



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**“EJE SIRT1 – P53 EN RESISTENCIA A
CITARABINA EN LA LÍNEA DE LEUCEMIA
MIELOIDE AGUDA WEHI-3.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

Bryan Jorge Lámbarry Castillo

Director de tesis:

Dr. Edelmiro Santiago Osorio



CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE, 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.

APOYOS FINANCIEROS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, de la Unidad de Investigación de Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, UNAM.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA UNAM, con clave: IN229820.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por permitirme unirme a su grupo de trabajo, por guiarme durante la elaboración de este proceso y por los conocimientos brindados.

A la Dra. Itzen Aguiñiga Sánchez quien gracias a sus conocimientos y experiencia me encamino a continuar con este proyecto, además de tenerme paciencia durante este largo proceso.

A la Dra. Guadalupe Fajardo Orduña por su entrega, dedicación y paciencia, así como compartir sus experiencias y manera de trabajo, me permitió expandir mi visión sobre la ciencia y sobre todo por ayudarme cuando más lo necesitaba.

A la Dra. Graciela Gavia García por sus consejos, técnicas y su amabilidad durante mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. David Hernández Álvarez por compartir sus técnicas y conocimientos para la elaboración de este trabajo.

Gracias a los profesores y profesoras que me dieron clases durante mi estancia en la facultad por compartir su tiempo y conocimiento.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Jair, Lalo, Michelle, Aramiz, Sac, Malu, Frida, Erandi, Luis, Mariana, Candy, Jud y Daniel por su tiempo y por mostrarme la combinación perfecta entre trabajo y diversión durante los experimentos en laboratorio.

A los miembros del jurado:

Dra. Aguiñiga Sánchez Itzen

Dr. Santiago Osorio Edelmiro

Dr. López Muñoz Hugo

Dr. Ledesma Martínez Edgar

M. en C. Martínez Jiménez Luis Antonio

DEDICATORIAS

A mis padres por darme el apoyo, formación y recursos para llegar hasta este punto, ya que sin su ayuda este trabajo no sería posible.

A mi hermano Alan, por su ayuda y comprensión.

A mi abuelo, quien en todo momento me manifestó su apoyo y confió en que sería un gran biólogo.

A los miembros del Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, por su apoyo y dedicación con los proyectos.

A mis amigos que hice antes y durante mi estancia a la FES: Michelle, Genesis, Rodrigo, Lalo, Aramiz, Jair, Kevin, Lupita, Natalia, Itzel, Cesar, Cecilia por haberme apoyado, guiado y por lo bien que la pase con ustedes.

INDICE

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
MARCO TEÓRICO.....	11
Leucemia Mieloide Aguda.....	11
Clasificación de la LMA.....	12
Tratamiento para la LMA.	13
Leucemia mieloide aguda refractaria o de recaída.....	15
Resistencia a fármacos como la citarabina en AML.	16
Sirtuinas.....	18
SIRT1	18
p53 y su papel en el Cáncer.....	19
Eje SIRT1- P53 en la Leucemia Mieloide Aguda.	21
Otras moléculas implicadas en resistencia a fármacos.....	23
Resistencia cruzada	24
Resistencia cruzada entre Ara-C y Daunorrubicina.	24
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES	51
REFERENCIAS	52

Lista de abreviaturas

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ara-C: Citarabina

FAB: French-American-British

OMS: Organización Mundial de la Salud

ELN: European Leukemia Net

AloTHP: Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

RC: Remisión Completa

RC1: Primera remisión completa

HIDAC: Altas Dosis de Citarabina

LDAC: Bajas Dosis de Citarabina

HSC: Células troncales hematopoyéticas

HSCT: Trasplante de células troncales hematopoyéticas

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado

SIRT1: Regulador silencioso de la información 1; Sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD⁺

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

dCK: Desoxicidina quinasa

RCF: Fuerza centrífuga relativa

LISTA DE TABLAS E IMÁGENES

Figuras:

Figura 1. Mecanismo de acción de la citarabina.

Figura 2. SIRT1 promueve la supervivencia celular a través de la desacetilación de p53, FOXO3a y E2F1

Figura 3. SIRT1 regula múltiples aspectos de la resistencia a los medicamentos contra el cáncer

Figura 4. Curva de las absorbancias obtenidas del ensayo de proliferación dependiente de la concentración de Ara-C en células WEHI-3/P medidas a 490 nm con MTS luego de 48 horas

Figura 5. Diagrama de la metodología empleada en el desarrollo de la línea celular WEHI-3 resistente (WEHI-3/Ara-CR)

Figura 6. Vista in situ de células WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR 48 horas después de cultivo en ausencia y presencia de 50 ng/mL (197nM) de citarabina (Ara-C) a 10x.

Figura 7. Tinción de células WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR con hemocolorante rápido sobre un cubreobjetos luego de 48 horas cultivo en ausencia y presencia de 197nM de citarabina (Ara-C) a 40x.

Figura 8. Ensayo de proliferación celular. Porcentaje de proliferación de células WEHI-3.

Figura 9. Curva de las absorbancias obtenidas del ensayo de proliferación dependiente de la concentración de Ara-C en células WEHI-3/Ara-CR evaluado a 490 nm con MTS 48 horas después del cultivo.

Figura 10. Imágenes de la expresión de los genes B-Actina, ENT1, dCK, MRP1 y MDR1 sobre gel de agarosa mediante PCR de punto final.

Figura 11. Gráfico del análisis densitométrico de la expresión de los genes ENT1, dCK, MRP1 y MDR1 en WEHI-3/P y WEHI-3 Ara-CR mediante la comparación de la densidad óptica (DO) con respecto a β -actina

Figura 12. Imágenes tomadas con fotodocumentador de la expresión de los genes SIRT1 y P53 en gel de agarosa mediante PCR de punto final.

Figura 13. Gráfico del análisis densitométrico de la expresión de los genes SIRT1 y P53 en WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR mediante la comparación de la densidad óptica (DO) con respecto a β -actina.

Figura 14. Curva de las absorbancias obtenidas del ensayo de proliferación dependiente de la concentración de daunorrubicina en células WEHI-3/P medidas a 490 nm con MTS luego de 48 horas.

Figura 15. Curva de las absorbancias obtenidas del ensayo de proliferación dependiente de la concentración de daunorrubicina en células WEHI-3/Ara-CR medidas a 490 nm con MTS luego de 48 horas.

Tablas:

Tabla 1. Categoría de riesgos entre la correlación citogenética y molecular en la Leucemia Mieloide Aguda.

Tabla 2. Lista de proteínas blanco no histonas que son silenciadas por SIRT1.

Tabla 3. Cebadores utilizados en la evaluación de expresión de genes para PCR de punto final.

Tabla 4. Viabilidad celular de WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR en presencia o ausencia de Ara-C por medio de azul tripano con ayuda de microscopio.

Tabla 5. Dosis media de inhibición de la citarabina (Ara-C) en células WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR. \pm Desviación estándar.

Tabla 6. Resumen del estado de la expresión de los genes relacionados con la resistencia a multidrogas en WEHI-3/Ara-CR comparado con WEHI-3/P.

Tabla 7. Dosis media de inhibición de la daunorrubicina en células WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR \pm Desviación estándar.

RESUMEN

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia maligna del sistema hematopoyético que afecta principalmente a adultos. Durante poco más de 50 años el tratamiento estándar ha sido la citarabina (Ara-C) que junto con daunorrubicina para terapia de inducción a la remisión que ha llevado resultados prometedores en LMA recién diagnosticada o en personas jóvenes aptas para el tratamiento, sin embargo, el principal obstáculo de esta terapia sigue siendo la recaída después de una respuesta favorable inicial, lo que indica la presencia de nuevas células leucémicas quimiorresistentes. Se ha reportado con anterioridad que en varios tipos de cáncer incluyendo la LMA hay una desregulación de una enzima desacetilasa dependiente de NAD⁺ de la familia de las sirtuinas conocida como SIRT1 en la cual el nivel de expresión de la misma juega un papel muy importante en la regulación epigenética de genes como lo es p53, se ha encontrado que SIRT1 es capaz de inhibir la expresión de p53 a veces denominado Eje SIRT1-p53 regulando procesos celulares como metabolismo, resistencia al estrés, ciclo celular, autofagia, apoptosis, la adquisición de resistencia a multidroga etc. Aunque SIRT1 no es el único pues comúnmente la resistencia multidroga está relacionada con otros genes siendo los más representativos MDR1, MRP1, dCK y ENT1. Debido a ello en este trabajo nos enfocamos en la generación de una línea celular leucémica aguda murina (WEHI-3) resistente a la citarabina, obteniendo luego de 207 días de resiembra con concentraciones crecientes del fármaco resultando en células cuya resistencia era superior por 7.19 veces que su contraparte original, entrando en la categoría de lo clínicamente relevante para su experimentación médica, que denominamos (WEHI-3/Ara-CR). Una vez que teníamos la resistencia hacia Ara-C, mediante PCR de punto final evaluamos la expresión del eje SIRT1-p53, así como los otros genes para conocer que desregulaciones tenían estas nuevas células resistentes. Los resultados nos arrojaron mayores expresiones de SIRT1 como reporta la literatura, así como cambios en la expresión de MDR1 y MRP1 y una sobreexpresión significativa en dCK que pudiera deberse a todo el fármaco que está siendo metabolizado por estas células, de la misma manera investigamos la posibilidad de que existiera resistencia cruzada a una antraciclina usada comúnmente en la terapia con Ara-C como la daunorrubicina, pero no encontramos una diferencia considerable. Por lo tanto, las células WEHI-3/Ara-CR pueden ser de utilidad en el futuro para buscar alternativas que nos ayuden a comprender y superar la resistencia a este fármaco y con ello elaborar nuevas estrategias para mejorar la terapia que reciben las personas.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo y la tercera en México, solo después de la diabetes mellitus y complicaciones de enfermedades isquémicas del corazón (Aldaco et al., 2018).

Las leucemias son un tipo de cáncer de los tejidos de la sangre incluida la médula ósea, mientras que la leucemia linfoblástica aguda (LLA) es típica de la edad pediátrica, la leucemia mieloide aguda (LMA) es más frecuente en la edad adulta representando hasta un 80% de los casos en este grupo de edad (Cammarata *et al.*,2020). La leucemia mieloide aguda, representa alrededor del 25% de todas las leucemias, siendo esta enfermedad la forma más frecuente de leucemia (Dombret & Gardin,2016). La LMA es una enfermedad altamente heterogénea que tiene subtipos biológicos y pronósticos distintos que se distinguen por diferencias citogenéticas y genéticas. Se ha caracterizado un número creciente de subconjuntos de LMA distintos y se ha logrado cierto avance en el tratamiento. Pero el manejo del paciente sigue siendo decepcionantemente uniforme y el mecanismo molecular por el cual se desestabiliza el metabolismo en la LMA sigue siendo muy poco estudiado (Tian et al.,2018). Los tratamientos comprometen la salud del paciente pues afectan tanto a las células leucémicas como las células hematopoyéticas sanas, pudiendo estas últimas generar resistencia a los medicamentos y agravar el problema. En el desarrollo de la quimioresistencia, las células leucémicas activan o suprimen diversos genes claramente involucrados en el desarrollo de estas características en las células leucémicas. Adicionalmente, en los últimos años se ha vinculado la participación de los genes SIRT-1 y P53 constituyendo un eje que participa en la regulación de la quimioresistencia (Tian et al.,2018; Sasca *et al.*,2014; Yi *et al.* 2010). En este trabajo se desarrolló una línea leucémica resistente a la citarabina para analizar los cambios en la expresión de ambos genes en la línea leucémica de ratón WEHI-3 parental y resistente a la citarabina, de la misma manera se analizó la expresión de aquellos tradicionalmente involucrados en la quimioresistencia como ENT1, dCK,MRP1 y MDR1. Existen otros genes relacionados a la quimioresistencia a citarabina, en la que se encuentran los transportadores ABC , una familia de proteínas que desintoxican a la célula expulsando diferentes fármacos impidiendo su metabolización , entre ellos los más representativos son MDR1 y MRP1(Kunadt *et al.* 2020; Kaltoum, *et al.* 2020) , por otro lado también se conoce una proteína (dCK) perteneciente al grupo de las quinasas que limita la activación de la citarabina (Ara-C), pues cataliza la fosforilación a Ara-C a monofosfato de citarabina (Ara-CMP) siendo un pilar en la metabolismo de la citarabina (Wu *et al.*, 2021), y por último una proteína transportadora usada como canal de captación que ha sido responsable de la captación de Ara-C conocida como ENT1 está estrechamente relacionada a la quimioresistencia(Macanas *et al.*, 2017). De igual manera se conoce que aparte de la resistencia al fármaco que en ese momento se está usando puede existir resistencia a otro que incluso no se parece ni estructural como funcionalmente como por ejemplo las antraciclinas, denominado resistencia cruzada (Aldonza *et al.*,2016). Por esta razón decidimos inducir la resistencia a la citarabina en la línea leucémica

de ratón WEHI-3 para analizar la expresión de los genes de resistencia a multidrogas.

MARCO TEÓRICO

En años recientes se ha logrado comprender los mecanismos relacionados con una hematopoyesis normal y el desarrollo de neoplasias (Aragón y Aragón, 2014). La leucemia y el cáncer en general se produce por una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, que les permite a las células sobrevivir, evadir mecanismos reguladores de apoptosis, proliferación y ciclo celular (Céron & Torres, 2015).

Los mecanismos de reparación del ADN pueden verse afectados por mutaciones que pueden ser de carácter hereditario o esporádico, estas mutaciones pueden ser por sustitución, adición o delección y estas mutaciones alteran la fisiología celular induciendo a la transformación de esta. A su vez se pueden afectar los genes supresores de tumores cuya acción es evitar la proliferación celular excesiva, por lo tanto, la pérdida de su función se implica en el desarrollo de cáncer como la leucemia (Akashi & Koeffler, 1998).

Leucemia Mieloide Aguda.

La leucemia es una proliferación clonal de células troncales hematopoyéticas en la médula ósea (Davis, A *et al.*, 2014). La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia maligna que surge al interior de la médula ósea y se caracteriza por la expansión clonal de células hematopoyéticas que proliferan sin control, asociado a proceso de hematopoyesis anormal (Showel & Levis, 2014; Saultz, J. N., & Garzon, R., 2016). La LMA es la neoplasia en médula ósea más común en adultos, debido a que a medida que las personas viven más tiempo, la incidencia de leucemia mieloide aguda aumenta (Heiblig *et al.*, 2016) y aunque se puede presentar prácticamente a cualquier edad se le considera relacionada a la edad pues tiene una mediana de edad en el momento del diagnóstico de 72 años, alcanzando el máximo índice de incidencia entre los 80 y 84 años (Murphy & Yee, 2017).

El pronóstico empeora de manera proporcional al avance de la edad del paciente, pues datos recientes indican una mediana de supervivencia de 3 meses para los pacientes mayores de 65 años, llegando hasta 2,5 meses para el rango de edad de 76 a 89 años, a su vez no más del 5% sobrevive a 5 años después del diagnóstico (Santoro *et al.*, 2018).

Clasificación de la LMA

La leucemia mieloide aguda ha experimentado varios cambios en su clasificación a través de los años con el avance de la genómica (Hou *et al.* 2020), clasificada inicialmente por la French-American-British (FAB) a mediados de los 70s en base al tipo de célula involucrada en el desarrollo de la LMA, su grado de diferenciación y la tinción citoquímica, clasificándolas en grupos de M0 a M7 donde los subtipos M0 a M5 se desarrollan de glóbulos blancos inmaduros, el subtipo M6 de eritrocitos inmaduros y la M7 de células productoras de plaquetas inmaduras, sin embargo, aunque resultaba útil no fue una clasificación que se considerara muy fiable, debido a que no tomaba en cuenta muchos factores que afectan el pronóstico, conforme más se aprendía acerca de la LMA se podía sacar más parámetros que pudieran clasificarla, gracias a los avances en genómica ayudó a la comprensión biológica del cáncer incluidas las leucemias. Fue en 2001 cuando la Organización Mundial de la Salud (OMS) introdujo un nuevo sistema de clasificación que incluía anomalías citogenéticas recurrentes como criterio, al que siguió una versión revisada en 2008 y una posterior actualización que se hizo en el 2016 que no fue de gran cambio, más bien fue para incorporar los nuevos conocimientos que se tenían desde la última publicación (Arber *et al.* 2016). La clasificación que dio la OMS se utiliza con el propósito de asignar a los pacientes a enfoques terapéuticos específicos y entrar en ensayos clínicos ya que se ha enriquecido por décadas de experiencia y aportes de un gran número de patólogos oncológicos y genetistas (Hasserjian, R. P. (2021)). En 2017 la European LeukemiaNet (ELN) realizó una publicación para establecer una clasificación de riesgo basada en aberraciones citogenéticas y moleculares (Tabla 1) (Grimm *et al.*, 2020). Esta clasificación funciona como una guía del tratamiento posterior a la remisión, de esta forma, en los pacientes de riesgo favorable casi no se contempla llevar a cabo un trasplante alogénico (aloTPH), mientras que, en los pacientes de riesgo desfavorable, el aloTPH en primera remisión completa (RC1) es la opción preferencial. En los pacientes de riesgo intermedio, existe todavía cierta controversia sobre el tratamiento post - remisión óptimo (García *et al.* 2016).

