



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O.D.
DR. EDUARDO LICEAGA

ASOCIACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ABCB1 AL MOMENTO DEL
DIAGNÓSTICO SOBRE LA RESPUESTA TEMPRANA EN PACIENTES CON
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA DE NOVO

TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
HEMATOLOGIA

PRESENTA:
DRA. JOHANNA ELIZABETH PAREDES SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. IRMA OLARTE CARRILLO
DR. CHRISTIAN RAMOS PEÑAFIEL

CO DIRECTOR DE TESIS:
DR. ADOLFO MARTINEZ TOVAR

CIUDAD DE MEXICO, 2017



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 ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O.D.
DR. EDUARDO LICEAGA

ASOCIACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ABCB1 AL MOMENTO DEL
DIAGNÓSTICO SOBRE LA RESPUESTA TEMPRANA EN PACIENTES CON
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA DE NOVO

TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
HEMATOLOGÍA

PRESENTA:
DRA. JOHANNA ELIZABETH PAREDES SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. IRMA OLARTE CARRILLO
DR. CHRISTIAN RAMOS PEÑAFIEL

CO DIRECTOR DE TESIS:
DR. ADOLFO MARTINEZ TOVAR

CIUDAD DE MEXICO, 2017

Dr. Lino E. Cardiel Marmolejo

Director de Educación y Capacitación en Salud
Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”

Dr. Juan Collazo Jaloma

Jefe del Servicio de Hematología
Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”

Dr. Christian Omar Ramos Peñafiel

Profesor Titular de Posgrado de la Especialidad de Hematología
Jefe del área clínica del Servicio de Hematología
Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”

Dra. Irma Olarte Carrillo

Investigadora en Ciencias Medicas
Laboratorio de Biología Molecular 204

Dr. Adolfo Martínez Tovar

Doctorado en Genética y Biología Molecular
Laboratorio de Biología Molecular 204

Dra. Johanna Elizabeth Paredes Sánchez

Residente de Hematología
Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”

TABLA DE CONTENIDOS

CONTENIDO

<u>AGRADECIMIENTOS</u>	I
AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL	III
<u>RESUMEN ESTRUCTURADO</u>	1
<u>INTRODUCCIÓN</u>	2
1. MARCO TEÓRICO	2
1.1 ANTECEDENTES	2
1.2 EPIDEMIOLOGÍA.	5
1.3 FACTORES PRONÓSTICOS	5
1.4 CRITERIOS DE RESPUESTA EN LEUCEMIA AGUDA MIELOIDE	7
1.4.1 CRITERIOS DE RESPUESTA	8
1.5 OPCIONES DE TRATAMIENTO	8
1.5.1 TERAPIA DE INDUCCIÓN DE ALTA INTENSIDAD	9
1.5.2 TERAPIA DE BAJA INTENSIDAD.	9
1.6 GEN ABCB1 RESISTENCIA A DROGAS	10
1.6.1 GENERALIDADES	10
1.6.2 CARACTERÍSTICA DE LOS GENES DE RESISTENCIA A MULTIDROGAS.....	10
<u>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	12
<u>3. JUSTIFICACIÓN</u>	13
<u>4. HIPÓTESIS</u>	13
<u>5. OBJETIVOS</u>	13
5.1 OBJETIVO PRIMARIO	13
5.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS	13
<u>6. METODOLOGÍA</u>	14
6.1 TIPO Y DISEÑO DEL ESTUDIO	14
6.2 POBLACIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA	14
6.2.1 TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	14

6.3 CRITERIOS	14
6.3.1. INCLUSIÓN.....	14
6.3.2 EXCLUSIÓN.....	15
6.3.3 ELIMINACIÓN.....	15
6.4 . DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES A EVALUAR Y FORMA DE MEDIRLAS.....	15
<u>7. PROCEDIMIENTO</u>	16
7.1 TOMA DE MUESTRAS.....	16
7.2 LÍNEA CELULAR (CONTROL POSITIVO).....	16
7.3 SEPARACIÓN DE LEUCOCITOS TOTALES.....	16
7.4 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE LEUCOCITOS Y LÍNEA CELULAR.....	16
7.5 DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD Y CUANTIFICACIÓN DEL RNA.....	17
7.6 SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO (CDNA).....	17
7.7 qRT-PCR PARA EL GEN DE RESISTENCIA A DROGAS ABC-B1.....	17
<u>8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.</u>	18
<u>9. RESULTADOS</u>	18
9.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.....	18
9.2 EXPRESIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA ABCB1 Y SU ASOCIACIÓN CON LAS VARIABLES CLÍNICAS.....	20
9.3 EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO Y FALLA TERAPÉUTICA.....	22
9.3.1 RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN PACIENTES CON SOBREENPRESIÓN DE ABCB1.....	22
9.3.2 IMPACTO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS EN PACIENTES MENORES DE 55 AÑOS.....	23
9.3.3 IMPACTO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS EN PACIENTES MAYORES DE 55 AÑOS.....	24
<u>10. DISCUSIÓN</u>	25
<u>11. BIBLIOGRAFÍA</u>	30

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a la División de estudios de Posgrado, UNAM, por permitirme ser parte de su prestigiosa Institución y acompañarme durante estos 4 años en mi formación como profesional.

De igual manera agradecer al Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga, el cual me abrió las puertas en el 2014, y se convirtió en mi segunda casa durante estos años, Institución donde he crecido como profesional y como persona, a todos sus pacientes y familiares que son el pilar fundamental para nuestra formación académica.

Al Servicio de Hematología Unidad 111D, al Área de hospitalización, al Laboratorio 204 de Hematología Especializada, en especial al personal de Biología Molecular, son un pilar fundamental para nuestros proyectos de investigación.

A la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, en conjunto con el proyecto de Subsecretaría de Fortalecimiento del Conocimiento y Becas consciente del constante crecimiento de ecuatorianos, me brindaron la oportunidad de acceder a estudios de cuarto nivel en universidades de prestigio académico internacional, financiado mis educación a través de una beca del Gobierno Nacional Ecuatoriano.

Este trabajo fue apoyado por la Dirección de Investigación del Hospital General de México con los números de registro DIC/08/204/04/017, DI/16/103/3/035

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mis padres Julio y Miriam, quienes han sido y serán mi ejemplo de superación, quienes desde mis primeros recuerdos supieron inculcar valores que me han permitido llegar a cumplir mis metas. Ellos son el motor que me impulsa a continuar. A mis morenas hermanas del alma Caro y Kika que me acompañaron y siempre me impulsan a seguir adelante y convertirme en alguien mejor.

A Christian Aguilar quien a la distancia supo ser el apoyo necesario para esta travesía en tierras mexicanas.

A mis maestros, Dr. Humberto Castellanos Sinco, Dr. Christian Ramos, Dra. Guadalupe León, Dr. Efreem Montaña, Dr. Juan Julio Kassak, Dra. Emma Gallardo, Dr. Juan Collazo, Dra. Etta Rozen, Dr. Adolfo Martínez, quienes con su esfuerzo y dedicación, compartieron sus conocimientos, se convirtieron en nuestra familia, y fueron personas que forman parte de una de las etapas más importantes de nuestra vida profesional.

A la Dra. Irma Olarte Tutor Principal, quien supo conducirnos desde un inicio a la Metodología de la Investigación, siendo nuestra guía y soporte, por su tiempo, paciencia y dedicación.

Al team 204 Anel, Iveth, Rafa, Adrián, quienes nos ayudaron a entender un poco del mundo molecular y por su puesto su amistad.

A pequeña Regina que junto a su padrino ayudo con los análisis y cálculo del OR. Seguro en un futuro lograra ser una pequeña Nish.

A mis amigas de generación, Angie, Mapau, Etsel. Juntas salimos adelante y logramos una meta más. Por su apoyo incondicional, por escuchar, por tolerar, compartir, son y siempre serán una parte importante de mi vida.

RESUMEN ESTRUCTURADO

Antecedentes: Se conoce que la expresión de ABCB1 en el diagnóstico de la leucemia aguda, es un factor pronóstico adverso, sin embargo existen pocos estudios en leucemia aguda mieloide, de nuestra población.

Objetivo: Evaluar la expresión de los ABCB1 como falla terapéutica en la respuesta al tratamiento en los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda de Novo.

Metodología: Tipo y diseño del estudio. Estudio experimental, prospectivo, longitudinal, y analítico. Periodo abril del 2016 a marzo del 2017. Sitio: Hospital General de México. Sujeto: Se incluyeron pacientes mayores de 14 años que cumplieron con los criterios de inclusión, exclusión, eliminación. Se realizó la determinación de la presencia o ausencia de la expresión de ABCB1, por técnica de qRT-PCR para el gen de resistencia a drogas ABC-B1 en los pacientes de reciente diagnóstico de leucemia mieloide aguda.

