



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

“Asociación de la expresión de dos marcadores (FLT3 ITD, ABCB1) sobre el pronóstico de pacientes portadores de Leucemia Mieloide Aguda.”

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE

ESPECIALISTA EN HEMATOLOGÍA

PRESENTA:

JUAN DIEGO MUÑOZ VEGA

TUTOR PRINCIPAL DE LA TESIS:

**DRA. IRMA OLARTE CARRILLO
BIOLOGÍA MOLECULAR HGM-UNAM**

**COTUTOR: DR CHRISTIAN RAMOS PEÑAFIEL.
MÉDICO ADSCRITO EN HEMATOLOGÍA HGM.**

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

“Asociación de la expresión de dos marcadores (FLT3 ITD, ABCB1) sobre el pronóstico de pacientes portadores de Leucemia Mieloide Aguda.”

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE

ESPECIALISTA EN HEMATOLOGÍA

PRESENTA:

JUAN DIEGO MUÑOZ VEGA

TUTOR PRINCIPAL DE LA TESIS:

**DRA. IRMA OLARTE CARRILLO
BIOLOGÍA MOLECULAR HGM-UNAM**

**COTUTOR: DR CHRISTIAN RAMOS PEÑAFIEL.
MÉDICO ADSCRITO EN HEMATOLOGÍA HGM.**

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2020.

Of. No. HGM-DG-312-DI-2020

Ciudad de México a 04 de agosto de 2020

DRA. IRMA OLARTE CARRILLO
HEMATOLOGÍA
Presente

Por medio de la presente hago de su conocimiento que el protocolo titulado: **“ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE DOS MARCADORES (FLT3 ITD, ABCB1) SOBRE EL PRONÓSTICO DE PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA”** con clave de registro DI/20/204/03/53, fue presentado a los Comités de Ética en Investigación, Comité de Investigación y el Comité de Bioseguridad, quienes dictaminaron su **A P R O B A C I Ó N**, por lo que puede dar inicio a su investigación.

Nota: Usted registro el proyecto con el tipo de financiamiento 03 (Recursos Existentes en el Hospital), por lo tanto, sólo podrá utilizar los recursos existentes dentro de su servicio, esto quiere decir que **NO** incluye el apoyo para estudios de laboratorio, gabinete, reactivos o insumos.

“A la Vanguardia en el Cuidado de la Vida”

Atentamente
Director de Investigación



DR. JOSÉ DAMIÁN CARRILLO RUÍZ
Con fundamento en lo establecido en el artículo 44
del Estatuto Orgánico del Hospital General de México.
la **Dra. Mayra A. Bustos Esquivel** firma en suplencia del
Director de Investigación

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A lo largo de este proceso llamado residencia, uno tiene la oportunidad de encontrarse con personas que por medio de sus enseñanzas nos hacen crecer, talvez sin darnos cuenta, pero poco a poco se convierten en los gestores de grandes cambios y consecución de metas.

Es por eso que hoy agradezco a la División de estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, por la oportunidad brindada de realizar este trabajo de Investigación y los estudios cursados a lo largo de estos años.

Es importante también agradecer a la Unidad de Investigación del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" por la aprobación del proyecto y asignación del folio DI/20/204/03/53, DI/16/103/03/035, DI/19/103/03/006

al Dr. Juan Collazo Jaloma, por la oportunidad brindada, al Dr. Carlos Martínez Murillo por ser un ejemplo y una guía, a la Dra. Irma Olarte Carrillo como tutor principal, al Dr. Christian Ramos Peñafiel como cotutor por todas sus enseñanzas y al Dr. Adolfo Martínez T., por su gran trabajo en investigación, a Adrián de la Cruz por su paciencia y entrega en el laboratorio.

A todo el equipo del Servicio de Hematología: Dr. Juan Francisco Zazueta, Dr. Gilberto Barranco, Dra. Guadalupe León, Dr. Efreén Montaña, Dr Juan Kassac, a mis compañeros residentes, a mis familiares y amigos, muchas gracias.

Agradecimientos a título personal

Cuando podemos decir que hemos concluido un proyecto, o haber logrado una meta, siempre es menester agradecer a los que nos dieron la oportunidad de adquirir un conocimiento, que nos permita servir a nuestros hermanos en cualquier lugar. En primer lugar a la UNAM y al Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", por ser mis centros de formación, que me han recibido con los brazos abiertos y en ningún momento me sentí un extranjero.

A mis padres y familia, quienes siempre con su apoyo me permitieron avanzar en este camino de la Medicina.

A todos los que han hecho que la estancia en este país sea más llevadera, al punto de poder decir que es mi segundo hogar, gracias a ustedes y gracias a México.

DEDICATORIA

A mis padres, por ser la base de cada logro y el máximo ejemplo a seguir,
A mis hermanos, Sofía y Esteban, por estar siempre conmigo, a pesar de la distancia,
A mis amigos Jorge, Alejandra y Fabio por ser una guía en el camino de la Medicina,
A Diana, por hacer que todo valiera la pena.

Contenido

Lista de figuras y cuadros.....	10
1. RESUMEN EN ESPAÑOL.....	12
2. RESUMEN EN INGLÉS (ABSTRACT).....	13
3. ANTECEDENTES.....	14
Cuadro clínico.....	14
Diagnóstico y clasificación.....	14
Epidemiología.....	17
Estratificación del riesgo.....	17
Factores previos al tratamiento.....	20
Factores post tratamiento.....	20
Tratamiento de la Leucemia mieloide Aguda.....	20
Pacientes refractarios y en recaída.....	22
Rol de FLT3 en Leucemia Mieloide Aguda.....	22
Papel del ABCB1 en la resistencia farmacológica.....	23
4. Planteamiento del problema.....	26
5. Justificación.....	27
6. Hipótesis.....	28
7. Objetivos.....	28
Principal.....	28
Secundarios.....	29
8. Metodología.....	29
Criterios de inclusión.....	29
Criterios exclusión.....	29
Criterio de eliminación.....	29
9. Definición de las variables.....	30
10. Procedimiento.....	31
Separación de mononucleares por ficoll-hypaque.....	31
Niveles de expresión de ABCB1.....	33
11. Resultados.....	34
12. Discusión.....	45
13. Conclusiones.....	49
14. Perspectivas futuras.....	49
Bibliografía.....	50

Lista de figuras y cuadros

Tabla 1. Clasificación de la Leucemia Aguda Mieloide por la OMS. 2016.

Tabla 2. Clasificación Morfológica de la Leucemia Aguda Mieloide (FAB).

Tabla 3. Estratificación pronóstica de la Leucemia mieloide aguda.

Tabla 4. Clasificación de las ATPasas ABC

Figura 1. Frecuencia y co-ocurrencia de mutaciones en pacientes con Leucemia aguda mieloide de reciente diagnóstico.

Figura 2. Verificación de la integridad del RNA en gel de agarosa al 2%.

Figura 3. Amplificación de la región JD del gen FLT3.

Gráfico 1. Distribución de pacientes por sexo.

Gráfico 2. Supervivencia global de los pacientes con leucemia aguda mieloide en el Hospital General de México.

Gráfico 3. Supervivencia de pacientes con Leucemia aguda mieloide dependiente de tratamiento.

Gráfico 4. Supervivencia de pacientes con LMA en el Hospital General de México. En azul menores de 60 años, en rojo mayores de 60 años.

Gráfico 5. Supervivencia libre de enfermedad de acuerdo a la expresión de ABCB1 en pacientes con LMA (en azul bajo-ausente; rojo expresión alta).

Gráfico 6. Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con LMA, de acuerdo a la expresión de FLT3. (En azul negativo, en rojo positivo).

Tabla 3. Análisis multivariado de las diferentes variables sobre la supervivencia

Tabla 4. Características generales de la población.

ABREVIATURAS

OMS: Organización Mundial de la Salud.

LMA: Leucemia mieloide aguda.

ABC B1: Gen ABC B1

FLT3: receptor-type tyrosine-protein kinase.

1. RESUMEN EN ESPAÑOL

Introducción: La leucemia aguda mieloide es una entidad heterogénea definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una proliferación anormal de precursores mieloides de tipo blástico que invade la médula ósea o tejidos extramedulares.

Aunque se han realizado múltiples avances en la comprensión de su fisiopatología y en la terapia, todavía sigue siendo una enfermedad devastadora y con pobre supervivencia global. Existen varios factores que permiten predecir la probabilidad de recaída, siendo los principales las alteraciones citogenéticas y moleculares, así como los polimorfismos.

Objetivos: el objetivo principal del estudio fue valorar la asociación de la expresión de las proteínas FLT3-ITD y ABCB1, y su relación con el resultado de los pacientes con Leucemia aguda mieloide.

Metodología: estudio de tipo prospectivo en 33 pacientes con diagnóstico de Leucemia Aguda mieloide, confirmados por morfología e inmunofenotipo, según los parámetros establecidos por la OMS. Mediante PCR se hizo la determinación de la presencia de la mutación FLT3-ITD así como de los polimorfismos de expresión de ABCB1, y posteriormente se realizó el análisis estadístico con el programa SPSS 20.0.

Resultados: Encontramos que la expresión de ABCB1 alto fue de 45%, mientras que la de FLT3-ITD fue del 12%; de los análisis estadísticos realizados se puede inferir que la expresión alta de ABCB1 se relaciona con una menor supervivencia a 40 meses en relación a los pacientes con expresión baja (normal) o nula de esta proteína. La expresión de FLT3-ITD fue ligeramente menor a la reportada en la mayoría de series latinoamericanas. Se requieren más estudios para poder validar estos hallazgos, así como la realización de estudios multicéntricos en población latinoamericana, con el objetivo de mejorar la supervivencia y la calidad de vida de estos pacientes.

2. RESUMEN EN INGLÉS (ABSTRACT)

Introduction: Acute myeloid leukemia is a heterogeneous entity defined by the World Health Organization (WHO) as an abnormal proliferation of blast-type myeloid precursors that invades the bone marrow or extramedullary tissues.

Although multiple advances have been made in understanding its pathophysiology and in therapy, it still remains a devastating disease with poor overall survival. There are several factors that allow predicting the probability of relapse, the main ones being cytogenetic and molecular alterations, as well as polymorphisms.

Objectives: the main objective of the study was to assess the association of the expression of the FLT3-ITD and ABCB1 proteins, and their relationship with the outcome of patients with acute myeloid leukemia.

Methodology: prospective study in 33 patients with a diagnosis of Acute Myeloid Leukemia, confirmed by morphology and immunophenotype, according to the parameters established by the WHO. Using PCR, the presence of the FLT3-ITD mutation was determined, as well as the expression polymorphisms of ABCB1, and later the statistical analysis was performed with the SPSS 20.0 program.

Results: We found that the expression of high ABCB1 was 45%, while that of FLT3-ITD was 12%; From the statistical analyzes carried out, it can be inferred that the high expression of ABCB1 is related to a lower survival at 40 months in relation to patients with low (normal) or null expression of this protein. The expression of FLT3-ITD was slightly lower than that reported in the majority of Latin American series. More studies are required to validate these findings, as well as the performance of multicenter studies in the Latin American population, with the aim of improving survival and quality of life in these patients.