Tabla 1. Categoría de riesgos entre la correlación citogenética y molecular en la Leucemia Mieloide Aguda (European Leukemia Net,2017).

Categoría de Riesgo	Anormalidad Genética
Favorable	t (8; 21) (q22; q22.1); RUNX1-RUNX1T1
	inv (16) (p13.1q22) o t (16; 16) (p13.1; q22); CBFβ-MYH11
	NPM1 mutado sin FLT3 -ITD o con FLT3 -ITD ^{bajo}
	CEBPA bialélica mutada
Intermedio	NPM1 mutado y FLT3 -ITD ^{alto}
	NPM1 de tipo silvestre sin FLT3 -ITD o con FLT3 -ITD ^{bajo} (sin lesiones genéticas de riesgo adverso)
	t (9; 11) (p21.3; q23.3); MLLT3-KMT2A
	Anomalías citogenéticas no clasificadas como favorables o adversas
Adverso	t (6; 9) (p23; q34.1); DEK - NUP214
	t (v; 11q23.3); KMT2A reorganizado
	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, cariotipo monosómico
	NPM1 de tipo silvestre y FLT3 -ITD ^{alto}
	RUNX1 mutado
	ASXL1 mutado
TP53 mutado	

Tratamiento para la LMA.

La terapia inicial destinada a inducir la remisión de la enfermedad conocida como “Terapia de inducción” que consiste en citarabina (Ara-C), un fármaco antineoplásico antimetabolito análogo de la histidina y la desoxicitidina que inhibe la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) (García *et al.*, 2018) y que ha sido el pilar en el tratamiento de la LMA por 50 años (Yamauchi, *et al.*, 2014), combinado con una antraciclina como daunorrubicina que con frecuencia puede causar apoptosis en las células leucémicas, (Showel & Levis., 2014). Esta combinación estándar se conoce como “7 + 3” debido a que consiste en administración continua de 7 días de citarabina en concentraciones de 100 o 200 mg / m² por día y daunorrubicina a 60 mg / m² por día en los días 1 a 3 (Dombret & Gardin, 2016).

Si se lleva a cabo la remisión, es considerada una terapia de inducción exitosa, pero en un gran número de casos aún quedan una pequeña cantidad de células a veces indetectables que en ausencia de terapia adicional en unos meses provocaran de nuevo la patología, es por ello que después de la terapia de inducción se administra la terapia de “consolidación” con el objetivo de eliminar las células remanentes para evitar una recaída.

Los tratamientos de consolidación más utilizados son ciclos de quimioterapia con altas dosis de citarabina conocido como HiDAC (High-Dose Cytarabine), en la cual se administra $3 \text{ g} / \text{m}^2$ de citarabina cada 12 h 3 días a la semana, un día sí y uno no, durante cuatro semanas o ciclos (Jabbour *et al.* 2014).

También se usa el trasplante de células troncales hematopoyéticas (HSCT) que puede ser alotrasplante (de un donante) o un autotrasplante (proviene del propio paciente), la cual se divide en dos etapas a partir de la hospitalización del paciente. La primera etapa es el “condicionamiento” cuyo objetivo es erradicar la enfermedad e inducir la inmunosupresión para posibilitar el injerto y la reconstitución de la hematopoyesis, es una etapa que requiere 7 a 10 días de preinfusión de las células troncales hematopoyéticas (HSC). Tras la infusión, el paciente comienza a presentar cambios en su sistema sanguíneo como la disminución simultánea de todos los elementos de la sangre (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas), este estado se conoce como “Pancitopenia” y supone una sensibilidad para el paciente a diversas infecciones y a los efectos tóxicos de sustancias de la quimioterapia (Machado *et al.*, 2018).

Aunque la terapia de inducción “7+3” seguida de un método de consolidación ha sido el estándar de atención para los pacientes con LMA teniendo remisiones a largo plazo del 30 a 44% para pacientes menores de 50 años, para los pacientes que rebasan los 65 años este porcentaje de supervivencia es solo de 10% a 15% (Kantarjian *et al.* 2021). Por lo tanto, aunque las terapias para la LMA han logrado tener gran avance, los mejores pronósticos son para los pacientes más jóvenes, por el otro lado, el resultado del tratamiento para los pacientes de edad avanzada es insatisfactorio (Heiblig *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2019).

El tratamiento para pacientes mayores con LMA sigue siendo un desafío. La leucemia mieloide aguda en pacientes mayores conlleva una biología de la enfermedad claramente diferente asociada con un cariotipo de alto riesgo que comúnmente conlleva una alta incidencia de anomalías citogenéticas, una alta incidencia de mutaciones múltiples, incluido TP53 (20% de los casos), y una alta incidencia de LMA secundaria relacionada con la terapia (20 a 30% de los casos), sumado a que muchas veces los pacientes de edad avanzada tienen múltiples comorbilidades como hipertensión, diabetes, anomalías cardíacas, pulmonares y renales) que dan como resultado una mala tolerancia a la quimioterapia intensiva y altas tasas de mortalidad temprana entre 4 a 8 semanas del 26 a 36% (Kantarjian *et al.* 2021).

Leucemia mieloide aguda refractaria o de recaída

Gran parte de los pacientes que presentan esta neoplasia no logran una remisión después del tratamiento o solo logran una remisión transitoria que más tarde vuelve a aparecer, a este proceso se le denomina LMA refractaria o de recaída (Gu *et al.* 2019). A pesar de las mejoras en el tratamiento de la LMA la recaída sigue siendo un importante desafío pues representa la principal causa de fracaso en el tratamiento de la enfermedad (DeWolf & Tallman, 2020), entre el 10 y 40 % de jóvenes recaen y en los pacientes mayores a 60 años el porcentaje es mucho mayor con valores entre el 40 y 60 % (Thol & Ganser, 2020)

Aunque no hay una estandarización sobre el tratamiento para los casos de recaída (Thol *et al.*, 2015), un tratamiento muy utilizado es el FLAG-IDA que es una combinación de fludarabina, altas dosis de citarabina, idarabina y factor estimulante de colonias granulocitos (G-CSF) que combinados con un fármaco inhibidor de BCL-2 recientemente aprobado para su uso en células cancerosas llamado venetoclax, representan un tratamiento intensivo que ha llegado a mejorar el pronóstico para los pacientes candidatos a estos tratamientos (DiNardo *et al.*, 2021). Sin embargo aunque esta terapia ha tenido una mejora en la supervivencia de los pacientes especialmente los recién diagnosticados con AML y que los científicos están adoptando la combinación de Venetoclax con otro tipo de quimioterapia, es muy pronto para que este fármaco se consolide puesto que aun a la fecha se encuentra en estudios de Fase 2 y los efectos secundarios son algo común, especialmente los bajos números de recuento de glóbulos blancos (neutropenia), y las infecciones como la neumonía y bacteriemia, por lo tanto aun hace falta definir la mejor combinación para este fármaco así como los efectos a largo plazo en el resultado de los pacientes (DiNardo *et al.*, 2021; Shimony *et al.*, 2022)

Para los pacientes no aptos a terapia intensiva, como los adultos mayores, en el caso de las recaídas se utilizan agentes hipometilantes (HMA) como la azacitidina, o también con dosis bajas de citarabina "LDAC" (Low-Dose Cytarabine) que actualmente se ha sumado el uso de venetoclax combinado con tanto con HMA como LDAC que si bien ha mejorado el pronóstico, también puede producirse rápidamente resistencia a este inhibidor de BCL-2 por un alza en los niveles de proteínas BCL-XL y MCL-1 (Bose *et al.*, 2017).

Por lo tanto, las terapias ofrecidas para los pacientes con AML no ha tenido mucho éxito y la supervivencia sobre todo en recaída sigue siendo deficiente, la razón principal de estos resultados terapéuticos es la resistencia a los fármacos (Zhang & Chen, 2019)

Resistencia a fármacos como la citarabina en AML.

Como hemos visto con anterioridad la tasa de remisión completa (RC) es más alta en adultos jóvenes que para adultos mayores de 60 años (Thol & Ganser, 2020), siendo en la mayoría de las ocasiones que los pacientes ancianos fracasa en el tratamiento debido a que no se ha tomado una sólida decisión para determinar la elección del tratamiento para esta patología puesto que aunque cronológicamente tengan la misma edad, varía mucho el grado de tolerancia al tratamiento en donde el fármaco puede afectar al paciente más que la propia enfermedad o por el contrario un tratamiento con dosis bajas puede controlar pero no eliminar la enfermedad en estos pacientes favoreciendo la aparición de resistencia a fármacos (Klepin *et al.*,2019; Ferrera *et al.*,2019). Estudios recientes reportan que la resistencia a los medicamentos es clave del fracaso del tratamiento (Si *et al.*,2019; Bryan & Jabbour, 2015).

El proceso de farmacorresistencia en células cancerígenas se puede dividir de 2 maneras resistencia primaria y resistencia adquirida. La resistencia primaria a los fármacos es el fenómeno de que las células tumorales no son sensibles a los fármacos antes del uso de los mismos, es una resistencia intrínseca o natural del tipo de célula. La resistencia adquirida hace referencia al fenómeno en que las células tumorales iniciales son sensibles a los medicamentos de quimioterapia, pero el efecto curativo de los medicamentos se reduce gradualmente y da como resultado la resistencia a los medicamentos después de la terapia de inducción (Zhang *et al.* 2019).

Para que el fármaco haga su función debe pasar por un proceso de activación que consta de mecanismos complejos en los que se puede modificar, degradar parcialmente o formar complejos entre el fármaco con otras moléculas o proteínas, lo que finalmente conduce a que ejerza o no su función. Muchos fármacos contra el cáncer deben someterse a activación metabólica para adquirir eficacia clínica. Sin embargo, las células cancerosas también pueden desarrollar resistencia a dichos tratamientos mediante la disminución de la activación del fármaco (Housman *et al.*, 2014). Un ejemplo se da con un fármaco muy común para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda que es la citarabina (Ara-C), un fármaco nucleósido que se activa después de múltiples eventos de fosforilación que lo convierten en Ara-C trifosfato(Ara-CTP) que es la forma activa y de esta manera se incorpora la cadena de ADN en síntesis impidiendo la replicación de las células (Figura 1), pero una baja en la regulación o una mutación en la vía metabólica que lleva a cabo este proceso puede producir una disminución en la activación de Ara-C, y por tanto puede conducir a la resistencia hacia la citarabina (Zahreddine & Borden, 2013).

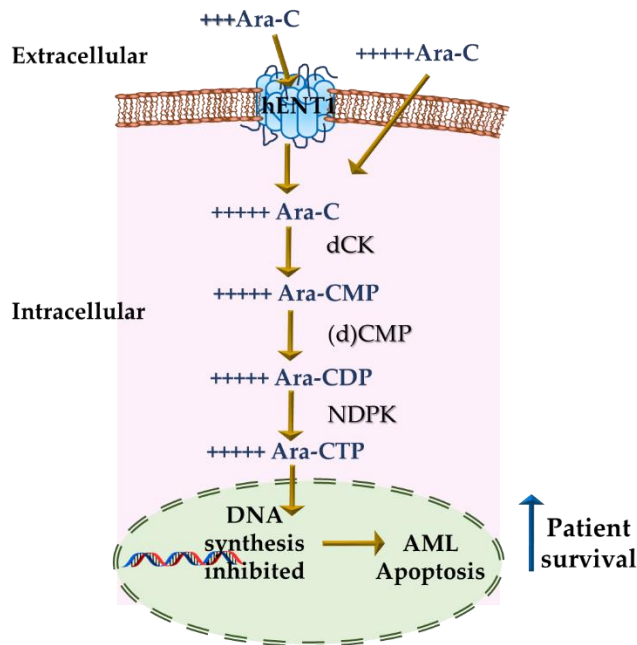


Figura 1. Mecanismo de acción de la citarabina. Para entrar la citarabina (Ara-C) al interior de la célula debe ser transportada por hENT1; una vez dentro Ara-C es fosforilada secuencialmente por las quinasas (dCK, dCMP y NDPK) hasta llegar a Ara-CTP, que se transloca al núcleo y bloquea la síntesis de ADN, provocando apoptosis en la célula (Tomado de Fajardo Orduña, *et al.*, 2021)

Descubrimientos recientes han puesto de relieve los importantes roles de los mecanismos epigenéticos en la patogénesis de la LMA humana (Wouters & Delwel, 2016). La epigenética es un campo relativamente nuevo de la genética definido en 1942 como el estudio de todos aquellos factores no genéticos que intervienen en la determinación de la ontogenia. También ha sido definida como los cambios heredables en la expresión génica, los cuales ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del ácido desoxirribonucleico (Waddington, 1942). Las modificaciones epigenéticas constan de varios mecanismos de regulación que incluyen metilación del ADN y modificaciones de histonas, entendiendo a estas proteínas como las encargadas de empaquetar el ADN y considerando que los dos tipos de mecanismos participan en la modulación de los complejos remodeladores de la cromatina (García Robles *et al.*, 2012). Con estudios recientes se ha dado a relucir que las enzimas epigenéticas desempeñan funciones esenciales durante el inicio y el desarrollo de la LMA humana. Un ejemplo de ello es la desacetilasa dependiente de NAD⁺, sirtuina 1; "SIRT1" (Yi & Luo, 2010).

Sirtuinas

SIRT1 pertenece al selecto grupo de enzimas conocidas como “sirtuinas” las cuales son proteínas histónicas desacetilasas (HDAC) que comparten un dominio central catalítico conservado de 275 aminoácidos y que dependen de la forma oxidada del dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD⁺) para ejercer función, existen 7 miembros de este grupo las cuales son SIRT del 1 al 7 que funcionan como sensores metabólicos muy sensibles a los niveles de NAD⁺ que contribuyen a mantener la homeostasis fisiológica del organismo (Kupis *et al.*, 2016; O'Callaghan, C., & Vassilopoulos, A., 2017).

SIRT1

SIRT1 es una proteína histona desacetilasa que es codificada por el gen que lleva el mismo nombre, es la más estudiada de las sirtuinas y participa en el silenciamiento génico y la formación de heterocromatina (Vaquero, 2009), también regula una amplia variedad de procesos biológicos y funciones celulares mediante la desacetilación de una lista creciente de proteínas no histónicas, incluidos los factores transcripcionales para regular la progresión del ciclo celular y supervivencia, factores de reparación del ADN y receptores nucleares, reloj circadiano y factores relacionados para regular el metabolismo (Tabla 2) (Houtkooper *et al.*, 2012).

Tabla 2. Lista de proteínas blanco no histonas que son silenciadas por SIRT1. (Tomado y adaptado de Roth y Chem, 2014).

Factores Transcripcionales	Factores de reparación	Receptores Nucleares
p53	Ku70	LXR
FOXO1	RAD51	FXR
FOXO3a	NBS1	ER α
NF-kB	APE1	AR
c-Myc	XPA/C	PPAR γ
N-MYC	WRN	PGC1 α
E2F1		CLOCK
		PER2

Por lo tanto, SIRT1 está vinculado al control regulador de diversos procesos celulares normales y anormales que van desde respuestas al estrés, envejecimiento, metabolismo y hasta cáncer (Houtkooper *et al.*, 2012).

p53 y su papel en el Cáncer

p53 es una proteína con múltiples funciones implicada en el control del ciclo celular, integridad del ADN, así como de supervivencia ante agentes que dañan el material genético, de esta manera, se le ha atribuido la capacidad antitumoral pues se hace más presente ante el estrés oxidativo y la hipoxia impidiendo la formación de células anormales deteniendo el ciclo celular cuando hay daños imposibles de reparar en el ADN (Blagih *et al.*, 2020), fue el primer objetivo de desacetilación no histónico identificado para SIRT1 (Vaziri *et al.*, 2001). Originalmente solo se tenía entendido que la desacetilación de p53 estaría mediada por el complejo PID / HDAC1, PID: proteína objetivo p53 en los complejos de desacetilasa (Luo *et al.*, 2000). Fue a partir del descubrimiento de las sirtuinas y su actividad desacetilasa que se sugirió que una de las isoformas humanas podría ser responsable de la inestabilidad observada de la acetilación de p53 (Langley *et al.*, 2002).

Debido a que p53 tiene potentes efectos apoptóticos y, en consecuencia, está sujeto a un estricto control regulador en las células, cuando las células están expuestas al estrés, incluido el estrés genotóxico, la proteína p53 se acumula rápidamente y se activa para las funciones biológicas posteriores, intentando reparar los daños o mandando a las células la apoptosis cuando el proceso es irreparable. Es por eso que la inversión de la acetilación puede modificar la función de p53, debilitando los efectos biológicos que este tiene sobre las células (Lain & Lane, 2003). La evidencia acumulada indica además que los tumores que retienen p53 de tipo silvestre tienen otros defectos en la vía p53 que son importantes en la formación de cáncer (Appella & Anderson, 2001). SIRT1 modula la supervivencia celular y la reparación del daño del ADN desacetilando p53 para reprimir su activación (Chalkiadaki & Guarente, 2015). Existen varios estudios que han indicado un papel patogénico de SIRT1 en leucemias humanas, incluida la LMA (Sasca *et al.*, 2014).