Resultados: Los resultados de la expresión de ABC-B1, se analizaron con estadística descriptiva, con las pruebas estadísticas χ^2 cuadrada, T de Student, $p < 0.05$ con un IC 95%. Se estudiaron un total de 52 pacientes con diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda de *novo*, en su mayoría correspondieron al género femenino ($n=31$, 59.6%) y el restante al género masculino ($n=21$, 40.4%). La media de edad fue de 44 años. La parte principal del tratamiento se basó en el esquema 7+3. La edad por encima de los 55 años como la sobre expresión del gen de resistencia ABCB1 impactaron sobre la respuesta (RC + RP) durante el primer mes de tratamiento. La expresión elevada al momento del diagnóstico se asoció con una mayor falla terapéutica y con el mayor OR dentro del subgrupo por encima de los 55 años (OR 5.00, 0.555-45.39).

Conclusión: En conclusión la expresión de ABCB1 en pacientes de reciente diagnóstico de leucemia aguda mieloide es un factor que se asocia a una mayor falla terapéutica.

Palabras claves: Leucemia, ABCB1, Quimioterapia, Genes de multiresistencia a Drogas

INTRODUCCIÓN

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES

La Leucemia Mieloide Aguda (LMA) es una neoplasia la cual acorde a la Organización Mundial de la Salud (OMS) se encuentra englobada dentro de las neoplasias mieloides. La clasificación de la OMS 2016 se describe en la tabla 1, divide a la LAM en 6 grupos generales: 1) LAM con anomalías genéticas características, 2) LAM con cambios relacionados a mielodisplasia, 3) Neoplasias mieloides asociadas al tratamiento 4) LAM (NOS) - no categorizada, 5) Sarcoma Mieloide, 6) Síndromes mieloproliferativos relacionados a Síndrome de Down. Mediante la colaboración desarrollada por la asociación Franco Américo Británica (FAB),⁽¹⁾ en 1976 se desarrolló la primera clasificación morfológica de las leucemias mieloides agudas, la cual se describe en la Tabla 2. Esta última menciona dentro de la nueva clasificación de la OMS 2016 se incluyen dentro del grupo de LAM no categorizadas.^(2,5) La definición de sus entidades está dada.⁽³⁾ Los procedimientos diagnósticos para clasificar a la Leucemia Mieloide Aguda, se basan en la evaluación morfológica de la médula ósea y sangre periférica, análisis de la expresión de la superficie celular o marcadores citoplasmáticos por citometría de flujo, la identificación de hallazgos cromosómicos por medio de citogenética convencional, y determinación de lesiones genéticas en las que encontramos mutaciones en los reguladores epigenéticos (DNMT3A, ASXL1, TET2), mutaciones en FLT 3.^(3,4,5) El pronóstico de los pacientes ha mejorado drásticamente gracias a los avances en el entendimiento de la biología molecular y la detección de diversos blancos moleculares principalmente inhibidores de mutación FLT-3, los cuales han modificado la supervivencia libre de enfermedad.⁽⁴⁻⁵⁾

El tratamiento de la Leucemia Mieloide Aguda consiste actualmente en la esquema clásico 7+3 el usado desde 1973⁴ sin poder ser remplazado hasta la actualidad. Se encuentra en desarrollo múltiples blancos terapéuticos como inhibidores de la cinasa de proteínas, moduladores epigenéticos, anticuerpos monoclonales, inmunoterapia con los cuales se busca alcanzar una mayor sobrevida global en estos pacientes.⁴ Posterior al inicio de la terapia existen criterios de respuesta en la LAM, que se dividen en diferentes categorías que son de utilidad para diferentes estudios clínicos, estos corresponden a remisión completa (CR), remisión completa con recuperación hematológica incompleta (CRi), remisión parcial (RP), enfermedad primaria refractaria, muerte en aplasia, muerte de causa no determinada, cada una de estas con su respectiva definición.⁽⁵⁾

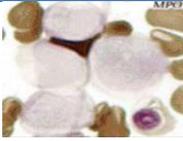
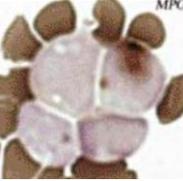
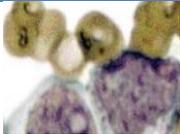
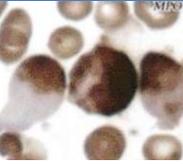
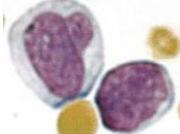
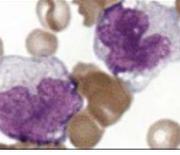
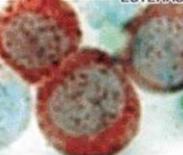
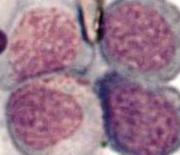
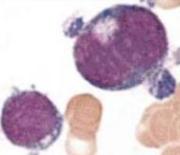
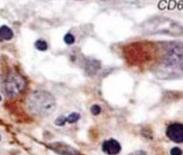


Como terapia de consolidación se utilizan esquemas de combinación de quimioterapéuticos en dosis altas o en caso de contar con un donador HLA-compatible según su riesgo inicial ser sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos. ⁽⁵⁻⁶⁾

Tabla 1. Clasificación de la OMS 2016 de las neoplasias mieloides y clasificación de la leucemia aguda

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA(LAM) Y NEOPLASIAS RELACIONADAS ⁵
LAM con anomalías genéticas características
LAM con t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1
LAM con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11
LAP con PML-RARA
LAM con t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A
LAM con t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214
LAM con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
LAM (megarioblastica) con t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1
Entidad provisional : LAM con BCR-ABL1
LAM con NPM1 mutado
LAM con mutaciones bialelicas de CEBPA
Entidad provisional: LAM con RUNX1 mutado
LAM con cambios relacionados a la mielodisplasia
Neoplasias mieloides asociadas a tratamiento
LAM , NOS no categorizada
LAM con mínima diferenciación
LAM sin maduración
LAM con maduración
Leucemia aguda mielomonocítica
Leucemia aguda monoblastica/monocítica
Leucemia eritroide pura
Leucemia aguda megacariocítica
Panmielosis aguda con mielofibrosis
Sarcoma mioide
Síndromes mieloproliferativos relacionados con Síndrome de Down
Leucemia aguda mioide con Síndrome de Down
Mielopoyesis anormal transitoria

Tabla 2. Clasificación de la Leucemia mieloide aguda según la FAB¹

Variante	Definición	Morfología	Citoquímica
M0	Leucemia mieloblástica aguda indiferenciada		
M1	Leucemia mieloblástica aguda con maduración mínima		
M2	Leucemia mieloblástica aguda con maduración		
M3	Leucemia promielocítica aguda		
M4 M4 eos	Leucemia mielomonocítica aguda aguda con eosinofilia		
M5	Leucemia monocítica aguda		
M6	Leucemia eritroide aguda		
M7	Leucemia megacarioblástica aguda		

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia acumulada ajustada a la edad en los Estados Unidos es de 1 por cada 100,000 personas con picos entre los 2 a 5 años y un segundo pico por encima de los 50 años.⁽⁹⁾ En México, acorde al registro mundial de Cáncer (Globocan, 2012) la incidencia acumulada de leucemia es de 6 casos por 100,000 personas, con una tasa de mortalidad de 5.9/100,000 personas.⁽⁹⁾ En el Hospital General de México, un centro de referencia para la atención de Leucemias Agudas establecido en el Distrito Federal se evaluaron la frecuencia de leucemias agudas en dos periodos de tiempo con 16 años de diferencia, con 250 nuevos casos siendo la leucemia mieloide aguda la variante menos frecuente con 95 casos correspondiente al 38% versus 155 casos de leucemia linfoide aguda con el 62% .⁽¹⁰⁾

1.3 FACTORES PRONÓSTICOS

En cuanto a los factores pronósticos que nos ayudan a determinar la supervivencia global, la enfermedad libre de progresión, existen factores previos y posterior al tratamiento. Estudios recientes han demostrado el aporte de estos factores para predecir enfermedad libre de progresión (EFS), y la supervivencia global(OS).^(5,13,14)

1.3.1 FACTORES PRE-TRATAMIENTO

1.3.1.1 RELACIONADOS CON EL PACIENTE

- **Edad:** presentar el diagnóstico a una edad avanzada ha demostrado ser un factor independiente asociado a mal pronóstico.^(5,13,14,23,24) Al igual manera el estado funcional del paciente, y comorbilidades que se puedan presentar al diagnóstico pueden modular el efecto de la edad en la tolerancia a la quimioterapia, por lo que por lo general a este grupo de pacientes se individualiza y la gran mayoría recibe tratamiento con regímenes de baja intensidad.⁽⁵⁾
- **Leucemia secundaria:** contar con diagnóstico previo de patologías como síndrome mielodisplásico, neoplasias mieloproliferativas, leucemia mielomonocítica crónica, exposición previa a sustancias citotóxicas, son factores que deben considerarse para la elección del esquema de tratamiento a iniciarse.⁵

1.3.1.2 FACTORES GENÉTICOS

Existen anomalías genéticas que representan fuertes factores pronósticos que han dado paso para que la clasificación del riesgo en las leucemias agudas mieloides se realice en base a estas pudiendo catalogarse en tres grupos que son: favorable, intermedio, adverso.^{6,7,8} Los cuales se describen en la Tabla 3.



