



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

CORRELACIÓN ENTRE QUIMIOSENSIBILIDAD  
*IN VITRO* A CITARABINA Y RESPUESTA AL  
PRIMER CICLO DE QUIMIOTERAPIA EN  
PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

O N C O L O G Í A P E D I Á T R I C A

P R E S E N T A

DRA. FARINA ESTHER ARREGUÍN GONZÁLEZ

TUTOR

Dra. Aurora Medina Sansón

ASESOR METODOLÓGICO

Dra. Elisa María Dorantes Acosta



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO  
FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

65 AÑOS DE EXCELENCIA EN PEDIATRÍA  
Salud para las Nuevas Generaciones

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2009



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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

**CORRELACIÓN ENTRE LA QUIMIO-  
SENSIBILIDAD A CITARABINA Y RESPUESTA  
AL PRIMER CICLO DE QUIMIOTERAPIA EM  
PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE  
AGUDA**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA**

**P R E S E N T A**

**DRA. FARINA ESTHER ARREGUÍN GONZÁLEZ**

**Vo. Bo. TUTOR**

**Dra. Aurora Medina Sansón**

**Vo. Bo. ASESOR METODOLÓGICO**

**Dra. Elisa María Dorantes Acosta**

**MÉXICO, D. F.**

**FEBRERO 2009**

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mis padres por estar a mi lado en todo momento. Muchas gracias por todo, sin ustedes no estaria donde estoy ahora...

Indira.....Te quiero mucho!.... Gracias por hacer que las cosas difíciles parezcan fáciles.

A Virginia Nava por su paciencia, su disposición, su tiempo y su gran ayuda en mi trabajo de laboratorio

A la Dra. Aurora Medina por compartir su sabiduría y su tiempo.

A la Dra Elisa Dorantes por su gran ayuda, y su amistad

## INDICE

	Página
I. INTRODUCCION.....	2
II.- ANTECEDENTES HISTORICOS.....	3
III.- MARCO TEORICO.....	8
IV.-PREGUNTA DE INVESTIGACION.....	22
V.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
VI.-JUSTIFICACION.....	23
VII.-HIPOTESIS.....	23
VIII.-OBJETIVO GENERAL.....	24
IX.-OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	24
X.-METODOLOGIA.....	27
XI.-RESULTADOS.....	29
XII.-DISCUSION.....	42
XIV.-CONCLUSIONES.....	47
XV.-ANEXOS.....	48
XVI.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFIAS.....	50

## INTRODUCCIÓN

El tratamiento de las Leucemias Agudas Mieloblásticas representa uno de los mayores retos dentro de la Oncología Pediátrica debido a la alta tasa de recaídas y a la mortalidad relacionada con el tratamiento.

A pesar de los grandes avances en el conocimiento de esta neoplasia, los logros obtenidos en términos de supervivencia han sido relativamente lentos. Actualmente alrededor de la mitad de los pacientes pueden esperar una supervivencia libre de enfermedad a 5 años.

El reto actual es el desarrollo de nuevas terapias que puedan interferir con la resistencia y reducir la tasa de recaídas.

## PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Existe correlación entre la quimiosensibilidad *in vitro* al Ara C medida por la prueba de MTT, con la respuesta al primer ciclo de quimioterapia?

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la mayoría de las neoplasias malignas la respuesta al tratamiento antineoplásico es uno de los factores pronósticos más importantes. En leucemia aguda Mieloblástica esta quimiosensibilidad es evaluada en vivo a través de la respuesta en médula ósea después de un ciclo de quimioterapia, considerándose como de mejor pronóstico a los pacientes que muestran remisión después del primer ciclo. Esta respuesta constituye un elemento para estratificar a los pacientes y adecuar la intensidad de la quimioterapia. Sin embargo, es necesario esperar 3 a 4 semanas para conocer la respuesta al tratamiento, además de que algunos pacientes fallecen por toxicidad a este primer ciclo.





## MARCO TEÓRICO

Las leucemias se clasifican en agudas y crónicas, y dependiendo del linaje en linfoides o mieloides. En edad pediátrica más del 90% de las leucemias mieloides son agudas y las restantes incluyen los trastornos mieloproliferativos crónicos o subagudos.

La leucemia mieloide aguda es una enfermedad maligna que se caracteriza por la proliferación clonal de células mieloides primitivas, inmaduras, con el consecuente reemplazo en la médula ósea de las células normales, que sin tratamiento evoluciona hacia la muerte.

La Leucemia Mieloide Aguda (LMA) se define como un trastorno clonal ocasionado por una transformación maligna de una célula madre, derivada de la médula ósea o progenitor, la cual demuestra una disminución en la tasa de autodestrucción y también en la diferenciación aberrante. Estos acontecimientos llevan a un aumento en la acumulación en la médula ósea y otros órganos debido a estas células mieloides malignas. Según la OMS <sup>(8)</sup> para llamarse aguda, la médula ósea generalmente debe incluir más de 20% blastos leucémicos.

Existen factores genéticos de riesgo relacionados con el desarrollo de la LMA con una elevada frecuencia de LMA en los gemelos idénticos, que se cree se debe en gran medida al hecho de compartir la circulación y la incapacidad de un gemelo de rechazar las células leucémicas del otro gemelo <sup>(9)</sup>. Hasta los 6 años de edad, existe un riesgo 2 a 4 veces más alto de que ambos gemelos idénticos padezcan leucemia. Después de esa edad, el riesgo no es significativamente mayor que el de la población en general <sup>(10)</sup>. El desarrollo de la LMA también se ha relacionado con una variedad de síndromes predisponentes que resultan de los desajustes o inestabilidades de los cromosomas, defectos en la reparación del DNA, alteraciones en el receptor de la citocina o la activación de las señales de las vías de transducción, así como una alteración de la síntesis de proteínas.

El Grupo de Cooperación de Francia, Estados Unidos y Gran Bretaña (FAB) en 1976 <sup>(9-12)</sup>, diseñó un sistema que clasifica a las LMA en diferentes subtipos, esencialmente basados en la citomorfología y detección de los marcadores de linaje mediante el empleo de anticuerpos monoclonales (M0 a M7) (Cuadro 1).

## CUADRO 1 : CLASIFICACION DE LMA ACORDE A LA FAB

Tipo	Nombre	Morfología	Histoquímica
M0	Indiferenciada	Blastos grandes, agranulares, indiferenciados. >90% blastos	MP- SN B - <sup>b</sup>
M1	Mieloblástica aguda sin maduración	Indiferenciada, >90% blastos, < 10% promielocitos/monocitos	MP+, SN+, PAS -
M2	Mieloblástica aguda con maduración	> 30% y < 89% blastos; >10% promielocitos, mielocitos ; < 20% monocitos	MP+, SN+, PAS-
M3	Aguda promielocítica hipergranular	>20% de promielocitos anormales hipergranulares, Cuerpos de Auer presentes	MP+, SN+, PAS-
M3v	Aguda promielocítica variante microgranular	Fina granularidad del citoplasma en los promielocitos, núcleos bilobulados.	MP+, SN+, PAS-
M4	Aguda mielomonocítica	>30% blastos en serie no eritroide, >20% pero <80% monolitos. Monocitos en sangre periférica >5x10 <sup>9</sup> /L; lisozima >3v lo normal.	MP+, NASDA +
M4Eo	Aguda mielomonocítica con eosinofilia	>5% eosinófilos anormales con gránulos basófilos.	MP+, NASDA+ eosinófilos, PAS+
M5a	Monocítica aguda	>80% células monocíticas son monoblastos, resto son promonocitos/monocitos	MP+, NASDA+
M5b	Monocítica aguda con diferenciación	<80% células monolíticas son monoblastos, el resto son promonocitos/ monocitos.	MP+,NASDA+
M6	Eritroleucemia	>30% de la serie no eritroide son blastos; >50% de la médula ósea son eritroblastos	PAS+, sideroblastos con tinción de Fe <sup>2+</sup>
M7	Megacarioblástica aguda	>30% de la serie no eritroide son megacarioblastos; mielofibrosis frecuente	MP-, SN-, NASDA plaquetaria +, MP+ por ME.

b) En el subtipo M0, menos del 3% de los blastos pueden ser SBB positivos.

MP: Mieloperoxidasa; NSE: esterasa no específica; PAS: tinción Periyódica ácida de Schiff; SBB: Sudán Negro B; NASDA: cloroacetato-naftol-ASD; ME: microscopía electrónica.

El sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) incorpora información clínica, morfológica (clasificación FAB), inmunofenotípica, citogenética y molecular <sup>(13)</sup>. (Cuadro 2).