3. ANTECEDENTES

La leucemia aguda mieloide (LAM) es una enfermedad clasificada de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) dentro del grupo de las neoplasias mieloides, cuya clasificación se muestra en la tabla 1.¹ Es el resultado de una secuencia de mutaciones somáticas en una célula hematopoyética multipotencial primitiva.² La exposición a radiación, a dosis altas de benceno, cigarrillo aumentan la incidencia de esta enfermedad. Un aumento en la proporción de casos se ha visto después de que un paciente con linfoma, un cáncer no hematológico, o una alteración autoinmune es expuesto a quimioterapia intensiva, especialmente con agentes alquilantes o inhibidores de la topoisomerasa II. La célula mutante hematopoyética adquiere las características de una célula madre capaz de auto renovación y diferenciación anormal. Tiene ventaja en el crecimiento y sobrevivencia en relación al resto de células de la médula ósea. Resultado de tal proliferación, la hematopoyesis normal es inhibida, y caen los niveles normales de células rojas, neutrófilos y plaquetas.³

Cuadro clínico

La anemia se refleja en debilidad, limitación del ejercicio, palidez; la trombocitopenia en hemorragias espontáneas, sobre todo de piel y membranas mucosas; la neutropenia y monocitopenia en infecciones, que generalmente no son graves al diagnóstico, pero a menudo se agravan por el progreso de la enfermedad o la quimioterapia intensiva.⁴

Diagnóstico y clasificación

El diagnóstico se basa en el conteo celular de sangre periférica y en el estudio de la médula ósea, encontrando células leucémicas o blastos utilizando la clasificación de la asociación Franco-Americano-Británica (FAB) (Tabla 1 y Tabla 2). El diagnóstico se confirma por inmunofenotipo en el que se encuentran ciertos clúster de diferenciación (ej. CD13, CD33). Ciertas alteraciones genéticas son frecuentes, incluidas t(8:21), t(15:17), inversión de 16 o t(16:16), trisomía 8, y deleciones de todo o parte del cromosoma 5 o 7. Se usa además marcadores moleculares de mutaciones comunes como NPM1, CEBPA, RUNX-1, FLT3, TET2, sobre todo para pronóstico.⁵

El tratamiento generalmente es con citarabina y un antracíclico (el denominado esquema 3+7), aunque otras drogas pueden ser añadidas o sustituidas en pacientes con pronóstico pobre, de la tercera edad, refractarios o en recaída. Una excepción es la leucemia promielocítica en la que el tratamiento se basa en ácido transretinoico, trióxido de arsénico y en ocasiones antraciclina.⁶

La probabilidad de remisión varía desde 80% en niños hasta menos del 25% en octogenarios. La probabilidad de cura desciende desde aproximadamente 50% en niños hasta prácticamente 0% en ancianos.⁷

Tabla 1. Clasificación de la Leucemia Aguda Mieloide por la OMS. 2016.

LMA, neoplasias precursoras relacionadas	
LMA con alteraciones genéticas recurrentes -LMA con t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 -LMA con inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 -LPA con PML-RARA (las anteriores definen LMA independientemente del porcentaje de blastos) -LMA con t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A -LMA con t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 -LMA con inv(3)(q21.3q26) o t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM -LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1 Entidad provisional: LMA con BCR-ABL1 -LMA con NPM1 mutado -LMA con mutación bialélica de CEBPA Entidad provisional: LMA con RUNX1 mutado	
LMA con cambios relacionados a mielodisplasia	
Neoplasias mieloides relacionadas a tratamientos (LMA-t)	
LMA no especificada (NOS): define LMA con > 20% de blastos -LMA con mínima diferenciación -LMA sin maduración -LMA con maduración -Leucemia mielomonocítica aguda -Leucemia monoblástica/monocítica aguda -Leucemia eritroide pura -Leucemia megacarioblástica aguda -Leucemia basofílica aguda -Panmielosis aguda con mielofibrosis	
Sarcoma mieloide	
Proliferaciones mieloides relacionadas con síndrome de Down -Mielopoyesis anormal transitoria (desorden mieloide transitorio) (TAM) -Leucemia mieloide asociada con síndrome de Down	
Leucemias agudas de linaje ambiguo -LA indiferenciada -LA con fenotipo mixto (MPAL) con t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 -LA con fenotipo mixto con t(v;11q23.3);con KMT2A reordenado -LA con fenotipo mixto B/Mieloide, NOS -LA con fenotipo mixto T/Mieloide, NOS	

Tabla 2. Clasificación Morfológica de la Leucemia Aguda Mieloide (FAB).

M0	Leucemia Aguda Mieloide indiferenciada.
M1	Leucemia Aguda Mieloide con maduración mínima.
M2	Leucemia Aguda Mieloide con maduración.
M3	Leucemia Aguda Promielocítica.
M4	Leucemia Mielomonocítica Aguda.

M4 eos	Leucemia Mielomonocítica Aguda con eosinofilia.
M5	Leucemia monocítica aguda
M6	Leucemia eritroide aguda.
M7	Leucemia megacarioblástica aguda.

Epidemiología

En adultos, la LMA tiene la tasa de incidencia más alta entre todas las leucemias y representa 80% a 90% de los casos de leucemia aguda. Se estima que 21.380 individuos (11 960 hombres y 9 420 mujeres) fueron diagnosticados con LMA y 10 590 murieron de LMA en los Estados Unidos en 2017. La LMA representa el 1.3% de todos los casos nuevos de cáncer y el 1.8% de todas las muertes por cáncer en Estados Unidos. El riesgo de por vida de LMA basado en las tasas desde 2012 hasta 2014 es aproximadamente 0.5% tanto en hombres como en mujeres.⁸

La incidencia de LMA aumenta con la edad, con una edad media de los pacientes de 67 años al diagnóstico. Es probable un aumento de la incidencia de LMA en los ancianos con el tiempo relacionado con una combinación de diagnóstico mejorado, reconocimiento de LMA por Síndrome Mielodisplásico, mayor supervivencia de los pacientes que reciben quimioterapia o radiación para tumores sólidos u otras neoplasias hematológicas y mayor esperanza de vida.⁹

La tasa de mortalidad en México para 2008 debido a leucemias (linfoide, mieloide, monocítica y otras) estimada por la Secretaría de Salud fue de 3.5 por cada 100,000 habitantes, mientras que Globocan reportó para 2012 una tasa de mortalidad ajustada por edad de 3.7 por cada 100,000 habitantes.⁴

Estratificación del riesgo

Los resultados en LMA son siempre heterogéneos, con factores atribuibles al paciente y a la enfermedad, por lo que una estadificación pronóstica adecuada es indispensable, ya que muchas veces deberemos escoger entre quimioterapia de consolidación vs Trasplante en primera remisión. Las categorías pueden variar y evolucionar según las terapias emergentes.

La estratificación se basa principalmente en la genética y estudios de biología molecular (Tabla 3).¹⁰

Al ser la Leucemia mieloide aguda una enfermedad heterogénea, los resultados han sido siempre insatisfactorios, en especial al valorar la supervivencia a largo plazo. Clásicamente la genética convencional ha sido la fuente de estratificación de riesgo en pacientes candidatos a tratamiento intensivo.

Aunque se han encontrado factores pronósticos en la citogenética, por ejemplo la t(8:21) como favorable, y un cariotipo complejo para riesgo desfavorable, es un hecho que los pacientes considerados de riesgo intermedio tienen resultados muy dispares. Esto hace de la clasificación molecular un arma importante en la estadificación y sobre todo la búsqueda de blancos terapéuticos tales como la midostaurina en pacientes expresores de FLT3-ITD.

Sin embargo, siendo una entidad que no depende de una sola mutación, sino de un complejo (y no siempre mutuamente excluyente) conjunto de alteraciones, que debe considerar sus asociaciones como un todo, lo que evidentemente hace que el tratamiento individualizado sea el objetivo a tener en cuenta para estos pacientes.

Tabla 3. Estratificación pronóstica de la Leucemia mieloide aguda.

Estratificación pronóstica de la Leucemia mieloide aguda			
	Favorable	Intermedio	Adverso
Citogenético	t(8:21) para RUNX1; iv(16) o t(16:16) para CBFβ-MYH11.	t(9:11) para MLL3-KMT2A, Cariotipo normal u otra anormalidad no clasificada como favorable o adversa.	t(6:9), t(9:22) para BCR-ABL1, inv(3) o t(3:3) para GATA2 y MECOM, -5 o del(5q), -7 y -17/abn(17p); cariotipo complejo y monosomía.
Molecular	NPM1 mutada sin FLT3-ITD, CEBPA	NPM1 mutada y FLT3-ITD, NPM1 no mutada	NPM1 no mutada con FLT3-ITD ^{alto} , RUNX1 mutado,

	mutado bialélico.	sin FLT3-ITD o con FLT3 ^{bajo} .	ASXL1 mutado, TP53.
--	-------------------	---	---------------------

En un estudio de 398 pacientes realizado en el Sloan Kettering Center, se identificaron mutaciones somáticas en el 97,3% de pacientes. De las mutaciones se encontró que FLT3-ITD, MLL-PTD, ASXL1 y PHF6 se asociaron a supervivencia global reducida. Se observó mayor heterogeneidad mutacional en pacientes con riesgo intermedio que en pacientes con riesgo favorable o desfavorable.³³

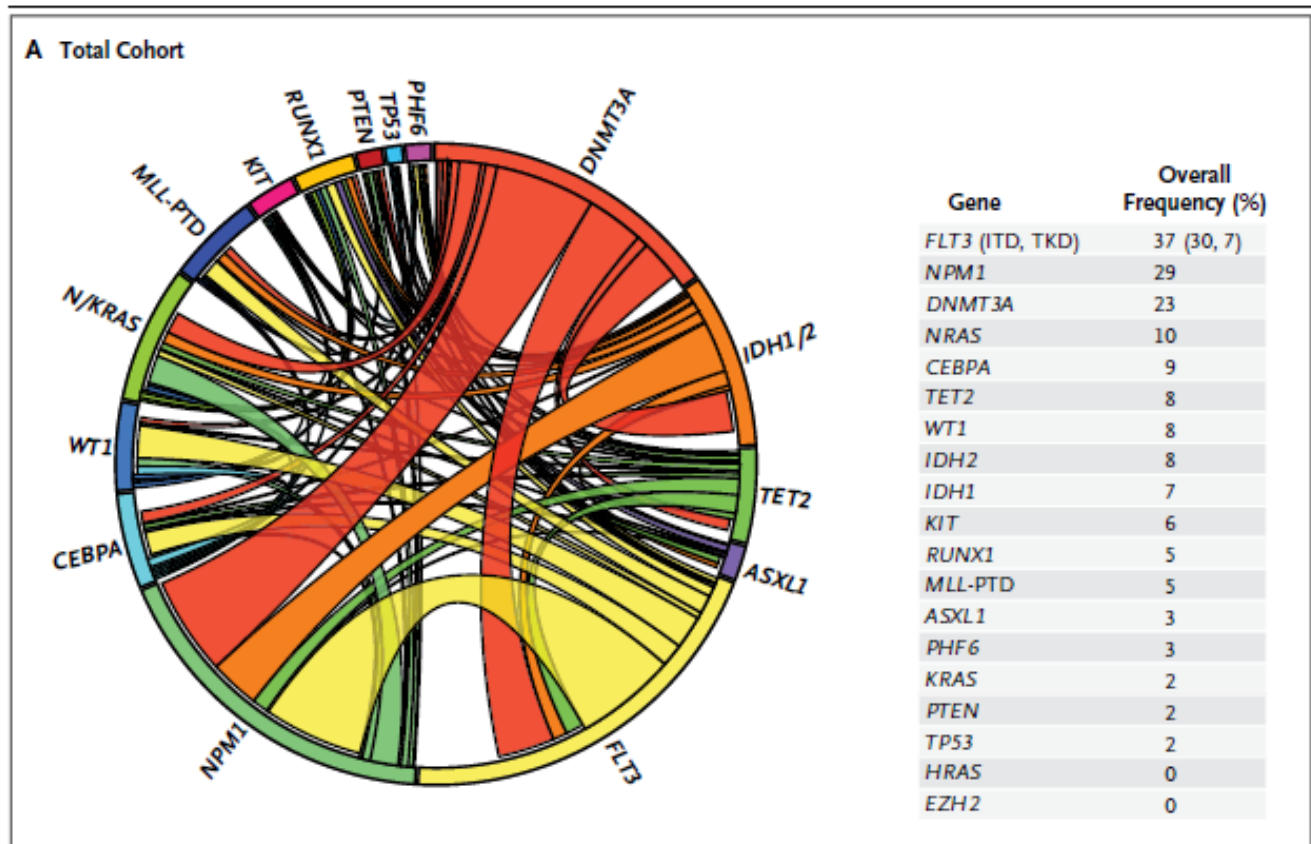


Figura 1. Frecuencia y co-ocurrencia de mutaciones en pacientes con Leucemia aguda mieloide de reciente diagnóstico. Tomado de The New England Journal of Medicine.