Tabla 3. Estratificación de riesgo por genética. European LeukemiaNet (ENL) 2017 ⁽⁵⁾

Riesgo	Anormalidad genética
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 NPM1 mutado sin FLT3-ITD o con FLT3-ITD ^{bajo} CEBPA con mutación bialélica
Intermedio	NPM1 mutado con FLT3-ITD ^{alto} Wild-type NPM1 sin FLT3-ITD o con FLT3-ITD ^{bajo} (sin alteraciones genéticas adversas) t(9;11) (p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A Anormalidades citogenéticas no clasificables como favorable o adverso
Adverso	(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214 t(v;11q23.3); rearreglo KMT2A t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM(EVI1) 5 o del(5q); -7; -17/abn(17p) Cariotipo complejo Wild-type NPM1 a FLT3-ITD ^{alto} RUNX1Mutado ASXL1Mutado TP53

Se reconocen otros reajustes equilibrados raros.⁽⁵⁾ Aunque se consideran eventos iniciadores de la enfermedad, pero no definen formalmente categorías de enfermedades. Estos implican genes, por ejemplo, que codifican reguladores epigenéticos (por ejemplo, KMT2A [MLL], CREBBP, NSD1) o componentes del complejo de poros nucleares (NUP98, NUP214). Algunos reordenamientos son citogenéticamente crípticos, como t(5; 11) (q35.2; p15.4); NUP98-NSD1, que ocurre en el 1% de la LMA en adultos más jóvenes y predice un mal pronóstico.^(5,23,24) Estudios recientes han puesto de relieve el potencial de las nuevas tecnologías de secuenciación para descubrir otros genes asociados a la LMA.⁽⁵⁾ La prevalencias de las distintas mutaciones se presentan en la Figura 1.

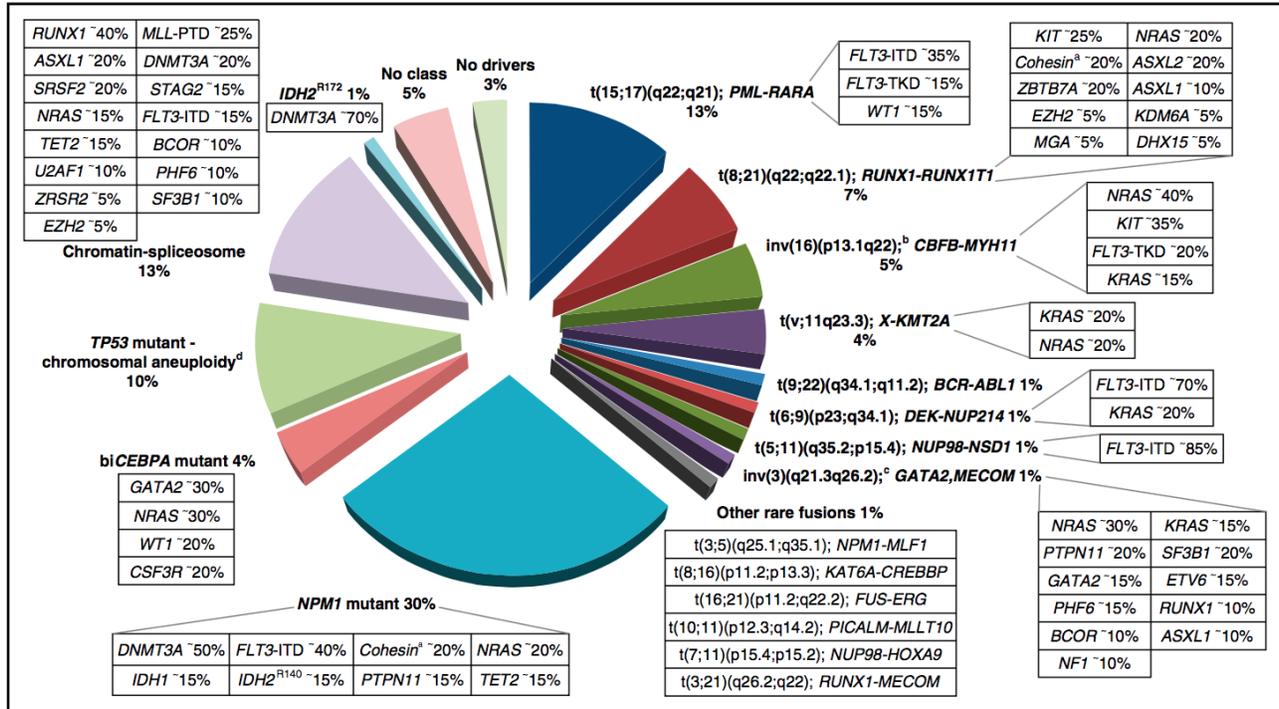


Figura 1. Clases moleculares de LAM y mutaciones de genes concurrentes en pacientes adultos hasta la edad de ~65 años. Tomado de (5)

1.3.2 FACTORES POSTERIOR AL TRATAMIENTO

1.3.2.1 MONITORIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL (EMR):

Dos métodos pueden ser utilizados en su detección como son la citometría de flujo y PCR en tiempo real cuantitativo. EMR puede realizarse al término de la terapia de inducción, de los ciclos de consolidación, para valorar estatus de remisión, además de detectar la inminente recaída morfológica. El estado de remisión evaluado por la EMR proporciona un predictor más fiable de los resultados que la evaluación convencional basada en la morfología.⁵⁻³⁸

1.4 CRITERIOS DE RESPUESTA EN LEUCEMIA AGUDA MIELOIDE

Dentro de la evaluación al término de la terapia de inducción es necesario catalogar la respuesta alcanzada en nuestros pacientes. Tabla 4. De esta manera poder determinar la estrategia terapéutica a seguir correspondiente al inicio de la terapia de consolidación, o en caso de ser necesario inicio de esquema de reinducción a la remisión⁵.



1.4.1 CRITERIOS DE RESPUESTA

- **Remisión completa (RC):** Se define cuando se cumple con los siguientes parámetros, determinación de blastos en medula ósea menor al 5 %, ausencia de blastos , blastos con bastones de Auer en sangre periférica, conteo total de neutrófilos mayor a $1.0 \times 10^9/L$, conteo plaquetario mayor a $100 \times 10^9/L$.
- **Remisión completa con recuperación hematológica incompleta (RCi):** Se define cuando se cumple con los siguientes parámetros, determinación de blastos en medula ósea menor al 5 %, ausencia de blastos , blastos con bastones de Auer en sangre periférica, conteo total de neutrófilos menor a $1.0 \times 10^9/L$, conteo plaquetario menor a $100 \times 10^9/L$.
- **Remisión parcial (RP):** Se define cuando se cumple con los siguientes parámetros, determinación de blastos en medula ósea del 5 al 25 %, disminución del 50 % de blastos en medula ósea pretratamiento, conteo total de neutrófilos mayor a $1.0 \times 10^9/L$, conteo plaquetario mayor a $100 \times 10^9/L$.

1.4.2 CRITERIOS DE FALLA TERAPÉUTICA

- **Enfermedad refractaria primaria:** no integra RC, RCi, después de dos ciclos de inducción con quimioterapia intensiva, se excluyen pacientes que mueran en aplasia o muerte de causa indeterminada
- **Muerte en aplasia:** muerte que ocurre después de los 7 días del inicio de tratamiento durante citopenia, medula ósea aplásica o hipoplásica obtenida dentro de los 7 días de la muerte, sin evidencia de actividad tumoral.
- **Muerte de causa indeterminada:** muerte que ocurre antes de completar el tratamiento, o antes de los 7 días del inicio del tratamiento; o después de 7 días del inicio de la terapia con ausencia de blastos en sangre periférica, pero aspirado de medula ósea no disponible.

1.5 OPCIONES DE TRATAMIENTO

En general el tratamiento no ha sufrido mayores modificaciones en años recientes. Una valoración inicial integral del paciente nos permitirá considerar si será candidato a un esquema de inducción con quimioterapia de alta intensidad versus un esquema de quimioterapia no intensivo. ⁽⁵⁻¹²⁾ A demás de considerar la edad, estado funcional, comorbilidades, para catalogar a un paciente como 'fit' versus 'unfit'. ⁽¹²⁻¹³⁾

1.5.1 TERAPIA DE INDUCCIÓN DE ALTA INTENSIDAD

Con tres días de antraciclinas y siete días de citarabina, esquema conocido como “7+3” la respuesta completa (RC), que se alcanza es del 60-80% en adultos jóvenes y del 40-60 % de adultos mayores (60 años o más).^(5, 16,17) La evidencia sugiere que la dosis de la daunorrubicina no debería ser menor a 60 mg/m².^(18,19) La dosis de la citarabina 100 mg/m².⁽⁵⁾

1.5.2 TERAPIA DE BAJA INTENSIDAD.

Este tipo de esquemas se ve limitado para pacientes unfit, en los cuales la administración de quimioterapia de alta intensidad conferiría más riesgo que beneficio, además de que estas alternativas nos permiten dar un mejor tratamiento de soporte y calidad de vida. Dentro de estas opciones contamos con dosis bajas de citarabina (LDAC), o agentes hipometilantes (HMA). Por lo general la LDAC es bien tolerada y puede llegar a producir un rango de remisión completa del 15-25 %, sin embargo la supervivencia global que otorga esta opción es referida con una mediana de 5-6 meses.^(5,20)

Se describen los diferentes esquemas utilizados durante la inducción en la tabla 4.