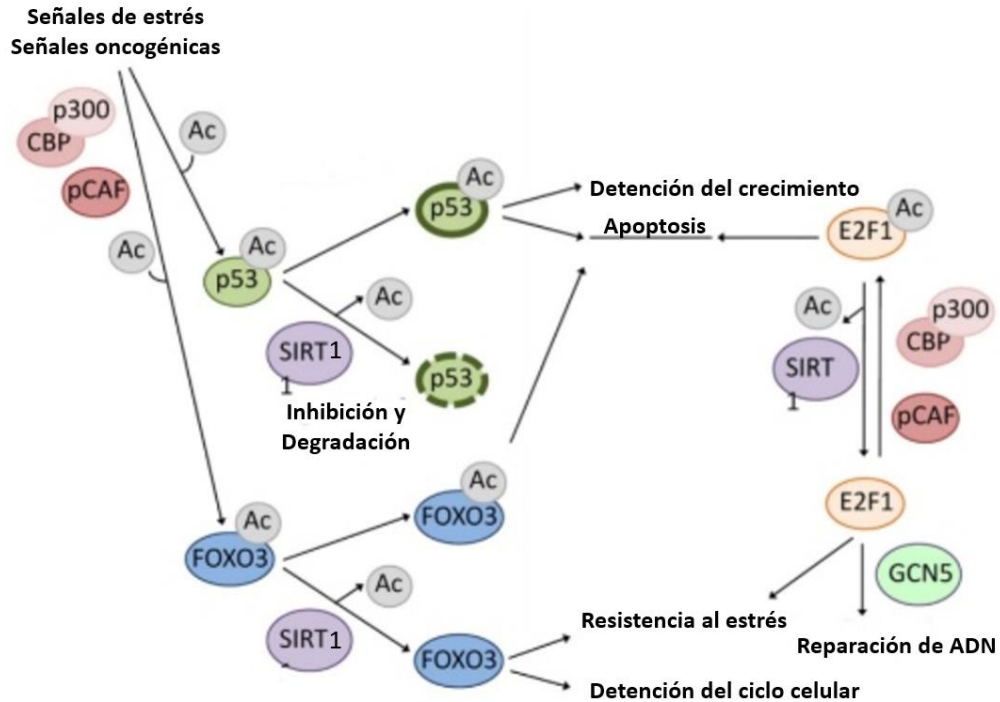


Figura 2. SIRT1 promueve la supervivencia celular a través de la desacetilación de p53, FOXO3a y E2F1 (Tomado y modificado de Olmos *et al.*, 2011).

En respuesta a las señales de estrés tanto oncogénicas como ambientales, p53 se acetila con CBP / p300 y P / CAF, lo que lleva a su estabilización y activación de los programas apoptóticos y de detención del ciclo celular. La desacetilación de p53 por SIRT1 inhibe su actividad transcripcional, suprimiendo así la apoptosis dependiente de p53, y permite la degradación de p53 mediada por Mdm2. Al igual que p53, el factor de transcripción FOXO3a se acetila en respuesta al estrés, lo que a su vez probablemente conduce a la activación de genes pro-apoptóticos. La desacetilación de SIRT1 a FOXO3a promueve la actividad de FOXO3a en genes involucrados en la detención del ciclo celular y la resistencia al estrés oxidativo, pero inhibe la capacidad de FOXO3a para inducir apoptosis, aunque el mecanismo que media este control diferencial de transcripción aún no está claro. La actividad del ciclo celular y el regulador de apoptosis E2F1 también está regulada por acetilación / desacetilación. La acetilación de E2F1 por P / CAF, y en menor medida por CBP / p300, estimula su actividad proapoptótica, que puede ser dependiente de p53 o independiente de p53. La desacetilación de E2F1 por SIRT1 impide la activación de sus genes diana pro-apoptóticos, incluidos p53 (Figura 2) (Olmos *et al.*, 2011).

Eje SIRT1- P53 en la Leucemia Mieloide Aguda.

En LMA, SIRT1 previene la activación de p53 genotóxica inducida por el estrés y promueve el desarrollo de células leucémicas (Chen *et al.*,2015). Además, SIRT1 no solo promueve el mantenimiento, sino que también facilita la resistencia a los medicamentos de las células troncales de LMA (Li L. *et al.*,2014).

El proceso por el cual SIRT1 facilita la resistencia a los medicamentos de las células troncales de LMA se debe a que las células troncales/progenitoras LMA demuestran diferentes niveles de sobreexpresión de SIRT1 y sensibilidad al tratamiento con inhibidores de SIRT1. Los efectos de la inhibición de SIRT1 en células de LMA se relacionan con el aumento de la acetilación p53 y la actividad transcripcional. Estos resultados indican un papel importante para la regulación descendente mediada por SIRT1 de p53 en el crecimiento y mantenimiento de las células troncales. Y que, aunque se ha podido encontrar que la activación de SIRT1 contribuye a la resistencia de fármacos en la LMA (Li L. *et al.*, 2014), el mecanismo por el cual SIRT1 se regula en la LMA humana no está totalmente comprendido (Tian *et al.*, 2018).

La penetración de fármacos es el primer paso de la terapia contra el cáncer y se determina por las propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) a nivel celular y del cuerpo (sistémico) (Pascuzzo & de Vallín,2008). La ingesta de fármacos celulares, el eflujo y la desintoxicación reflejan las propiedades de ADME de las células cancerosas. La expresión elevada de los transportadores de membranas de la familia ABC es un mecanismo bien conocido de resistencia multidrogas también conocida como multifarmacos (Oh *et al.*,2010). Se ha documentado que SIRT1 se activa en múltiples líneas celulares de cáncer resistentes a los medicamentos y biopsias clínicas. La activación de SIRT1 aumenta la expresión del transportador ABC P-glicoproteína y MDR1 a través de la desacetilación de FOXO1 y el aumento del nivel nuclear de FOXO1. También se ha demostrado que SIRT1 regula positivamente el receptor X del receptor nuclear y aumenta la expresión del gen objetivo LXR ABCA1, otro transportador ABC. En consecuencia, la expresión activada de los transportadores ABC por SIRT1 puede aumentar el eflujo de fármacos, disminuir la concentración de fármacos en las células cancerosas y conducir a la resistencia a los medicamentos (Figura 3) (Wang & Chen, 2013).

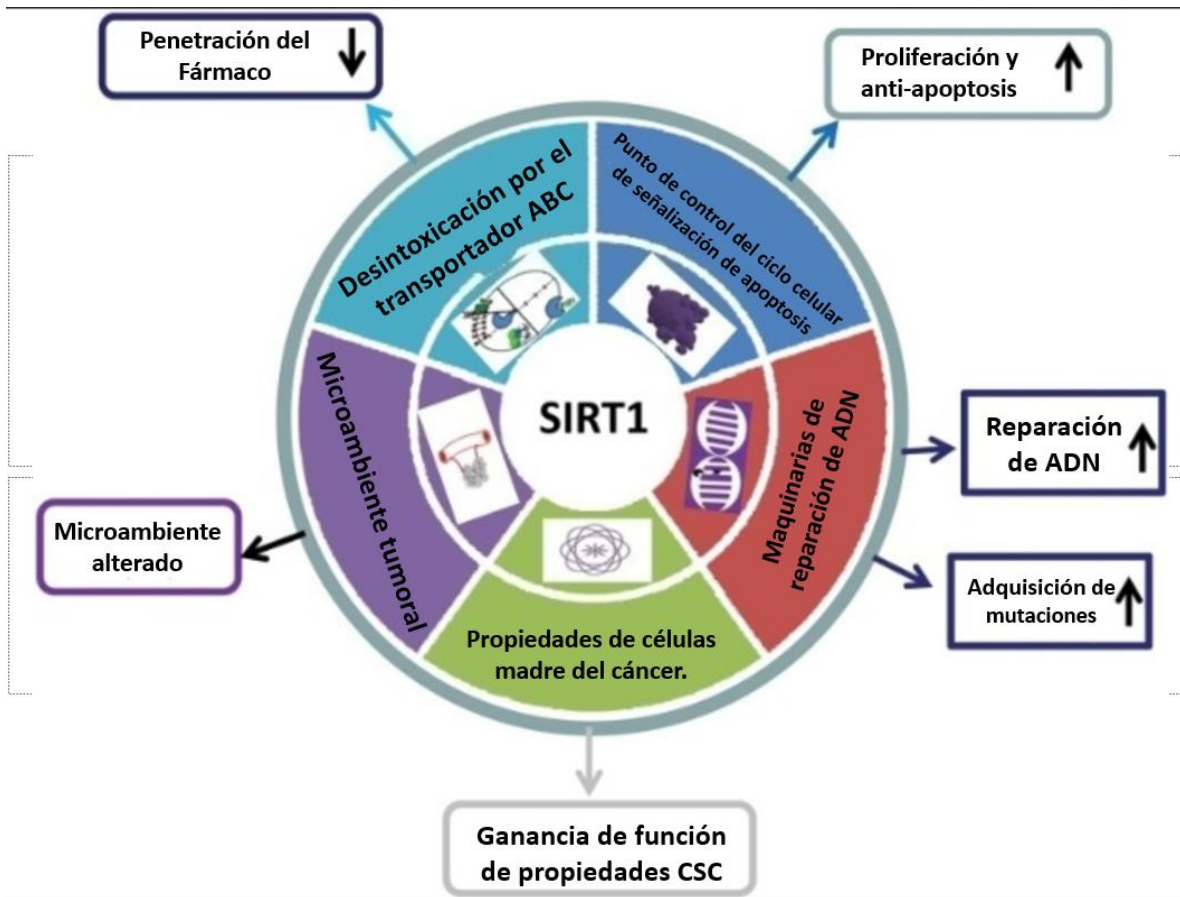


Figura 3. SIRT1 regula múltiples aspectos de la resistencia a los medicamentos contra el cáncer (Tomado, modificado y traducido de Wang *et al.*, 2013).

La sobreexpresión de SIRT1 en las células cancerosas reduce la penetración de fármacos, confiere la proliferación celular y las ventajas antiapoptóticas, promueve la reparación del daño del ADN y la adquisición de mutaciones genéticas bajo estrés terapéutico, aumenta la ganancia de la función de las propiedades de las células madre cancerosas y modula el microambiente tumoral para la resistencia a los fármacos de células cancerosas (Figura 3). El porcentaje de sobreexpresión de SIRT1 silvestre en LMA es desconocido, sin embargo, se han investigado moléculas que bloquean la actividad de SIRT1 como los son el Sirtinol (Ota H. *et al.*, 2016), un inhibidor de SIRT1 que induce la detención del crecimiento celular similar a la senescencia con señalización atenuada de Ras-MAPK en células cancerosas humanas, permitiendo que p53 ejerza actividad apoptótica sobre las células cancerígenas. También existe otro inhibidor encontrado más recientemente, conocido como “IRF9” (Tian *et al.*, 2018), el cual se une al promotor SIRT1 y reprime la expresión de SIRT1, activando así el supresor tumoral p53 y sus genes diana.

Otras moléculas implicadas en resistencia a fármacos.

Como hemos visto anteriormente (Figura 1), existen varias moléculas que interaccionan con Ara-C para tomar su forma activa (Ara-CTP) para integrarse al núcleo y detener la replicación del ADN, a continuación, mencionaremos algunas de las más relevantes:

ENT1 (Transportador equilibrante de nucleósidos 1): Es una proteína transportadora unida a la membrana cuya principal función es el transporte de nucleósidos de pirimidina y purina del cual, aunque se conoce poco, se ha reportado como el responsable del 80 % de la captación de Ara-C en las células de leucemia humana (Ueda *et al.*, 2015; Macanas *et al.*, 2017; Boswell & Hays, 2017).

dCK (Desoxicitidina quinasa): Es una proteína perteneciente al grupo de las quinastas que limita la activación de la citarabina (Ara-C), pues cataliza la fosforilación a Ara-C a monofosfato de citarabina (Ara-CMP), un paso necesario para que la citarabina continúe siendo metabolizada por la célula hasta llegar a trifosfato de citarabina (Ara-CTP) y así incorporarse en el ADN frenando la replicación del mismo, permitiendo la eficacia clínica de este fármaco, se ha reportado que una baja en la expresión de dCK se ha relacionado a un mecanismo de resistencia a la citarabina en la LMA (Wu *et al.*, 2021; Abraham *et al.*, 2015).

MRP1 (Proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos 1): Es una proteína miembro del grupo conocido como transportadores de casete de unión a ATP transmembranales (transportadores ABC), importante para la salida de sustrato, protegiendo a las células contra metabolitos tóxicos, siendo en la AML y el cáncer en general un mecanismo reportado de resistencia a múltiples sustratos fisiológicos como los fármacos terapéuticos, influyendo en fracaso del tratamiento farmacológico, la progresión de la enfermedad y la generación de resistencia a múltiples fármacos incluyendo la citarabina (Fletcher *et al.* 2010; Kunadt *et al.* 2020).

MDR1 (Gen de resistencia a múltiples fármacos 1): Es otro miembro de los transportadores ABC, conocido también como glicoproteína-P, cuya función se centra en la desintoxicación y el metabolismo de fármacos. Se ha reportado que la sobreexpresión de este gen se relaciona con un mal pronóstico en el tratamiento con quimioterapia en pacientes con AML pues tenían tasas más bajas de remisión completa, así como una tasa de recaída más alta. Aunque no ha sido identificado como un desintoxicador específico de la citarabina es de relevancia cuando se habla de resistencia multifármacos, es por ello que en este estudio veremos si cambia su expresión en la resistencia a Ara-C. (Kaltoum, *et al.* 2020; Xutao *et al.* 2018)

Resistencia cruzada

Como sabemos la quimioterapia es la principal estrategia para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, existe un gran problema que limita el éxito de esta misma, el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos ya sea al fármaco que en ese momento se está usando o a otro que incluso no se parece tanto estructural como funcionalmente, a esto se la ha nombrado como “Resistencia cruzada” (Aldonza *et al.*,2016), planteado un desafío incluso mayor que la resistencia preexistente puesto que ya que el tratamiento de segunda línea pierde su eficacia (Buck *et al.* 2021). En el caso de una antimetabolito como lo es la citarabina la mayor limitación del tratamiento es que se llegan a producir clones de estas células malignas resistentes tanto in vitro como in vivo que dejan de responder al tratamiento (Martin *et al.*, 2000). Cuando se pasa de un estado sensible a uno indiferente hacia el fármaco por parte de las células tumorales se habla de una transformación fenotípica la cual los científicos han denominado el fenotipo (MDR), aunque esta especificado que efectos engloban al fenotipo MDR su origen es multifactorial explicado por una variedad de mecanismos moleculares de quimiorresistencia que incluyen varios genes o proteínas con expresión o función alterada, como por ejemplo la hiperactividad en la salida del fármaco por los transportadores dependientes de ATP de la familia ABC como lo es MDR1 cuya expresión se correlaciona con un aumento en la recaída del paciente durante o después del tratamiento con varios medicamentos de quimioterapia, lo que conduce a una reducción en la eficacia de los agentes anticancerígenos (Fajardo *et al.*, 2021).

Resistencia cruzada entre Ara-C y Daunorrubicina.

Aunque no se ha confirmado resistencia cruzada puntual entre citarabina y daunorrubicina existe información que sugiere que las mutaciones, sobreexpresión o baja expresión de p53 ha logrado favorecer la resistencia a los medicamentos estándar como las antraciclinas grupo al cual pertenece la daunorrubicina, (Hientz *et al.*,2017). En el caso de SIRT1 hay experimentos previos en células de LMA donde la sobreexpresión de este genera resistencia a la apoptosis causada por fármacos y al momento de inhibir SIRT1 estas mismas células se sensibilizan a fármacos como la citarabina y la daunorrubicina (Sasca *et al.*,2015), por lo tanto , cabe la posibilidad de que encontremos resistencia cruzada entre estos 2 farmacos en las células que desarrollemos la resistencia, por el otro lado existe en estudio en células de LMA humanas HL60 resistente a doxorubicina que tenía resistencia cruzada a daunorrubicina pero seguía siendo sensible a los antimetabolitos como Ara-C y el metotrexato (Bhalla *et al.*,1985.). Como hay poca información reciente sobre esta resistencia cruzada a estos fármacos es importante actualizar esta información de forma experimental.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tratamiento para la leucemia mieloide aguda que consiste en inducción estándar de citarabina combinada con antraciclinas no conduce a una remisión a largo plazo en la gran mayoría de los pacientes debido a la inducción de resistencia a los fármacos, que provoca recaídas o recidivancias no solo al fármaco aplicado sino a fármacos similares debido a la resistencia cruzada, provocando limitaciones en el tratamiento para estos pacientes. Existen estudios que reportan un incremento en la expresión de SIRT1 en AML humana en recaída y recidivante bloqueando la actividad de P53 y por tanto inhibiendo la apoptosis de estas células y confiriéndole resistencia a múltiples fármacos, pero en células leucémicas de ratón como WEHI-3 silvestres o resistentes a citarabina no se conoce la participación del eje SIRT1-p53.