En esta clasificación, la cuenta de blastos en médula ósea para establecer el diagnóstico de LMA se reduce de 30% a 20%. Se han identificado anormalidades cromosómicas clonales en los blastos de cerca del 75% de los niños con LMA y son útiles en la definición de los subtipos con características particulares, por ejemplo, t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q22) y t(15;17)(q22;q12) t(8;21) con M2, t(15;17) con M3, inv(16) con M4 Eo, anomalías 11q23 con M4 y M5, t(1;22) con M7) <sup>(14)</sup>. En los pacientes con estas anormalidades citogenéticas, el diagnóstico se establece independientemente de la cuenta de blastos <sup>(15)</sup>. En consecuencia, es crucial diagnosticar los tipos de leucemia <sup>(16)</sup>.

## CUADRO 2: CLASIFICACION DE LMA ACORDE A LA OMS

### 1. LMA con anomalías genéticas recurrentes:

---

a) LMA con t(8;21)(q22;q22); (LMA1[CBFA]/ETO).

b) LMA con eosinofilos de médulas anormales.

1. inv(16)(p13q22).
2. t(16;16)(p13;q22) (CBFB/MYH11).

c) Leucemia promielocítica aguda (LMA con t(15;17)(q22;q12) (PML/RARA) y variantes (incluido como M3 en la clasificación FAB).

d) LMA con anomalías 11q23 (MLL).

2. LMA con displasia de multilineaje (de novo o seguimiento de un síndrome mielodisplásico, la mayoría de los casos de anemia resistente al tratamiento con exceso de blastos en la transformación cae en la categoría más abajo).

3. LMA, relacionada con la terapia:

a) LMA relacionada con un fármaco alquilante.

b) LMA relacionada al inhibidor de la topoisomerasa II.

4. Leucemia aguda de linaje ambiguo:

a) Leucemia aguda no diferenciada (los blastos leucémicos muestran señales mínimas o ninguna de las señales de expresiones morfológicas o de proteínas de maduración).

1. Leucemia aguda bilineal (más de un linaje celular que muestra transformación leucémica).
2. Leucemia aguda bifenotípica (una población única de blastos leucémicos tiene expresión simultánea de marcadores de expresión proteínica de linajes celulares hematopoyéticos diferentes).

5. LMA no categorizada de otra manera (incluyendo la morfología FAB basada en M0 a M2, y categorías de M4 a M7):

1. LMA mínimamente diferenciada (FAB M0).
2. LMA sin maduración (FAB M1).
3. LMA con maduración (FAB M2).
4. AML (FAB M4).
5. Leucemia monoblástica aguda y monocítica (FAB M5a y M5b respectivamente).
6. Leucemia eritroide aguda (FAB M6).
  1. Eritroleucemia (FAB M6a).
  2. Leucemia eritroide pura (FAB M6b).
7. Leucemia megacarioblástica aguda (FAB M7).
8. Leucemia basofílica aguda.
9. Panmielosis aguda con mielofibrosis.
10. Sarcoma mielóide (granulocítico) sarcoma.

La LMA es una enfermedad grave, y al igual que en otras neoplasias malignas, se han identificado factores pronósticos como la edad (mayor de 10 años), el número de leucocitos al diagnóstico (>50 000 según St Jude), la presencia de ciertas alteraciones citogenéticas (monosomía 5, monosomía 7, rearrreglos MLL/11q23) <sup>(17)</sup> y un factor muy importante es la respuesta al primer ciclo de quimioterapia <sup>(18)</sup>.

Con base en la citogenética, algunos autores estratifican a las LMA en tres grupos (Cuadro 3)

El grupo de pronóstico favorable, incluyen la LMA M3, la t(8;21) y aquellas LAM con translocaciones que involucran al core-binding-factor (CBF), es decir aquellas con traslocación t(16;16) e inv 16. Globalmente este tipo de leucemias tiene una supervivencia de 60%. Las leucemias de pronóstico desfavorable, logran una supervivencia inferior al 20%, los pacientes que tienen pronóstico intermedio, alcanzan tasas de supervivencia de 30 a 40% con los protocolos actualmente usados. Existen otros factores pronósticos como la presencia de proteínas transportadoras transmembrana, que confieren resistencia al tratamiento, mutaciones o la sobreexpresión de genes

específicos como FLT3, nucleofosmina, c-kit, ERG y BCL2-BAX, entre otros.

CUADRO 3: GRUPOS DE RIESGO EN LMA

RIESGO	MRC	SWOG/ECOG	CALCB
FAVORABLE	t (8;21) inv 16/t(16;16) t(15;17)	t (8;21) inv 16/t(16;16) del 16(q)	t (8;21) inv 16/ t(16;16) del 9(q)
INTERMEDIO	Cariotipo normal, +8, del7(q), del 9 (q), anomalías 11q23, +21,+22	Cariotipo normal +8, -Y, +6 del (12p)	Cariotipo normal, del (q), -Y, t(9;11), +11,+21,+13, del 5(q), del 9(q), del 20(q)
DESFAVORABLE	Anomalías 3q, del 5 (q), -7	Anomalías 3q Del 7(q), t(6;9) , anomalías 9q,20q,21q y 17p	Inv(3) t(3;3) T(;9) t(11;19) T(6;11) +8.

MRC: Medical Research Council (Grimwade et al, 1998)

SWOG/ECOG: Southwest Oncology Group Eastern Cooperative Oncology Group (Slovak et al, 2000)

CALCB: Cancer and Leukemia GroupB (Byrd et al, 2002)

Hasta hace poco tiempo, los niños con LMA tenían un pronóstico extremadamente malo. Los protocolos pediátricos contemporáneos para la LMA logran tasas de remisión completa de 75% a 90%<sup>(19-21)</sup>. Con excepción del subtipo M3, para alcanzar una remisión completa es necesario inducir una profunda aplasia de la médula ósea.

Los fármacos más eficaces para alcanzar remisión en los pacientes con LMA son la citarabina y las antraciclinas que pueden darse en combinación con otros agentes como etopósido o tioguanina.

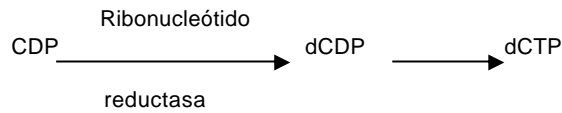
Los antimetabolitos constituyen un grupo de agentes antineoplásicos estructuralmente parecidos a los metabolitos de las células y que por lo tanto actúan como sustratos de los procesos enzimáticos celulares. Se unen a una enzima generando un bloqueo, o bien sus metabolitos se incorporan a las macromoléculas, generando productos no son funcionales.

La citarabina se conoce también como Ara-C, arabinosilcitoína y beta-D-arabinofuranosilcitosina y es un análogo de las pirimidinas. Este fármaco se vuelve activo cuando se convierte en nucleótido-5-monofosfato y es catalizado por la deoxicitincinasa, que produce reducción del difosfato de citidina, causando inhibición de la formación del DNA, también evita la replicación y compite con la deoxicitidina-difosfato por la polimerasa del DNA, inhibiendo su síntesis. Es específico de la fase de síntesis del ciclo celular <sup>(22)</sup> .

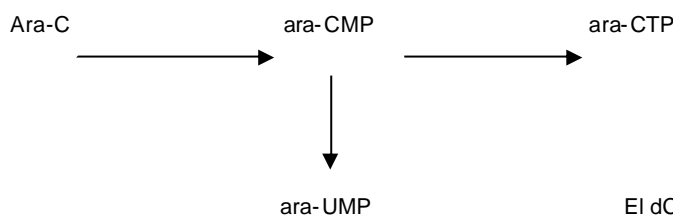


## FIGURA 1. MECANISMO DE ACCION DE ARA-C

1.-Trifosfato de Timidina inhibe la síntesis de dCTP



2.- La reducción de los niveles de dCTP inhibe la formación de ara-CTP y la incorporación a DNA



El dCTP y el ara-CTP compiten por la incorporación al DNA

DNA

Mecanismo de acción de Ara C. Cancer and Chemotherapy Principles and Practice.4th Edition. Chabner B. Página. 194.

La citarabina es un potente agente mielosupresor, capaz de provocar leucopenia, trombocitopenia y anemias graves, con alteraciones megacarioblásticas profundas. Otras manifestaciones tóxicas incluyen alteraciones gastrointestinales y con menor frecuencia estomatitis, conjuntivitis, disfunción hepática, tromboflebitis en el lugar de la inyección, fiebre y dermatitis. Después de la administración intratecal y cuando se administran dosis

altas por vía intravenosa, pueden presentarse convulsiones y otras manifestaciones de neurotoxicidad <sup>(23)</sup>.