Tabla 4. Esquemas de quimioterapia utilizados en la inducción a la remisión.

Esquemas de quimioterapia utilizados	
Pacientes candidatos a quimioterapia intensiva	
Terapia de inducción(todas las edades)(7+3)	<ul style="list-style-type: none"> 3d IV antraciclina:daunorrubicina por lo menos a 60 mg / m² ,idarrubicina 12mg/m² , o mitoxantrona 12 mg/m² más 7 d de citarabina en infusión continua (100-200mg/m²)
Pacientes no candidatos a quimioterapia intensiva	
Azacitidina	<ul style="list-style-type: none"> 75 mg/m2, SC, d 1-7, cada 4 semanas, hasta la progresión
Decitabina	<ul style="list-style-type: none"> 20 mg/m2, IV , d 1-5, cada 4 semanas, hasta la progresión
Dosis bajas de citarabina	<ul style="list-style-type: none"> 20 mg c/12 h, SC, d 1-10, cada 4 semanas, hasta la progresión, no se recomienda en pacientes con riesgo genético adverso
Cuidados Best supportive care	<ul style="list-style-type: none"> Incluyendo hidroxiurea, para pacientes que no pueden tolerar ninguna quimioterapia o que no desean recibir quimioterapia

1.6 GEN ABCB1 RESISTENCIA A DROGAS

1.6.1 GENERALIDADES

La familia MDR pertenece a una superfamilia de 49 genes humanos ABC (adenosine triphosphate (ATP) – Binding Cassette) que están clasificados en 8 subfamilias que van de ABC-A hasta ABC-G y ANSA (arsenite and antimonite transporter) en base al grado de homología entre sus secuencias. Estos genes están especializados en el transporte celular dependiente de energía y participan en un amplio rango de eventos como la expulsión de sustancias nocivas, secreción de toxinas, movilización de iones y péptidos y señalización celular. Los genes ABCB se localizan en el brazo largo del cromosoma 7, banda 21.1 (7q21.1). El gen ABCB -1 codifica o expresa una proteína de 170 kd conocida como glicoproteína P (gp-170 [P de permeabilidad]) la cual es una molécula enlazadora de ATP con características de una proteína de membrana formadora de poro, que funciona como bomba dependiente de energía, la cual exporta o expulsa la droga fuera de las células. En los últimos años, se han descrito más de 15 polimorfismos del gen ABCB1. ⁽⁹⁻¹⁰⁾.

1.6.2 CARACTERÍSTICA DE LOS GENES DE RESISTENCIA A MULTIDROGAS

La multidrogoresistencia (MDR), mediada por múltiples transportadores de fármacos ABC (ATP-binding cassette), es un punto crítico en el tratamiento de leucemia aguda. Estudios han demostrado que la MDR intrínseca puede incrementarse debido a la expresión de perfiles génicos específicos y que la expresión inducida por drogas de glicoproteína-P (P-gp) y otras proteínas de MDR pueden resultar en resistencia adquirida. ⁽²¹⁾.

Multidrogo-resistencia contribuye al fracaso terapéutico en varias neoplasias hematológicas principalmente cuando son tratadas con regímenes que contienen antracíclicos, alcaloides de la vinca o epipodofilotoxinas los cuales son modulados en su concentración intracelular por la glicoproteína p 170. Las células leucémicas resistentes a la quimioterapia de inducción conducen a refractariedad de la enfermedad o recaída y en última instancia a la muerte temprana del paciente ⁽²²⁾. Su expresión se ha establecido en una serie de adultos mayores portadores de Leucemia Mieloide Aguda, en donde su sobreexpresión se ha relacionado con una baja tasa de remisiones completas ⁽²²⁾. De igual manera en leucemia aguda linfoide los resultados mostraron altos niveles de genes ABCB1 y ABCG2, que fueron 4,5 y 2,3 veces los niveles de donantes sanos, respectivamente. Un total de 52% de los pacientes del estudio expresaron altos niveles de ABCB1 y se asociaron significativamente con el grupo de pacientes de alto riesgo y una disminución de la tasa de supervivencia a los 40 meses del 78%. Por lo que en esta patología la detección temprana de los niveles de expresión génica ABCB1 podría ser importante para el diagnóstico y la monitorización de todos los pacientes. ⁽³⁶⁾

La glucoproteína de permeabilidad (P-gp) fue identificada como el primer transportador ABC asociado con la resistencia a drogas. Las tres proteínas más estudiadas de MDR son P-gp, codificada por el gen ABCB-1, la proteína 1 asociada a multidrogo resistencia (MRP1) y la proteína de resistencia asociada al cáncer de mama (BCRP o ABCG2). Los genes responsables de codificar para estas proteínas, así como otros genes codificantes de transportadores ABC adicionales se saben involucrados en la resistencia a fármacos antineoplásicos.⁽²³⁻²⁴⁾ Venditti y colaboradores demostraron que pacientes con LMA recién diagnosticados quienes expresaron Bcl-2 y ABCB1 tuvieron una significativamente baja tasa de remisión completa con terapia de inducción estándar que pacientes que expresaron solo alguna de estas proteínas⁽²⁵⁾. ABCB1 no es el único transportador MDR asociado con peor respuesta a la terapia y sobrevida en leucemia aguda.^(25,26,29,30)

Existen alternativas para inhibir la actividad de ABCB1 y otras bombas de expulsión de fármacos, por ejemplo existen nuevos fármacos que pueden modificarse para no ser sustratos de P-gp y evadir su expulsión. Algunos fármacos pueden hacerse más lipofílicos y por lo tanto más fácilmente internalizados, del mismo modo la encapsulación de fármacos en liposomas puede ayudar a los resultados contra MDR como se ha reportado con la doxorubicina liposomal, estos métodos, los cuales incrementan la permeabilidad pasiva lipídica de los compuestos y resulta en mejor difusión pasiva previene el desarrollo de grandes gradientes de concentración que pueden potencialmente disminuir la resistencia debido a la expulsión por los transportadores sin importar si el compuesto es sustrato o no^(26,27,28). Dado el potencial impacto de MDR sobre la eficacia de la terapéutica antineoplásica, esto es claramente un punto clave para ser considerado durante el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Leucemia Mieloide Aguda es una de las principales neoplasias hemato-oncológicas que se atiende en los centros de referencia. Su importancia radica en la pobre supervivencia en conjunto con la pobre respuesta al tratamiento. Desde 1943 el esquema de inducción a la remisión 7+3 sigue como piedra angular del tratamiento. Junto al advenimiento de nuevos blancos moleculares, moduladores epigenéticos se espera mejorar los resultados. Desafortunadamente la resistencia a los diversos fármacos se encuentra asociada directamente con la falla terapéutica. Muchos mecanismos se encuentran implicados en la resistencia a los fármacos quimioterapéuticos pero tal vez la más conocida es la expresión de los genes de resistencia a multidroga, dentro de ellos los más estudiados en leucemias agudas linfoides los genes ABCB 1 y ABCB 2. La expresión de estos genes codifica a diversas bombas de flujo con mecanismo específico para diversos fármacos. Por lo tanto el estudio de la expresión de la glicoproteína P, en pacientes con diagnóstico reciente de leucemia mieloide aguda, podría ser un factor determinante de mal pronóstico en esta enfermedad, el cual podría ser un factor determinante para considerar los pacientes que de alto riesgo de no integrar remisión, de esta manera valorar trasplante de médula ósea de primera intención, además de cambios en el esquema terapéutico.

3. JUSTIFICACIÓN

Conocemos que existe la expresión de los genes ABCB1 en las diferentes enfermedades oncológicas incluyendo la leucemia aguda. Su presencia o ausencia ha demostrado asociarse con una pobre respuesta al tratamiento debido a que desarrolla un mecanismo de resistencia a los principales fármacos empleados dando como resultado el fracaso de los mismos en cumplir su objetivo. Consideramos necesario conocer la relación que existe en nuestra población de los niveles expresión de ABCB1 y la influencia de estos para alcanzar remisión en los pacientes con diagnóstico reciente de Leucemia Mieloide Aguda.

4. HIPÓTESIS

Si el gen ABCB1 se encuentra expresado en el diagnóstico inicial de la leucemia mieloide aguda entonces determinara una pobre respuesta al tratamiento con esquema de quimioterapia de inducción a la remisión en base 7+3 al presentar criterios de falla terapéutica.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO PRIMARIO

Evaluar la expresión de los ABCB1 como falla terapéutica en la respuesta al tratamiento en los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda de Novo.