Factores previos al tratamiento

Se pueden dividir en factores relacionados en la capacidad del paciente de tolerar la quimioterapia y aquellos relacionados a la quimiosensibilidad o quimioresistencia de la enfermedad. Los factores relacionados al paciente incluyen edad avanzada, mal estado funcional y comorbilidades como diabetes o insuficiencia de algún órgano, lo que produce una alta mortalidad con terapia intensa. Sin embargo las terapias menos intensivas tienen menor tasa de remisión. ¹¹

Factores post tratamiento

La respuesta de un paciente a la terapia es un determinante crucial del resultado futuro²². La remisión completa medular se define como menos del 5% de blastos con recuperación de los elementos de la sangre periférica (neutrófilos >1.000, plaquetas >100.000) y sin evidencia de enfermedad extramedular. Una recuperación incompleta en sangre periférica se asocia a resultados menos favorables. Existen test más sensibles para la medición de Enfermedad mínima residual (EMR)¹², siendo éstos la citometría de flujo multiparámetro y PCR cuantitativo en tiempo real, ambos con sus ventajas y desventajas. Éstos se convierten en un nuevo criterio de respuesta, aunque hasta el momento no estandarizado.

En tanto la remisión parcial se define cuando se cumple determinación de blastos en médula ósea del 5 al 25 %, disminución del 50 % de blastos en médula ósea pretratamiento, conteo total de neutrófilos mayor a 1.000, conteo plaquetario mayor a 100.000.¹³

Tratamiento de la Leucemia mieloide Aguda

Los pacientes deben ser clasificados según su estado funcional y comorbilidades para tomar la decisión más adecuada en cuanto al tratamiento, sobre todo en pacientes mayores y

candidatos a trasplante hematopoyético, siendo muy importante también el soporte familiar y social.¹⁴

El tratamiento convencional con terapia citotóxica se divide en dos fases, inducción a la remisión y terapia post remisión (consolidación). La consolidación se administra después de que el paciente ha alcanzado remisión completa, su finalidad es retrasar o prevenir la recurrencia de la enfermedad y maximizar la posibilidad de cura.¹⁴

El régimen de inducción más común incluye el uso de citarabina y un antracíclico. La citarabina se incorpora al ADN durante su síntesis y solo es efectivo en células en fase S del ciclo celular. Las antraciclinas no dependen del ciclo celular y poseen potente actividad antimitótica y citotóxica, que se logra formando complejos con ADN, inhiben la actividad topoisomerasa II, la actividad de la ADN polimerasa, regulación de la expresión de genes, produciendo radicales libres.¹⁵

El régimen conocido como “3+7” se administra con una infusión continua de Citarabina a 100 a 200mg/m² en infusión continua, más la antraciclina intravenosa en bolos de manera diaria los primeros 3 días de citarabina. La antraciclina más comúnmente usada es la daunorrubicina a dosis de 30-90mg/m². En EEUU se demostró la superioridad del régimen con 90mg/m² vs 45mg/m² de daunorrubicina en esquema “7+3” sobre todo en pacientes con citogenética de riesgo intermedio.¹⁶

En ausencia de terapia post remisión la probabilidad de cura es aproximadamente 0%, con una media de recaída a los 6 meses. Por eso se continua el régimen con dosis altas de citarabina de 1000-3000mg/m² por 4-12 dosis. Estas dosis pasan la barrera hematoencefálica, ayudando a prevenir la recaída en sistema nervioso central. No se recomienda su administración en pacientes con depuración de creatinina menor a 40-45ml/min. La eficacia de este régimen también es variable de acuerdo al riesgo citogenético, siendo de 78% de pacientes aun en remisión a los 5 años en los del grupo favorable, 40% en el grupo de cariotipo normal, y 21% en los que tienen otras anormalidades.¹⁷

En pacientes no aptos para terapia intensiva, se han desarrollado varios agentes, entre ellos los inhibidores de la DNA metiltransferasa, decitabina y azacitidina. Decitabina es eficaz y ha sido bien tolerada, con dosis de 20mg/m² intravenoso cada día por 5 días con ciclos cada 4 semanas. Se continúa hasta la progresión o aparición de efecto adverso. Tiene una tasa de RC de 24%. Azacitidina también tiene eficacia en esta enfermedad, con dosis de 75mg/m² por 7 días, SC, cada 4 semanas, de la misma manera que decitabina, hasta la progresión de la enfermedad.¹⁸

Se puede usar además citarabina en dosis bajas, y guadecitabina, un nuevo agente hipometilante, aún en fase de estudios.¹⁸

Pacientes refractarios y en recaída

El tratamiento para pacientes refractarios y en recaída es uno de los retos más grandes de la oncología. Los resultados de estos pacientes son extremadamente pobres, con supervivencia global de no más del 10% a 3 años.¹⁹ En pacientes considerados fit, un esquema de quimioterapia intensiva con el objetivo de lograr una segunda remisión y llevarlos a trasplante alogénico es aceptable, pero la supervivencia a largo plazo es aun baja, por la falla en lograr la respuesta necesaria para lograr este “puente a trasplante”. Esto principalmente por comorbilidades, edad, toxicidad residual, falta de un donador y otros factores. Se pueden ofrecer otras terapias de baja intensidad, pero en la mayoría de casos se consideran como paliativas. En los últimos años se han aprobado nuevos agentes, sobre todo del tipo de terapias dirigidas como Gentuzumab ozogamicina, el inhibidor de FLT3 midostaurina, decitabina, guadecitabina, etc.²⁰

Rol de FLT3 en Leucemia Mieloide Aguda

En el 30% de pacientes de reciente diagnóstico de Leucemia aguda mieloide se detecta una mutación en el gen de esta cinasa de tirosina. Tres cuartos de estos pacientes tienen la mutación ITD (Internal tandem duplication), que resulta de la duplicación de entre 3 y 100 aminoácidos localizados en la región yuxtamembranal³¹. Ésta se asocia a peor pronóstico debida a una alta tasa de recaída sobre todo cuando hay una expresión elevada de alelos mutados y “wild type”. El 8% de pacientes tienen una mutación a nivel del TKD (tyrosine kinase domain) aunque el efecto de esta mutación es aún incierto. Estas mutaciones incrementan la proliferación mieloide, produciendo neoplasias fatales en modelos roedores.²¹

Midostaurina, un inhibidor de cinasa de tirosina, administrado por vía oral, en una dosis de 50mg dos veces al día, a partir del día 8 de inducción y consolidación, ha demostrado mejorar de manera significativa la supervivencia global y supervivencia libre de evento en pacientes con LMA que expresan la mutación FLT3. Los principales eventos adversos son anemia, náusea, neutropenia, que son mayores a los observados con la quimioterapia estándar.²²

Papel del ABCB1 en la resistencia farmacológica

Una de las funciones celulares fundamentales es el paso de sustancias a través de su membrana, siendo uno de los mecanismos el transporte activo, es decir contra un gradiente de presión, proceso en el cual se utiliza ATP. Existen 4 tipos de bombas que utilizan ATP conocidas como bombas ATPasas. Dentro de estas, la familia ABC constituye la más grande de los transportadores de membrana.²⁶

El término ABC deriva de “ATP binding cassette”, existiendo en humanos 49 genes para esta familia. Estas ATPasas bombean de forma unidireccional o vectorial aminoácidos, péptidos, proteínas, iones, lípidos, sales biliares, compuestos hidrófobos, incluyendo medicamentos, fuera de la célula contra un gradiente de concentración.²⁶

Las proteínas producidas por estos genes son esenciales para algunos procesos de absorción y eliminación de fármacos, además las mutaciones de algunos de ellos se asocian a enfermedades como por ejemplo la fibrosis quística. Se han caracterizado también polimorfismos en estos genes que pueden conducir a resistencias farmacológicas y limitar tratamientos posteriores.^{27,30}

Las ATPasas de tipo ABC tienen 4 dominios, 2 son proteínas de membrana y 2 están en la cara citoplasmática de la membrana. Los dos dominios transmembrana tienen 6 segmentos que forman el canal de paso de solutos. Los otros dos se unen a ATP y acoplan su hidrólisis al proceso de transporte. Estos transportadores se subdividen en 7 clases o subfamilias (Tabla 4)²⁷:

Se han encontrado 3 proteínas que están implicadas principalmente en la resistencia farmacológica, sobre todo antitumorales²⁸:

- Glicoproteína P (gpP), relacionada con subfamilia ABCB1.
- Proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos (Mrp), relacionada con la ABCC2.
- Proteína asociada a resistencia en cáncer de mama (Bcrp) relacionada con ABCG2.

Tabla 4. Clasificación de las ATPasas ABC

ABCA	tiene 12 miembros
ABCB	tiene 11 miembros
ABCC	tiene 13 miembros
ABCD	tiene cuatro miembros
ABCE	tiene un miembro
ABCF	tiene tres miembros
ABCG	tiene cinco miembros

En este caso nos concentraremos en la resistencia a fármacos antitumorales, siendo que la mayoría de los tumores termina teniendo cierto grado de resistencia a estos fármacos. Puede ser por mecanismos intracelulares o extracelulares, aunque en este caso el principal

mecanismo es la expulsión del fármaco hacia la matriz extracelular. Las proteínas relacionadas son las siguientes²⁸

- Glicoproteína P: proteína de membrana codificada por el gen ABCB1, se localiza en el cromosoma 7. Su expresión determina resistencia a: alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, taxanos y antraciclinas.
- Las proteínas MRP codificadas por ABCC2, se subdividen en varios tipos con resistencias específicas según cada uno, por ejemplo vincristina, cisplatino, etopósido, doxorubicina, metotrexato.
- El Bcrp, codificado por ABCG2 confiere elevada resistencia a fármacos diferentes, pueden bloquear a imatinib, dasatinib, nilotinib, además inhibidores de topoisomerasas (antracíclicos).