Dado que la quimioterapia de inducción ocasiona una mielosupresión grave, la morbilidad y la mortalidad derivada de la aparición de infección o hemorragia durante el periodo de inducción pueden ser significativas. En general el pronóstico sigue siendo malo y sólo un 30 a 40% puede lograr una remisión prolongada y curarse de la enfermedad.

Aunque la mayoría de los pacientes con LMA pueden lograr una remisión completa inicial con la quimioterapia de inducción, sólo el 60% logra una supervivencia a largo plazo y el 30% presentan recurrencia de la enfermedad <sup>(24)</sup>.

Al menos un 20% de estos pacientes no logran tener una remisión con la terapia estándar. En este grupo de pacientes se han implicado varios mecanismos de resistencia a fármacos, incluyendo transportadores de membrana como la MRP (Multidrug Resistance-associated Protein), LRP (Lung Resistance related Protein), VMAT (Vesicular Monoamine Transporter), Gp-170 (producto del gen de resistencia a múltiples drogas 1 *MDR1*). Se ha observado que un incremento en la expresión de

Glicoproteína P en blastos de LMA se traduce en tasas bajas de remisión y una supervivencia más corta <sup>(25)</sup>.

Recientemente se han identificado un total de 48 transportadores de ABC (Casete de unión de adenosina trifosfato) en humanos, que podrían haber cubierto parcialmente la especificidad de sustrato con los transportadores clásicos de MDR. Por lo que éstos en conjunto juegan un papel importante en la resistencia a fármacos en LMA no identificados previamente. Maria M. Ho y colaboradores en el Departamento de Genética y Cancer, en Vancouver, Canada, han realizado experimentos específicos para tratar de medir la expresión de ciertos genes en células de LMA y correlacionarlos con la respuesta a la quimioterapia <sup>(26)</sup>.

La quimiosensibilidad *in vitro* es un método efectivo para predecir si el tumor responderá a los fármacos administrados y la quimiorresistencia supone la existencia de mecanismos de resistencia. Un ensayo de quimiosensibilidad es una prueba de laboratorio en la cual se mide el número de células cancerosas que son eliminadas con un medicamento antineoplásico específico con el objetivo de ver que tan efectivo es este. Conocer este concepto de quimiosensibilidad proporciona la pauta

para elegir el tipo de fármaco y determinar la dosis óptima de tratamiento en los pacientes con cáncer.

La elección del fármaco a emplear depende de la sensibilidad de los blastos probada *in vitro* o *in vivo*, la penetrabilidad del fármaco en sistema nervioso central, del índice terapéutico (relación entre eficacia/toxicidad de las concentraciones empleadas) y la farmacocinética del agente empleado. Inicialmente se utilizan los cultivos celulares y después modelos animales y posteriormente se prueban en humanos <sup>(27)</sup>. En el caso de la Citarabina, su eficacia contra blastos de LMA ha sido ampliamente demostrada en estudios *in vivo* e *in vitro*. <sup>(28-29)</sup>

Sin embargo, para poder incrementar el conocimiento de los mecanismos y ciertos patrones de resistencia involucrados en la falla al tratamiento es necesario estudiar primero muestras de pacientes <sup>(30)</sup>. El ensayo de MTT, basado en la reducción de este compuesto a un producto de formazán (de color azul) por las células vivas, tanto proliferativas como no proliferativas y mide el efecto final de resistencia. Es decir, determina *in Vitro*, la resistencia de la clona <sup>(28)</sup>. Esta prueba permite cuantificar la proporción de células vivas mediante mediciones colorimétricas. Facilita de manera importante el estudio de resistencia

farmacológica en pacientes con leucemia y puede ser usado para estudios a gran escala.

Pieters y colaboradores reportan resultados similares utilizando el ensayo de MTT y otros métodos como el ensayo de citotoxicidad de DiSC (Differential staining cytotoxicity assay), sin embargo éste último requiere de más tiempo para su realización <sup>(31)</sup>. Este mismo autor realizó el primer estudio que relacionó quimiosensibilidad inicial con resultado clínico en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA), encontrando que los pacientes que tenían células quimioresistentes al diagnóstico, obtenían menores tasas de remisión clínica completa que aquellos con células quimiosensibles. Esto fue probado con Prednisona, y finalmente se concluyó que la resistencia celular a este fármaco es un factor importante en la falla a la quimioterapia en niños con LLA <sup>(32)</sup>.

En la literatura se reportan ensayos con MTT donde se concluye que la prueba de quimiosensibilidad *in vitro* predice de manera significativa que pacientes con LMA que mantendrán remisiones prolongadas y aquellos que van a presentar recaída <sup>(33)</sup>. Este tipo de pruebas podría mejorar los protocolos de tratamiento en pacientes de alto riesgo, realizando ciertas modificaciones a la terapia convencional

y eventualmente dar quimioterapia en base al individuo y no a la enfermedad <sup>(34)</sup>. Al ajustar la intensidad al riesgo es posible evitar sobretratar o subtratar a los pacientes.

## ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El primero en describir esta enfermedad fue Velpeau en 1827. Barth estudió en 1839 a un paciente cuya sangre fue analizada por Donné en 1844, quien observó en la autopsia al microscopio, unos “glóbulos blancos”.

Los estudios iniciales de pacientes vivos con leucemia se hicieron en 1845 por tres investigadores de la época: Virchow (1845) en Alemania, el cual llamó a la enfermedad sangre blanca y fue el primero en proponer que el problema no era infeccioso sino una patología diferente que afectaba a ciertos órganos, Bennett (1845) y Craigie (1845) en Escocia, los cuales reconocieron también la entidad como un problema propio de los glóbulos blancos.

Virchow (1856), quien llegaría a ser uno de los grandes hombres en la patología mundial, introdujo dos años después el término leucemia, el cual ha perdurado hasta nuestros días. Virchow diferenció en su trabajo la leucemia de la leucocitosis, describiendo a la vez dos tipos de leucemia: el esplénico, asociado con esplenomegalia, y el linfático, donde se presentaba aumento de tamaño de los ganglios linfáticos. Friedreich (1857) describió por primera vez una modalidad de leucemia que llamó aguda, y

Neumann (1878) estableció la existencia de la leucemia mielógena, conceptos novedosos para aquel tiempo<sup>(1)</sup>. Sin embargo, la clasificación y el estudio de la leucemia no se pudo visualizar hasta que se conoció la tinción de Erlich en 1891, la cual permitió diferenciar la maduración de los leucocitos y así identificar las variantes de las células leucémicas.

Los primeros medicamentos eficaces utilizados en el tratamiento de las neoplasias provinieron del estudio y modificación química de los productos utilizados en la guerra química. De la identificación de la actividad linfotóxica del gas mostaza empleado en la primera Guerra Mundial, surgió la síntesis de las llamadas “mostazas nitrogenadas” y de sus derivados a mediados de siglo. Sin embargo, hay otros que provienen de fuentes naturales, tal es el caso de la Citarabina, que se extrajo por primera vez en 1950 de una esponja marina. A partir del conocimiento de los metabolitos esenciales para las células tumorales se han desarrollado varios fármacos antineoplásicos.

Para el tratamiento de la leucemia aguda, se deben utilizar esquemas intensos de quimioterapia, así como medidas de sostén que permitan lograr una remisión prolongada y



erradicar la neoplasia, que es el objetivo del tratamiento, así como conservar una calidad de vida adecuada.

En los años 80's en el Nacional Cancer Institute se probaron *in vitro* gran cantidad de agentes antineoplásicos, identificando a la citarabina como uno de los fármacos con mayor actividad contra la leucemia aguda mieloblástica, posteriormente el medicamento se probó diversos estudios clínicos y sigue siendo una de las piedras angulares en el tratamiento de esta neoplasia.

La resistencia a fármacos es un término general que describe la insensibilidad de las neoplasias al tratamiento. Se han reconocido varios mecanismos, sin embargo, independientemente de los mecanismos que la produzcan ésta puede ser innata o adquirida. Muchas neoplasias al ser tratadas con quimioterapia siguen las reglas establecidas por Skipper, Goldie y Coldman (1973-1983) <sup>(2)</sup>. Sin embargo el objetivo de la quimioterapia es erradicar la clona maligna, para ello es necesario que el fármaco llegue en cantidades letales a la célula diana. Cualquier circunstancia que se interponga puede ser causa de resistencia.