5.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Determinar la frecuencia de presentación de los ABCB1 en pacientes con diagnóstico reciente de leucemia mieloide aguda .
- Conocer el grupo de edad de mayor expresión de los ABCB1.
- Establecer el subtipo morfológico más frecuente en la población estudiada .
- Establecer relación del ABCB 1 con falla terapéutica mediante la prueba OR

6. METODOLOGÍA

6.1 TIPO Y DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio experimental, prospectivo, longitudinal, y analítico.

6.2 POBLACIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

Pacientes del Hospital General de México con diagnóstico de novo de leucemia mieloide aguda que se encuentren en el servicio de Hematología Unidad 111 D.

6.2.1 TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Se realiza el cálculo de tamaño de la muestra en base a una proporción, realizándola con los datos obtenidos de la experiencia institucional de la frecuencia de presentación de la leucemia mieloide aguda, en donde se estimó en base de la incidencia registrada en de LAM. Durante dos periodos se registraron 250 casos de leucemia aguda, de los cuales 38 % (n = 95) correspondió a leucemia mieloide aguda y 62 % (n = 155) a leucemia linfocítica aguda

$$n = \frac{N \cdot Z_{\alpha}^2 \cdot p \cdot (1-p)}{e^2 \cdot (N-1) + Z_{\alpha}^2 \cdot p \cdot (1-p)}$$

El cálculo de tamaño final de la muestra corresponde a 52 individuos

6.3 CRITERIOS

6.3.1. INCLUSIÓN.

- Pacientes mayores de 14 años portadores de Leucemia Mieloide Aguda de novo
- Ambos géneros
- Que cuenten con consentimiento informado para el uso de sus muestras para el análisis de material genético.

6.3.2 EXCLUSIÓN

- Pacientes portadores de Leucemia promielocítica aguda
- Leucemia aguda en recaída tardía que requieran reiniciar el protocolo de diagnóstico y tratamiento
- No exista suficiente material genético que permita la amplificación del gen o de cualquiera de los genes constitutivos que se utilizaran

6.3.3 ELIMINACIÓN

- Ausencia de registros médicos.
- Abandono o no aceptación de tratamiento

6.4 . DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES A EVALUAR Y FORMA DE MEDIRLAS.

- **Variable dependiente:** Respuesta al tratamiento
- **Variable independiente:** Expresión de los genes ABCB1 al diagnóstico

CUADRO DE OPERACIONALIDAD DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	VALORES
Expresión del los ABCB1	Identificada por RT-PCR	Cuantitativa	Continua	Alto Intermedio Bajo
Remisión Completa	Ausencia de mieloblastos en MO a las 4 semanas de iniciado el tratamiento. Menor al 5 % de blastos	Cualitativa	Nominal Dicotómica	Si No
Refractariedad al tratamiento	Presencia de mas 5 mieloblastos en medula ósea a las 2 semanas de iniciado al tratamiento	Cualitativa	Nominal Dicotómica	Si No
Muerte	Ausencia de los signos vitales	Cualitativa	Nominal Dicotomica	Si No
Edad	Tiempo que ha vivido una persona desde su nacimiento	Cuantitativa	Continua	0 – 100
Sexo	Condición que distingue a hombres a mujeres	cualitativa	Nominal	Hombre Mujer
Leucocitos	Conteo de leucocitos al diagnóstico	Cuantitativa	Continua	0 – 1.000.000
Deshidrogenasa Láctica (DHL)	Enzima catalizadora- marcador bioquímico	Cuantitativa	Continua	0- 1000 mg-dl

7. PROCEDIMIENTO

Se incluyeron a pacientes mayores de 14 años portadores de Leucemia Mieloide Aguda de novo, atendidos en el Hospital General de México. Se seleccionó a todos los pacientes con diagnóstico de estirpe mieloide a excepción de la variante promielocítica. Se realizó el registro de las variables en estudio y se documentó los resultados en el formato de captura. Posteriormente se analizó para establecer relaciones. Se realizó frotis de medula ósea al día + 28 para análisis y determinar la respuesta al tratamiento.

7.1 TOMA DE MUESTRAS

Para la extracción de RNA, se realizó la toma de muestra de sangre periférica y/o medula ósea en 1 tubo de EDTA, la toma se realizó al momento del diagnóstico, previo al inicio del esquema de quimioterapia.

7.2 LÍNEA CELULAR (CONTROL POSITIVO)

Se llevó a cabo el cultivo de la línea celular K562 en medio RPMI1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY), L- glutamina 2mM, piruvato de sodio 1mM (Hyclone Laboratorios, Logan, UT), penicilina/estreptomicina 1% y 2mercaptoetanol 50uM (Gibco BRL, Grand Island, NY). Estas células se utilizaron como controles durante el análisis de expresión del gene ABC-B1.

7.3 SEPARACIÓN DE LEUCOCITOS TOTALES

Se realizó la separación de leucocitos totales por método de lisis de eritrocitos. Las muestras se mezclaron en proporción 1:5 con solución lítica lo que causó lisis de eritrocitos, posteriormente se incubó durante 5 minutos a 4°C y se centrifugó a 2000rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante con posterior separación del botón leucocitario, además de lavado con PBS 1X y centrifugación a 2000rpm por 5 minutos, posteriormente los leucocitos obtenidos fueron alicuotados en paquetes de aproximadamente $1-2 \times 10^6$ células.

7.4 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE LEUCOCITOS Y LÍNEA CELULAR

El RNA total se aisló mediante el uso de Solución D (Chomczynski-Sacchi). Se procedió a homogeneizar los paquetes celulares con 500 μ L de Solución D, con posterior incubación por 60 minutos a 4°C. Se agregó 150 μ L de solución de ácido acético/acetato de sodio 2M, pH=3; 500 μ L de solución de fenol/agua (1:1); y 200 μ L de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1);, se incubó en hielo durante 7 minutos, posterior centrifugación a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C. Posteriormente se separó la fase superior acuosa (RNA soluble) y se mezcló con etanol al 100%, incubando a -20°C por 1 hora, esto para



precipitar el RNA. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 20 minutos a 4°C; el botón obtenido fue lavado con etanol al 75%, nuevamente se procedió a una centrifugación a 7,500 rpm por 7 minutos a 4°C, terminada la misma se secó el botón a temperatura ambiente y se resuspendió en agua inyectable. Finalmente se alineo incubando a 70°C por 10 minutos. Se guardó a -80°C hasta su posterior uso.

7.5 DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD Y CUANTIFICACIÓN DEL RNA

Para determinar la concentración y pureza del RNA total se midió la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda en espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys 10S UV-Vis). La integridad del RNA se comprobó observando las bandas 18S y 28S del RNA ribosomal (rRNA) lo que confirmo la integridad, esto mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% y corriéndolo en cámara de electroforesis durante 40 minutos a 70 volts.

7.6 SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO (CDNA)

El cDNA se sintetizó a partir de 2500 ng de RNA total a un volumen final de 20 µL. El RNA se mezcló con 1 µL de Oligo dT (PROMEGA, Madison WI, USA) y el volumen correspondiente de H₂O inyectable; se incubó a 70°C por 10 minutos. Luego se añadió 5 µL de buffer (PROMEGA, Madison WI, USA), 3 µL de dNTPs 10 µM (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA) y 1 µL de transcriptasa reversa MML-V (PROMEGA, Madison WI, USA), se incubo a 37°C por 50 minutos y para finalizar se inactivo la enzima (MML-V) incubando la muestra a 70°C por 10 minutos.

7.7 QRT-PCR PARA EL GEN DE RESISTENCIA A DROGAS ABC-B1

Los niveles de expresión de mRNA de los genes ABCB1 (Hs01069047), ABCG2 (Hs0105379) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; Hs00985689) usando el ensayo de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). El gen GAPDH se usó como un control endógeno, y cada muestra se analizó por triplicado. Los niveles de expresión relativa se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ con médula ósea como calibrador. Los puntos de corte de alta y baja expresión se determinaron por los valores medios observados en donantes sanos.⁽³⁷⁾

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se utilizó el Software estadístico SPSS versión 20.0 (Chicago ILL, USA). Se realizó estadística descriptiva para la obtención de la media y los diferentes rangos de las variables numéricas. Para la prueba de contraste de hipótesis se realizó la prueba Ji - Cuadrado (X^2) considerándose como significativo un valor de $p \leq 0.05$ (95%IC). Para la diferencia de media de las variables cuantitativas (edad, cuenta de leucocitos) se realizó la prueba *T-student*. Posterior a la obtención del valor de p , se estableció los diferentes valores de Odds Ratio de las diferentes variables de riesgo (edad, valores de leucocitos, nivel de expresión de ABCB1).

