda. HL=leucemia híbrida.

Tabla 2. Valores de ERM, expresión y función de Pgp de los pacientes con leucemia aguda

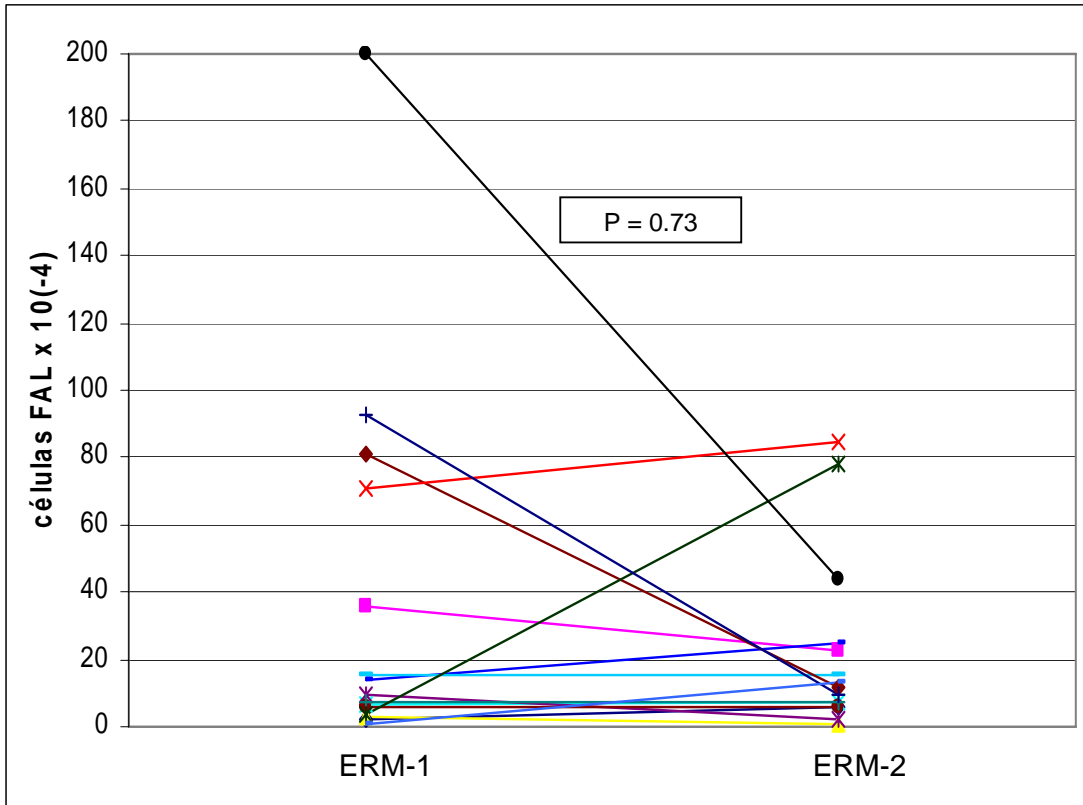
	LMA	LLA	LH
Expresión de Pgp	2.23	3.09 ¹	2.79
mediana (intervalo)	(0.74-3.14)	(2.34-8.7)	(2.58-3.0)
Cociente de captación Rho123/ Eflujo	1.56	1.43	3.10
Rho 123, mediana (intervalo)	(1.01-4.0)	(0.77-7.9)	(1.95-4.26)
Cociente de Eflujo Rho123 modificado por ciclosporina/Eflujo Rho123, mediana (intervalo)	1.72 (0.77-8.9)	1.08 (0.74-1.61)	3.43 (2.15-4.72)
MRD-1, x10 ⁽⁻³⁾ , mediana (intervalo)	2.5 ² (0.4-20)	0.64 (0.1-8.1)	3.1 (0.5-5.8)
MRD-2, x10 ⁽⁻⁴⁾ , mediana (intervalo)	23.8 (1.9-85)	9.6 (0.47-15)	----- -----