De acuerdo con Lehnert <sup>(3)</sup> los factores que determinan resistencia a fármacos antineoplásicos se puede clasificar en extracelulares e intracelulares. La historia de las proteínas causantes de resistencia a multifármacos inicia en 1973 con el descubrimiento de Keld Dano de las proteínas MDR <sup>(4)</sup>.

Se ha observado que aproximadamente el 20% de las Leucemias Mieloides no responden a la terapia de inducción a la remisión, y aproximadamente 40 a 60% de los casos que remiten, presentan recaída en algún momento de la evolución. La resistencia a la quimioterapia es la principal causa de esta falla al tratamiento. Generalmente se trata de resistencia a múltiples agentes, sin embargo es difícil identificar a un sólo fármaco como causa de resistencia, ya que la terapia para la leucemia mieloide es un régimen multifarmacológico <sup>(5)</sup>.

Se han diseñado múltiples técnicas *in vitro* para probar la quimiosensibilidad farmacológica en líneas celulares, una de ellas es la prueba que emplea Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), que fue desarrollada por Mosmann en 1983 <sup>(6)</sup> y se basa en la reducción metabólica del MTT a formazán, que se lleva a cabo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa,

este ensayo fue modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang <sup>(7)</sup> y ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular.

## JUSTIFICACION.

Algunos casos de LMA muestran resistencia clínica a los agentes antineoplásicos, sin embargo hasta el momento no existe ningún trabajo publicado en el que se evalué la utilidad de la prueba de MTT empleando únicamente citarabina que es una de las piedras angulares del tratamiento en la LMA, como indicador pronóstico y al correlacionarlo con la respuesta al primer ciclo de quimioterapia.

Contar con un recurso que permita evaluar la quimiosensibilidad al diagnóstico permitiría individualizar la intensidad del tratamiento desde el diagnóstico y con ello disminuir la toxicidad en los pacientes de buen pronóstico.

## HIPOTESIS

Existe una correlación positiva entre la quimiosensibilidad *in vitro* al Ara-C y la respuesta primer ciclo de quimioterapia en pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda infantil.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe correlación entre la quimiosensibilidad *in vitro* al AraC por Ensayo de MTT (4,5 dimetil tiazol-2,5 difenil bromuro de tetrazolio) con la respuesta al primer ciclo de quimioterapia.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Calcular la dosis efectiva 50 (DE50) y la Dosis efectiva 25 (DE25) de Ara C *in vitro* en células de pacientes con LMA para determinar la quimiosensibilidad *in vitro*
- 2) Correlacionar la DE50 y la DE25 con la respuesta al primer ciclo de quimioterapia

DISEÑO.

- Transversal, prospectivo

## POBLACIÓN OBJETIVO

- Pacientes pediátricos con LMA

## POBLACION ELEGIBLE

- Pacientes con reciente diagnóstico de LMA, atendidos en el Hospital Infantil de México.

## TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Dado que no existe ningún estudio previo que explore la correlación entre la quimiosensibilidad *in vitro* acerca de mecanismos de resistencia a fármacos antineoplásicos (Citarabina) en LMA, se realizó un estudio piloto y se incluyeron 5 muestras.

## VARIABLES

- Variables independientes: exposición a dosis logarítmica de AraC (0, 0.001, 0.01,0.1, 1, 10,100 y 1000 µg/mL)
- Variables dependientes:
  - Quimiosensibilidad (DE50, DE25)
  - Respuesta al primer ciclo

## CRITERIOS DE INCLUSION

- Diagnóstico definitivo de Leucemia Mieloblástica con base en criterios de la FAB, citoquímicos (mieloperoxidasa y/o sudán negro positivos) e inmunobiológicos (positividad para antígenos mieloides)
- Obtención de al menos  $2 \times 10^5$  células viables
- Haber recibido al menos un ciclo de quimioterapia posterior al diagnóstico para evaluar respuesta.
- Contar con aspirado de médula ósea apropiado para evaluar la respuesta al primer ciclo de quimioterapia.

## CRITERIOS DE EXCLUSION

- Leucemia Aguda no Linfoblástica M3

## ANALISIS ESTADISTICO.

Estadística descriptiva, empleando frecuencias simples y proporciones de las variables categóricas.



## **PREGUNTA DE INVESTIGACION**

¿Existe correlación entre la quimiosensibilidad *in vitro* al Ara C medida por la prueba de MTT, con la respuesta al primer ciclo de quimioterapia?

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En la mayoría de las neoplasias malignas la respuesta al tratamiento antineoplásico es uno de los factores pronósticos más importantes. En leucemia aguda Mieloblástica esta quimiosensibilidad es evaluada en vivo a través de la respuesta en médula ósea después de un ciclo de quimioterapia, considerándose como de mejor pronóstico a los pacientes que muestran remisión después del primer ciclo. Esta respuesta constituye un elemento para estratificar a los pacientes y adecuar la intensidad de la quimioterapia. Sin embargo, es necesario esperar 3 a 4 semanas para conocer la respuesta al tratamiento, además de que algunos pacientes fallecen por toxicidad a este primer ciclo.

## **JUSTIFICACION.**

Algunos casos de LMA muestran resistencia clínica a los agentes antineoplásicos, sin embargo hasta el momento no existe ningún trabajo publicado en el que se evalué la utilidad de la prueba de MTT empleando únicamente citarabina que es una de las piedras angulares del tratamiento en la LMA, como indicador pronóstico y al correlacionarlo con la respuesta al primer ciclo de quimioterapia.

Contar con un recurso que permita evaluar la quimiosensibilidad al diagnóstico permitiría individualizar la intensidad del tratamiento desde el diagnóstico y con ello disminuir la toxicidad en los pacientes de buen pronóstico.

## **HIPOTESIS**

Existe una correlación positiva entre la quimiosensibilidad *in vitro* al Ara-C y la respuesta primer ciclo de quimioterapia en pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda infantil.

# METODOLOGÍA

## OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe correlación entre la quimiosensibilidad *in vitro* al AraC por Ensayo de MTT (4,5 dimetil tiazol-2,5 difenil bromuro de tetrazolio) con la respuesta al primer ciclo de quimioterapia.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Calcular la dosis efectiva 50 (DE50) y la Dosis efectiva 25 (DE25) de Ara C *in vitro* en células de pacientes con LMA para determinar la quimiosensibilidad *in vitro*
- 2) Correlacionar la DE50 y la DE25 con la respuesta al primer ciclo de quimioterapia

## DISEÑO.

- Transversal, prospectivo

## POBLACIÓN OBJETIVO

- Pacientes pediátricos con LMA

## **POBLACION ELEGIBLE**

- Pacientes con reciente diagnóstico de LMA, atendidos en el Hospital Infantil de México.

## **TAMAÑO DE LA MUESTRA.**

Dado que no existe ningún estudio previo que explore la correlación entre la quimiosensibilidad *in vitro* acerca de mecanismos de resistencia a fármacos antineoplásicos (Citarabina) en LMA, se realizó un estudio piloto y se incluyeron 5 muestras.

## **VARIABLES**

- Variables independientes: exposición a dosis logarítmica de AraC (0, 0.001, 0.01,0.1, 1, 10,100 y 1000 µg/mL)
- Variables dependientes:
  - Quimiosensibilidad (DE50, DE25)
  - Respuesta al primer ciclo

## **CRITERIOS DE INCLUSION**

- Diagnóstico definitivo de Leucemia Mieloblástica con base en criterios de la FAB, citoquímicos (mieloperoxidasa y/o sudán negro positivos) e inmunobiológicos (positividad para antígenos mieloides)
- Obtención de al menos  $2 \times 10^5$  células viables
- Haber recibido al menos un ciclo de quimioterapia posterior al diagnóstico para evaluar respuesta.
- Contar con aspirado de médula ósea apropiado para evaluar la respuesta al primer ciclo de quimioterapia.

## **CRITERIOS DE EXCLUSION**

- Leucemia Aguda no Linfoblástica M3

## **ANALISIS ESTADISTICO.**

Estadística descriptiva, empleando frecuencias simples y proporciones de las variables categóricas.

## PROCEDIMIENTOS:

*Muestras:* Se extrajeron 5ml de médula ósea de pacientes con diagnóstico de LMA. Estas muestras fueron centrifugadas, y los leucocitos fueron separados mediante método de ficol, posteriormente fueron suspendidos en medio de cultivo RPMI 1240 sin rojo fenol suplementado con suero fetal de ternera al 10%, penicilina y estreptomycinina al 5%, y fluconazol al 1% (pH del medio=7.0) y se criopreservaron en DMSO al 20% a una temperatura de -70° C.