En el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” se han realizado previamente estudios sobre la expresión de genes de la familia ABC, tanto en Leucemia Aguda Linfocítica como mielocítica, en los que se ha demostrado que la presencia de actividad de estas proteínas y la carga de la misma (ABCB1), tiene un efecto negativo sobre la respuesta a tratamiento, esto debido a la actividad de bomba de estas proteínas, que estimula la salida del fármaco del ambiente intracelular, lo que limita o directamente impide su acción, siendo sobreexpresado el ABCB1 en hasta el 50% de pacientes con LLA. En estos pacientes se observó una diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia global a 40 meses, comparando entre los que tuvieron una alta expresión del gen con los que no lo expresaban ($p < 0.05$), siendo que hasta el 78% de pacientes del estudio que lo expresaban fallecieron. Sin embargo, los que no lo expresaban, fallecieron apenas 21%.^{33,34}

Como conclusión podemos argumentar que los polimorfismos de esta familia de proteínas puede llevar a la resistencia farmacológica de múltiples sustancias fundamentales en el tratamiento oncológico, de ahí la importancia de su estudio.²⁸

4. Planteamiento del problema

A diferencia de otras neoplasias hematológicas, el pronóstico de la Leucemia Mieloide Aguda es aún adverso, esto en gran medida a la combinación tanto de mecanismos de resistencia a los diferentes fármacos, una ventaja proliferativa sobre el resto de precursores hematopoyéticos y finalmente por mecanismos para la evasión de la apoptosis. Esto contribuye a que a pesar de que los pacientes cuenten con un estado funcional adecuado, una citogenética de buen pronóstico y una respuesta a las 4 semanas, muestren recaídas tempranas y menos del 20% de los casos aún estén vivos a 5 años de seguimiento. Entre los principales mecanismos de resistencia a fármacos se encuentra la expresión de bombas de flujo en la membrana de las células leucémicas, dentro éstas se encuentran la Glicoproteína P codificada por el gen de resistencia a drogas ABCB1, su sobreexpresión ya ha sido identificada como un factor de riesgo independiente de mal pronóstico en diversos tipos de leucemia incluyendo la Leucemia Mieloide Aguda. Su sobreexpresión es variable, abarcando cerca de un tercio de los casos de leucemias de novo, independiente tanto del tipo morfológico como de la citogenética. Desde hace una década la citogenética convencional ha permitido brindar una estratificación a los casos de leucemia aguda mieloide, desafortunadamente

aquellos casos con citogenética normal muestran un comportamiento impredecible ya que en la mayoría su pronóstico es adverso, actualmente se sabe que esto es debido a alteraciones moleculares que son independientes de cualquier alteración cromosómica, entre ellas la activación de la Tirosina cinasa FLT3 (del inglés FMS like tyrosine kinase). Estos marcadores han cobrado mucho interés en los últimos años, logrando desarrollar diferentes fármacos inhibidores de FLT3, pero debido a su costo y a su desarrollo aun no son una opción terapéutica para la mayor parte de la población.

5. Justificación

La Leucemia Mieloide Aguda es una enfermedad cuyas características cambian por completo el estilo de vida de los pacientes, y en la cual el tratamiento ha permanecido invariable por décadas, sin embargo las investigaciones recientes a nivel mundial han logrado encontrar nuevos objetivos terapéuticos que permiten mejorar la tasa de supervivencia en estos pacientes. Debido a que solo un tercio de los casos mostrará una respuesta favorable con sensibilidad a las diferentes combinaciones de quimioterapia es necesario identificar diferentes factores de riesgo que permitan identificar a aquellos pacientes los cuales mostrarán una falla terapéutica temprana y finalmente puedan beneficiarse por una estrategia más específica como lo es el trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico. Hasta el momento diversos factores biológicos como es la expresión de la cinasa FLT-3 o la sobreexpresión del gen ABCB1 se han identificado como factores de riesgo aislados tanto para refractariedad como para recaída temprana, pero al momento no se cuentan con estudios los cuales combinan diferentes biomarcadores cuya función biológica es distinta con la finalidad de predecir la respuesta al tratamiento.

Por lo tanto, es importante que se inicie con la búsqueda y registro de las mutaciones de FLT3 ITD y ABCB1 en pacientes con diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda y que en un futuro podamos relacionar estos datos con el éxito o fracaso del tratamiento en pacientes con cariotipo normal.

6. Hipótesis

La leucemia aguda mieloide es una de las primeras causas de mortalidad en hematología, a diferencia de la Leucemia aguda linfocítica, tiene una tasa de supervivencia a la inducción de 80% vs 60% y a los 6 meses bajan aún más estos porcentajes.

Esto se debe a que existen múltiples mecanismos de resistencia al tratamiento como producción de cinasas de tirosina, producción de glucoproteína P (resistencia a fármacos), que mantienen la proliferación.

De manera individual cada uno de estos factores ha tenido valor pronóstico de respuesta a tratamiento, por lo que se establece la siguiente hipótesis:

La determinación positiva de FLT3 y ABCB1 influye de manera negativa en el pronóstico de pacientes con Leucemia Aguda Mieloide con cariotipo normal.

7. Objetivos

Principal

- Identificar la asociación de la combinación de 2 factores de riesgo biológico en el pronóstico a corto plazo en el tratamiento en leucemia mieloide aguda durante 6 meses.

Secundarios

- Identificar el valor pronóstico de cada uno de los marcadores biológicos sobre el riesgo de refractariedad o recaída a corto plazo.

8. Metodología

Tipo y diseño de estudio

Este es un estudio prospectivo, observacional, longitudinal y analítico.

Se realizó en pacientes con Leucemia Mieloide aguda con cariotipo normal, para evitar la variación pronóstica dependiente de citogenética.

Todos los pacientes continuaron su seguimiento en hospitalización y consulta para monitorización de recaída, efecto adverso o muerte.

Población

El estudio contó con la participación de 33 pacientes, quienes cumplieron con los criterios de inclusión (teniendo en cuenta la contingencia por COVID-19).

Criterios de inclusión
<ul style="list-style-type: none">• Pacientes con diagnóstico de Leucemia aguda mieloide de novo acorde a los criterios morfológicos y corroborados por citometría de flujo que cuenten con estudio de citogenética normal
<ul style="list-style-type: none">• Pacientes mayores de 18 años y menores a 65 años
<ul style="list-style-type: none">• Estado funcional óptimo para inicio de tratamiento (ECOG:0 o 1)
<ul style="list-style-type: none">• Pacientes que se encuentren en recaída a médula ósea y que sean candidatos a reiniciar esquema de quimioterapia• Que cuenten con consentimiento informado
Criterios exclusión
<ul style="list-style-type: none">• Pacientes con leucemia aguda mieloide M3 (Promielocítica).
<ul style="list-style-type: none">• Pacientes referidos a la institución ya en remisión para continuar su tratamiento
<ul style="list-style-type: none">• Pacientes con infiltración a sitios extramedulares como sistema nervioso central, hígado, pleura, pericardio
<ul style="list-style-type: none">• Portador de enfermedad renal crónica asociada
<ul style="list-style-type: none">• Insuficiencia hepática crónica CHILD-B o mayor
Criterio de eliminación
<ul style="list-style-type: none">• Pacientes los cuales no cuentan con registros clínicos en la institución y no se cuente con

datos suficientes para su seguimiento

- Casos que no cuenten con material biológico suficiente para la extracción de las células mononucleares para la prueba de reacción de cadena de polimerasa

9. Definición de las variables

VARIABLES

Variable dependiente.		
Nombre de la variable	Tipo de Variable	Medición
Supervivencia Pacientes quienes se mantuvieron vivos al final del seguimiento.	Cualitativa dicotómica	0) Vivo. 1) Muerto.
Nombre de la variable	Tipo de Variable	Medición
Recaída Presencia durante el seguimiento de actividad leucémica (>10% de blastos en MO) en cualquier momento.	Cualitativa dicotómica	0) Ausente 1) Presente.
Nombre de la variable	Tipo de Variable	Medición
Respuesta Pacientes los cuales al final del tratamiento de inducción integraran remisión completa definida por la normalización de la Hemoglobina, plaquetas y leucocitos	Cualitativa dicotómica	0) En Remisión 1) Falla de Tratamiento

VARIABLES INDEPENDIENTES

Nombre de la variable	Tipo de Variable	Medición
Expresión de FLT3. Determinación por reacción en cadena de polimerasa de FLT3 en la muestra analizada de cada paciente.	Cualitativa dicotómica	0) Ausente 1) Presente

Expresión de ABCB1. Determinación por reacción en cadena de polimerasa de ABCB1 en la muestra analizada de cada paciente.	Cualitativa dicotómica	0) Expresión normal o ausente 1) Expresión aumentada
Nombre de la variable	Tipo de Variable	Medición
Edad Edad cumplida en años al momento del diagnóstico	Cualitativa continua	0 en adelante
Edad estratificada Se analizaron los casos acorde a diferentes estratos de edad	Cualitativa ordinal	0) 18 a 35 1) 35-50 2) >50
Situación clínica Se clasificó a los pacientes acorde a la situación clínica de su diagnóstico	Cualitativa nominal	0) De novo 1) Recaída

10. Procedimiento

Para el procesamiento de las muestras de pacientes con diagnóstico reciente de Leucemia aguda mieloide realizado en la Unidad 204, se llevó a cabo el siguiente proceso:

Separación de mononucleares por ficoll-hypaque

Se tomaron 3 ml de Médula ósea (jeringa heparinizada) y/o 2 tubos de sangre periférica (tubos de EDTA) para la obtención de células mononucleares y fueron transportadas a la U-204 para el estudio

Las muestras se mezclaron en una proporción 1:1 suavemente con solución de fosfatos PBS 1X o bien con solución salina 0.14 M de NaCl (0.9%). Una vez homogenizadas las muestras se emplea Ficoll-Hypaque o solución lítica para su separación (Lymphoprep, Nycomed Pharma AS, densidad 1.077 g/l), utilizando aproximadamente 1/3 del volumen total de sangre o médula ósea. Posteriormente se almacenan a -70°C hasta su uso.

Se obtuvo el DNA y RNA utilizando DNazol y TRIZOL según las condiciones del proveedor. Una vez extraídos son cuantificados y visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% a voltaje constante de 60 volts durante 35 minutos. Para observar el gel se observó el transiluminador UV (High Performance, UV Transilluminator UVP).

Verificación de la integridad del material genético

Se realizó un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 2% del RNA total extraído a partir de leucocitos aislados de AMO/SP para corroborar su integridad y calidad, verificando la presencia de las bandas correspondientes a las subunidades 18S y 28S del RNA ribosomal (figura 2).

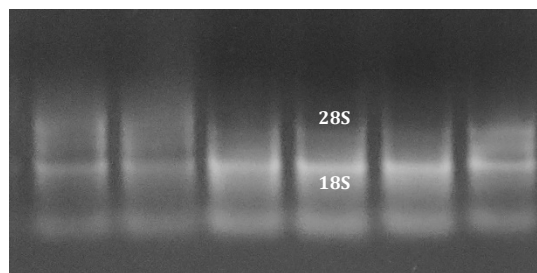


Figura 2. Verificación de la integridad del RNA en gel de agarosa al 2%.

Síntesis de cDNA

Se llevó a cabo la síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir de 2,000ng de RNA extraído. Se utilizó Oligo dT junto con la enzima retro-transcriptasa del virus de leucemia murina de Moloney (MMLV-RT).

Detección de inserciones ITD en el gen FLT3

La detección de inserciones en la región ITD se llevó a cabo a través de la amplificación por RT-PCR del dominio yuxtamembranal (JD), en los exones 14 y 15 del gen FLT3. Se utilizaron

los primers: 5'-GTCGAGCAGTACTCTAAACA-3' (forward), y 5'-ATCCTAGTACCTTCCCAAATC-3' (reverse), dando como resultado un producto de 366pb. La presencia de una inserción mayor a 3pb tuvo como resultado la detección de una banda correspondiente a la secuencia no mutada (*wild type*), de 366pb, y una banda de mayor longitud, correspondiente a una inserción contenida en la secuencia detectada (figura 3).



Figura 3. Amplificación de la región JD del gen FLT3. Carriles 1 – 3: banda de 366pb, correspondiente al fragmento wild type de la región JD. Carril 5: banda de 366pb + banda de mayor tamaño, correspondiente a una inserción tipo ITD en la región JD.