JUSTIFICACIÓN

La relevancia de este trabajo recae en la generación de una célula WEHI-3 resistente a citarabina, de la cual no está reportada su existencia en la literatura. La generación de esta línea resistente permitirá tener un modelo de estudio de la leucemia resistente a multidrogas no solo en México si no a nivel internacional. Por otro lado, mostrar la participación del eje SIRT1-p53 en este modelo de resistencia a multidrogas permitirá dotar a los investigadores de información sobre este evento y hacer experimentos futuros destinados a superar la resistencia a citarabina en donde participan estos genes.

HIPÓTESIS

La citarabina, es el fármaco por excelencia para tratar la LMA, ya que es citotóxica para las células leucémicas, también desarrolla resistencia en la mayoría de los pacientes, que en casos de recaída se vuelve a usar, pero en dosis más altas, generando algunas veces más resistencia. Debido a ello suponemos que al exponer células leucémicas de ratón WEHI-3 a concentraciones crecientes de citarabina adquirirán resistencia a este fármaco, se ha reportado que la adquisición de resistencia a la citarabina en células leucémicas humanas es un proceso en lo que estaría implicada la ruta SIRT1-p53. Por lo anterior la generación de la línea celular de leucemia de ratón WEHI-3 resistente citarabina tendrán alteraciones en SIRT1 o p53.

OBJETIVOS

Objetivos Generales.

Generar una línea celular WEHI-3 Resistente a citarabina.

Comparar la expresión del ARNm de SIRT1 y p53 en la línea celular WEHI-3 silvestre y resistente citarabina.

Objetivos Particulares.

1. Determinar la IC50 de citarabina para la línea celular WEHI-3 Parental (WEHI-3/P).
2. Desarrollar una línea celular WEHI-3 Resistente a citarabina (WEHI-3/Ara-CR).
3. Determinar la IC50 de citarabina para la línea celular (WEHI-3/Ara-CR).
4. Determinar el nivel de expresión de los genes implicados en la resistencia a multifarmacos (ENT1, dCK, MRP1 y MDR1) en WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR.
5. Determinar el nivel de expresión de p53 en WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR.
6. Determinar el nivel de expresión de SIRT1 en WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR.
7. Determinar la existencia de resistencia cruzada a daunorrubicina en las células WEHI-3/Ara-CR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas Celulares y Cultivo celular

La línea de leucemia mielomonocítica WEHI-3 de ratón obtenidas del ATCC (American Type Culture Collection), se cultivaron en medio de cultivo IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium Gibco BRL, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO BRL, USA) y 1.5 μ M de beta-mercaptoetanol, a una densidad de 2×10^3 células/ml en 5ml, bajo las condiciones de 37°C y 5% de CO₂ con resiembra cada 48 h. Para inducir resistencia se cultivaron con concentraciones crecientes de Ara-C que incrementaba cuando las células alcanzaban una proliferación similar a la parental aplicando como concentración la mitad del duplicado que en ese momento se estaba manejando. (64.5 nmol, 88.6 nmol, 133nmol y 197.5nmol) por un periodo de 11 meses durante el tiempo de cultivo.

Proliferación Celular (MTS)

Las células WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR se cultivaron en placas de 96 pocillos a la densidad de 5×10^3 células, en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de citarabina. Para evaluar la proliferación celular después del crecimiento, se le agregó CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS) ((bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) y se dejó durante 4 horas. Se leyó a una densidad óptica a 490 nm y se determinó utilizando un lector de placas (Multiskan Go).

Obtención de la IC50

Para la determinación de la concentración inhibitoria media (IC50) las células WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR los datos obtenidos del ensayo con MTS y se determinaron mediante regresión lineal usando el software Microsoft Office Excel 2019, se determinó la desviación estándar mediante 3 ensayos individuales de este mismo experimento.

Viabilidad celular (Azul tripano).

Los ensayos de exclusión de azul tripano (Sigma, St. Louis, MO) se utilizaron para determinar el número de células viables en cada cultivo tratado, se determinó mediante el conteo directo en una cámara Neubauer, y las células no teñidas se consideraron viables.

Cytospin

Para obtener las fotografías de las células parentales con o sin citarabina fue necesario realizar centrifugados de muestras de células en 20 μ L de PBS a una densidad de 20,000 cel/ml a 500 RCF por 5 minutos en un cytopspin (Shandon Elliot Cytospin Blood Plasma Centrifuge), luego la tinción se hizo con el hemocolorante rápido (HYCEL), se sumergió un cubreobjetos con células 20 segundos en la solución fijadora, posteriormente se dejó 20 segundos en el hemocolorante 1 (Eosina), y por último 20 segundos en el hemocolorante 2 (Azul de metileno), con lavados con agua destilada entre cada cambio de colorante y fijador.

Diseño de Cebadores

Para seleccionar los “primers” o cebadores de los genes a evaluar fue necesario acceder al sitio del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/genes-expression>) y buscar cada uno de los genes por separado en el apartado titulado “RefSeq transcripts”, subapartado “FASTA” y copiamos la secuencia de gen para pegarla en una hoja de WORD seguido del código del gen que generalmente comienza con “NM-XXXX”. En la sección del NCBI “Primer Blast” pegamos el número del gen y ajustamos los valores que buscamos en los genes, en el WORD resaltamos la secuencia FORWARD, copiamos el REVERSE y en seguida le sacamos su cadena complementaria. Buscamos la secuencia complementaria en el WORD y la resaltamos también, copiamos la secuencia FORWARD hasta dónde llega la complementaria que resaltamos y contamos el número de caracteres, si el número de pares de bases coincidía con la descripción del Primer sabíamos que es un primer bien diseñado y confiable.

Tabla 3. Cebadores utilizados en la evaluación de expresión de genes para PCR de punto final.

Gen	Secuencia del Primer (Forward).	Secuencia del Primer (Reverse).
P53	5'-GTT CCG AGA GCT GAA TGA GG-3'	5'-TCT GAG TCA GGC CCT TCT GT-3'
SIRT1	5'-CGG CTA CCG AGG TCC ATA TAC-3'	5'-CAG CTC AGG TGG AGG AAT TGT-3'
Gen Control B-Actina	5'-CAC TGT CGA GTC GCG TCC -3'	5'-CGC AGC GAT ATC GTC ATC CA -3'
MRP1	5'-CAG TGG TCC AGG GAA GGA GTC A -3'	5'-GCA TCA GTG TCA CTC TGG GAT C -3'
MRP1	5'-CAG TGG TTC AGG GAA GGA GTC A -3'	5'-CAC TGT GGG AAG ACG TGC T -3'
dCK	5'-AGC AGG GAG TCT GGA GGT AG-3'	5'-GAG AAG GCA GAG AAG GCT GG-3'
ENT1	5'-CTG GAA AAG CGT AGA GGC TG -3'	5'-CTT CCC TTC GCA GAC TGC TT -3'

Extracción de RNA

Para obtener el RNA de las Células WEHI-3 Parentales y Resistentes fue necesario lisar con 500µL de TRI (SIGMA No. De Cat. T9424-100mL) por cada 1×10^6 cel (1 ml para $5-10 \times 10^6$), y luego adicionamos 200 microlitros de cloroformo para vortexear pasando luego a centrifugar a 30,000 RCF por 15 min pasando la fase acuosa resultante a un tubo nuevo adicionando 300µL de isopropanol para volver a centrifugar a 30,000 RCF por 10 minutos a 4 °C, se le adiciono 1 ml de etanol al 75%, con un tercer periodo de centrifuga a 2000 RCF por 5 minutos a 4 °C, se secó el pellet y se hidrató con agua inyectable.

Obtención de cDNA (Retrotranscripción)

El procedimiento para obtener el cDNA a partir del RNA requirió del kit (Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit No. Cat. 4368814) usando las cantidades de 2µL de 10x RT Buffer, 0.9 µL de 2x dNTPs Mix, 2 µL de random primers y 1µL de MultiscribeRT, y 2 µL de RNA y H2O destilada para

acompletar correspondiente para 20 μ L de reacción, se pasó al Termociclador y se le agrego los ciclos que indicados para los cebadores.

PCR Punto final

Para preparar la reacción usada para PCR usamos las inidicaciones del manual del kit de (Applied Biosistems SYBER Green PCR Master Mix No de CAT. 4309135), donde en tubos eppendorf, se añadió el 2 μ L de cDNA, posteriormente se agregó 5ul PCR MasterMIX, 1ul de los cebadores (Forward/Reverse) previamente reconstituidos y 2 μ L de agua destilada.

Nota: El primer se realizaron alícuotas para no arriesgar toda la muestra y se puso en el termociclador el tiempo que indico el manual.

Preparación de TBE 10x

Para preparar TBE 10x se diluyeron 108g de tris base, 55g de ácido bórico y 40 mL de EDTA (0.5M pH 8 y se aforó a 1 L con agua destilada.

Preparación de gel de agarosa

El gel se preparó con TBE diluido a 0.5X y agarosa al 1.5% (Invitrogen No. Cat. 16500-100), luego se agregaron 70 mL de TBE 0.5X + 1.05g de agarosa, se puso en el microondas hasta hervir y una vez que se disolvió correctamente se dejó reposar unos minutos para agregar 1.5 μ L de bromuro de etidio (Sigma Aldrich No. Cat.E1385-5mL), se vertió el líquido en el molde de la cámara de electroforesis junto con el peine dejándolo enfriar y secarse.

Carga de bandas y parámetros

Para la carga de las bandas se quitó el peine del gel y se colocó dentro de la cámara de electroforesis, llenamos hasta que quede sumergido en TBE 0.5X y se colocó 1.5 μ L del marcador de peso molecular (CSL-MDNA-100BP Cleaver), por pozo se puso 1.5 μ L de buffer de carga y 2 μ L de cada muestra. Los parámetros para para correr el gel fueron 90 Volts por 40 minutos y finalmente tomar una fotografía en fotodocumentador (E-BOX VX-2/20LMX BIOTECH SL.) para su posterior análisis.

Análisis densitrometrico de bandas

Para el análisis de bandas en el gel de agarosa usamos el software Image Lab versión 6.0.1 (BIO-RAD Laboratories) las imágenes tomadas con la fotodocumentador tuvieron que convertirse de formato .jpg a .tiff para ser reconocidas por el software la comparación de valores e intensidad de banda lo hace en automático entregando un reporte el cual pegamos en EXCEL para graficar. En Excel separamos y acomodamos los valores correspondientes a las WEHI-3 Parentales y WEHI-3 Resistentes para compararlos, llevamos los valores que tenían las Parentales al 100% y con base a eso que decremento o incremento tenía la resistente comparada con la parental, sacamos promedios de los experimentos individuales para acomodar las 3 repeticiones, se determinó la desviación estándar de los datos y se graficaron los valores.

Análisis estadístico

Se analizaron los datos obtenidos de cada experimento individual de WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR para obtener promedios, desviación y error estándar, se graficaron los valores y se les realizo prueba de T de Student.

RESULTADOS

Determinación de la IC50 a Ara-C en la línea de leucémica mielomonocítica de ratón WEHI-3 parental (WEHI-3/P).

Para el desarrollo de la línea celular WEHI-3 resistente a citarabina (WEHI-3/Ara-CR) primero se realizó una curva de proliferación dependiente de la concentración de 123 a 716 nmol con las células WEHI-3 parentales (WEHI-3/P), misma que se evaluó con MTS (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) luego de 48 horas de cultivo.

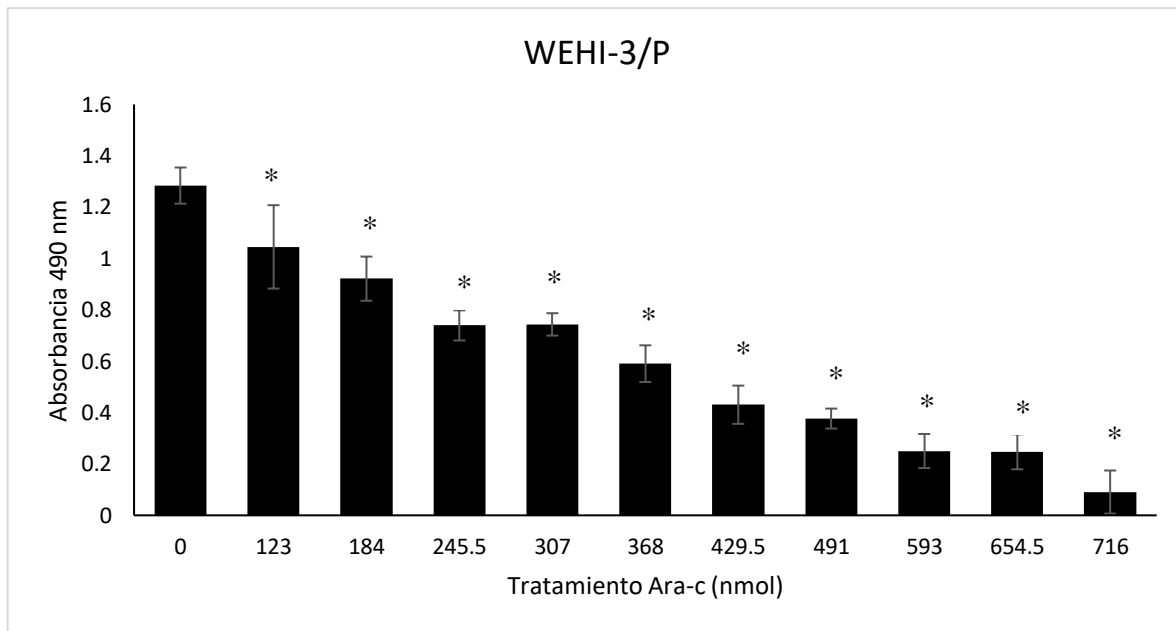


Figura 4: Curva de las absorbancias obtenidas del ensayo de proliferación dependiente de la concentración de Ara-C en células WEHI-3/P medidas a 490 nm con MTS luego de 48 horas. Control con vehículo – PBS (0), Ara-C (123,184, 245.5, 307, 368, 429.5, 491, 593, 654.5, 716 nmol). Promedio de 3 experimentos independientes \pm Desviación estándar. *Los resultados estadísticamente significativos diferentes con respecto al control (0) con la prueba Tukey (p. ≤ 0.05).

Los resultados muestran que se inhibe la proliferación, en forma significativa, a medida que la concentración se incrementa a partir de 123 nM de Ara-C (Figura 4). Se encontró que la concentración media de inhibición de la proliferación (IC50) de la citarabina (Ara-C) en células WEHI-3/P fue 352.78 nmol (Tabla 5). De estos datos se decidió probar cantidades para ver como reaccionaban las células a las 48 horas, necesitábamos comenzar con concentraciones que fueran menores a la IC50 para evitar dañar a las células, pero suficiente para iniciar su condicionamiento y permitir la adaptación y conseguir proliferación a pesar de la Ara-C tal como se señala en la Figura 5.

Diseño de desarrollo de una línea celular WEHI-3 Resistente a Citarabina (WEHI-3/Ara-CR).

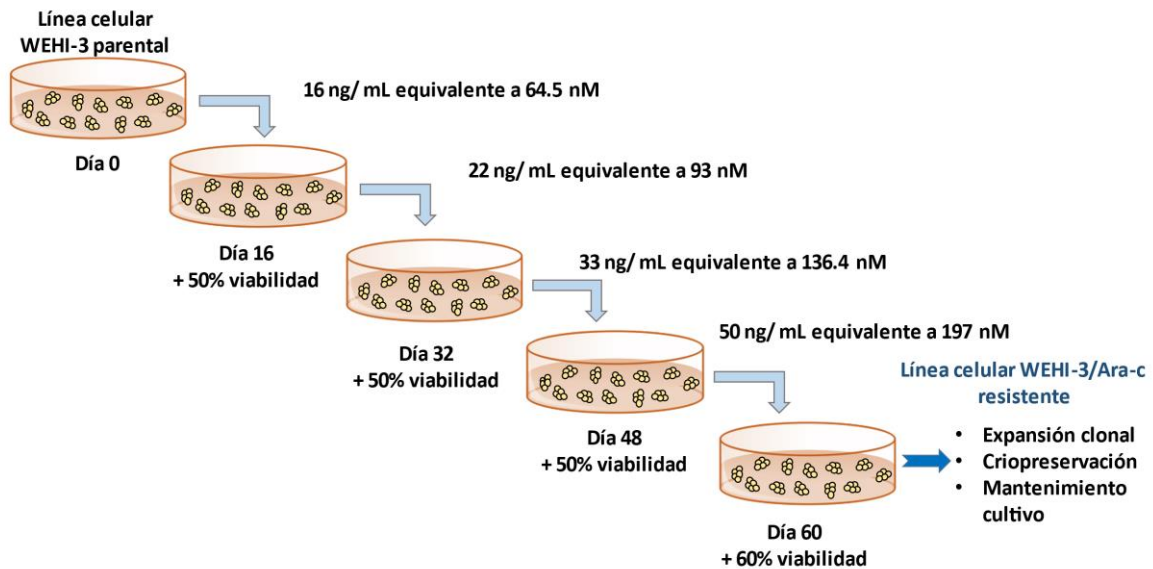


Figura 5.- Diagrama de la metodología empleada en el desarrollo de la línea celular WEHI-3 resistente (WEHI-3/Ara-CR).