*Cuantificación celular:* El día de la prueba de quimiosensibilidad las células se descongelaron y las células viables se cuantificaron por el método de azul de tripano ®.

*Determinación de quimiosensibilidad in vitro:* Se sembraron 10 mil células por pozo en placas de 96 pozos con fondo en "U" por duplicado. Se aplicó el fármaco Citarabina (Cytosar-U® PHARMACIA & UPJOHN polvo 500mg) a diferentes concentraciones de blanco, 0.001 µg, 0.01 µg, 0.1 µg, 1.0 µg, 10 µg, 100 µg y 1000 µg en una cámara de 96 pozos y posteriormente se dejó en incubación. Tras incubación en dióxido de carbono al 5% por 48 hrs a 37°C se realizó en ensayo con MTT<sup>(34)</sup>.

*Ensayo con MTT in Vitro:* Se preparó una solución stock de 5mg/ml, disolvió el MTT en PBS y se preparó una solución de trabajo diluyendo la solución stock de MTT 1:10 en RMPMI sin rojo fenol. Se agregó a cada pozo 100 µL de MTT al 10%. Se dejó actuar por un período de 4 hrs y se centrifugaron las muestras, se aspiró el sobrenadante. La sal de tetrazolio fue reducida a formazán por las células vivas. Los cristales de formazán fueron disueltos en 100 µL de isopropanol. Se colocaron en el agitador por 20 minutos y posteriormente se realizó la lectura en el lector de ELISA a 570nm una hora después. La dosis efectiva 25 (DE25) fue calculada tras 48 hrs de exposición al Ara C.

## RESULTADOS

### *Casos Clínicos*

Se analizaron las muestras de médula ósea de cinco pacientes con diagnóstico de Leucemia Aguda Mieloblástica, cuatro de ellos no tratados previamente y uno en el momento de la recaída. Las características clínicas y de laboratorio de estos pacientes al momento del diagnóstico se encuentran resumidas en la tabla 1.

Todos los pacientes fueron tratados con el protocolo NOPHO modificado (ver anexo 3) durante 5 días. El primer ciclo de quimioterapia (ATEDox) consiste en Citarabina (200mgm<sup>2</sup> día) en infusión continua días 1 a 4, Etopósido 100mgm<sup>2</sup> día en infusión continua días 1 a 4, Doxorrubicina 75mgm<sup>2</sup> día en infusión de una hora día 5 y 6-Mercaptopurina 75mgm<sup>2</sup> día días 1 a 4.

La respuesta al primer ciclo fue evaluada en el frotis de médula ósea en el día 16 en 4 de los pacientes y en el 18 en un caso.



De los 5 pacientes incluidos 3 fueron masculinos y dos femeninos, con edades de 3 meses a 12 años, las variedades citomorfológicas fueron M1 en un caso, M2 en uno, M6 en un paciente y M4 en dos pacientes. Todos contaron con inmunofenotipo y estudio de citogenética y sólo en uno de ellos no se realizó este último.

## **Caso 1**

Femenino de 12 años de edad, la cual inició su padecimiento actual tres meses previos a su ingreso al Hospital con palidez generalizada y ataque al estado general. A la exploración física con palidez exclusivamente. Estudios de laboratorio con Hb 11g/dL Hto. 32% Leucocitos 26,800 con 43% de blastos en sangre periférica, 110,000 plaquetas. Pruebas de función renal, tiempos de coagulación, pruebas de función hepática y electrolitos séricos sin alteraciones. Únicamente presentó hiperuricemia (7.2mg%). Se realizó AMO que reportó 93.5% blastos de tipo mieloide M2 acorde a clasificación de la FAB. Los anticuerpos monoclonales mostraron positividad para CD15, CD13, CD34, CD45, CD117 y MPOx. El estudio de citogenética mostró traslocación (9;11). El AMO posterior al primer ciclo de quimioterapia reportó médula ósea con 1% blastos por lo

que se consideró en remisión.

## **Caso 2**

Femenino de 3 meses de edad, la cual fue referida de Hospital de segundo nivel con padecimiento actual caracterizado por con irritabilidad, rechazo a la vía oral, hepatoesplenomegalia de un mes de evolución como característica clínica principal. A su ingreso presenta acidosis metabólica e insuficiencia renal aguda. Los exámenes de laboratorio reportaron Hb 7.3 g/dL, Hto 21.8%, Leucocitos 33,200 y 11,000 plaquetas, Acido úrico de 10.7 BUN 26, Creatinina 0.8, resto de laboratorios (electrolitos séricos, pruebas de función hepática y tiempos de coagulación) sin alteraciones. Durante su estancia presentó lisis tumoral y requirió colocación de catéter tipo Tenckhoff para realización de diálisis peritoneal, también curso con choque séptico y paro cardiorrespiratorio que se reversionó. Se realizó AMO el cual reportó 41 % de blastos de características mieloides con morfología M6. El estudio de citogenética reportó t(4;11) y los anticuerpos monoclonales eran positivos para CD13, CD45 y MPOx 33.6%. No presentó infiltración al sistema nervioso central al momento del diagnóstico. Posterior al primer ciclo de quimioterapia se

realizó AMO que reportó 0.25% de blastos, por lo que se consideró en remisión.

### **Caso 3**

Masculino de 1 año de edad, el cual se inició padecimiento actual 2 semanas previas a su ingreso con palidez generalizada y petequias. A la exploración física con esplenomegalia de 4cm debajo de borde costal y adenopatías generalizadas, y petequias en extremidades inferiores. Los estudios de laboratorio con Hb 5.6g/dL Hto.16.3% Leucocitos 9,400 13% de blastos en sangre periférica y 5,000 plaquetas, tiempos de coagulación, pruebas de función hepática y renal sin alteraciones. Se realizó AMO el cual reportó 50% de blastos de características mieloides M1 acorde a la clasificación de la FAB. No tenía involucro a SNC. Los anticuerpos monoclonales eran positivos para CD13, CD15, y MPOx. El estudio de citogenética se reportó sin alteraciones. Posterior al primer ciclo se reportó con 1.5% de blastos en la médula ósea (en remisión).

### **Caso 4**

Masculino de 5 años de edad, el cual ingresó con padecimiento caracterizado por palidez y equimosis. No visceromegalias ni adenopatias. Los exámenes de laboratorio reportaron una Hb de 5.4g/dL Hto. 16%, Leucocitos 4,000 y 8,000 plaquetas, tiempos de coagulación, pruebas de función renal y hepática sin alteraciones. Se realizó AMO el cual reportó una LMA M4 con 85% de blastos, no se realizó estudio de citogenética y los anticuerpos monoclonales eran positivos para CD15,CD33, CD13, MPOx, CD117, se realizó la punción lumbar sin involucro a SNC. La médula ósea posterior al primer ciclo de quimioterapia se reporta hipocelular sin blastos.

## **Caso 5**

Masculino de 12 años de edad, que se diagnosticó con LMA M4e tratado con esquema MRC 10 modificado que incluyó altas dosis de Ara-C, entre otros agentes antineoplásicos, durante 6 ciclos, los cuales recibió en forma irregular. A un mes de haber concluido el tratamiento acude por palidez generalizada, los exámenes de laboratorio mostraron Hb 5.9 g/dL, Hto. 16%, leucocitos 300, plaquetas 19,000, tiempos de coagulación, pruebas de función hepática y renal sin alteraciones. En el frotis de médula ósea se

encontró 71% de blastos de características mieloides. En el análisis con anticuerpos monoclonales se encontraron CD 45, CD15, CD 13, CD79a, MPOx positivos. El cariotipo se reportó sin alteraciones. La MO después del primer ciclo de quimioterapia se reportó con 32% de blastos, la evolución de este paciente mostró un comportamiento resistente a los ciclos de quimioterapia recibidos.

De los pacientes analizados, se obtuvo respuesta al primer ciclo en 4 de 5 y no se alcanzó remisión en médula ósea en un paciente.

Tabla 1. CARACTERISTICAS CLINICAS PACIENTES

PACIENTE	EDAD	SUBTIPO	HB g/dL	HTO %	LEUCOCITOS	PLAQUETAS	INVOLUCRO SNC	CUADRO CLINICO
No. 1	12años	M2	11	32	26,800	110,000	No	Adenopatias Palidez, ataque al edo. general
No. 2	3meses	M6	7.3	21.8	33,200	11,000	No	Hepatoesple nomegalia
No. 3	1año	M1	5.6	16.3	9,400	5,000	No	Esplenomeg alia, adeno patias, palidez.
No. 4	5a	M4	5.4	16	4,000	8,000	No	Palidez equimosis
No. 5	12a	M4	5.9	16	300	19,000	No	Palidez

Hb: Hemoglobina

Hto: Hematocrito

### *Criopreservación y Cultivo*

Se obtuvieron 12 mL de médula ósea por punción de la cresta iliaca postero-superior, la muestra fue procesada para análisis citomorfológico, inmunobiológico y citogenético y el volumen restante (aproximadamente 5 mL) fue utilizado para el análisis de quimiosensibilidad.