Niveles de expresión de ABCB1

Para la cuantificación del gen ABCB, se utilizó el cDNA a una concentración de 2 µg/µl, con la sonda Hs00184500 m1 Las muestras se realizaron por triplicado. Se realizó la cuantificación relativa por medio de $\Delta\Delta C_t$ en el equipo StepOne™, (Applied Biosystems® Life Technologie).

Niveles de expresión de FLT3-ITD

La mutación de FLT3-ITD fue detectada mediante oligos específicos para la región según (Bianchini), se utilizará 150 ng/µl, realizando una amplificación de PCR a un volumen final de 10ul; y 0.2U de Taq Polimerasa. Posterior a la reacción los productos fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

Características de los pacientes

Se incluyeron 33 pacientes, siendo 20 de sexo masculino (59%) y 13 femenino (41%), como se observa en el gráfico 1.

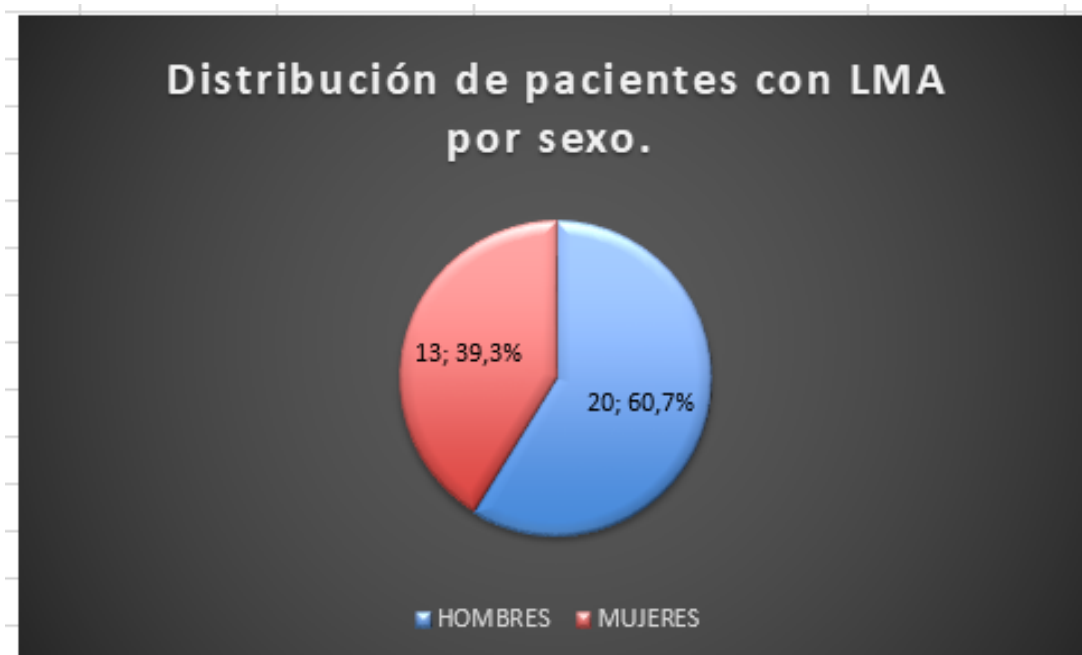


Gráfico 1. Distribución de pacientes por sexo.

11. Resultados.

Se estudiaron un total de 33 pacientes con diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda de novo. En su mayoría, los pacientes correspondieron al género masculino (n=20, 60.6%), con una

media de edad de 49 años (18 a 82 años), siendo ligeramente mayor para el género masculino [51 años (26 a 79 años) versus 46 años (18 a 82 años)] pero sin ser esta diferencia significativa ($p=0.443$, 95% IC). Un 30.3% ($n=10$) de los casos contó con edad superior a los 60 años, en su mayoría casos del género masculino ($n=8$, 80%).

Lugar de origen: La mayoría de los pacientes es originario del Estado de México o área metropolitana ($n=13$, 39.4%), seguido de los habitantes de la Ciudad de México ($n=7$, 21.2%), Veracruz ($n=3$, 9.1%), origen no registrado en 4 casos y un caso (3%) para los Estados de Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Oaxaca. Al estratificar el lugar de origen el 60.6% ($n=20$) era originario de la Ciudad de México o área metropolitana.

Factores de riesgo: Dentro de sus antecedentes un 23.5% ($n=8$) refirió una exposición significativa a agentes mielotóxicos, en su mayoría en individuos del género masculino ($n=5$, 62.5%). Al analizar la edad con la exposición a mielotóxicos tampoco se reportó una asociación significativa ($p= 0.630$, 95% IC). Dentro de las comorbilidades, el 14.7% ($n=5$) era portador de Diabetes Mellitus, 17.6% ($n=6$) Hipertension arterial sistémica y solo un caso (2.9%) contó con enfermedad renal asociada.

Características al diagnóstico.

El síndrome anémico y hemorrágico fueron las principales manifestaciones al diagnóstico, solo un 12.1% ($n=4$) mostraron hepatomegalia y un 6.1% ($n=2$) esplenomegalia al diagnóstico. No se registró infiltración en encías, piel o afectación al sistema nervioso central. Ningún paciente contó con crecimientos ganglionares o enfermedad extramedular al diagnóstico. La media del conteo de leucocitos al diagnóstico fue de $35.8 \times 10^3/\text{mcl}$ ($0.5- 163 \times 10^3/\text{mcl}$), de hemoglobina (6.7g/dl, 2.6-10.6g/dL) y plaquetas de $39.1 \times 10^3/\text{mcl}$ ($2-167 \times 10^3/\text{mcl}$). Un 9.1% de los casos ($n=3$) contaron con elevación de transaminasas 2 veces el límite superior al diagnóstico.

Evaluación morfológica.

Las características morfológicas se realizaron acorde a los criterios de la asociación Franco-Américo-británica. Acorde al tipo morfológico, la mayor parte de los casos fueron de tipo Mielomonobásica (variante M4) no eosinofílica (n=19, 57.6%), seguido del tipo mieloide con diferenciación tipo M2 (n=11, 33.3%) y tipo M1 (n=2, 6.1%). Solo se registró un caso de eritroleucemia (variante M6). Al conjuntar los subtipos de leucemia, el 39.4% (n=13) se trataron de un componente exclusivamente mieloide y el 60.6% (n=20) a un componente mielomonocitoide.

Alteraciones citogenéticas y moleculares.

Del total de los casos, un tercio no contó con crecimiento en su estudio citogenético, siendo el hallazgo más frecuente el cariotipo de tipo normal (n=20, 60.6%). Las alteraciones restantes fueron un cariotipo complejo en un caso (3%), poliploidia y una alteración en el CBF (core-binding factor, t(8;21). La presencia de la duplicación interna en tándem del FLT3 se presentó en 12.1% de los pacientes (n=4), esta mutación se registró de manera más frecuente en individuos con cariotipo normal (n= 3, 15% de los cariotipos normales) y en un caso en donde no se desarrolló el estudio citogenético. La edad promedio de los individuos con mutación positiva fue de 40 años (rango de 29-44 años), siendo esta diferencia no significativa (p=0.263, 95%IC). La distribución de los casos acorde al tipo de leucemia mieloide fue semejante, siendo la mitad (n=2) para variantes con componente mieloide exclusivo y la otra mitad para variantes monocitoide. Esta distribución también fue semejante para el género (2 casos por género). La media de leucocitos en los individuos con FLT-3 ITD fue ligeramente menor (32 x 10³/mcl, 26 - 45 x 10³/mcl), pero sin relevancia estadística (p=0.645, 95% IC).

Expresión del gen ABCB1.

Acorde a la expresión, los pacientes se dividieron en tres tipos, aquellos con expresión alta del gen, expresión ausente y expresión baja, esta última es la que se encuentra en individuos sanos. La expresión alta se encontró en un 45.5% (n=15), mientras que la expresión ausente en un 36.4% (n=12) y solo un 18.2% (n=6) contaron con una expresión baja. Acorde al tipo morfológico, los casos con leucemia con componente monocitoide mostraron una tendencia de sobre-expresión del gen (n=11, 73.3%) mientras que, en el grupo con expresión baja, la mayor parte correspondieron a leucemias de componente mielóide puro (83.3%, n=5). En cuanto a la expresión ausente en su mayoría fueron casos de tipo monocitoide (66.7%, n=8). La media de edad de los individuos con sobreexpresión fue de 49 años (18-75 años), 42 años para los individuos de expresión baja (27-55 años) y 52 años (20-82 años) para los individuos de expresión ausente. En cuanto a la asociación con FLT3 ITD, la mayor parte de los individuos con FLT3 ITD se asociaron con la expresión baja (75%, n=3), solo un caso de FLT3 ITD se asoció con la expresión alta. Al analizar los pacientes acordes si cuentan o no con alteración en la expresión (expresión alta o ausente vs expresión baja) con la expresión de CD117 (receptor de c-kit) tampoco se demostró una asociación significativa (p=0.510, 95% IC). La asociación de la sobre-expresión del gen ABCB1 con las variables de mal pronóstico se describen en la Tabla 2.0

Respuesta al Tratamiento

La mayoría de los pacientes (63.6%, n=21) recibieron como esquema de tratamiento el esquema 7+3 como inducción y dosis altas de Citarabina como esquema de consolidación, solo un 36.4% (n=12) recibieron esquemas de intensidad reducida como Citarabina subcutánea o soporte transfusional. De los pacientes que recibieron un tratamiento intensivo, el 42.9% (n=9) fueron refractarios al tratamiento. De la proporción de pacientes refractarios al tratamiento de inducción, al analizar los individuos con FLT3 ITD (n=2), la mitad fueron refractarios al tratamiento, en cuanto a la expresión de CD117+, la refractariedad de del 33.3%

(n=3, p=0.405), en cuanto a los individuos que recibieron el esquema 7+3 (menores de 60 años), la refractariedad se registró en 39.1% (n=9). Al analizar a respuesta acorde a la alteración en FLT3 ITD o la expresión (alta o ausente) de ABCB1, esta no mostró una asociación significativa con la respuesta (p=0.533, 95%IC). Al analizar la respuesta acorde al lugar de origen, una mayor proporción correspondieron a individuos de provincia (46.2%) a diferencia de los originarios de la Ciudad de México en donde un 33.3% (n=3) fueron refractarios, pero sin ser de relevancia estadística (p=0.60, 95% IC).

Recaída: Un total de 30.3% de los pacientes presentaron una recaída (n=10), en cuanto el origen, semejante a la respuesta al tratamiento el 46.2% (n=6) no eran originarios de la Ciudad de México, debido a que los pacientes con tratamiento de intensidad reducida solo recibieron dosis de Citarabina subcutáneo, todos los individuos que recayeron se encontraban en tratamiento con esquema 7+3 y consolidación con dosis altas de Citarabina. En cuanto a las alteraciones moleculares la mitad de los individuos FLT-3 ITD (n=2) presentaron una recaída, mientras que los pacientes con afectación en la expresión del gen ABCB1 (Ausente o Alto) de todos los individuos que recayeron el 80% contó con alguna alteración en la expresión del gen, pero al analizar la proporción acorde al nivel de expresión, el 50% de los pacientes en recaída (n=5) mostraron una sobreexpresión del gen, 3 individuos contaron con expresión ausente y solo 2 contaron con niveles bajos.