LMA=leucemia mieloide aguda. LLA=leucemia linfocítica aguda. LH=leucemia híbrida

¹. p =0.023 (Kruskall-Wallis)

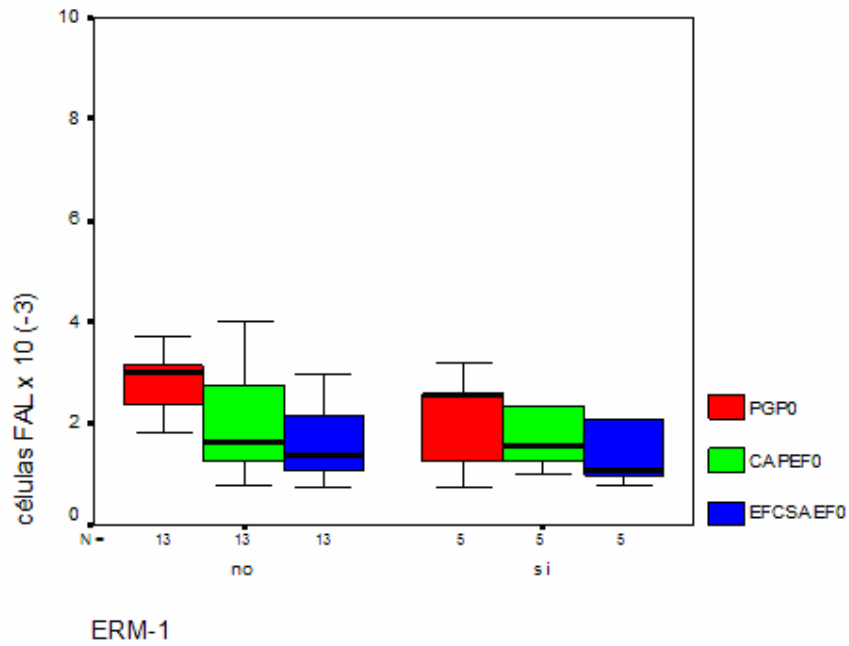
². p=0.046 (U de Mann-Whitney), cuando se compararon caso de LMA vs. LLA

Figura 1. Valores de enfermedad residual mínima después de inducción a la remisión (ERM-1) y después de consolidación (ERM-2).



Células FAL= células con fenotipo aberrante asociado con leucemia

Figura 2. Expresión y función de Pgp en pacientes con y sin ERM-1



ERM-1= enfermedad residual mínima después de inducción a la remisión.

Células FAL=células con fenotipo aberrante asociado con leucemia.

Datos al momento del diagnóstico: Pgp0= expresión antigénica de Pgp. CAPEF0= radio de captación Rho123/eflujo Rh123. EFCSAEF0=radio de eflujo Rh123 modificado por ciclosporina/eflujo Rh123. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

A11

BIBLIOGRAFÍA

1. Bruggemann M, Raff T, Flohr T, Gokbuget N, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006;107:1116-1123.

2. San Miguel JF, Martínez A, Macedo A, Vidriales MB, López-Berges C, González M, Caballero D, García-Marcos MA, Ramos F, Fernández-Calvo J, Calmuntia MJ, Díaz-Mediavilla J, Orfao A. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997;90:2465-2470.

3. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995;85:1416-1434.

4. Campana D. Determination of minimal residual disease in leukemia patients. *Br J Haematol* 2003;121:823-838.

5. Venditti A, Buccisano F, Del Poeta G, Maurillo L, et al. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3948-3952.