Las células mononucleares fueron separadas mediante el método de Ficol, mezclando 3 mL del reactivo con 6 mL de médula ósea, se centrifugaron a 180 rpm durante 15 minutos, se separó la capa de mononucleares y posteriormente estas células se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1240 sin rojo fenol, suplementado con suero fetal de ternera al 10%, adicionado con penicilina y estreptomina al 5%, y fluconazol al 1% (pH del medio=7.0), posteriormente fueron criopreservadas en DMSO al 20% a una temperatura de menos 70° C

para su uso posterior. Para realizar la prueba de quimiosensibilidad, las células se descongelaron en baño María a 37° C, se lavaron con PBS y se centrifugaron dos veces para eliminar el DMSO.

Se realizó una cuenta en cámara de Neubauer empleando azul de tripano. En todos los casos se obtuvieron  $>2 \times 10^5$  células viables después de la descongelación. Se sembraron en placas de 96 pozos (Corning®), un total de 10,000 células por pozo y se expusieron durante 48 hrs a diferentes concentraciones de citarabina (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se incubaron en una cámara humidificadora con 5% de  $\text{CO}_2$ , durante 48 hrs a una temperatura de 37°C. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### *Prueba de Quimiosensibilidad in Vitro*

Después de 48 hrs, las placas fueron retiradas de la incubadora y a cada pozo se agregaron 100 $\mu\text{L}$  de una solución de MTT que contenía 5mg/mL en solución salina de MTT (Sigma®) guardado a una temperatura de -20°C y posteriormente se incubaron por 4 hrs con las mismas condiciones. Los cristales de formazán fueron disueltos con 100  $\mu\text{L}$  de alcohol NHCl-isopropilo (isopropanol) al 0.04%. La

densidad óptica correspondiente al porcentaje de células viables fue medida con un lector de Elisa con un filtro de 540nm.

Durante la realización de la prueba con las condiciones establecidas (10,000 células por pozo, dosis de 0 a 1000 ug/mL de citarabina y 48 hrs de exposición), las células de la mayoría de los pacientes mostraron un patrón variable, y sólo en un caso fue posible determinar la dosis efectiva (DE) 50, y la DE25 en los 5 casos.

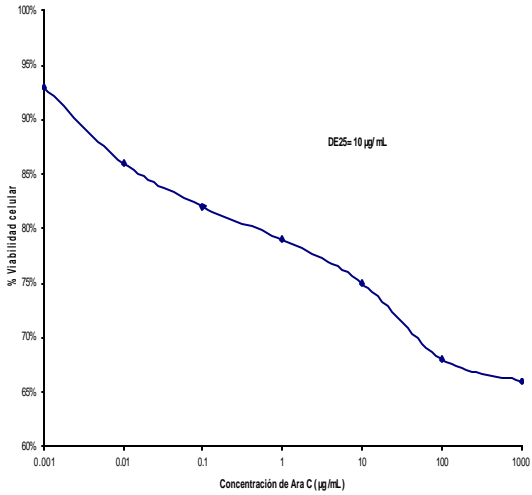
## DE25

La dosis efectiva 25 se define como la concentración de fármaco capaz de inhibir en un 25% el crecimiento celular con respecto a las células no expuestas al medicamento. Las DE25 obtenidas quedaron en el rango de 0.001 a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (0.001, 1, 10, 250 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), con una mediana de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La figura 2 muestra las curvas dosis-respuesta de los 5 casos y las DE25. El eje de las y representa la viabilidad celular expresada en porcentaje. El eje de las x representa la concentración de fármaco expresado en forma logarítmica.

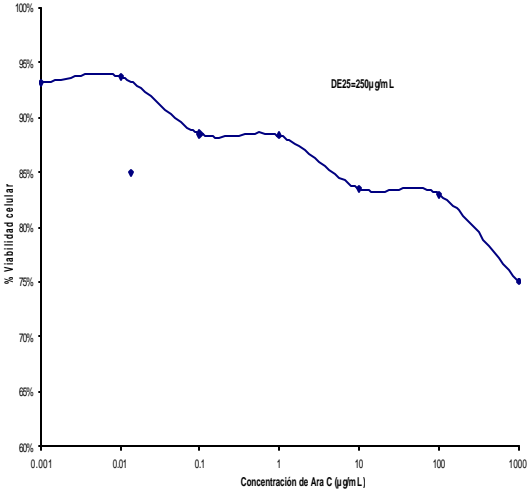


CURVAS DOSIS RESPUESTA

PACIENTE 1



PACIENTE 2



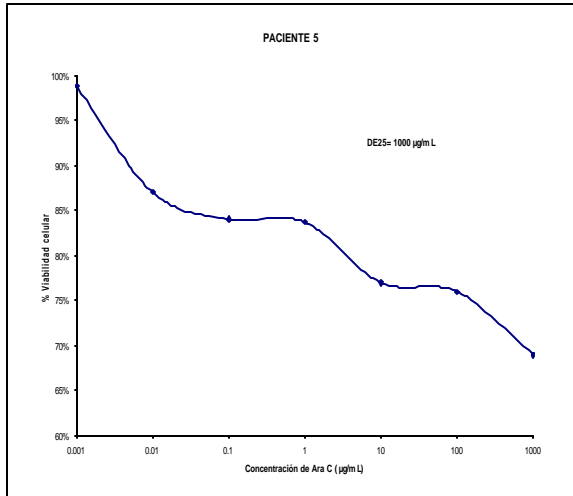
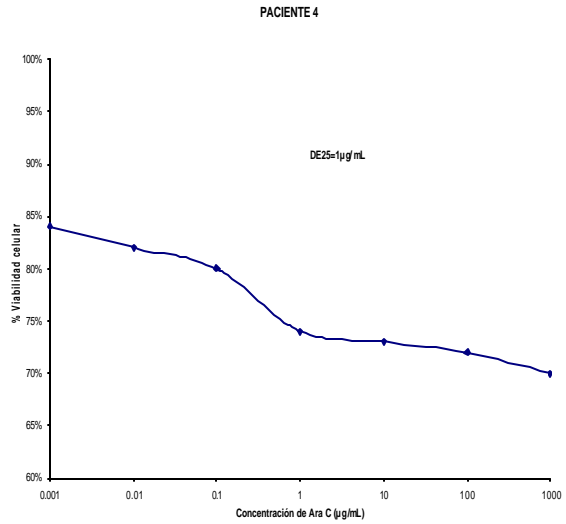
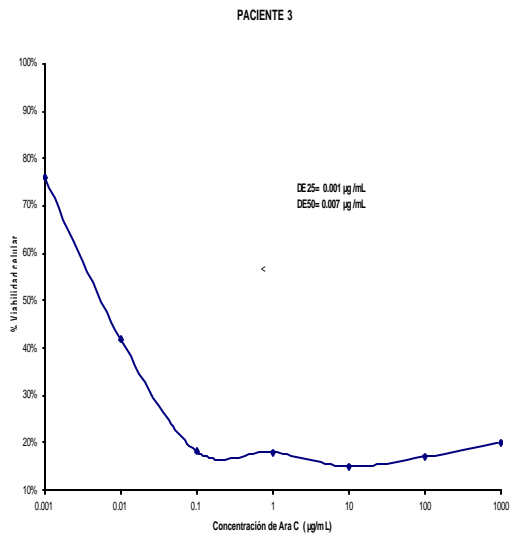


Fig.2. Tablas de curvas dosis-respuesta en 5 muestras de pacientes con LMA.

La viabilidad celular fue calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \text{Densidad óptica} \times 100 / \text{Densidad óptica de las células control}$$

Las lecturas obtenidas y el porcentaje de viabilidad celular calculado para cada uno de los pacientes se muestran las siguientes tablas.

Tabla 2. Viabilidad celular y densidad óptica en 5 pacientes con LMA.