Supervivencia. La media de seguimiento fue 158 días (2-501 días), alcanzando la media de supervivencia a los 200 días posterior al inicio de tratamiento. La supervivencia global esta fue del 30% a 18 meses de seguimiento (Figura 2). Al analizar el impacto de diferentes variables sobre la supervivencia se identificó que el tipo de tratamiento impactó significativamente sobre la supervivencia (Log Rank: 0.000) (Figura 3), la edad superior a 60 años también se asoció con el pronóstico (Log Rank: 0.000) (Figura 4). Dentro de las variables asociadas a la leucemia,

el tipo de leucemia (Mieloide vs Monocitoide) no mostró un impacto significativo (Log Rank: 0.624), al igual que el conteo de leucocitos por encima de $50 \times 10^3/\text{mcl}$ (Log Rank: 0.780) o la presencia de la mutación de FLT3 (Log Rank: 0.702). Al combinar todos los genotipos de expresión del gen ABCB1 (bajo, ausente o expresión alta) no se encontró una diferencia significativa sobre la supervivencia (Log Rank: 0.087), pero al combinar la expresión del gen (bajo plus ausente versus expresión alta) los pacientes con expresión alta mostraron menor supervivencia (Log Rank: 0.028) (Figura 5).

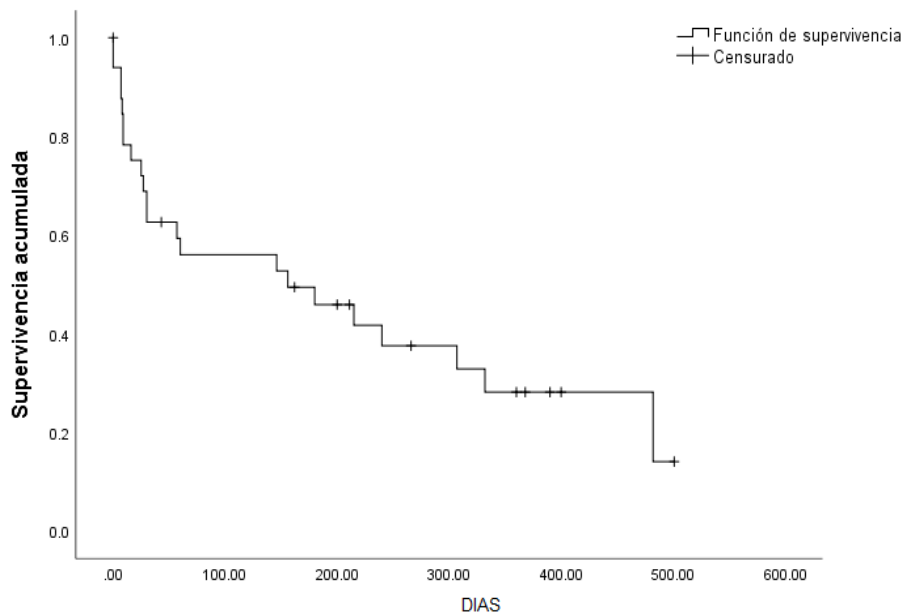


Gráfico 2. Supervivencia global de los pacientes con leucemia aguda mieloide en el Hospital General de México.

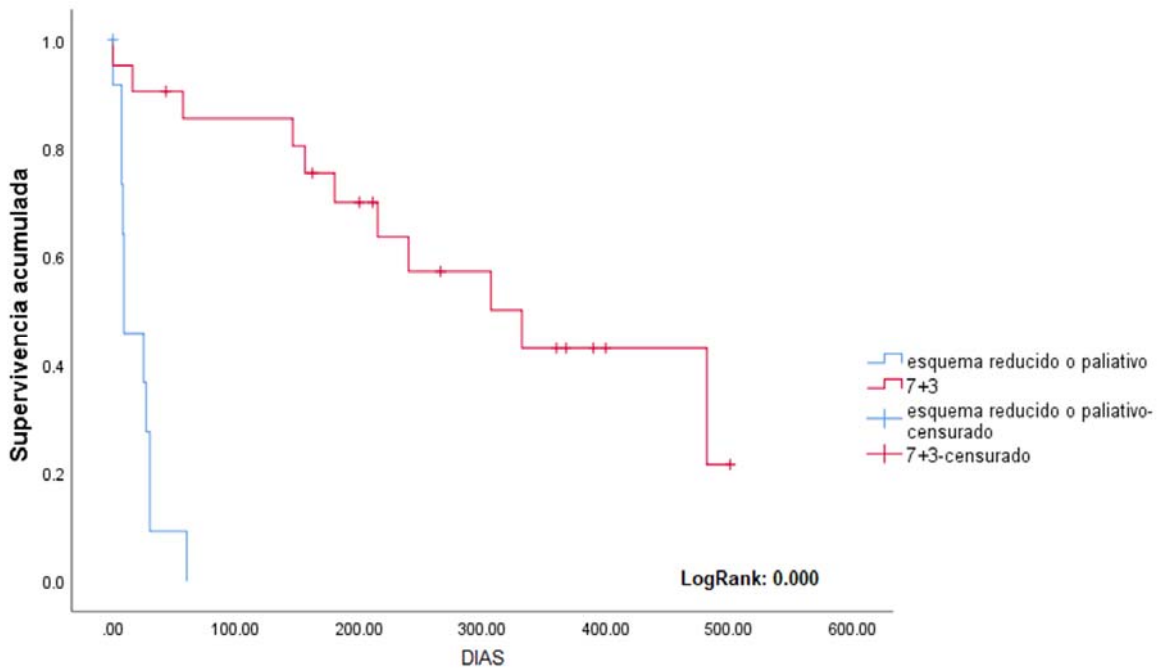


Gráfico 3. Supervivencia de pacientes con Leucemia aguda mieloide dependiente de tratamiento.

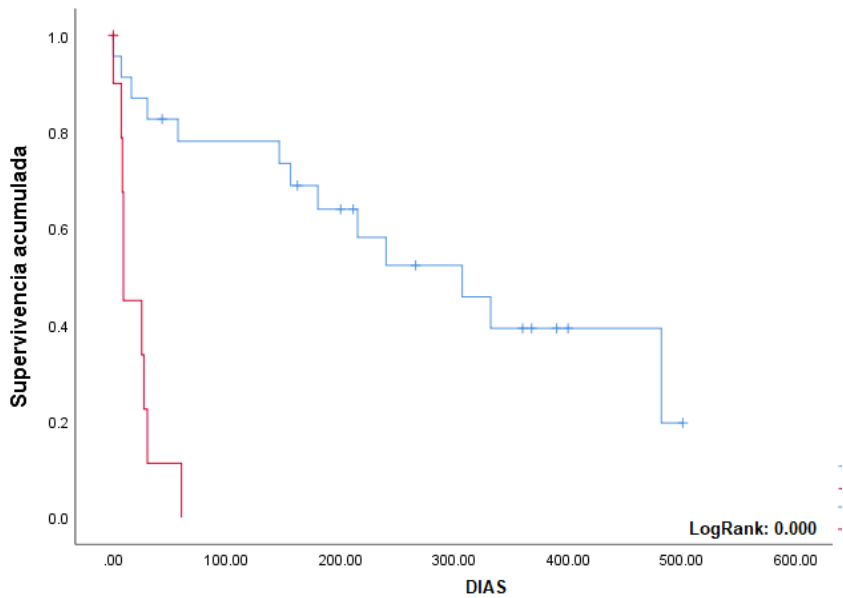


Gráfico 4. Supervivencia de pacientes con LMA en el Hospital General de México. En azul menores de 60 años, en rojo mayores de 60 años.

Supervivencia libre de enfermedad (SLE). La media de SLE fue de 158 días (0-501 días), al analizar el impacto de las diferentes variables sobre la supervivencia, tanto el tipo morfológico (Log Rank: 0.856) como el conteo de leucocitos al diagnóstico (Log Rank: 0.075) no impactaron con el resultado. Al analizar la expresión del gen ABCB1 al combinar la expresión del gen (Alto o ausente versus expresión baja) no se mostró un impacto significativo sobre la supervivencia libre de enfermedad (Log Rank: 0.833). También al analizar el efecto de la mutación ITD en FLT3, su expresión no mostró un impacto sobre la supervivencia (Log Rank: 0.834). La supervivencia libre de enfermedad acorde a la expresión del gen ABCB1 o la presencia de la mutación FLT3 ITD se describen en la Figura 5 y Figura 6.

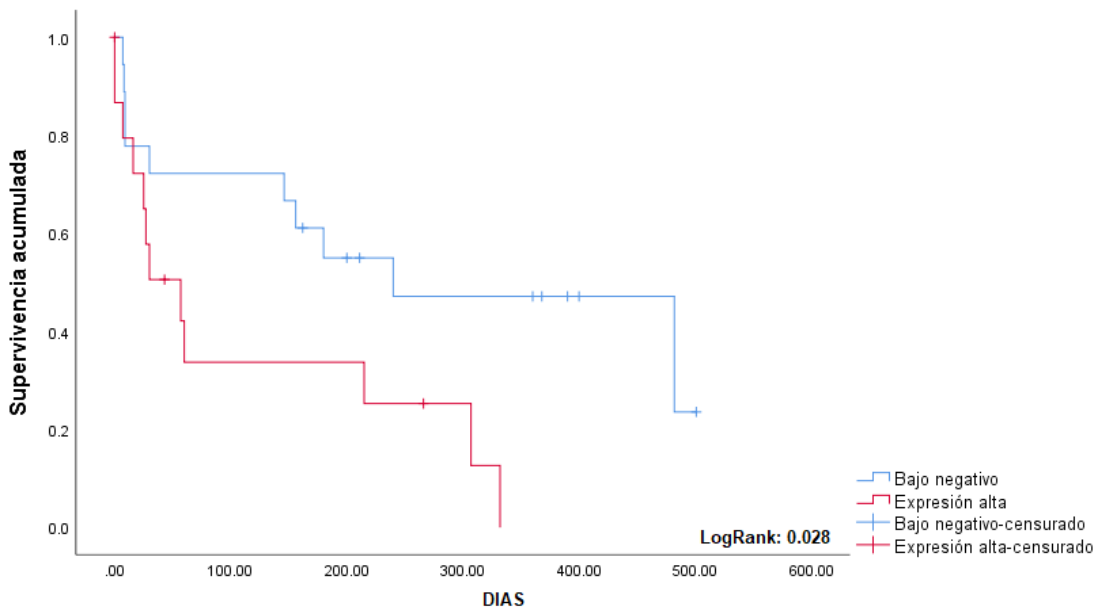


Gráfico 5. Supervivencia libre de enfermedad de acuerdo a la expresión de ABCB1 en pacientes con LMA (en azul bajo-ausente; rojo expresión alta).

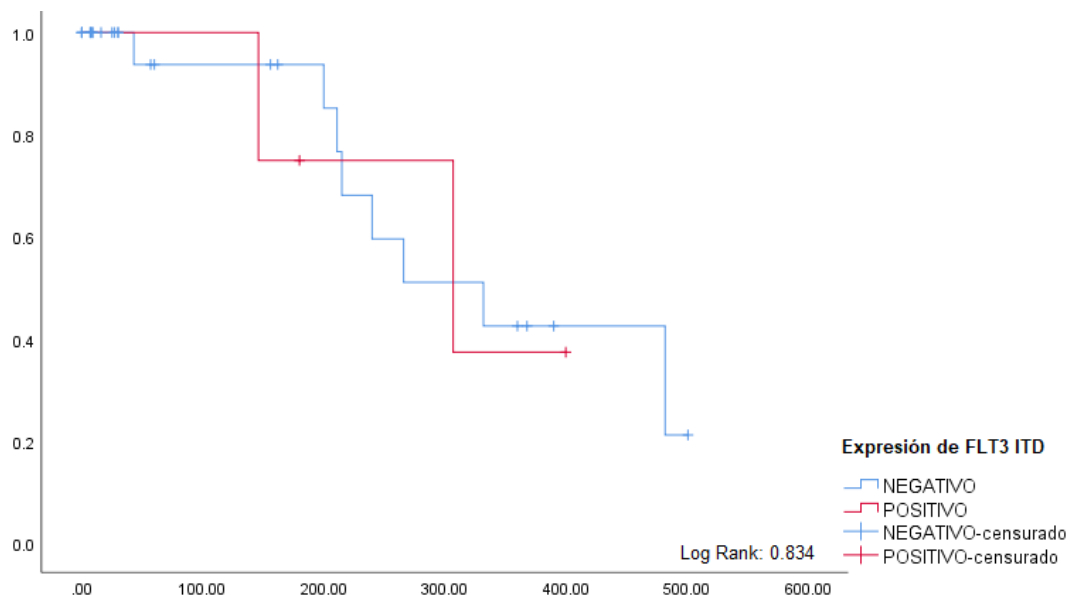


Gráfico 6. Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con LMA, de acuerdo a la expresión de FLT3 en días. (En azul negativo, en rojo positivo).