Con base en lo anterior decidimos comenzar con 64.5 nM de Ara-C, pues esta cantidad estresaba a las células, pero las mantenía vivas para generar el proceso de la resistencia en cada resiembra cada 48 horas. Cuando las células alcanzaban una proliferación similar a la parental se le subió la concentración a la mitad del duplicado de la concentración que en ese momento se estaba manejando. Así las células pasaron 21 días con 64 nM, la siguiente resiembra se incrementaba la concentración de Ara-C a 93 nM y se tomaba como día cero para esa nueva concentración y con cada incremento se repitió el ciclo. Así al llegar al día 92 con 197 nM, no eran 92 días totales, si no que habían pasado por las cantidades previas de tal manera que al llegar el día 92 en realidad las células estuvieron un total de 207 totales con Ara-C para adquirir resistencia y los experimentos posteriores se hicieron pasados esta cantidad de días.

Efecto de Ara-C sobre WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR.

Luego de observar que las células resistentes proliferaban y a simple vista se veían igual que las parentales, decidimos comparar el efecto de la presencia y ausencia de citarabina en estas líneas celulares cultivadas a mismas condiciones de cultivo y a la misma densidad celular.

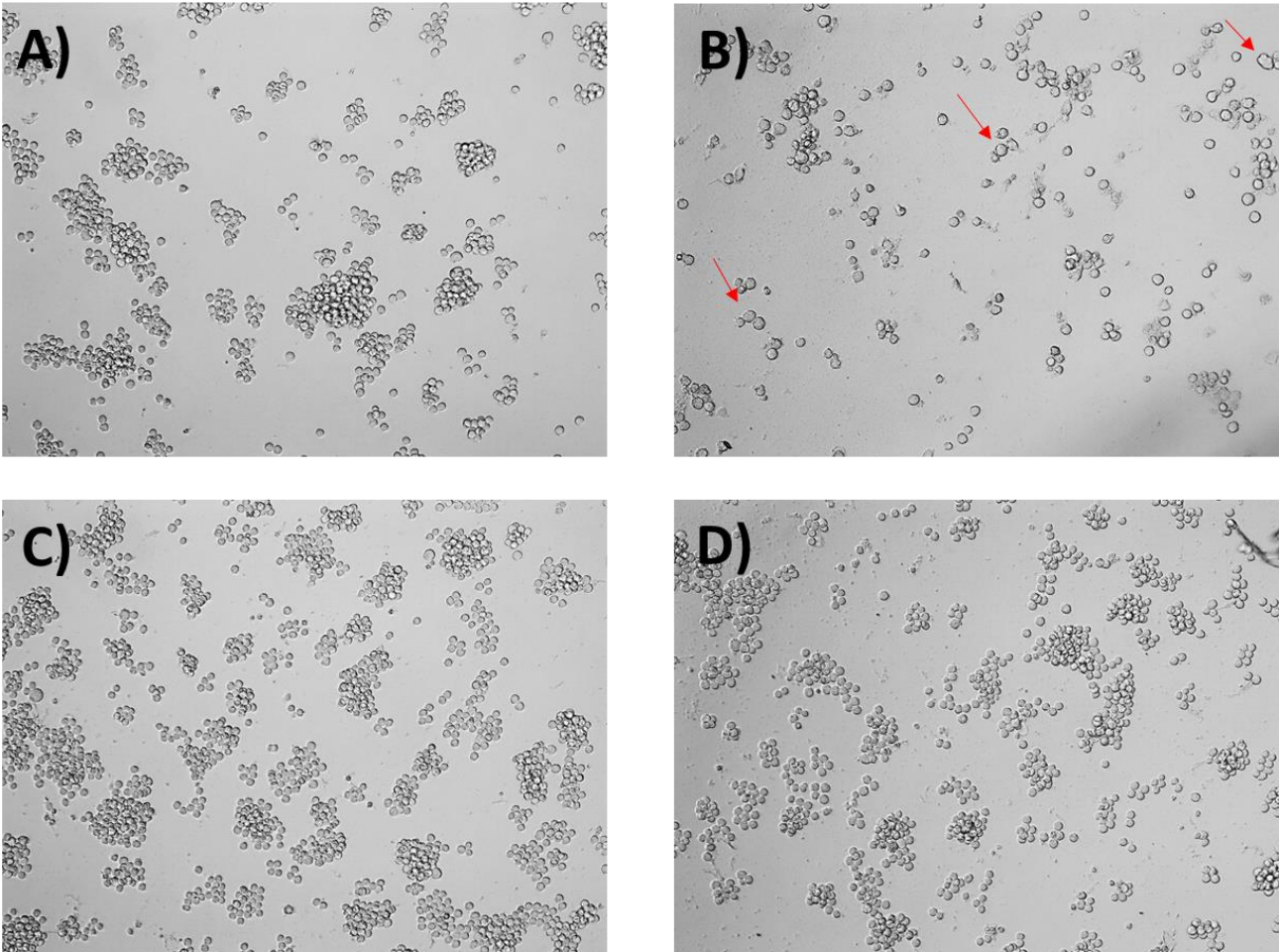


Figura 6. Vista in situ de células WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR 48 horas después de cultivo en ausencia y presencia de 50 ng/mL (197nM) de citarabina (Ara-C) a 10x. A) WEHI-3/P, B) WEHI-3/P + 197 nM de Ara-C, C) WEHI-3/Ara-CR, D) WEHI-3/Ara-CR + 197 nM de Ara-C.

Después de 48 h de cultivo, bajo el microscopio invertido se observa gran cúmulo de células en todas las placas de cultivo, excepto en WEHI-3/P en presencia de 197 nM de Ara-C cuyas células se observan de mayor tamaño lo que nos indicaría una posible inducción a diferenciación y con una marcada disminución del número de células como se señala con las flechas (Figura 5). También WEHI-3/P en presencia de 197 nM de Ara-C, pasadas más de 48 horas de cultivo ya no proliferaban las suficientes células para conseguir más resiembas, cosa que no sucedió con las

resistentes con o sin citarabina mostrando número de células, capacidad de formar grupos de células y morfología idéntica a su contraparte sin citarabina (Figura 5). Al evaluar la viabilidad celular se encontró que y solo WEHI-3/P con Ara-C (197 nM) sufren una reducción significativa (Tabla 4).

Tabla 4. Viabilidad celular de WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR en presencia o ausencia de Ara-C por medio de azul tripano con ayuda de microscopio. Promedio de 3 experimentos independientes \pm Desviación estándar. *Los resultados estadísticamente significativos diferentes con respecto al WEHI-3 parental sin Ara-C con la prueba Tukey ($p. \leq 0.05$).

Tipo de Célula	Viabilidad (%) Promedio más SD.
WEHI-3/Ara-CR + 197 nM de Ara-C	91.3 \pm 7.0
WEHI-3/Ara-CR sin Ara-C	98.61 \pm 2.4
WEHI-3/P + 197 nM de Ara-C	24.62 \pm 14.4*
WEHI-3/P sin Ara-C	100 \pm 0

Con base en lo obtenido por estos experimentos, vimos la morfología y estado celular en presencia y ausencia de citarabina, por ello fijamos células en un portaobjetos y las teñimos con hemocolorante rápido para observarlas a 40x al microscopio (Figura 7).

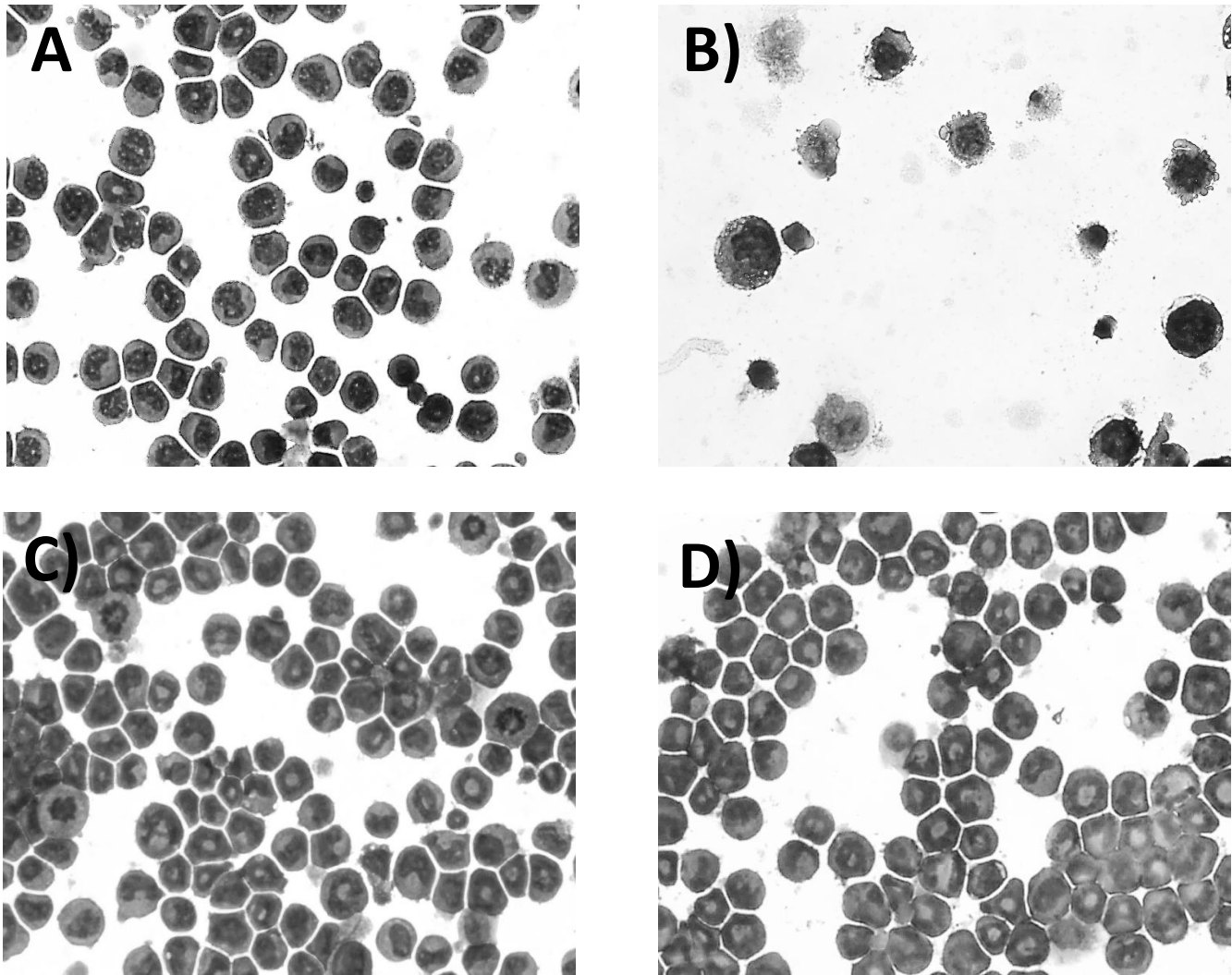


Figura 7. Tinción de células WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR con hemocolorante rápido sobre un cubreobjetos luego de 48 horas cultivo en ausencia y presencia de 197nM de citarabina (Ara-C) a 40x. A) WEHI-3/P, B) WEHI-3/P + 197 nM de Ara-C, C) WEHI-3/Ara-CR , D) WEHI-3/Ara-CR + 197 nM de Ara-C.

Con un aumento mayor podemos ver que efectivamente solo WEHI-3/P tratadas con 197 nM de Ara-C presentan la membrana celular irregular lo que sugiere pérdida de su integridad y por ello el colorante azul tripano penetra y revela pérdida de viabilidad celular (Figura 7B). Las demás células cultivadas en diferentes condiciones presentan morfología similar (Figura 7).

Para poder graficar esta diferencia de proliferación decidimos evaluar las células con las mismas condiciones en presencia y ausencia de la máxima concentración usada para el desarrollo de la resistencia a citarabina (197 nM) con el kit de MTS (CellTiter 96 AQ ueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay), y lo evaluamos pasadas 48 horas. La proliferación es similar en todos los cultivos, excepto en WEHI-3/P con 197 nM de Ara-C quien redujo significativamente su proliferación en aproximadamente un 80 % (Figura 8).

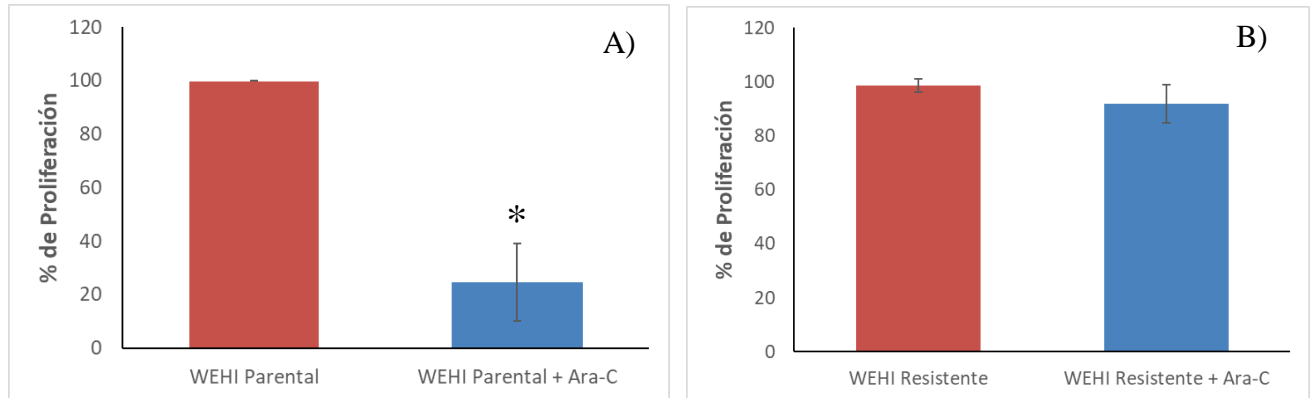


Figura 8. Ensayo de proliferación celular. Porcentaje de proliferación de células WEHI-3. A) Parentales con Ara-C (197nM) (Rojo) y sin Ara-C(Azul) y B) Resistentes con Ara-C(197nM) (Rojo) y sin Ara-C (Azul) después de 48 horas de la administración del fármaco y evaluados con MTS. Promedio de 3 experimentos independientes \pm Desviación estándar. *Los resultados estadísticamente significativos diferentes con respecto al control sin Ara-C con la prueba Tukey ($p. \leq 0.05$).

Determinación de la IC50 a Ara-C en la línea celular WEHI-3 Resistente a Citarabina (WEHI-3/Ara-CR).

El cultivo de las células WEHI-3 resistente con concentración creciente de Ara-c presenta una proliferación que disminuye a medida que la concentración aumenta (Figura 9), pero es a partir de 135 nM disminuye significativamente respecto al control (0) hasta la dosis máxima donde la proliferación prácticamente es inexistente. A partir de los datos de esta curva de proliferación se calculó la IC50 que resultó ser de 2538 comparado con 352.78 nM de las células WEHI-3 parentales con Ara-C (Tabla 5). Así, después de 207 días de desarrollo de resistencia a la citarabina (Ara-C) se consiguió una resistencia de 7.19 veces más que su contraparte original (WEHI-3 Parental).

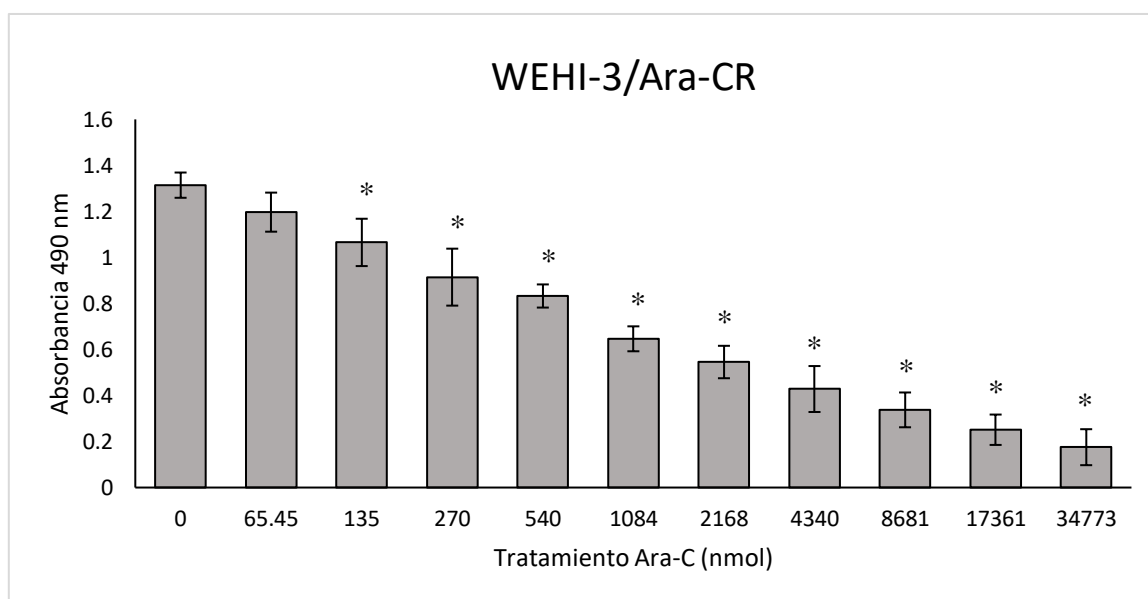


Figura 9. Curva de las absorbancias obtenidas del ensayo de proliferación dependiente de la concentración de Ara-C en células WEHI-3/Ara-CR evaluado a 490 nm con MTS 48 horas después del cultivo. Control con Vehículo (0), Ara-C (65,45,135,270,540,1084,2168,4340,8681,17361,34773 nmol). Promedio de 3 experimentos independientes \pm Desviación estándar. *Los resultados estadísticamente significativos diferentes con respecto al control (0) con la prueba Tukey ($p. \leq 0.05$).