**PACIENTE1**

Concentración Ara C	Viabilidad celular %	Densidad Optica
Blanco	100%	1.82
0.001	93%	1.7
0.01	86%	1.58
0.1	82%	1.51
1	79%	1.44
10	75%	1.37
100	68%	1.25
1000	66%	1.24

**PACIENTE 2**

Concentración Ara C	Viabilidad celular %	Densidad Optica
Blanco	100%	6.75
0.001	98.8%	6.67
0.01	87%	5.89
0.1	84%	5.68
1	83.7%	5.65
10	77%	5.24
100	76%	5.18

1000	69%	4.72
------	-----	------

### **PACIENTE.3**

Concentración Ara C	Viabilidad celular %	Densidad Optica
Blanco	100%	9.8
0.001	76%%	7.5
0.01	41.8%	4.1
0.1	18.1%	1.78
1	17.95%	1.76
10	15%	1.48
100	17%	1.69
1000	20%	2.0

### **PACIENTE 4**

Concentración Ara C	Viabilidad celular %	Densidad Optica
Blanco	100%	8.87
0.001	84%	7.47
0.01	82%	7.3
0.1	80%	7.17
1	74%	6.60
10	73%	6.52
100	72%	6.46
1000	70%	6.27

### **PACIENTE 5**

Concentración Ara C	Viabilidad celular %	Densidad Optica
Blanco	100%	5.57
0.001	93.2%	4.93
0.01	93.7%	5.25
0.1	88.48%	5.16
1	88.33%	5.06
10	88.52%	4.79
100	83%	4.55
1000	75%	4.43

### *Respuesta al primer ciclo de quimioterapia*

En todos los casos a excepción del paciente 5 se obtuvo adecuada respuesta posterior al primer ciclo de quimioterapia. Es decir en el AMO del día 16 se reportó con menos del 5% de blastos.

Tabla 3. RESPUESTA AL PRIMER CICLO DE QUIMIOTERAPIA

PACIENTE	% DE BLASTOS AL DIAGNOSTICO	% DE BLASTOS POSTERIOR A PRIMER CICLO DE QT
1	71%	32%
2	41%	0.25%
3	50%	1.5%
4	85%	1%
5	93.5%	1%

## *Correlación entre quimiosensibilidad in vitro y respuesta al primer ciclo*

En todos los casos se calculó la DE25 en las células leucémica obtenidas antes del primer ciclo de quimioterapia y la respuesta a este ciclo fue evaluada el día 16 de iniciado el primer ciclo.

## DISCUSION

La Leucemia Aguda Mieloblástica constituye un reto terapéutico ya que se trata de una neoplasia con un alta tasa de mortalidad y que se caracteriza por ser altamente resistente a la quimioterapia.

El objetivo final del tratamiento antineoplásico es erradicar la enfermedad con la menor toxicidad concomitante. El desarrollo de resistencia a los agentes antineoplásicos constituye uno de los factores más importantes de falla al tratamiento.

Aunque se han reportado varios mecanismos de resistencia, son pocos los trabajos que incorporan esta información a la práctica clínica. El objetivo de este trabajo fue explorar la utilidad potencial de una prueba de quimiosensibilidad *in vitro* como un elemento útil al diagnóstico para predecir respuesta a tratamiento y en el futuro incluirlo como factor pronóstico que contribuya a individualizar el tratamiento.

Hay algunos trabajos publicados que han empleado la prueba de MTT para identificar patrones de quimiosensibilidad a fármacos

específicos y que han intentado correlacionar esta respuesta in Vitro con el comportamiento clínico, la mayoría de ellos en Leucemias Agudas Linfoblásticas. Kaspers G <sup>(33)</sup> (Dutch Childhood Leukemia study Group) concluyó en sus estudios que el ensayo de MTT provee información valiosa para predecir el pronóstico a largo plazo.

El conocer la quimiosensibilidad de las células tumorales a los diferentes fármacos antineoplásicos proporcionan una herramienta poderosa para poder individualizar el tratamiento en los pacientes con Leucemia Aguda mieloblástica. A medida que se conoce más información acerca de los mecanismos de resistencia en pacientes con LMA es más fácil entender la biología y el comportamiento de esta enfermedad.

Este trabajo se planeo como un estudio piloto y debido al reducido número de pacientes no es posible establecer conclusiones definitivas en cuanto a la utilidad de la prueba para predecir respuesta, sin embargo los resultados obtenidos muestran información de interés como el haber encontrado una DE muy alta (1000 µg/mL) en el paciente que portaba una LAM refractaria y una DE muy baja (0.001 µg/mL) en uno de los pacientes que



respondieron después de un ciclo de quimioterapia. Tres pacientes que también respondieron presentaron valores diversos de DE25. Lo anterior plantea nuevas preguntas para investigaciones futuras, será importante conocer el punto de corte para la DE25 (o DE50) que defina pacientes con buen y mal pronóstico, también conocer en el seguimiento a largo plazo si existe correlación entre una DE25 alta y falla a tratamiento a pesar de haber obtenido buena respuesta al primer ciclo como podría ser el caso de la paciente 2, quien tuvo una DE25 de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a pesar de haber remitido después de un ciclo; en este caso será interesante dar seguimiento al comportamiento clínico, ya que esta paciente, fuera de subtipo morfológico, no cumple con criterios de alto riesgo en LAM, sin embargo debutó con lisis tumoral que probablemente sea reflejo de una elevada tasa de replicación de las células leucémicas, por otra parte haber otros factores que hayan favorecido la remisión como son el evento de sepsis previo al inicio del tratamiento en donde puede haber mayor producción de citocinas, incluyendo factor de necrosis tumoral.

Otro aspecto interesante de este trabajo es haber definido condiciones de criopreservación para estas células en congelación sin utilizar nitrógeno líquido, conservando una viabilidad celular que

permitió la realización de la prueba.

De igual manera, en este trabajo fue posible estandarizar condiciones de cultivo y de exposición al fármaco empleado para obtener resultados de quimiosensibilidad en pacientes con Leucemia Aguda Mieloblástica generando una potencial herramienta diagnóstica y posiblemente pronóstica fácil de realizar en un tiempo corto y a un bajo costo. A futuro habrá que considerar el mejoramiento de las condiciones de cultivo, y es probable que el agregar insulina, transferrina y selenio, como ha sido previamente reportado <sup>(31)</sup> permita obtener mayor viabilidad celular para esta y otras pruebas.

La terapia para los pacientes con LMA es un reto y es importante individualizar la dosis en los pacientes, con el fin de dar una dosis óptima y disminuir toxicidad. Este trabajo cumplió con la finalidad de estandarizar la técnica para poder realizar el ensayo de MTT para probar quimiosensibilidad a la Citarabina. Es importante ampliar la muestra a un número significativo la finalidad de incrementar la validez, así como probar otras condiciones como el tiempo de exposición al fármaco con la finalidad de exponer y obtener mayor información en cuanto a dosis efectiva 50 y 75.

Estos resultados no parecen reflejar una correlación entre la

sensibilidad in vitro y la respuesta al primer ciclo, ya que tenemos resultados variables y las diferencias en las quimiosensibilidades en estos 4 casos parecen ser reflejo de quimioresistencia y quimiosensibilidad intrínseca de los blastos, sólo el seguimiento a largo plazo permitirá conocer el verdadero valor de esta prueba al diagnóstico.



## CONCLUSIONES

- 1- La prueba de MTT para evaluar quimiosensibilidad en pacientes con Leucemia Aguda Mieloblástica puede ser un método factible y útil para identificar pacientes de mayor riesgo de falla al tratamiento.
- 2- La criopreservación por congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  en DMSO es apropiada para conservar viabilidad en células de leucemia mieloide aguda y permite reexpandirlas en cultivo.
- 3- Las condiciones de cultivo establecidas en este estudio para la prueba de MTT fueron adecuadas para obtener un valor de dosis efectiva 25 que a su vez tuvo relación en la mayoría de los casos con la respuesta al primer ciclo.
- 4- Es necesario incrementar el tamaño de la muestra para poder establecer una correlación entre quimiosensibilidad *in Vitro* y respondedores y no respondedores al primer ciclo.
- 5- A futuro será importante conocer el comportamiento clínico y la supervivencia a largo plazo de estos pacientes para identificar el verdadero valor pronóstico de la prueba.