9. RESULTADOS

9.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

Se estudiaron un total de 52 pacientes con diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda de *novo*, en su mayoría correspondieron al género femenino (n=31, 59.6%) y el restante al género masculino (n=21, 40.4%). La media de edad fue de 44 años (15-86 años), siendo ligeramente mayor para el género femenino (44 años v 43 años), sin encontrarse una diferencia estadística entre los géneros ($p=0.720,95\%IC$). Al agrupar por edades, los pacientes contaban con menos de 35 años (n=21, 40,4%), seguidos por el grupo de 35 a 55 años con (n=13, 25%), más de 55 años (n=18 ,34.6%). Este finalmente fue uno de los principales puntos para considerar el tipo de Tratamiento en conjunto con su estado funcional. El diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda se realizó tanto por los hallazgos morfológicos como por medio de la Citometría de flujo, dentro de los primeros la mayoría de los pacientes contaron con Leucemias que combinaron características monocitoides (M4, 61.5%), seguido de aquellas Mieloides con diferenciación (M2, 28.8%). En cuanto a la Citometría de flujo, la mayor parte de los pacientes expresaron en su blastos la presencia de CD13+, CD14+, CD33+, CD34+ (n=33, 63.5%) y solo 2 casos expresaron MPO (n=2, 3.8%). Ningún caso expreso en conjunto marcadores linfoides. En cuanto a las principales alteraciones genéticas identificadas, el 44.2 % contaron con un cariotipo normal (n=23, 44.2%) y solo en un caso se detectó hiperdiploidia. Debido a la falta de desarrollo del cariotipo, no se pudo realizar la clasificación en cuanto a riesgos. Dentro de los parámetros de la hematimetría, la media de hemoglobina fue de 7.7 g/dl (4-12.7) con una media de Leucocitos de $48.95 \times 10^3/mcl$ ($0.2-456 \times 10^3/mcl$) y de $47 \times 10^3/mcl$ para las plaquetas ($3 - 228 \times 10^3/mcl$). El resto de los parámetros clínicos como de laboratorio se describen en la TABLA 5.0

Tabla 5. Características Generales de los Pacientes

Características de los casos (n=52)	N = (%)
Género	
Masculino	21 (40.4)
Femenino	31 (59.6)
Edad (años)	
Menos de 35 años	21 (40.4)
35- 55 años	13 (25)
Mayores de 35 años	18 (34.6)
Leucocitos (x 10³/mcl)	
Menores de 35 x 10 ³ /mcl	35 (67.3)
35 – 100 x 10 ³ /mcl	10 (19.2)
Mayores de 100 x 10 ³ /mcl	07 (13.5)
Hemoglobina (g/dL)	Media (rango) 7.76 (4-12.7)
Plaquetas (x 10³/mcl)	Media (rango) 47.21(3-228)
DHL (UI/L)	
Valor menor de 350 UI/L	23 (44.2)
Valores mayores de 350UI/L	29 (55.8)
Variedades morfológicas (FAB)	
M1 (sin diferenciación)	02 (3.8)
M2 (con diferenciación)	15 (28.8)
M4 (Mielo-monocitoide)	32 (61.5)
M5 (Monocitoide)	02 (3.8)
M7 (Megacarioblástica)	01 (1.9)
<i>Subtipos acorde a las variantes morfológicas</i>	
Mieloides	18 (34.6)
Mielo-monocitoides	34 (65.4)
<i>Cuenta de Blastos en MO al diagnóstico</i>	
< 40%	16 (30.8)
40-60%	06 (11.5)
>60%	30 (57.7)
Cariotipo	
Citogenetica normal	23 (44.2)
Hiperdiploidia	01 (1.9)
No crecimiento	28 (53.8)

Tratamiento	
Esquema 7 +3 (dosis standard)	43 (82.7)
Esquema 7+3 (dosis reducida)	02 (3.8)
Citarabina Subcutánea	06 (11.5)
Otros esquemas reducidos	01 (1.9)
Intensidad del tratamiento	
Intensidad estándar	43 (82.7)
Intensidad reducida	09 (17.3)
Nivel de expresión de RNAm ABCB1	
Expresión baja	18 (34.6)
Expresión Alta	19 (36.5)
Expresión Ausente	15 (28.8)
Tipo de Respuesta Global	
Remisión completa	25 (48.1)
Remisión Parcial	03 (5.8)
Refractaria	10 (19.2)
Muerte en aplasia	12 (23.1)
Muerte indeterminada	02 (3.8)
<i>Agrupación de los casos acorde a la respuesta</i>	
RC + RP (Respuesta global)	28 (53.8)
Falla de tratamiento (Refractaria + muerte)	24 (46.2)

9.2 EXPRESIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA ABCB1 Y SU ASOCIACIÓN CON LAS VARIABLES CLÍNICAS

La expresión de la glicoproteína P (ABCB1) se realizó mediante la detección de m RNA en sangre periférica al momento del diagnóstico. Acorde a la expresión y en comparación con los individuos sanos se clasifico a los pacientes en expresión baja, ausente o elevada. La mayor parte de los pacientes contaba con sobre expresión al momento del diagnóstico (n=19, 36.5%) seguido de aquellos con expresión baja (n=18, 34.6%) y ausente (n=15, 28.8%). La asociación de los diferentes niveles con las variables clínicas se describe en la TABLA 6.0

Tabla 6. Asociación de la expresión de ABCB1 con las diferentes variables clínicas

Variables clínicas	Expresión del ABCB1 (%)		
	BAJO	ALTO	NEGATIVO
Género			
Masculino	08 (38.1)	06 (28.6)	07 (33.3)
Femenino	10 (32.3)	13 (41.9)	08 (25.8)
Grupos de edad			
Menos de 35 años	08 (38.1)	06 (28.6)	07 (33.3)
35 a 55 años	05 (38.5)	03 (23.1)	05 (38.5)
Mayores de 55 años	05 (27.8)	10 (55.6)	03 (16.7)
Tipo de intensidad del tratamiento			
Esquema 7 + 3	17 (39.5)	12 (27.9)	14 (32.5)
Esquema de baja intensidad	01 (11.1)	07 (77.8)	01 (11.1)
Cuenta de leucocitos (x 103/mcl)			
Menos de 35 x 103/mcl	11 (31.4)	13 (37.1)	11 (31.4)
36- 100 x 103 /mcl	06 (60.0)	01 (10.0)	03 (30.0)
Más de 100 x 103/mcl	01 (14.3)	05 (71.4)	01 (14.3)
Nivel sérico de DHL (UI/L)			
Menos de 350 UI	08 (34.8)	08 (34.8)	07 (30.4)
Más de 350 UI	10 (34.5)	11 (37.9)	08 (27.6)
Variante morfológica			
Mieloides	06 (33.3)	08 (44.4)	04 (22.2)
Mieloide-Monocitoide (M4,M5)	12 (35.5)	11 (32.4)	11 (32.4)
Porcentaje de blastos en MO (%)			
< 40 %	03 (18.8)	09 (56.2)	04 (25.0)
40 – 60%	03 (50.0)	02 (33.3)	01 (16.7)
>60%	12 (40.0)	08 (26.7)	10 (33.3)
Respuesta al Tratamiento			
General			
Respuesta (RC + RP)	13 (46.4)	03 (10.7)	12 (42.9)
Falla al tratamiento	05 (20.8)	16 (66.7)	03 (12.5)
Particular			
Remisión completa (RC)	12 (48.0)	01 (4.0)	12 (48.0)
Remisión parcial (RP)	01 (33.3)	02 (66.7)	00 (00.0)
Refractaria	00 (00.0)	09 (90.0)	01 (10.0)
Muerte en aplasia	04 (33.3)	06 (50.0)	02 (16.7)
Muerte indeterminada	01 (50.0)	01 (50.0)	00 (00.0)

Al analizar la expresión del gen ABCB1, se realizó una agrupación entre la sobreexpresión con la expresión ausente, en comparación con la expresión baja (semejante a los individuos sanos). Al realizar el contraste de hipótesis aquellos pacientes que mostraron una expresión disminuida mostraron una mayor tasa de Respuestas globales ($p= 0.049$, 95% IC). Dentro de la asociación del nivel de expresión con las condiciones clínicas aquellos pacientes por encima de los 55 años fueron los que mostraron una mayor expresión de ABCB1 (55.6%) al igual que en aquellos con conteos por encima de los $100 \times 10^3/\text{mcl}$ (71.4%). Esto sugiere que la sobreexpresión del gen ABCB1 se asocia directamente con la edad y esta puede estar incrementada en especial en aquellos pacientes con hiperleucocitosis.

9.3 EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO Y FALLA TERAPÉUTICA

La parte principal del tratamiento se basó en el esquema 7+3, la intensidad del tratamiento se estableció principalmente por la edad y en el estado funcional de los pacientes. El esquema de intensidad normal 7 + 3 (Citarabina $100\text{mg}/\text{m}^2$ durante 7 días plus Daunorrubicina $60\text{ mg}/\text{m}^2$ durante 3 días) se inició en 43 pacientes ($n=82.7\%$), un total de 6 pacientes recibió dosis de Citarabina de manera subcutánea como esquema de baja intensidad al igual que a dos casos se les redujo la dosis del esquema habitual (3.8%). Solo un paciente recibió un esquema de dosis altas de Citarabina. Todos los esquemas de baja intensidad, tanto de manera subcutánea como de reducción de dosis se administraron en los pacientes por encima de 55 años y que se encontrara comprometido su estado funcional. El restante de los casos recibieron el esquema 7+3.