Tabla 5: Dosis media de inhibición de la citarabina (Ara-C) en células WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR. \pm Desviación estándar. *Los resultados estadísticamente significativos diferentes con respecto a WEHI-3/P con la prueba Tukey ($p. \leq 0.05$).

Ara-C	WEHI-3/P	WEHI-3/Ara-CR
IC ₅₀ (nmol)	352.78 \pm 12.9	2,538 \pm 31.8 *

Niveles de expresión de genes implicados en resistencia.

La extracción de RNAm de células parentales y resistentes y posterior ensayo de RT-PCR de punto final, revelan que el gen constitutivo se expresa sin problemas y en forma similar en ambas poblaciones (B-actina), ENT1 no cambia, pero MRP1 Y MDR1 se observa una mayor expresión, mientras que dCK se ve claramente una mayor expresión en las células resistente (Figura 10).

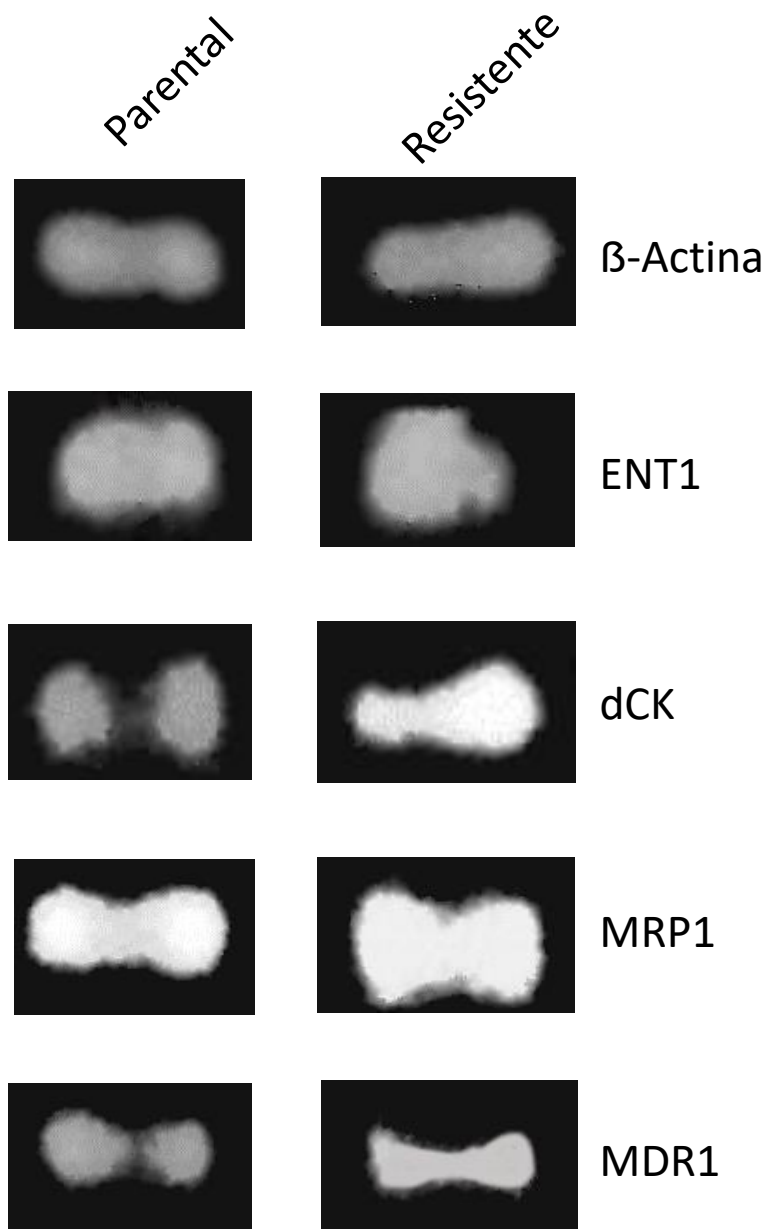


Figura 10. Imágenes de la expresión de los genes B-Actina, ENT1, dCK, MRP1 y MDR1 sobre gel de agarosa mediante PCR de punto final.

Para tener mayor certeza de los datos, se realizó un análisis densitométrico con el programa ImageLab 6.0.1 donde los valores de intensidad de banda los pasamos a una hoja de Excel para poder graficarlos. Los gráficos del análisis nos muestran que ENT1 se mantiene igual (Figura 11A), ligeros aumentos no significativos en MRP1 y MDR1 (Figura 11 C y D), así como un incremento estadísticamente significativo de dCK (Figura 11 B).

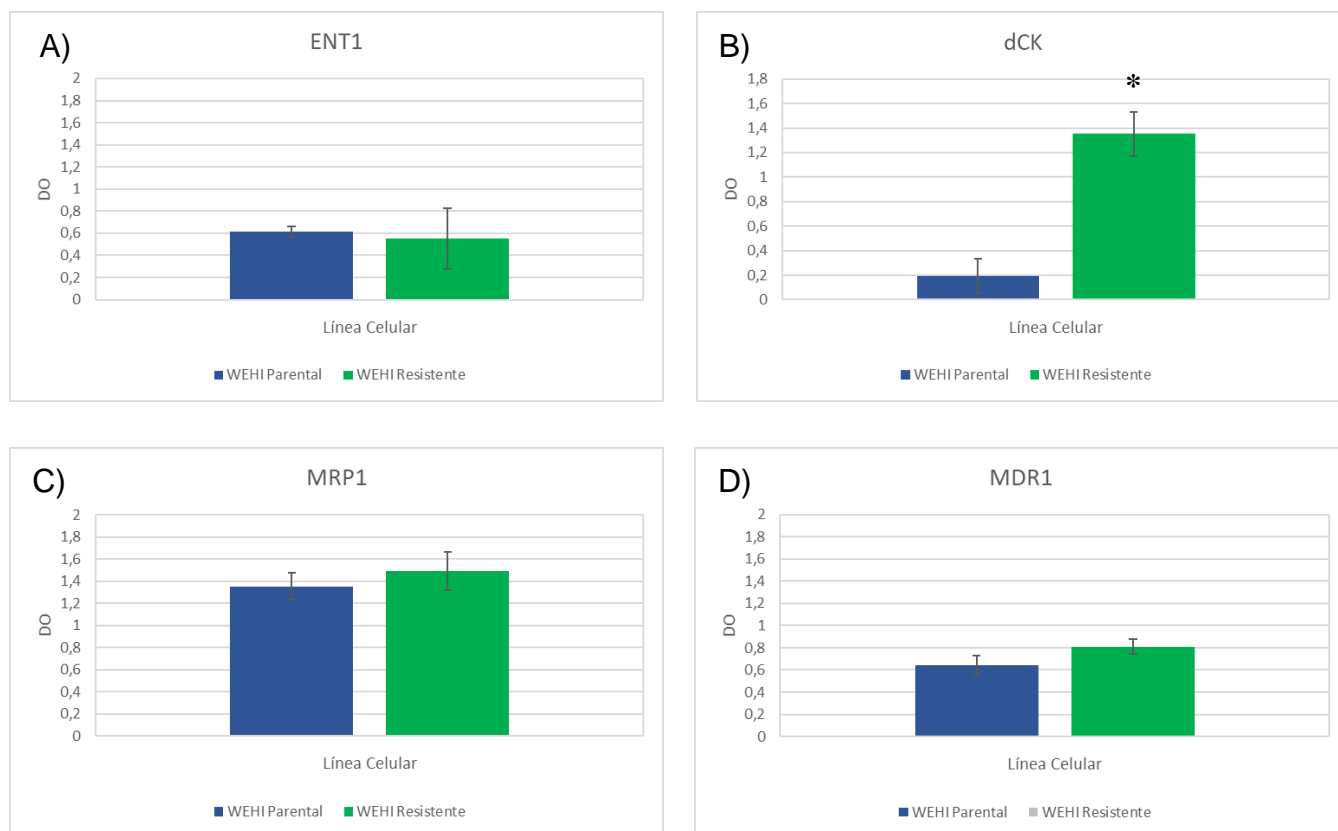


Figura 11. Gráfico del análisis densitométrico de la expresión de los genes ENT1, dCK, MRP1 y MDR1 en WEHI-3/P y WEHI-3 Ara-CR mediante la comparación de la densidad óptica (DO) con respecto a β -actina. Promedio de 3 experimentos independientes \pm Error Estándar. *Los resultados estadísticamente significativos diferentes con respecto al control (0) con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

Nivel de expresión de SIRT1 y P53 en la línea celular WEHI-3 Parental y Resistente.

La literatura reporta que la expresión de gen SIRT1 y P53 están alterados en líneas resistentes a la quimioterapia. Para determinar el estado de expresión de SIRT1 y P53 en las células WEHI-3 Parentales y Resistentes se extrajo RNAm y se realizó RT-PCR punto final. La banda de SIRT1 en WEHI-3 resistente se ve más consistente, luminosa e integra que su contraparte parental, pero sobre los niveles de P53 no (Figura 12), es por ello que, para poder graficar, a partir de estas imágenes decidimos procesarlas mediante un análisis densito-métrico de bandas.

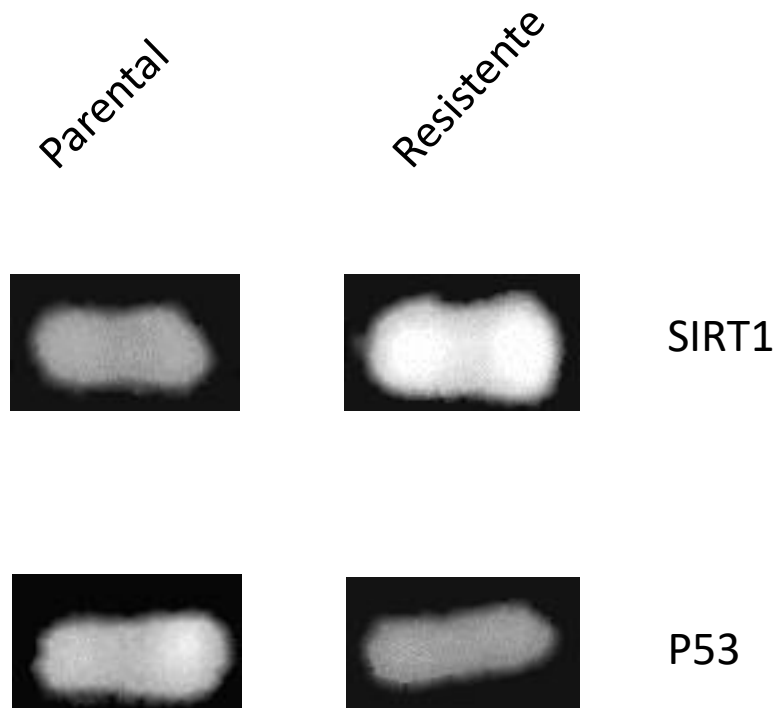


Figura 12. Imágenes tomadas con fotodocumentador de la expresión de los genes SIRT1 y P53 en gel de agarosa mediante PCR de punto final.

El análisis densitométrico de bandas nos confirmó que, aunque SIRT1 se llegó a expresar más en las células WEHI-3 Resistentes no es estadísticamente significativo, mientras que P53 se mantuvo sin ningún cambio significativo en su expresión (Figura 13).

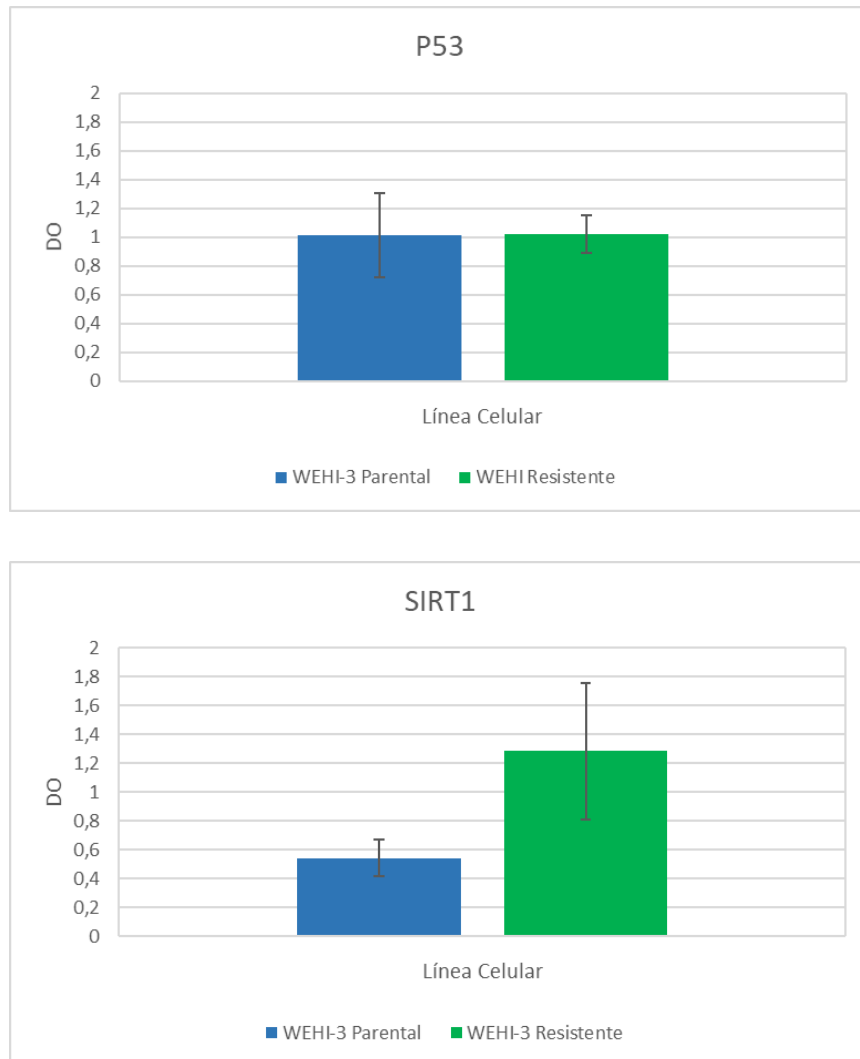


Figura 13. Gráfico del análisis densitométrico de la expresión de los genes SIRT1 y P53 en WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR mediante la comparación de la densidad óptica (DO) con respecto a β -actina. Promedio de 3 experimentos independientes \pm Error Estándar. *Los resultados estadísticamente significativos diferentes con respecto al control (0) con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

Tabla 6. Resumen del estado de la expresión de los genes relacionados con la resistencia a multidrogas en WEHI-3/Ara-CR comparado con WEHI-3/P.

Gen	Estado	
	WEHI-3/P	WEHI-3/Ara-CR
ENT1	Presente	Sin alteración
dCK	Presente	Sobreexpresado
MRP1	Presente	Tiende a incrementarse
MDR1	Presente	Tiende a incrementarse
SIRT1	Presente	Tiende a incrementarse
P53	Presente	Sin alteración

Recapitulando el estado de los genes en WEHI-3/Ara-CR con respecto a WEHI-3/P encontramos que ENT1, y p53 no tuvieron un cambio en su expresión, mientras que MRP1, MDR1 y SIRT1 tuvieron aumentos no significativos en su expresión y por último, dCK incremento su expresión de forma significativa.

Determinación de la IC50 a Daunorrubicina en la línea WEHI-3.

Para probar si existe resistencia cruzada hacia una antraciclina decidimos usar daunorrubicina, la más usada en combinación con citarabina para el tratamiento de la LMA, por lo que decidimos hacer un experimento de IC50 a la daunorrubicina en WEHI-3 Parentales (Figura 14) y WEHI-3 Resistentes (Figura 15). Hicimos un cultivo de células WEHI-3 Parentales en ausencia de citarabina pero con concentraciones crecientes de daunorrubicina, la proliferación disminuyó a medida que se incrementaba la concentración y a partir de 9.32 nM la proliferación disminuyó significativamente respecto al control (0) hasta la concentración máxima donde la proliferación se hace inexistente, Los valores obtenidos en la curva nos arrojaron una IC50 de las células WEHI-3 Parentales a la daunorrubicina de 33.93 nM.