# ANEXOS

## ANEXO 1 PROTOCOLO NOPHO-AML 84,88,93

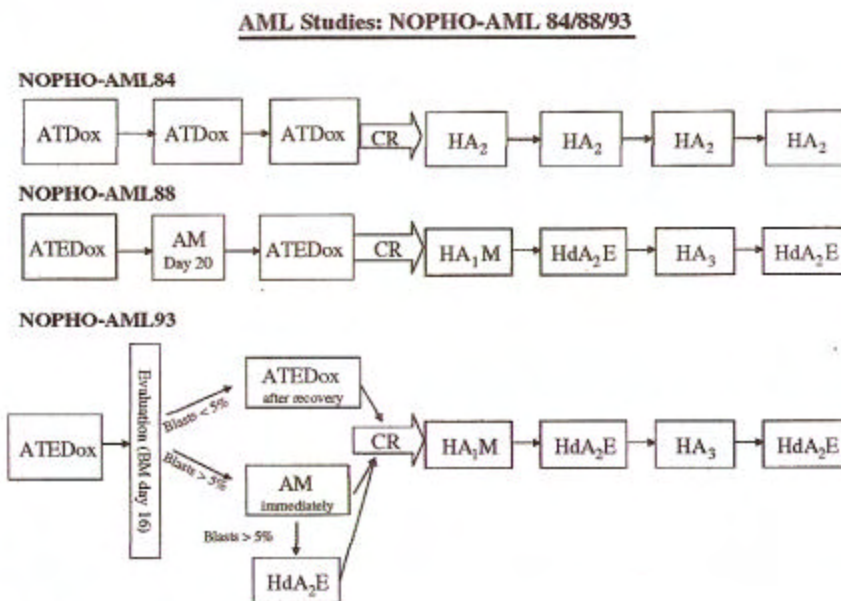


Figure 1 Flow diagram of studies NOPHO-AML 84/88/93.

ATEDox :

Ara C 200mg<sup>2</sup>dia en infusión continua del día 1 al 4.  
Etopósido 100mg<sup>2</sup>dia en infusión continua del día 1 al 4.  
Tioguanina 100mg<sup>2</sup>do cada 12 hrs del día 1 al 4  
Doxorrubicina 75mg<sup>2</sup>dia día 5

ATEDox modificado HIM: Puesto que no hay Tioguanina en México, se cambia este medicamento por 6-Mercaptopurina a dosis de 75mg<sup>2</sup>dia del día 1 al día 4. La evaluación posterior a este ciclo se realiza el día 16 con un AMO y acorde al número de blastos se indica siguiente ciclo de quimioterapia.

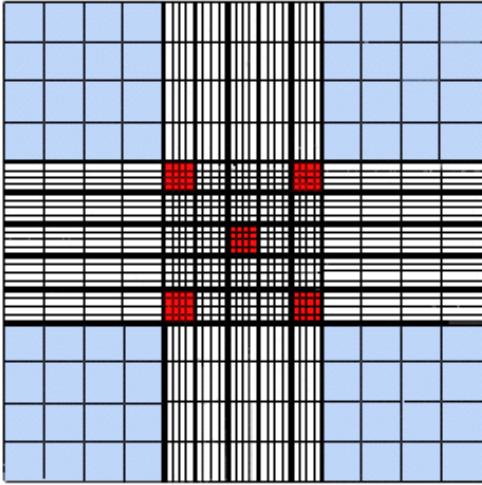
## ANEXO 2

### CAMARA DE NEUBAUER (HEMACITOMETRO)





■ areas en donde se cuentan glóbulos blancos



■ areas en donde se cuentan eritrocitos

## REFERENCIAS

- 1.- Jiménez Bonilla R. Historia e Investigación de la Leucemia. Rev. Biol. Trop. Volumen.52 Núm.3 San José Septiembre 2004. p. 559-569.
- 2.- Skipper HE, Simpson-Herren L. Relationship between stem cell heterogeneity and responsiveness to chemotherapy. Important advances in Oncology 1985. Editado por DeVita, S.Hellman, SA Rosenberg. JB Lippincot Company, Philadelphia 1985: 63-77.
- 3.- Chu E. DeVita VT. Principles of Cancer Management: Chemotherapy Cancer, Principles and Practice of Oncology. Editado por DeVita, S.Hellman, SA Rosenberg. JB Lippincot Company, Philadelphia 2001: 289-386.
- 4.- Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascitis tumor cells. Biochim. Biophys Acta 1973;323: 466-483.
- 5.-Kyung Ran Jun. Relationship between In Vitro Chemosensitivity assessed with MTT Assay and Clinical Outcomes in 103 Patients with Acute Leukemia. Korean J Lab Med 2007; 27:89-95.

6.- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 1983; 65: 55–63.

7.- Denizot F., Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 1986; 89: 271–277.

8.- Vardiman James. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 1 October 2002. Volume 100 Number 7 Pàg 2292-2300.

9.- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al.: Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO) *Br J Haematol* 78 (3): 325-9, 1991.

10.- Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, et al.: A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia* 17 (2): 277-82, 2003.

11.- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al.: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103 (4): 620-5, 1985

12.- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al.: Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103 (3): 460-2, 1985

13- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD: The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100 (7): 2292-302, 2002.

14.- Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al.: The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92 (7): 2322-33, 1998.

15.- Vardiman J. The World Health Organization classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 1 October 2002. Volume 100, No.7 Pág. 2292-2300.

- 16.- Kuerbitz SJ, Civin CI, Krischer JP, et al.: Expression of myeloid-associated and lymphoid-associated cell-surface antigens in acute myeloid leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 10 (9): 1419-29, 1992.
- 17.- C H Pui .Prognostic factors in infants with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2000 (14). Pags 684-687.
- 18.- Rubnitz J. Prognostic factors and outcome of recurrence in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer* January 1,2007. Volume 109 No. 1 Pg: 157-163.
- 19.- Stevens RF, Hann IM, Wheatley K, et al.: Marked improvements in outcome with chemotherapy alone in paediatric acute myeloid leukemia: results of the United Kingdom Medical Research Council's 10th AML trial. MRC Childhood Leukaemia Working Party. *Br J Haematol* 101 (1): 130-40, 1998.
- 20.-Creutzig U, Ritter J, Zimmermann M, et al.: Improved treatment results in high-risk pediatric acute myeloid leukemia patients after intensification with high-dose cytarabine and mitoxantrone: results of Study Acute

Myeloid Leukemia-Berlin-Frankfurt-Münster 93. J Clin Oncol 19 (10): 2705-13, 2001

21.- Woods WG, Kobrinsky N, Buckley JD, et al.: Timed-sequential induction therapy improves postremission outcome in acute myeloid leukemia: a report from the Children's Cancer Group. Blood 87 (12): 4979-89, 1996

22. Rivera L. Principios Generales de Hemato-Oncología Pediátrica 2006. ETM Pag. 129-156.

23.- Pizzo P, Poplack D. Principios y Práctica de Oncología Pediátrica. 5ª Edición. Editorial Lippincott Williams y Wilkins. Páginas: 290-365

24.- Hubeek I. In Vitro sensitivity and cross resistance to deoxynucleoside analogs in childhood acute leukemia. Acute Myeloid Leukemia Research Paper. Haematologica 2006; 91 Pag 17-23.

25.- Marie JP. Multidrug resistance (MDRL) gene expresión in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and in Vitro drug sensitivity. Blood 1991;78:586-592.

- 26.- Maria M. Ho. MDR1 and BCRP1 expression in leukemic progenitors correlates with chemotherapy response in acute myeloid leukaemia. *Experimental Hematology* 36 (2008) Pág 433-442.
- 27.- Gil-Salù y cols. Neurocirugía. 2008; 12:5-11 Ensayo de Quimiosensibilidad en cultivos de tumores cerebrales.
- 28.- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application for proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*.1983 ;65: 55-63.
- 29.- Denizot F. Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improve sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 1986; 89:271-277.
- 30.- Bird MC. Long term comparison of results of an in vitro drug sensitivity assay with a patient response in lymphatic neoplasms. *Cancer* 61: 1104, 1988.
- 31.- Pieters R. Comparison of the rapid automated MTT-assay with a a dye exclusion assay for the chemosensitivity testing in childhood leukaemia. *Br. J. Cancer* 59: 217, 1989.

- 32.- Pieters R. Relation of cellular drug resistance to long-term clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 338:399, 1991.
- 33.- Teruaki Hongo. In Vitro Drug Sensitivity testing can predict induction failure and early relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. [www.bloodjournal.org](http://www.bloodjournal.org) June 18, 2008. Pag 2959-2965.
- 34.- Pieters R. In Vitro Drug Sensitivity of Cells from children with leucemia using the MTT Assay with Improved Culture Conditions. [www.bloodjournal.org](http://www.bloodjournal.org) Julio 18, 2008.
- 35.- Lie SO, Abrahamsson J. Long-Term in children with AML : NOPHO-AML Study Group Report of three consecutive trials. *Leukemia* 2005 (19); 2090-2100.