Impacto de las variables sobre el pronóstico. Al analizar el impacto de las diferentes variables sobre el pronóstico se utilizó el análisis de regresión de Cox. Se analizaron el impacto de diferentes variables incluyendo características clínicas en conjunto con las alteraciones en expresión del gen ABCB1 o la presencia de expresión de FLT3 ITD. Al realizar el análisis se identificó que solo la intensidad de tratamiento impactó significativamente con la supervivencia ($p=0.002$, 95% IC). El impacto de las diferentes variables sobre el pronóstico se describe en la Tabla 2.0

Tabla 3. Análisis multivariado de las diferentes variables sobre la supervivencia

	B	SE	Wald	Df	Sig.	Exp(B)
FLT3	-.504	.845	.356	1	.551	.604
ABCB1 alto	.041	.973	.002	1	.967	1.042
WBC50	.582	.614	.899	1	.343	1.790
Edad60	-.357	.980	.132	1	.716	.700
Intensidad	-3.253	1.059	9.443	1	.002	.039
Mieloide vs Monocitoide	-.344	.545	.397	1	.529	.709
ABCB1 bajo	.439	.586	.561	1	.454	1.551
CD117	-.368	.592	.386	1	.534	.692

Tabla 4. Características generales de la población

Características de la población de estudio.		
	Rango	Media
Edad	19-82	49
Masculino	20	
Femenino	13	
Leucocitos iniciales	500-163.000/mm ³	38.700
Hemoglobina inicial	2,6 – 10,6g/dl	6,8g/dl
Comorbilidades		
Diabetes mellitus	5	
HAS	6	
Enf renal crónica	1	
Falla hepática inicial	3	
Tratamiento		
7 + 3	21	
5 + 2	2	
Citarabina SC	7	Mayores de 60 años todos.
Otro	1	Azacitidina (protocolo)
Resultados moleculares		
FLT3		4
Expresión ABCB1	Negativo	11
	Bajo	7
	Alta	15
Cariotipo normal	20	
Características clínicas		
Esplenomegalia	5	
Hepatomegalia	2	
Adenomegalia	0	
Exposición a mielotóxicos	8	

12. Discusión

El tratamiento de la leucemia aguda mieloide ha permanecido prácticamente inalterado en las últimas décadas, a excepción de la leucemia aguda mieloide M3 con el ácido transretinoico. Aunque el conocimiento de la biología de la enfermedad ha permitido el desarrollo de nuevas terapias blanco, como los inhibidores de FLT3 e IDH, los avances se han enfocado en modificaciones de dosis de los fármacos citotóxicos o el progreso del trasplante de células hematopoyéticas.

En los pacientes jóvenes, se ha logrado alcanzar tasas de remisión completa de hasta el 80%, con supervivencia a 5 años del 40%. En pacientes mayores, el uso de agentes hipometilantes ha mejorado la supervivencia a corto y mediano plazo, pero no ha mejorado la posibilidad de cura, que permanece decepcionantemente baja. Otro abordaje que se ha realizado es la adición de una tercera droga a la terapia de inducción, sin embargo los estudios son difíciles de comparar debido que éstos difieren en algunas características claves.³⁴

La leucemia aguda mieloide sin tratamiento es uniformemente fatal. La mayoría de pacientes busca atención por síntomas relacionados a la anemia, infecciones o hemorragia, requiriendo tratamiento inmediato. La tasa de mortalidad aumenta significativamente con la edad y el estado funcional, principalmente asociado a comorbilidades. Esto se correlaciona a los pacientes del presente estudio, ya que al sobrepasar del límite (aunque arbitrariamente establecido) de 60 – 65 años no se pudo administrar quimioterapia citotóxica a la dosis estándar, lo que afectó su pronóstico (la edad superior a 60 años también se asoció con el pronóstico (Log Rank: 0.000)³⁵. En un estudio descriptivo de 51 pacientes realizado en Brasil, se observó que la causa principal de muerte fue el shock séptico (63% de pacientes), otras causas fueron leucostasis pulmonar y hemorragias, estando la mayoría en actividad de su enfermedad.³⁵

En los estudios epidemiológicos de Estados Unidos se observa que con la terapia de inducción, en algunas series se puede alcanzar el 80% de remisión completa, en esta serie el 57% de pacientes logró remisión completa. En estudios recientes para los pacientes menores de 55 años se informa una tasa de supervivencia a 5 años de 23%, mientras para los mayores de esta edad es 11%. En nuestro estudio se realizó un seguimiento con una media de 158 días, se calculó la supervivencia a 18 meses de seguimiento en 30%, significativamente menor que la referida en la literatura.³⁶

Otro de los datos importantes que se recopilaron del estudio fue la pobre supervivencia general de los pacientes mayores de 60 años, que fue menor a los 100 días en todos los casos, que también es menor a la reportada en la literatura, con un promedio de supervivencia de 2 a 8 meses; incluso con el uso de agentes hipometilantes como azacitidina y decitabina. Los factores que se asocian a estos pobres resultados son historia de síndrome mielodisplásico, cariotipo desfavorable, mal estado funcional, comorbilidades. Por tanto, la mayoría de estos pacientes recibieron únicamente cuidados de soporte o citarabina subcutánea.³⁷

El papel de la estratificación genética y molecular ha cambiado el panorama de la enfermedad, tanto a nivel pronóstico como de tratamiento. La mutación FLT3-ITD (75-80%) de las mutaciones de FLT3 ha demostrado ser un marcador pronóstico asociado a alta posibilidad de recaída y peor supervivencia global. Esta es una mutación particularmente común en los pacientes de cariotipo normal. Por ello surgió el inhibidor de FLT3 midostaurina, aprobado en 2017 por la FDA y la EMA.³⁹

La edad media de pacientes con LMA en México es 32 años, con prevalencia de la mutación de FLT3 de 20,3%, expresando mal pronóstico. En este estudio la edad media al diagnóstico

de LMA fue de 49 años y la presencia de FLT3-ITD fue 12,1%. En otros estudio de países latinoamericanos existe una variación de la presencia de la mutación por ejemplo en Ciudad de México 15%, Colombia 9,4% y Argentina 16,7%.⁴⁰

Las mutaciones se detectaron principalmente en pacientes con LMA morfológicamente M2 en 50% y M4 en 50% de casos, es importante recalcar que en este estudio no se analizaron pacientes con LMA M3 por considerarse diferente su fisiopatología y vías de señalización, aunque la mutación pudiera estar presente. La mutación de FLT3-ITD se presentó en un 75% de casos en pacientes con cariotipo normal, y en 1 caso en donde no se desarrolló citogenética, esto corresponde con la mayoría de estudios publicados en la literatura. La media de leucocitos en los individuos con FLT-3 ITD fue ligeramente menor ($32 \times 10^3/\text{mcl}$, $26 -45 \times 10^3/\text{mcl}$), pero sin relevancia estadística ($p=0.645$, 95% IC). La edad de la mutación al diagnóstico fue de 40 años, sin diferencia significativa en relación a no FLT3-ITD y en este caso la presencia de la mutación tampoco se asoció a menor tasa de supervivencia.⁴⁰

Por lo tanto, la mutación de FLT3 es un factor de riesgo independiente de pobre pronóstico aunque en este estudio su prevalencia fue ligeramente menor a la reportada en la mayoría de series latinoamericanas. No hubo pacientes que recibieran trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

La relación entre la predisposición genética y los factores ambientales que causan daño al ADN juegan un rol crucial en el desarrollo de leucemia aguda mieloide. Se sabe que la actividad de los transportadores de membrana también contribuye a la susceptibilidad a LMA.⁴¹

La familia de transportadores ABC (ATP binding cassette) y en específico la glicoproteína P (Gp-P o ABCB1) es un mecanismo clásico de la multidrogo resistencia en leucemia aguda

mieloide actuando como bomba con los fármacos antineoplásicos. Varios estudios sobre el rol clínico y funcional de polimorfismos de nucleótidos únicos en ABCB1 han producido resultados discrepantes. Sin embargo ciertas mutaciones se han asociado con la ocurrencia de tumores renales, leucemia aguda linfoblástica en niños, así como es predictivo para resultados de la terapia en leucemia aguda mieloide.⁴¹

Algunas mutaciones de estos genes se han asociado con menor toxicidad sobre todo en ABCC1-ABCC2 y ABCG2, sobre todo menor cardiotoxicidad. En un estudio realizado en España con 225 pacientes en los que evaluaron varios polimorfismos de genes ABC, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las características de presentación ni tasa de remisión completa. En este estudio la expresión alta de ABCB1 tuvo un promedio de 49 años, ligeramente mayor a los de expresión baja (considerado normal) pero más jóvenes que los pacientes de expresión ausente, esto sin embargo no plantea una diferencia significativa. En este estudio el nivel de expresión de ABCB1 tampoco estuvo relacionado a la tasa de remisión completa.⁴¹

En los estudios previamente realizados en población mexicana (Olar-te-Carrillo) se demostró ya la sobreexpresión de los genes ABCB1 y ABCG2 en pacientes con leucemia aguda linfocítica, comparado con controles sanos. Se confirmó que la expresión aumentada se asoció con una disminución en la tasa de supervivencia a 40 meses.

En nuestro estudio se reportó una frecuencia de expresión aumentada de ABCB1 en 45,5% de pacientes, siendo más común en las leucemias de tipo monocitoide, aunque no hubo relación con la respuesta a la inducción, como se mencionó previamente. En cuanto a recaída, el 50% de los pacientes que la presentaron tuvieron expresión alta de este gen.⁴²

También se comprobó que los pacientes que tenían expresión aumentada de ABCB1 tuvieron una supervivencia global disminuida (Log Rank 0.028) en comparación con los de expresión normal o ausente.⁴²

13. Conclusiones

La leucemia aguda mieloide es una enfermedad agresiva, de difícil tratamiento, y que aún no ha sido caracterizada completamente, por lo tanto todavía hay un campo grande de investigación en este tema. La presencia de la mutación FLT3-ITD en este estudio presentó una frecuencia muy baja comparada con lo referido en la literatura latinoamericana y mundial, por lo que los resultados son de difícil reproducibilidad. Sin embargo la presencia de expresión aumentada de ABCB1 si se relacionó a un peor pronóstico de la enfermedad, específicamente en supervivencia global y tasa de recaída, lo que coincide con lo informado en trabajos previos. Aun así, consideramos que pueden y deben realizarse más estudios en este campo, con la finalidad de describir mejor la enfermedad, entender su fisiopatología, y buscar un mejor tratamiento para nuestros pacientes.