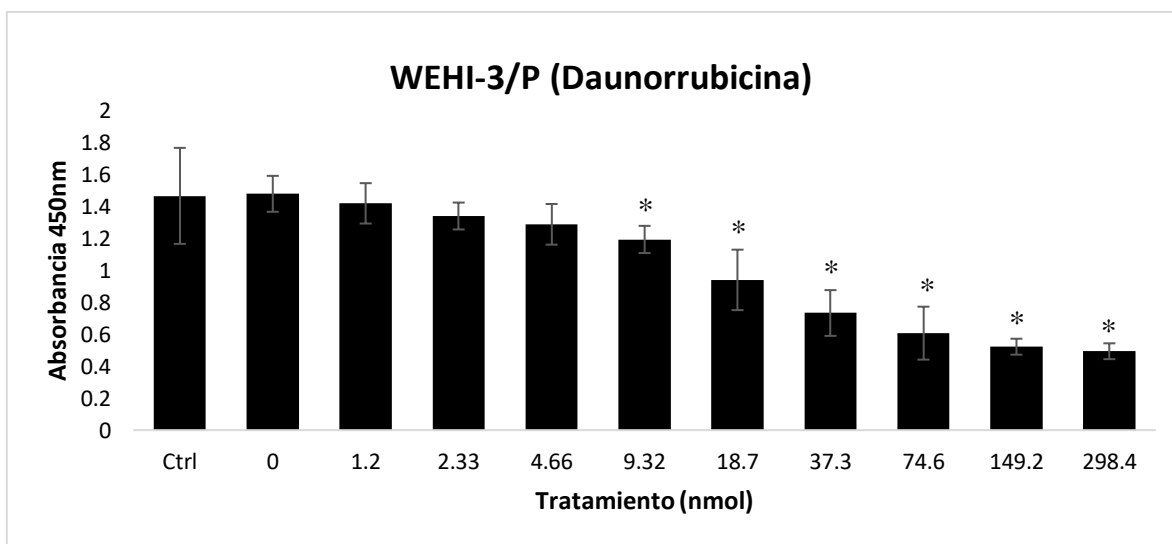


Figura 14. Curva de las absorbancias obtenidas del ensayo de proliferación dependiente de la concentración de daunorrubicina en células WEHI-3/P medidas a 490 nm con MTS luego de 48 horas. Control con vehículo – PBS (0), daunorrubicina (1.2, 2.33, 4.66, 9.32, 18.7, 18.7, 37.3, 74.6, 149.2, 298.4 nmol). Promedio de 3 experimentos independientes \pm Desviación estándar. *Los resultados estadísticamente significativos diferentes con respecto al control (0) con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

Determinación de la IC50 a Daunorrubicina en la línea celular WEHI-3 Resistente a Citarabina.

Se realizó un cultivo de células WEHI-3/Ara-CR en ausencia de citarabina, pero con concentraciones crecientes de daunorrubicina, la proliferación disminuyó a medida que se incrementaba la concentración (Figura 15), pero es a partir de 4.66 nM donde disminuye significativamente la proliferación respecto al control (0) hasta la dosis máxima donde la proliferación es inexistente. Obteniendo a partir de los datos de la curva la IC50 que corresponde a 41.68 nM, que comparada con los 33.93 nM (Tabla 7) revelo que la resistencia hacia daunorrubicina no se elevaba conforme aumentaba la resistencia hacia Ara-C, obteniendo que la diferencia de IC50 fue de 7.75 nmol y que al comparar esta diferencia no se encontró significancia estadística.

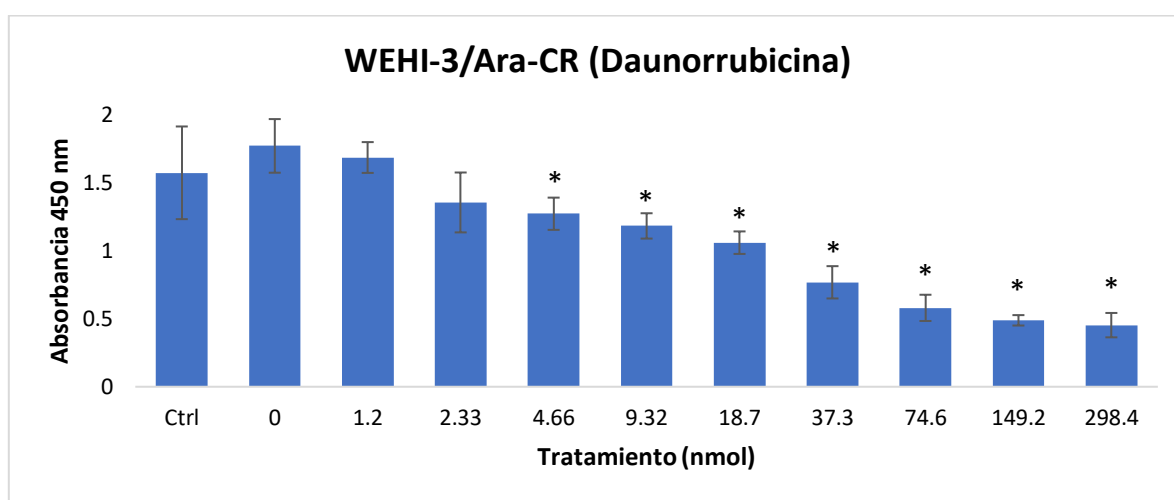


Figura 15. Curva de las absorbancias obtenidas del ensayo de proliferación dependiente de la concentración de daunorrubicina en células WEHI-3/Ara-CR medidas a 490 nm con MTS luego de 48 horas. Control con vehículo – PBS (0), daunorrubicina (1.2,2.33,4.66,9.32,18.7,18.7,37.3,74.6,149.2,298.4 nmol). Promedio de 3 experimentos independientes \pm Desviación estándar. *Los resultados estadísticamente significativos diferentes con respecto al control (0) con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

Tabla 7: Dosis media de inhibición de la daunorrubicina en células WEHI-3/P y WEHI-3/Ara-CR \pm Desviación estándar.

Daunorrubicina	WEHI-3/P	WEHI-3/Ara-CR
IC ₅₀ (nmol)	33.93 \pm 6.2	41.68 \pm 5.4

DISCUSIÓN

Como sabemos, la citarabina ha sido el compuesto estándar en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda, incluso en casos de recaída o recidivante en que por muchos años se ha mantenido como una herramienta importante e indispensable para el tratamiento de esta patología, sin embargo, la resistencia adquirida a los agentes anticancerígenos es un obstáculo importante para el tratamiento exitoso del cáncer, por lo cual superar la resistencia a la citarabina ofrecería nuevas estrategias para el tratamiento de la LMA (Yamauchi *et al.*,2014;Chen *et al.*, 2018;Zhang *et al.*,2019).

En este estudio el objetivo fue obtener unas células WEHI-3 Resistentes a citarabina (WEHI-3/Ara-CR), a partir de la IC₅₀ de las WEHI-3 Parentales(WEHI-3/P) que fue 352 nM para el desarrollo de la resistencia hacia la citarabina, comenzamos con 64.5 nM de Ara-C, cantidad que daña a las células pero nos permitía seguir con células viables para las posteriores resiembras y fuimos subiendo las concentraciones de Ara-C hasta que las células mostraran indiferencia al tratamiento hasta llegar a 197 nM, donde esta misma concentración ya no daña a las células y esto nos tomó más de 200 días, la obtención de esta resistencia fue un proceso gradual durante el cual las células mostraban cambios en su comportamiento desde bajadas en la proliferación, capacidad de formar grupos, aumento de tamaño de las células, hasta que se adaptaron a las concentraciones recuperaban su comportamiento habitual. Esto que observamos esta reportado durante el desarrollo de resistencia hacia fármacos en general en muchos tipos de células cancerígenas donde los cambios ocurren de forma temporal durante el desarrollo de la resistencia y algunos otros cambios morfológicos se quedan permanentes debido a que la morfología de las células tumorales está estrechamente relacionada con su actividad y fenotipo (Xin *et al.*,2021; Yao *et al.*,2019; Puspita & Bedford,2017; Dey *et al.* 2017). Es por ello que, aunque nuestras células se vean a simple vista iguales proponemos en un futuro analizar las células con un método ampliamente utilizada en los últimos años para monitorear los cambios morfológicos dinámicos de las células vivas como lo es la microscopía holográfica digital (DHM) (Kemper *et al.*,2019), la cual ya ha sido utilizada para evaluar cambios morfológicos en células resistentes a fármacos como el cisplatino en células tumorales (Yao *et al.*, 2019), por lo tanto, sería de igual utilidad para para develar bien que cambios tienen nuestras células WEHI-3/Ara-CR y con ello formular nuevas estrategias farmacológicas o tratamientos dedicados tanto a nuevos diagnósticos de AML así como una alternativa afectiva hacia la AML de recaída que tanto ha limitado la esperanza de vida de los pacientes.

Una vez que teníamos células WEHI-3 Resistentes a 197 nM de Ara-C (WEHI-3/Ara-CR) se estableció una curva de concentración-respuesta donde encontramos que era 7.19 veces superior en resistencia a Ara-C que su contraparte original (WEHI-3/P), por lo tanto los resultados de nuestra resistencia coincide dentro de los valores de una resistencia clínicamente relevante en la literatura, coincidiendo a la vez con experimentos de desarrollo de resistencia a citarabina en 5 líneas de

leucemia mieloide aguda humana donde el valor más bajo fue de 5 veces más resistente que su contraparte parental (Ijo *et al.*, 2010).

En la expresión génica de los genes implicados en la resistencia a citarabina y quimioterapéuticos en general, el análisis de ENT1 arrojó resultados idénticos entre sí, por lo tanto, no se encontró disminución en su expresión tal como reporta la literatura de algunas líneas celulares resistentes (Alarcón *et al.*, 2020; Leisewitz *et al.*, 2011), por lo que podemos inferir que en las células WEHI-3 resistentes el mecanismo de resistencia se debe a algún otro gen diferente de ENT1.

Aunque hay artículos que reportan decrementos en la expresión de dCK en ensayos de resistencia a citarabina (Rathe & Largaespada, 2010; Klanova *et al.*, 2014; Fajardo *et al.*, 2021). Por lo que la sobreexpresión que tuvo nuestro trabajo se puede deber a una mutación en dCK como se ha reportado en el artículo de (Wu *et al.*, 2021) o donde tanto en pacientes recidivantes como en líneas celulares humanas de LMA donde las mutaciones en pacientes no estaban presentes antes de la terapia y DCK también estaba mutado en líneas celulares de AML resistentes a citarabina, pero no la línea celular parental. Aunque como este artículo lo menciona no se puede afirmar con certeza que las mutaciones de *DCK* hacen que las células de AML sean resistentes a la citarabina debido a que la frecuencia de mutación de *DCK* y la concentración de ARNm no se correlacionó con el grado de resistencia a la citarabina, indicando que intervienen otros factores (Wu *et al.*, 2021), nosotros suponemos que puede ser una mutación de dCK en las células WEHI-3 Resistentes a Citarabina (WEHI-3/ARA-C) o que por el contrario la sobreexpresión se debe a que las células en un mecanismo de protección están produciendo más dCK para metabolizar la citarabina que ingresa y el factor que está limitando la conversión de Ara-C en Ara-CTP se encuentra aguas abajo en el metabolismo de la citarabina, por eso proponemos estudios posteriores para analizar las demás moléculas restantes como dCMP, NDPK, NT5C2, CDA y DCTD en las WEHI-3/Ara-CR para comprender el mecanismo que involucra su resistencia a Ara-C y la sobreexpresión de dCK.

El incremento en la expresión de MRP1 no se modificó en WEHI-3Ara-CR, aunque el incremento ha sido reportado anteriormente en ensayos de pacientes con AML de recaída y en pacientes que no han tenido remisión completa de la enfermedad en comparación con pacientes que tuvieron remisión completa y pacientes sanos, indicando que este gen puede ser un mal pronóstico para que el paciente logre una remisión completa favoreciendo el fenotipo MDR en las células malignas (Paprocka *et al.*, 2017). Además, una mayor expresión de MDR1 ha sido reportado anteriormente en ensayos de resistencia multidrogas en pacientes con AML, en donde esta subida de expresión de MDR1 se ha correlacionado con una respuesta deficiente a la quimioterapia (Xutao *et al.*, 2018). Podemos asociar un poco el incremento tanto de MRP1 y de MDR1 en una estrategia de las células en la expulsión de la citarabina haciendo que pierda un poco de acción.

El incremento en la expresión de SIRT1 en las células resistentes a los tratamientos farmacológicos comparados con su contraparte normal es un fenómeno reportado en la LMA (Li *et al.*,2014), tal como sucedió en nuestro ensayo de resistencia a la citarabina en las células WEHI-3.

Debido a que p53 no tuvo cambio en su expresión creemos que el aumento de SIRT1 que, aunque no es estadísticamente significativo, podría estar bloqueando la acción de p53 impidiendo que las células WEHI-3 Resistentes entren en estado de apoptosis ya que SIRT1 estaría promoviendo resistencia ante el estrés que provoca en antineoplásico impidiendo que p53 suba sus niveles de expresión dando como resultado que las células WEHI-3 Resistentes tengan mismos niveles de expresión que las WEHI-3 Silvestres. Existen ensayos sobre p53 que concluyeron que la inhibición farmacológica de SIRT1 mejora los niveles de acetilación de p53, lo que lleva a un aumento de la expresión génica diana p53, la inhibición del crecimiento celular y una mayor sensibilidad al tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa (Sasca *et al.*,2015). Lo cual nos habla del importante papel que juega SIRT1 en la AML, abriendo la posibilidad de estudiar la inhibición de SIRT1 como una estrategia en el tratamiento de la AML.

Respecto a la resistencia cruzada hacia otro fármaco, en este caso una vez que obtuvimos resistencia hacia la citarabina, decidimos evaluar con una antraciclina comúnmente usada en combinación con la Ara-C durante la terapia de inducción a la remisión en este caso la daunorrubicina, cuando comparamos el efecto que tenía la daunorrubicina sobre las células WEHI-3/P y WEHI-3 /Ara-CR, mostró que las IC₅₀ a este fármaco eran idénticas, este evento ya ha sido mostrado con anterioridad aclarando que la resistencia a los antimetabolitos como la citarabina, normalmente no crea resistencia cruzada a las antraciclinas (Takaemura *et al.*, 2001).

Aquí se aportan evidencias que hemos generado una línea de leucemia de ratón resistente a citarabina WEHI-3 Ara-C/R en la FES-Zaragoza, en un rango de resistencia de relevancia clínica, debido a que varios autores concuerdan en que la principal desventaja o error al crear estos modelos es que cuanto mayor es el nivel de resistencia, menos relevante se vuelve el modelo para uso clínico, debido a que es imposible alcanzar esas altas concentraciones en el cuerpo de un paciente (McDermott *et al.*,2014) es por ello que dependiendo el autor sobre el número de veces que aumenta la resistencia clínicamente relevantes, algunos mencionan que las células desarrolladas de esta manera suelen mostrar entre 2 y 8 veces más resistencia en comparación con las células parentales (He *et al.*, 2019).

CONCLUSIONES

Tomando en cuenta que las células WEHI-3 pasados más de 200 días de desarrollo de la resistencia a citarabina (Ara-C), lograron ya no responder a concentraciones iguales o inferiores a 50 ng/mL equivalentes a 197nM del fármaco, concentración para su contraparte original resulta muy toxica e inhibe su proliferación pasadas 48 horas, podemos hablar de que tenemos una línea celular WEHI-3 Resistente a citarabina.

Sobre el estado del Eje SIRT1 - p53, el aumento en los niveles de expresión de SIRT1 en las células WEHI-3/Ara-CR y la prístina expresión de p53 podemos inferir que SIRT1 está desempeñando un papel de resistencia ante el estrés generado por la citarabina.

REFERENCIAS

Abraham A, Devasia A, Varatharajan S, Karathedath S, Balasubramanian P, Mathews V. (2015). Effect of cytosine arabinoside metabolizing enzyme expression on drug toxicity in acute myeloid leukemia. *Annals Hematology* ;94(5):883-885.

Akashi, M., & Koeffler, H. P. (1998). Li-Fraumeni syndrome and the role of the p53 tumor suppressor gene in cancer susceptibility. *Clinical obstetrics and gynecology*, 41(1), 172-199.

Alarcón, S., Toro, M., Villarreal, C., Melo, R., Fernández, R., Ayuso, S., ... & Quezada, C. (2020). Decreased equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) activity contributes to the high extracellular adenosine levels in mesenchymal glioblastoma stem-like cells. *Cells*, 9(8), 1914.

Aldonza, M., Hong, J., Alinsug, M., Song, J., & Lee, S. (2016). Multiplicity of acquired cross-resistance in paclitaxel-resistant cancer cells is associated with feedback control of TUBB3 via FOXO3a-mediated ABCB1 regulation. *Oncotarget*, 7(23), 34395.

Appella, E., & Anderson, C. W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European Journal of Biochemistry*, 268(10), 2764-2772.

Aragón G, M., & Aragón G, C. (2014). Diagnóstico molecular y tratamiento de leucemias. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 71(609), 39-45.

Arber, D., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., ... & Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 127(20), 2391-2405.

Bhalla, K., Hindenburg, A., Taub, R., & Grant, S. (1985). Isolation and characterization of an anthracycline-resistant human leukemic cell line. *Cancer research*, 45(8), 3657-3662.

Blagih, J., Buck, M., & Vousden, K.(2020). p53, cancer and the immune response. *Journal of Cell Science*, 133(5).