9.3.1 RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN PACIENTES CON SOBREEXPRESIÓN DE ABCB1

Posterior al inicio de la terapia de inducción se valoró la respuesta al tratamiento considerándose la recuperación tanto de los parámetros de la biometría hemática como la disminución de la cifra de blastos en médula ósea. Acorde a esto se clasifico a los pacientes en diferentes tipos de respuesta. Un total de 25 pacientes (48.1%) contaron con criterios de Remisión Completa, mientras que 3 pacientes ($n=5.8\%$) se consideraron como Respuesta Parcial. En cuanto a las leucemias refractarias, un 19.2% ($n=10$) mostraron resistencia al primer esquema de tratamiento, mientras que un 26% ($n=14$) fallecieron durante la etapa de inducción a la remisión (12 casos por muerte en aplasia y 2 casos por muerte indeterminada). En general un 53.8% de los pacientes conto con algún tipo de respuesta (RC plus RP) y un 46.2% ($n=24$) se consideró como falla a tratamiento (refractariedad o muerte). Asociando con la edad, la mayor parte de los pacientes que mostraron una falla al tratamiento fueron por encima de los 55 años ($n=12/18$, 66.7%) seguidos de los pacientes entre 35-55 años ($n= 5/13$, 38,5%) y aquellos menores de 35 años ($n=7$, 7/14, 33.3%). El tipo de tratamiento también influencio en la respuesta ya que aquellos pacientes que fueron sometidos solo a una terapia de baja intensidad (citarabina SC, reducción de la dosis del esquema 7 +3) presentaron una mayor tasa de falla terapéutica

(Citarabina SC: n= 4/6, 66.7%, esquema 7 + 3 reducido: n=1/1, 50%). En cuanto a la expresión alta de ABCB1 mostro tener una asociación directa con falla terapéutica al contar con una p =0.049**. El resto de las variables clínicas y su asociación con la falla terapéutica se presentan en la Tabla No.7.

Tabla 7. Análisis univariado de las diferentes variables clínicas sobre la falla terapéutica

Variables clínicas	Respuesta al Tratamiento		Valor de p	Significancia	
	Respuesta	Falla terapéutica		OR	Rango
Edad >55 años (%)	6 (33.3)	12 (66.7)	0.031**	3.666	1.097-12.25
Edad >35 años (%)	14 (45.2)	17 (54.8)	0.107	2.428	0.768-7.673
Variantes monocitoides (M4, M5)	20 (58.8)	14 (41.2)	0.243	0.560	0.176-1.775
DHL > 350UI/L	14 (48.3)	15 (51.7)	0.267	1.666	0.549-5.055
Leucocitos > 35 x 103/mcl	09 (52.9)	08 (41.7)	0.580	1.055	0.330-3.372
Leucocitos > 100 x 103/mcl	02 (28.6)	05 (71.4)	0.151	3.420	0.598-19.55
Quimioterapia de Baja Intensidad	03 (33.3)	06 (66.7)	0.161	2.777	0.621-12.60
Expresión alta de ABCB1	15 (44.1)	19 (55.9)	0.049**	3.293	0.950-11.30

9.3.2 IMPACTO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS EN PACIENTES MENORES DE 55 AÑOS

Dentro del análisis general de las diferentes variables sobre el riesgo de refractariedad tanto la edad por encima de los 55 años como la sobre expresión del gen de resistencia ABCB1 impactaron sobre la respuesta (RC + RP) durante el primer mes de tratamiento. Posteriormente al dividir los casos en cuanto a la edad (55 años) se valoró el impacto de las diferentes variables. En cuanto al tratamiento todos los pacientes por debajo de los 55 años recibieron la dosis integra del esquema 7+3. En la Tabla 8 se describe el impacto de las diferentes condiciones clínicas sobre el éxito del tratamiento. Solo la cuenta de leucocitos por encima de 100x 103/mcl mostró un mayor OR sobre la falla terapéutica semejante al análisis general (OR 4.2, 0.339-52.98) pero considerando que solo 3 casos mostraron cuenta de leucocitos por encima de 100 x 103/mcl. En cuanto a la expresión elevada de ABCB1, a pesar de no ser significativo en este grupo de pacientes el OR fue considerable (OR 2.5, 0.529-11.81) a diferencia de otras situaciones clínicas como la cuenta de leucocitos, el nivel de lactato deshidrogenasa.

Tabla 8.0 Impacto de las variables clínicas en pacientes menores de 55 años

Variables clínicas	Respuesta al Tratamiento			Significancia	
	Respuesta	Falla terapéutica	Valor de p	OR	Rango
Variantes monocitoides(M4,M5)	16 (69.6)	07 (30.4)	0.315	0.525	0.119-2.311
DHL > 350UI/L	12 (60)	08 (40.0)	0.377	1.676	0.385-7.209
Leucocitos > 35 x 103/mcl	06 (66.7)	03 (33.3)	0.610	0.889	0.177-4.443
Leucocitos > 100 x 103/mcl	01 (33.3)	02 (66.7)	0.580	4.200	0.339-52.98
Expresión alta de ABCB1	12 (57.1)	09 (42.9)	0.292	2.500	0.529-11.81

9.3.3 IMPACTO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS EN PACIENTES MAYORES DE 55 AÑOS

El siguiente análisis se enfocó en aquellos pacientes por encima de 55 años, este grupo de pacientes recibió en su mayoría quimioterapia de baja intensidad, principalmente dosis de Citarabina subcutánea o variantes reducidas del esquema 7 + 3. A diferencia del grupo por debajo de los 55 años los pacientes mayores mostraron una mayor tasa de falla terapéutica en el grupo que mostró sobreexpresión de la ABCB1 (76.9%). En la tabla 9 se describe a este grupo. A su vez la expresión elevada al momento del diagnóstico se asoció con una mayor falla terapéutica y con el mayor OR dentro del subgrupo por encima de los 55 años (OR 5.00, 0.555-45.39). Variables como la cuenta de leucocito no mostraron un impacto significativo semejante a las diferentes variantes morfológicas. Solo la elevación de la Lactato deshidrogenasa representó un factor de riesgo (OR 2.8) pero no tan relevante como la sobreexpresión de ABCB1 (5.00).

Tabla 9. Impacto de las variables clínicas en pacientes mayores de 55 años

Variables clínicas	Respuesta al Tratamiento			Significancia	
	Respuesta	Falla terapéutica	Valor de p	OR	Rango
Variantes monocitoides (M4,M5)	04 (36.4)	07 (63.6)	0.570	0.560	0.176-1.779
DHL > 350UI/L	02 (22.2)	07 (77.8)	0.310	2,800	0.360-21.72
Leucocitos > 35 x 103/mcl	09 (52.9)	08 (47.1)	0.563	1.050	0.330-3.372
Leucocitos > 100 x 103/mcl	01 (25.0)	03 (75.0)	0.593	1.666	0.135-20.57
Expresión alta de ABCB1	03 (23.1)	10 (76.9)	0.176	5.000*	0.555-45.39

10. DISCUSIÓN

Desde 1973 la piedra angular en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda continúa siendo el esquema a base de antraciclinas y análogos de las pirimidinas conocido como el esquema de inducción a la remisión 7+3^(3,5). El cual a pesar el advenimiento de nuevos blancos moleculares que incluyen anticuerpos monoclonales, fármacos modificadores de alteraciones epigenéticas entre otros, persiste como la primera línea de tratamiento⁽³⁻¹⁵⁾ En una revisión realizada por Dohner et al, en la cual se realizó el análisis de diferentes ensayos clínicos, no se ha logrado demostrar que el uso de éstos logre una superioridad en cuanto a supervivencia global.