14. Perspectivas futuras

Hoy por hoy, la leucemia aguda mieloide es uno de los campos terapéuticos más apasionantes de la hematología, ya que los avances en biología molecular y secuenciación genética, han permitido encontrar blancos terapéuticos no basados únicamente en quimioterapia sistémica. Sin embargo por la fisiopatología de esta enfermedad, nos encontramos aún lejos de una cura, por lo que el tratamiento se orienta a fármacos diseñados para atacar estas dianas moleculares, por ejemplo FLT-3 ITD, IDH1 y 2, BCL-2, y agentes hipometilantes, entre otros. A su vez esperamos que la mejor comprensión de los transportadores de membrana nos ofrezcan alternativas terapéuticas a lo largo del tiempo.

Bibliografía

1. Kenneth Kaushansky, MD, Josef T. Prchal, MD, Oliver W. Press, MD, et al, Williams Hematology, 9na Edición, New York, McGraw-Hill Education, 2016.
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. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069254>
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. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27693133>
4. Leyto-Cruz F. Leucemia mieloide aguda. *Hematol Méx.* 2018;19(1):24-40. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/hematologia/re-2018/re181d.pdf>
5. Heiblig M, Labussière-Wallet H, Nicolini FE, et al. Prognostic Value of Genetic Alterations in Elderly Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Single Institution Experience. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4):570. Published 2019 Apr 22. doi:10.3390/cancers11040570
6. Wang ES. Incorporating FLT3 inhibitors in the frontline treatment of FLT3 mutant acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2019;32(2):154-162. doi:10.1016/j.beha.2019.05.006
7. Bose P, Vachhani P, Cortes JE. Treatment of Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Curr Treat Options Oncol.* 2017;18(3):17. doi:10.1007/s11864-017-0456-2
8. Siveen KS, Uddin S, Mohammad RM. Targeting acute myeloid leukemia stem cell signaling by natural products. *Mol Cancer.* 2017;16(1):13. Published 2017 Jan 30. doi:10.1186/s12943-016-0571-x
9. Cerrano M, Itzykson R. New Treatment Options for Acute Myeloid Leukemia in 2019. *Curr Oncol Rep.* 2019;21(2):16. Published 2019 Feb 4. doi:10.1007/s11912-019-0764-8
10. Davidson-Moncada J, Viboch E, Church SE, Warren SE, Rutella S. Dissecting the Immune Landscape of Acute Myeloid Leukemia. *Biomedicines.* 2018;6(4):110. Published 2018 Nov 25. doi:10.3390/biomedicines6040110
11. Illangeswaran RSS, Das S, Paul DZ, Mathews V, Balasubramanian P. A personalized approach to acute myeloid leukemia therapy: current options. *Pharmgenomics Pers Med.* 2019;12:167-179. Published 2019 Aug 2. doi:10.2147/PGPM.S168267
12. Ravandi F, Walter RB, Freeman SD. Evaluating measurable residual disease in acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2018;2(11):1356-1366. doi:10.1182/bloodadvances.2018016378
13. Bohl, S. R., Bullinger, L., & Rücker, F. G. (2019). New Targeted Agents in Acute Myeloid Leukemia: New Hope on the Rise. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 1983. <https://doi.org/10.3390/ijms20081983>
14. Bewersdorf JP, Shallis R, Stahl M, Zeidan AM. Epigenetic therapy combinations in acute myeloid leukemia: what are the options?. *Ther Adv Hematol.* 2019;10:2040620718816698. Published 2019 Jan 11. doi:10.1177/2040620718816698.

15. Mei C, Ren Y, Zhou X, et al. Clinical and biological characteristics of acute myeloid leukemia with 20-29% blasts: a retrospective single-center study. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(5):1136-1145. doi:10.1080/10428194.2018.1515938.
16. Murphy T, Yee KWL. Cytarabine and daunorubicin for the treatment of acute myeloid leukemia. *Expert Opin Pharmacother*. 2017;18(16):1765-1780. doi:10.1080/14656566.2017.1391216
17. Benard B, Gentles AJ, Köhnke T, Majeti R, Thomas D. Data mining for mutation-specific targets in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2019;33(4):826-843. doi:10.1038/s41375-019-0387-y
18. Kayser S, Levis MJ. Clinical implications of molecular markers in acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2019;102(1):20-35. doi:10.1111/ejh.13172.
19. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*. 2017;377(5):454-464. doi:10.1056/NEJMoa1614359
20. Ampasavate C, Jutapakdee W, Phongpradist R, et al. FLT3, a prognostic biomarker for acute myeloid leukemia (AML): Quantitative monitoring with a simple anti-FLT3 interaction and flow cytometric method. *J Clin Lab Anal*. 2019;33(4):e22859. doi:10.1002/jcla.22859.
21. Assi R, Ravandi F. FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: Choosing the best when the optimal does not exist. *Am J Hematol*. 2018;93(4):553-563. doi:10.1002/ajh.25027
22. Wagner S, Vadakekolathu J, Tasian SK, et al. A parsimonious 3-gene signature predicts clinical outcomes in an acute myeloid leukemia multicohort study. *Blood Adv*. 2019;3(8):1330-1346. doi:10.1182/bloodadvances.2018030726.
23. DiNardo CD, Rausch CR, Benton C, et al. Clinical experience with the BCL2-inhibitor venetoclax in combination therapy for relapsed and refractory acute myeloid leukemia and related myeloid malignancies. *Am J Hematol*. 2018;93(3):401-407. doi:10.1002/ajh.25000.
24. Zhou JD, Zhang TJ, Xu ZJ, et al. BCL2 overexpression: clinical implication and biological insights in acute myeloid leukemia. *Diagn Pathol*. 2019;14(1):68. Published 2019 Jun 29. doi:10.1186/s13000-019-0841-1
25. Morales-Pérez, Mayasil, & García-Milian, Ana Julia. Papel de la superfamilia ABC en la resistencia farmacológica. *Horizonte sanitario*, 16(2),9301, 2017.
26. Kassem NM, Medhat N, Kassem HA, El-Desouky MA. Chemotherapeutic Resistance in Egyptian Acute Myeloid Leukemia Patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(8):2421-2427. Published 2019 Aug 1. doi:10.31557/APJCP.2019.20.8.2421
27. Ji N, Yang Y, Cai CY, et al. Midostaurin Reverses ABCB1-Mediated Multidrug Resistance, an *in vitro* Study. *Front Oncol*. 2019;9:514. Published 2019 Jun 18. doi:10.3389/fonc.2019.00514.
28. Gupta P, Gao HL, Ashar YV, Karadkhelkar NM, Yoganathan S, Chen ZS. Ciprofloxacin Enhances the Chemosensitivity of Cancer Cells to ABCB1 Substrates. *Int J Mol Sci*. 2019;20(2):268. Published 2019 Jan 11. doi:10.3390/ijms20020268.
29. Cianfriglia M. Targeting MDR1-P-glycoprotein (MDR1-Pgp) in immunochemotherapy of acute myeloid leukemia (AML). *Ann Ist Super Sanita*. 2013;49(2):190-208. doi:10.4415/ANN_13_02_11.
30. Bewersdorf JP, Stahl M, Zeidan AM. Are we witnessing the start of a therapeutic revolution in acute myeloid leukemia?. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(6):1354-1369. doi:10.1080/10428194.2018.1546854

31. Loaiza L, Olarte I, Ramos C, Asociación clínica de polimorfismos C3435T y G421T de los genes ABC B1 y ABC G2 con la toxicidad en el uso de quimioterapia como Metotrexate en pacientes con Diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda en fase de consolidación, Universidad Autónoma de México, 2018.
32. Ramos Peñafiel C, Olarte Carrillo I, Effect of metformin on the survival of patients with ALL who express high levels of the ABCB1 drug resistance gene. *Journal of Translational Medicine*, 2018. Ramos-Penafiel et al. *J Transl Med* (2018) 16:245. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1620-6>.
33. Patel, Jay & Gönen, Mithat & Figueroa, Maria & Fernandez, Hugo & Sun, Zhuoxin & Racevskis, Janis & Vlierberghe, Pieter & Dolgalev, Igor & Thomas, Sabrena & Aminova, Olga & Huberman, Kety & Cheng, Janice & Viale, Agnes & Socci, Nicholas & Heguy, Adriana & Cherry, Athena & Vance, Gail & Higgins, Rodney & Ketterling, Rhett & Levine, Ross. (2012). Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine*. 366. 1079-89. 10.1056/NEJMoa1112304.
34. Cardoso de Lima , Bousfield da Silva D, (2015). Acute Myeloid Leukemia: analysis of epidemiological profile and survival rate. *Sociedade Brasileira de Pediatria*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2015.08.0080021-7557>.
35. Dombret, H., & Gardin, C. (2016). An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood*, 127(1), 53–61. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-604520>
36. Deschler, B., & Lübbert, M. (2008). Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology. *Acute Leukemias*, 47–56. https://doi.org/10.1007/978-3-540-72304-2_3
37. Dombret, H., Seymour, J. F., Butrym, A., Wierzbowska, A., Selleslag, D., Jang, J. H., Kumar, R., Cavenagh, J., Schuh, A. C., Candoni, A., Récher, C., Sandhu, I., Bernal del Castillo, T., Al-Ali, H. K., Martinelli, G., Falantes, J., Noppeney, R., Stone, R. M., Minden, M. D., McIntyre, H., ... Döhner, H. (2015). International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. *Blood*, 126(3), 291–299. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-621664>
38. Terreros-Muñoz E, Solís-Poblano JC, Reyes-Pérez EN, López-Marthen JL y col. Treatment of FLT3-mutated acute myeloid leukemia (AML) with midostaurin in Mexico: the challenges in a developing country. *Hematol Méx.* 2019 April-June;20(2):117-123. <https://doi.org/10.24245/rhematol.v20i2.2980>
39. Best-Aguilera C, Rodrigo Gómez-Vázquez O, Elizabeth Guzmán-Hernández A, Monserrat Rojas-Sotelo R. Treatment of Acute Myeloid Leukemia with the FLT3 Gene Mutation. *Curr Oncol Rep*. 2017 Mar;19(3):21. doi: 10.1007/s11912-017-0573-x. PMID: 28283965.
40. Jorge Cuervo-Sierra, Jose Carlos Jaime Perez, Prevalence and Clinical Significance of FLT3 Mutation Status in Acute Myeloid Leukemia Patients in Two Latin American Countries: A Multicenter Study, *Archives of Medical Research* - (2016).
41. Juan Eduardo Megías-Vericat, Pau Montesinos, María José Herrero, Federico Moscardó, Virginia Bosó, Luis Rojas, David Martínez-Cuadrón, David Hervás, Blanca Boluda, Ana García-Robles, Rebeca Rodríguez-Veiga, María Martín-Cerezuela, José Cervera, Luis Sendra, Jaime Sanz, Antonio Miguel, Ignacio Lorenzo, José Luis Poveda, Miguel Ángel Sanz & Salvador F. Aliño (2016): Impact of ABC single nucleotide polymorphisms upon the efficacy and toxicity of

induction chemotherapy in acute myeloid leukemia, *Leukemia & Lymphoma*.
<http://dx.doi.org/10.1080/10428194.2016.1231405>.

42. Jamroziak K, Balcerczak E, Cebula B, Janus A, Mirowski M, Robak T. No influence of 3435C>T ABCB1 (MDR1) gene polymorphism on risk of adult acute myeloid leukemia and P-glycoprotein expression in blast cells. *Ther Drug Monit.* 2006 Oct;28(5):707-11. doi: 10.1097/01.ftd.0000245770.75097.3f. PMID: 17038891.