Bose, P., Gandhi, V., & Konopleva, M. (2017). Pathways and mechanisms of venetoclax resistance. *Leukemia & lymphoma*, 58(9), 2026-2039.

Boswell, C., & Hays, F. (2017). Equilibrative nucleoside transporters—A review. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 36(1), 7-30.

Bryan, J., & Jabbour, E. (2015). Management of relapsed/refractory acute myeloid leukemia in the elderly: current strategies and developments. *Drugs & aging*, 32(8), 623-637.

Buck, S. A., Koolen, S. L., Mathijssen, R. H., de Wit, R., & van Soest, R. J. (2021). Cross-resistance and drug sequence in prostate cancer. *Drug Resistance Updates*, 56, 100761.

Cammarata, S., Girardi, K., Strocchio, L., Merli, P., Bernardin, A. G., Galeotti, A., ... & Callea, M. (2020). Oral manifestations and complications in childhood acute myeloid leukemia. *Cancers*, 12(6), 1634.

Cerón, L., & Torres, J. (2015). Angiogénesis: la actividad promotora de la expansión de las células malignas. *Morfología*, 7(3).

Chalkiadaki, A., & Guarente, L. (2015). The multifaceted functions of sirtuins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(10), 608-624.

Chen, C. W., Koche, R., Sinha, A., Deshpande, A., Zhu, N., Eng, R., ... & Wang, X. (2015). DOT1L inhibits SIRT1-mediated epigenetic silencing to maintain leukemic gene expression in MLL-rearranged leukemia. *Nature medicine*, 21(4), 335.

Chu, F., Chou, P. M., Zheng, X., Mirkin, B. L., & Rebbaa, A. (2005). Control of multidrug resistance gene *mdr1* and cancer resistance to chemotherapy by the longevity gene *sirt1*. *Cancer research*, 65(22), 10183-10187.

Davis, A., Viera, A. J., & Mead, M. D. (2014). Leukemia: an overview for primary care. *American family physician*, 89(9), 731-738.

Dey, G., Bharti, R., Das, A. K., Sen, R., & Mandal, M. (2017). Resensitization of Akt induced docetaxel resistance in breast cancer by 'Iturin A' a lipopeptide molecule from marine bacteria *Bacillus megaterium*. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.

DiNardo, C., Lachowicz, C., Takahashi, K., Loghavi, S., Xiao, L., Kadia, T., ... & Kantarjian, H. M. (2021). Venetoclax combined with FLAG-IDA induction and consolidation in newly diagnosed and relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 39(25), 2768-2778.

Döhner, H., Estey, E., Amadori, S., Appelbaum, F., Büchner, T., Burnett, A., ... & Bloomfield, C. D. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the

European LeukemiaNet. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 115(3), 453-474.

Dombret, H. & Gardin, C. (2016) An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia, *Blood*. 127(1), 53-61.

Fajardo, O., Ledesma, M., Aguiñiga, S., Mora, G., Weiss, S., & Santiago O. (2021). Inhibitors of Chemoresistance Pathways in Combination with Ara-C to Overcome Multidrug Resistance in AML. A Mini Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4955.

Ferrara, F., Lessi, F., Vitagliano, O., Birkenghi, E., & Rossi, G. (2019). Current therapeutic results and treatment options for older patients with relapsed acute myeloid leukemia. *Cancers*, 11(2), 224.

Fletcher, J. I., Haber, M., Henderson, M. J., & Norris, M. D. (2010). ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nature Reviews Cancer*, 10(2), 147-156.

Fort E. (2010). Principios básicos de la farmacología oncológica. Resistencia a la quimioterapia [monografía en Internet]. Institute Catalá d'Oncologia, departament de salut.

García, R., Ayala, R., & Perdomo, V. (2012). Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Revista Ciencias de la Salud*, 10(1), 59-71.

García, L., Cabrero, M., & del Cañizo, C. (2016). Leucemias agudas. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(21), 1201-1212.

García, M., Gálvez, A., González D., & León C., (2018). Patrón de consumo de antineoplásicos utilizados para el tratamiento del cáncer en La Habana del 2011-2015. *Horizonte sanitario*, 17(1), 39-50.

Grimm, J., Jentzsch, M., Bill, M., Goldmann, K., Schulz, J., Niederwieser, D., ... & Schwind, S. (2020). Prognostic impact of the ELN2017 risk classification in patients with AML receiving allogeneic transplantation. *Blood advances*, 4(16), 3864-3874.

Gu, M., Hao, X., Cong, L., & Sun, J. (2019). The prevalence, risk factors, and prognostic value of anxiety and depression in refractory or relapsed acute myeloid leukemia patients of North China. *Medicine*, 98(50).

Hasserjian, R. P. (2021). Controversies in the recent (2016) World Health Organization classification of acute myeloid leukemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 101249.

He, J., Hajj, K. A., Knapp, C. M., & Whitehead, K. A. (2019). Development of a clinically relevant chemoresistant mantle cell lymphoma cell culture model. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 244(11), 865–872.

Heiblig, M., Elhamri, M., Tigaud, I., Plesa, A., Barraco, F., Labussière, H., Ducastelle, S., Michallet, M., Nicolini, F., Plesa, C., Wattel, E., Salles, G., & Thomas, X. (2016). Treatment with Low-Dose Cytarabine in Elderly Patients (Age 70 Years or Older) with Acute Myeloid Leukemia: A Single Institution Experience. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 8(1), e2016009.

Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., & Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*, 6(3), 1769-1792.

Houtkooper, R., Pirinen, E., & Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(4), 225-238.

Jabbour, E., Daver, N., Champlin, R., Mathisen, M., Oran, B., Ciurea, S., ... & de Lima, M. (2014). Allogeneic stem cell transplantation as initial salvage for patients with acute myeloid leukemia refractory to high-dose cytarabine-based induction chemotherapy. *American journal of hematology*, 89(4), 395-398.

Kaltoum, A., Sellama, N., Hind, D., Yaya, K., Mouna, L., & Asma, Q. (2020). MDR1 gene polymorphisms and acute myeloid leukemia AML susceptibility in A Moroccan adult population: A case-control study and meta-analysis. *Current research in translational medicine*, 68(1), 29-35.

Kemper, B., Bauwens, A., Bettenworth, D., Götte, M., Greve, B., Kastl, L., ... & Vollmer, A. (2019). Label-free quantitative in vitro live cell imaging with digital holographic microscopy. In *Label-Free Monitoring of Cells in vitro* 219-272.

Klanova, M., Lorkova, L., Vit, O., Maswabi, B., Molinsky, J., Pospisilova, J., ... & Klener, P. (2014). Downregulation of deoxycytidine kinase in cytarabine-resistant mantle cell lymphoma cells confers cross-resistance to nucleoside analogs gemcitabine, fludarabine and cladribine, but not to other classes of anti-lymphoma agents. *Molecular cancer*, 13(1), 1-14.

Kueng, W., Silber, E., & Eppenberger, U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical biochemistry*, 182(1), 16-19.

Kunadt, D., Dransfeld, C., Dill, C., Schmiedgen, M., Kramer, M., Altmann, H., ... & Stölzel, F. (2020). Multidrug-related protein 1 (MRP1) polymorphisms rs129081, rs212090, and rs212091 predict survival in normal karyotype acute myeloid leukemia. *Annals of hematology*, 99(9), 2173-2180.

Kupis, W., Pałyga, J., Tomal, E., & Niewiadomska, E. (2016). The role of sirtuins in cellular homeostasis. *Journal of physiology and biochemistry*, 72(3), 371–380.

Lain, S., & Lane, D. (2003). Improving cancer therapy by non-genotoxic activation of p53. *European Journal of Cancer*, 39(8), 1053-1060.

Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U. M., Frye, R. A., Minucci, S., ... & Kouzarides, T. (2002). Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *The EMBO journal*, 21(10), 2383-2396.

Leary, M., Heerboth, S., Lapinska, K., & Sarkar, S. (2018). Sensitization of drug resistant cancer cells: a matter of combination therapy. *Cancers*, 10(12), 483.

Ledesma, M., Pérez C., Sánchez T., Aguiñiga S., Córdova G., Weiss S., & Santiago O. (2013). El CasNa modula diferencialmente la proliferación y viabilidad de la línea leucémica WEHI-3, células hematopoyéticas normales y el co-cultivo de ambas. *Vertientes. Revista especializada en Ciencias de la Salud*, 16(1).

Ledesma, M., Pérez C., Córdova G., Sánchez T., Huerta Y., Aguiñiga S., & Santiago O. (2012). Casein induces the proliferation of bone marrow mononuclear cells, apoptosis of WEHI-3 leukaemic cells and increased survival in a leukaemia mouse model. *Oncology letters*, 4(3), 461-466.

Li, L., Osdal, T., Ho, Y., Chun, S., McDonald, T., Agarwal, P., & Hsieh, Y. T. (2014). SIRT1 activation by a c-MYC oncogenic network promotes the maintenance and drug resistance of human FLT3-ITD acute myeloid leukemia stem cells. *Cell stem cell*, 15(4), 431-446.

Li, X., Zhang, S., Blander, G., Jeanette, G. T., Krieger, M., & Guarente, L. (2007). SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Molecular cell*, 28(1), 91-106.

Luo, J., Su, F., Chen, D., Shiloh, A., & Gu, W. (2000). Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature*, 408(6810), 377-381.

Macanas, P., Broekhuizen, R., González, A., Oyanadel, C., Ernst, D., García, P., ... & Nervi, B. (2017). Resistance of leukemia cells to cytarabine chemotherapy is

mediated by bone marrow stroma, involves cell-surface equilibrative nucleoside transporter-1 removal and correlates with patient outcome. *Oncotarget*, 8(14), 23073.

Martin, A., Mukherjee, K., Taylor, B., Ivy, S., Fu, C., Ardi, V., & Avramis, V. (2000). Cytosine arabinoside (ara-C) resistance confers cross-resistance or collateral sensitivity to other classes of anti-leukemic drugs. *Anticancer research*, 20(1A), 139-150.

McDermott, M., Eustace, A. J., Busschots, S., Breen, L., Crown, J., Clynes, M., O'Donovan, N., & Stordal, B. (2014). In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. *Frontiers in oncology*, 4, 40.

Meléndez Ibarra, Frida Montserrat. (2019). "Efecto sinérgico del caseinato de sodio combinado con citarabina y daunorrubicina en la eliminación de células leucémicas WEHI-3". (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3497587>

Morales P., & García M., (2017). Papel de la superfamilia ABC en la resistencia farmacológica. *Horizonte sanitario*, 16(2), 93-101.

Murphy, T., & Yee, K. W. (2017). Cytarabine and daunorubicin for the treatment of acute myeloid leukemia. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 18(16), 1765-1780.

O'Callaghan, C., & Vassilopoulos, A. (2017). Sirtuins at the crossroads of stemness, aging, and cancer. *Aging cell*, 16(6), 1208-1218.

Olmos, Y., Brosens, J., & Lam, E. (2011). Interplay between SIRT proteins and tumour suppressor transcription factors in chemotherapeutic resistance of cancer. *Drug Resistance Updates*, 14(1), 35-44.

Ota., H, Tokunaga, E., Chang, K., Hikasa, M., Iijima, K., Eto, M., Kozaki, K., Akishita, M., Ouchi, Y., Kaneki, M.(2006).Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest with attenuated Ras-MAPK signaling in human cancer cells. *Oncogene* 2006; 25:176–185.

Pascuzzo, L., & de Vallín, N., (2008). Introducción al Estudio de la Farmacología. *FARMACOLOGÍA BÁSICA*, 13.

Puspita, N., & Bedford, A. (2017). Morphological Changes of Cisplatin-resistant Human Breast Cancer MCF-7 Cell Line. *International Journal of Integrated Health Sciences*, 5(1), 8-14.

Rathe, S., & Largaespada, D. (2010). Deoxycytidine kinase is downregulated in Ara-C-resistant acute myeloid leukemia murine cell lines. *Leukemia*, 24(8), 1513-1515.

Robak, T., Wierzbowska, A. (2009) Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia. *Clin. Ther* 31: 2349–2370.

Salim, L., Othman, R., Abdulla, M., Al-Jashamy, K., Ali, H., Hassandarvish, P., & Mohan, S. (2014). Thymoquinone inhibits murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and in vitro. *PLoS One*, 9(12).

Sasca, D., Hähnel, P., Szybinski, J., Khawaja, K., Kriege, O., Pante, S., & Kindler, T. (2014). SIRT1 prevents genotoxic stress-induced p53 activation in acute myeloid leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 124(1), 121-133.

Saultz, J. & Garzon, R. (2016). Acute myeloid leukemia: a concise review. *Journal of clinical medicine*, 5(3), 33.

Si, W., Shen, J., Zheng, H., & Fan, W. (2019). The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clinical epigenetics*, 11(1), 1-24.

Shimony, S., Stone, M., & Stahl, M. (2022). Venetoclax combination therapy in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Current Opinion in Hematology*, 29(2), 63-73.

Showel, M., & Levis, M. (2014). Advances in treating acute myeloid leukemia. *F1000prime reports*, 6.

Takemura, H., Urasaki, Y., Yoshida, A., Fukushima, T., & Ueda, T. (2001). Simultaneous treatment with 1-β-D-arabinofuranosylcytosine and daunorubicin induces cross-resistance to both drugs due to a combination-specific mechanism in HL60 cells. *Cancer research*, 61(1), 172-177.

Thol, F., & Ganser, A. (2020). Treatment of relapsed acute myeloid leukemia. *Current Treatment Options in Oncology*, 21(8), 1-11.

Thol, F., Schlenk, R. F., Heuser, M., & Ganser, A. (2015). How I treat refractory and early relapsed acute myeloid leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 126(3), 319-327.

Tian, W., Guo, R., Wang, F., Jiang, Z., Tang, P., Huang, Y., & Sun, L. (2018). The IRF9-SIRT1-P53 axis is involved in the growth of human acute myeloid leukemia. *Experimental cell research*, 365(2), 185-193.

Ueda, K., Hosokawa, M., & Iwakawa, S. (2015). Cellular uptake of decitabine by equilibrative nucleoside transporters in HCT116 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38(8), 1113-1119.

Vaquero, A. (2009). El papel conservado de las sirtuinas en la regulación de la cromatina. *Revista Internacional de Biología del Desarrollo*, 53(2-3), 303-322.

Vaziri, H., Dessain, S. K., Eaton, E. N., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., ... & Weinberg, R. A. (2001). hSIR2/SIRT1 functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, 107(2), 149-159.

Waddington, C. H. (1942). The epigenotype. *Endeavour*, 1, 18-20.

Wang, Z., & Chen, W. (2013). Emerging Roles of SIRT1 in Cancer Drug Resistance. *Genes & cancer*, 4(3-4), 82-90.

Wang, Z., Yuan, H., Roth, M., Stark, J. M., Bhatia, R., & Chen, W. (2013). SIRT1 deacetylase promotes acquisition of genetic mutations for drug resistance in CML cells. *Oncogene*, 32(5), 589-598.

Weiss, S., Córdova, Y., Aguiñiga S., Martínez, E., Domínguez M., & Santiago, O. (2019). El caseinato de sodio y la caseína α inhiben la proliferación de la línea celular mielóide de ratón 32D clone 3 (32Dcl3) mediante el TNF- α . *Biomédica*, 39(2), 291-299

Wouters, B. & Delwel, R. (2016) Epigenetics and approaches to targeted epigenetic therapy in acute myeloid leukemia, *Blood*. 127, 42-52.

Wu, B., Mao, Z. J., Wang, Z., Wu, P., Huang, H., Zhao, W., ... & Yin, B. (2021). Deoxycytidine Kinase (DCK) Mutations in Human Acute Myeloid Leukemia Resistant to Cytarabine. *Acta Haematologica*, 1-8.

Xutao, G., PengCheng, S., Yin, L., Huijuan, D., Yan, W., Haiqing, Z., & Bing, X. (2018). BCL11A and MDR1 expressions have prognostic impact in patients with acute myeloid leukemia treated with chemotherapy. *Pharmacogenomics*, 19(4), 343-348.

Yamauchi, T., Uzui, K., Nishi, R., Shigemi, H., & Ueda, T. (2014). Cytarabine-resistant leukemia cells are moderately sensitive to clofarabine in vitro. *Anticancer research*, 34(4), 1657-1662.

Yang, H. L., Thiyagarajan, V., Liao, J. W., Chu, Y. L., Chang, C. T., Huang, P. J., ... & Hseu, Y. C. (2017). Toona sinensis inhibits murine leukemia WEHI-3 cells and promotes immune response in vivo. *Integrative cancer therapies*, 16(3), 308-318.

Yao, T., Cao, R., Xiao, W., Pan, F., & Li, X. (2019). An optical study of drug resistance detection in endometrial cancer cells by dynamic and quantitative phase imaging. *Journal of biophotonics*, 12(7), e201800443.

Yi, J., & Luo, J. (2010). SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(8), 1684-1689

Zahreddine, H., & Borden, K. (2013). Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in pharmacology*, 4, 28.

Zhang, J., Gu, Y., & Chen, B. (2019). Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. *OncoTargets and therapy*, 12, 1937–1945.