Es bien conocido que la sobre expresión de genes de resistencias a drogas impactan en el pronóstico de pacientes con diagnóstico de leucemia aguda, puesto a que la mayor parte de agentes quimioterapéuticos son sustratos de canales transportadores como son el ABCB1 y ABCB2. Olarte y colaboradores en estudios de leucemia Linfoblástica identificaron que tanto la expresión de los ABCB1 como ABCB 2 constituyen un factor independiente para la falla terapéutica (fallo al integrar remisión), además de ser un factor independiente para presentar recaída.⁽³⁴⁾

En una cohorte brasileña de 109 pacientes Scheiner y colaboradores describieron que la expresión del ABCB1 no mostró impacto en la respuesta a la terapia de inducción de la remisión, sin embargo la expresión del ABCB1 del grupo que no logro integrar remisión fue mayor que la del grupo de pacientes con remisión completa ($p = 0,04$). La supervivencia global (OS) fue significativamente influenciada por CR ($p = 0,0001$). Teniendo como conclusiones de su revisión que los polimorfismos en el gen ABCB1 y los niveles de expresión de ABCB1 podrían ser útiles para identificar el pronóstico en pacientes con LMA.⁽⁴⁰⁾

Olarte y colaboradores, evaluaron la expresión del gen *MDR-1* (*ABCB1*) en 22 pacientes con Leucemia Aguda Mieloide, se encontró la expresión del gen *MDR-1* (*ABCB1*) en el 27.3% (6/22) de los pacientes. En el análisis estadístico, se encontró correlación ($p = 0.009$) de la expresión del *MDR-1* con la actividad del padecimiento de base posterior al tratamiento de Inducción (leucemia refractaria).⁽¹¹⁾

Dentro de los hallazgos de nuestra población analizada la expresión de niveles altos del gen ABCB1 en los pacientes con LAM de novo, se relacionó de manera directa con la falla terapéutica ($p = 0.049^{**}$).

El grupo de pacientes mayores a 55 años los niveles de expresión fueron mayores, si bien lo mencionan varias revisiones como la realizadas por Kantarjian y colaboradores ^(39,40,41,42) el tratamiento del adulto mayor debería ser individualizado. Como se mencionó previamente dentro de nuestra institución la mayoría de pacientes reciben esquemas de alta intensidad, debido a la falta de acceso a medicamentos que en la actualidad se encuentran indicados como manejo de primera línea en este grupo como son los agentes modificadores de alteraciones epigenéticas (fármacos hipometilantes).

En conclusión la expresión de ABCB1 en pacientes de reciente diagnóstico de leucemia aguda mieloide es un factor que se relaciona con la falla terapéutica al esquema de primera línea, estos resultados son una base importante para continuar con esta línea de investigación y valorar si en cohortes de mayor tamaño estos siguen siendo reproducibles, además de continuar con el seguimiento de estos pacientes a lo largo del tiempo para valorar su importancia como factor de pronóstico y su relación con la supervivencia global; así una vez identificado el gen, referir a los pacientes para la realización de trasplante de progenitores hematopoyéticos o que puedan ingresar a protocolos de estudio en los cuales puedan acceder a nuevos blancos terapéuticos.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F.GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet].Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood Res* 2016; 127(20):180-191
3. Bennet JM. 2016. Changes in the Updated 2016: WHO Classification of the Myelodysplastic Syndromes and Related Myeloid Neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2016; 16 (11):607-609.
4. Ley T, Miller C, Ding L, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013; 368 (22): 2059-2074.
5. Hartmut D, Elihu E, David G, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood Res.* 2017 ; 26;129(4):424-447 2017.
6. Lichtman MA . A historical perspective on the development of the cytarabine (7 days) and daunorubicin (3 days) treatment regimen for acute myelogenous leukemia:2013 the 40th anniversary of 7 + 3. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2013; 50(2):119-30.
7. Döhner H , Estey E, Grimwade D, Amadori, S, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017; 129(4), 424-447.
8. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366(12):1079-1089.
9. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2016; 374(23): 2209-2221.
10. Jan M, Snyder TM, Corces-Zimmerman MR, et al. Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Sci Transl Med.* 2012; 4(149): 118-149.
11. Olarte I, Miranda E, Lopez A. et al. Expression of the gene to multidrug resistance (MDR-1) in patients with acute myeloblastic leukemia. *Rev Med Hosp Gen Mex* 2010; 73, (4).
12. Sorrow M, Storer B, Elsayy M, et al. Relative benefit for intensive versus non-intensive induction therapy for patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia (AML) using a composite, age-comorbidity-cytogenetic, model. Presented at the 21st Congress of the European Hematology Association. 11 June 2016. Copenhagen, Denmark. Abstract LB580.
13. Giles FJ, Borthakur G, Ravandi F, et al. The haematopoietic cell transplantation comorbidity index score is predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving induction therapy for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2007;136(4): 624-627.
14. Krug U, Rö'llig C, Koschmieder A, et al; German Acute Myeloid Leukaemia Cooperative Group; Study Alliance Leukemia Investigators. Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: a web-based application for prediction of outcomes. *Lancet.* 2010; 376(9757):2000-2008.
15. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. et al. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2015;373(12): 1136-1152.



16. Othus M, Kantarjian H, Petersdorf S, et al. Declining rates of treatment-related mortality in patients with newly diagnosed AML given 'intense' induction regimens: a report from SWOG and MD Anderson. *Leukemia* 2014; 28(2):289-292.
17. Lowenberg B, Ossenkoppele GJ, Van Putten W, et al; Dutch-Belgian Cooperative Trial Group for Hemato-Oncology (HOVON); German AML Study Group (AMLSG); Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK) Collaborative Group. High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 362 (12): 1235-1248.
18. Lee JH, Joo YD, Kim H, et al; Cooperative Study Group A for Hematology. A randomized trial comparing standard versus high-dose daunorubicin induction in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2011;118(14): 3832-3841.
19. Burnett AK, Milligan D, Prentice AG, et al. A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. *Cancer* 2007;109(6):1114-1124.
20. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, et al; AMLCG Study Group. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2016;128(5): 686-698.
21. Walter RB, Othus M, Borthakur G, et al. Prediction of early death after induction therapy for newly diagnosed acute myeloid leukemia with pretreatment risk scores: a novel paradigm for treatment assignment. *J Clin Oncol* 2011; 29(33):4417-4423.
22. Gough SM, Slape CI, Aplan PD. NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biologic insights. *Blood* 2011;118(24):6247-6257.
23. Thol F, Kolking B, Hollink IH, et al. Analysis of NUP98/NSD1 translocations in adult AML and MDS patients. *Leukemia* 2013;27(3):750-754.
24. Broxterman HJ¹, Schuurhuis GJ. Transport proteins in drug resistance: detection and prognostic significance in acute myeloid leukemia. *J Intern Med Suppl* 2007; 740:147-51.
25. Illmer T, Schuler U, Thiede C, et al. MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Research* 2002;62:4955-4962.
26. Kolk V, Vries E, Putten W, et al. P-glycoprotein and multidrug resistance protein activities in relation to treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2000; 6(8):3205-14
27. Xia C, Smith P. Drug efflux transporters and multidrug resistance in acute leukemia: therapeutic impact and novel approaches to mediation. *Molecular Pharmacology Fast Forward* 2012; 8 (9) 1110:1124.
28. Szakacs G, Paterson J, Ludwig J, et al. Targeting Multidrug Resistance in Cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:219-234.
29. Venditti A, Del P, Maurillo L, et al. Combined Analysis of Bcl-2 and MDR1 Proteins in 256 Cases of Acute Myeloid Leukemia. *Haematologica* 2004; 89:934-939.
30. Riganti C, Voena C, Kopecka J, et al. Liposome-Encapsulated Doxorubicin Reverses Drug Resistance by Inhibiting P-Glycoprotein in Human Cancer Cells. *Mol Pharm* 2011;8:683-700.
31. Belpomme D, Gauthier S, Pujade-Lauraine E, et al. Verapamil Increases the Survival of Patients With Anthracycline-Resistant Metastatic Breast Carcinoma. *Ann Oncol* 2000;11:1471-1476.
32. Solary E, Drenou B, Campos L, et al. Quinine As a Multidrug Resistance Inhibitor: a Phase 3 Multicentric Randomized Study in Adult De Novo Acute Myelogenous Leukemia. *Blood*



2003;102:1202-1210.

33. Kolitz JE, George S L, Marcucci G, et al. P-Glycoprotein Inhibition Using Valspodar (PSC-833) Does Not Improve Outcomes for Patients Younger Than Age 60 Years With Newly. Diagnosed Acute Myeloid Leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 19808. *Blood* 2010;116:1413-1421.
34. Olarte I, Ramos C, Miranda E. Clinical significance of the ABCB1 and ABCG2 gene expression levels in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* 2017;22(5):286-291.
35. Chen X, Xie H, Wood BL, et al. Relation of clinical response and minimal residual disease and their prognostic impact on outcome in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2015;33(11): 1258-1264.
36. Kantarjian H, O'Brien S, Cortes J, et al. Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: predictive prognostic models for outcome. *Cancer* 2006; 106(5):1090-1098.
37. Klepin HD. Geriatric perspective: how to assess fitness for chemotherapy in acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014;2014(1):8-13.
38. Klepin HD, Geiger AM, Tooze JA, et al. Geriatric assessment predicts survival for older adults receiving induction chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2013;121(21): 4287-4294.
39. Deschler B, Ihorst G, Platzbecker U, et al. Parameters detected by geriatric and quality of life assessment in 195 older patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia are highly predictive for outcome. *Haematologica* 2013;98(2):208-216.
40. Scheiner M, da Cunha F, da Matta R, et al. ABCB1 genetic variation and P-glycoprotein expression/activity in a cohort of Brazilian acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res Clin Oncol* 2012 J;138(6):959-69.