6. Ciudad J, San Miguel JF, López-Berges MC, Vidriales B, Valvaerde B, Ocqueteau M, Mateos G, Caballero MD, Hernández J, Moro MJ, Mateos MV and Orfao A. Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 1998;16:3774-3781.
7. Mahadevan D, List AF. Targeting the multidrug resistance-1 transporter in AML: molecular regulation and therapeutic strategies. *Blood* 2004;104:1940-1951.
8. Gottesman MM, Pastan I: Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993;62:385-427.
9. Huet S, Marie JP, Gualde N, Robert J: Reference method for detection of Pgp mediated multidrug resistance in human hematological malignancies: A method validated by the laboratories of the French Drug Resistance Network. *Cytometry Comm.Clin.Cytometry* 1998;34:248-256.
10. Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdem L, Slovak ML, McConnell TS, Head DR, Appelbaum FR, Willman CL. Acute myeloid leukemia in elderly: Assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biological subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group Study. *Blood* 1997;89:3323-3329.

11. Zochbauer S, Gsur A, Brunner R, Kyle PA, Lechner K, Pirker R. P-glycoprotein expression as unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1994;8:974-977.
12. Wood P, Burgess R, MacGregor A, Liu JA. P-glycoprotein expression on acute myeloid leukemia blast cells at diagnosis predicts response to chemotherapy and survival. *Br J Haematol* 1994;87:509-514.
13. Musto P, Melillo L, Lombardi G, Natera R, DiGiorgio G, Carotenuto M. High risk of early resistant relapse for leukaemic patients with presence of multidrug resistance associated P-glycoprotein positive cells in complete remission. *Br J Haematol* 1991;77:50-53.
14. Venditti A, Tamburini A, Buccisano F, Del Poeta G, Maurillo L, Panetta P, Scornajenghi KA, Cox C, Amadori S. Clinical relevance of minimal residual disease detection in adult acute myeloid leukemia. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 2002;11:349-357.
15. Beishuizen A, Verhoeven MA, van Wering ER, Hahlen K, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Analysis of Ig and T-cell receptor genes in 40 childhood acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and subsequent relapse: Implications for the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction analysis. *Blood* 1994;83:2238-2247.

16. Orfao A, Ciudad J, López-Berges MC, López A, Vidriales B, Caballero MD, Valverde B, González M, San Miguel JF. Acute lymphoblastic leukemia (ALL): Detection of minimal residual disease (MRD) at flow cytometry. *Leuk Lymphoma* 1994;13(suppl 1):87-90.
17. San Miguel JF, Vidriales MB, López-Berges C, López-Berges C, Díaz-Mediavilla J, Gutiérrez N, Cañizo C, Ramos F, Calmuntia MJ, Pérez JJ, González M, Orfao A. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 2001;98:1746-1751.
18. Cheson BD, Cassilth PA, Head DR, et al. Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute leukemia. *J Clin Oncol* 1990;8:813-819.
19. Kantarjian HM, O'Brien S, Smith TL, et al. Results of treatment with hyper-CVAD, a dose intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2000;18:547-561.
20. Gokbuget N, Hoelzer D, Arnold R, et al. Treatment of adult ALL according to protocols of the German Multicenter Study Group for Adult ALL (GMALL). *Hematol Oncol Clin North Am* 2000;14:1307-25

21. Van der Pol MA, Pater JM, Feller N, Westra AH, van Stijn A, Ossenkoppele GJ, Broxterman HJ, Schuurhuis GJ. Functional characterization of minimal residual disease for P-glycoprotein and multidrug resistance protein activity in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2001;15:1554-1563.
22. Sonnenveld P. Multidrug resistance in haematological malignancies. *Journal of Internal Medicine* 2000;247:521-534.
23. Van der Pol MA, Broxterman HJ, Pater JM, Feller N, van der Maas M, Weijers WD, Scheffer GL, Allen JD, ScheperRJ, van Loevezijn A, OssenkoppeleGJ, Schuurhuis GJ. Function of the ABC transporters, P-glycoprotein, multidrug resistance protein and breast cancer resistance protein, in minimal residual disease acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2003;88:134-147.
24. Bailly JD, Muller C, Jaffrezou JP, Demur C, Gassar G, Bordier C, Laurent G. Lack of correlation between expression and function of P-glycoprotein in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia* 1995;9:799-807.