



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A CITARABINA EN LA LÍNEA  
DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA WEHI-3**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA  
P R E S E N T A :  
**MARIANA VÁZQUEZ GUERRERO**

DIRECTORA DE TESIS

DRA. GUADALUPE ROSARIO FAJARDO ORDUÑA

Ciudad de México, Marzo del 2024





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 (PAPIT), DGAPA, UNAM, con clave: IN229820

## Agradecimientos

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo al momento de finalizar mi licenciatura y para poder realizar este proyecto, agradezco por siempre brindarme su apoyo en todo momento y por tenerme paciencia. Su guía y apoyo me han llevado a alcanzar alturas que nunca imaginé. Gracias por siempre confiar en mi y sobre todo hacer que confiara en mi misma.

A la Dra. Guadalupe Rosario Fajardo Orduña por su tiempo, apoyo incondicional, comprensión y paciencia a lo largo de la realización de este proyecto, por siempre estar atenta y ayudarme a resolver dudas y poder ampliar mi panorama y conocimiento dentro de la investigación. Sin sus palabras, correcciones y su experiencia no hubiese podido llegar a esta meta. Gracias por su guía y los consejos brindados para aplicar dentro de la investigación y en mi vida cotidiana, los llevaré por siempre grabados en mi memoria.

A la Dra. Itzen Aguiñiga Sánchez, que desde el primer momento en que la conocí me hizo amar la investigación. Gracias por toda su paciencia, su conocimiento y su experiencia, los cuales fueron una base fundamental en la realización de este proyecto, además de ser una gran guía para mi formación como bióloga. Gracias por siempre ayudarnos a mantener un ambiente sano, divertido y de buena convivencia entre todos los integrantes.

Al Dr. David Hernandez Álvarez y a la Dra. Graciela Gavia García por todo su apoyo, por brindarme de conocimiento en nuevas técnicas y por siempre estar pendientes cuando necesitaba su ayuda sin importar la hora. Su guía y apoyo fue muy importante para mi y para poder realizar este proyecto.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia: Lambarry, Eduardo, Daniel, Karen Mendoza, Katia, Amanda, Naomy, Sac, Malú, Anita, Karen Miranda, Mich, Hilary, Demián, Adrián, Diego, Ángel, Jessys, Mariana.

## Dedicatoria

A mis padres Javier y Lourdes, que, gracias a todo su amor, paciencia, educación y por los recursos brindados para poder lograr mis metas una por una, por siempre confiar en mí, escucharme y estar conmigo cuando la vida podía ser un poco abrumadora. Gracias por hacer de mi una persona que intenta siempre mejorar día con día con sus enseñanzas, amor y consejos, este logro también es de ustedes.

A mi hermana Susana por estar siempre pendiente de mí, por cuidarme, escucharme y estar siempre feliz por mis logros.

A mis tías Isabel y Gisela porque siempre han estado pendiente de mí, brindándome su amor, sus palabras de aliento y ayudándome a lograr mis metas.

A todos mis primos y tíos, porque siempre se preocupan por mí y me brindan todo el apoyo necesario, además de animarme a cumplir cada meta de mi vida.

A mis amigos Kobe, Thory, Monse, Cass, Sol, Yesi y Tona por ser parte de mi vida, porque cuando los días tristes vienen o las palabras tristes puedan atravesar mi corazón, sé que todo estará bien, porque están ahí con una enorme sonrisa sosteniendo mi mano fuertemente, hacen que todo esté bien, porque convierten en luz hasta el día más nublado. Hay días en los que siento que no soy nada o que puedo pasar de desapercibida, pero cuando escucho sus voces, me hacen sentir muy amada y me hacen sentir muy especial. Gracias por hacerme muy feliz.

A mis amigos de la licenciatura Diana, Samuel y Tere, por hacer todos esos años muy divertidos, por el apoyo mutuo, las clases compartidas, las horas haciendo tareas, por esas horas libres donde podíamos estar hablando como si no hubiera un mañana mientras comíamos o no hacíamos nada. Gracias por ser parte de mi vida y hacer mi experiencia en la universidad única.

Al equipo de cáncer del laboratorio, Sac, Lalo, Lambarry, Naomy, Katy, Amanda, Karen y Demián por estar conmigo siempre, por su apoyo y palabras de aliento, porque cuando tenía que realizar experimentos extensos, estuvieron ahí conmigo y no me dejaron sola, por siempre escucharme y por hacer de mi estadía en el laboratorio e incluso fuera de, muy divertida, única y especial que siempre recordaré.

*“... llevaremos un fragmento de nosotros a cada cosa que hagamos después,  
para no olvidar quiénes somos y quiénes debemos ser.”*  
*Gwen Stacy, The Amazing Spiderman 2*

# ÍNDICE

RESUMEN .....	8
1. Introducción .....	9
2. Hematopoyesis.....	10
3. Leucemia.....	12
4. Leucemia Mieloide Aguda (LMA).....	13
5. Tratamiento para la LMA.....	14
6. Mecanismo de acción de Ara-C.....	16
7. Resistencia a fármacos en LMA.....	18
8. Desarrollo de sistemas de estudios de resistencia a fármacos. ....	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
JUSTIFICACIÓN .....	26
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVOS .....	28
Objetivo general.....	28
Objetivos particulares .....	28
MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
Cultivo celular.....	29
Desarrollo de la sublíneas resistentes a Ara-C. Para el desarrollo de la sublínea.....	29
Viabilidad celular.....	29
Proliferación celular.....	29
Determinación de la IC <sub>50</sub> .....	30
Extracción, cuantificación e integridad de RNA.....	30
Diseño de oligos.....	30
Análisis de PCR en tiempo real.....	30
Análisis estadístico.....	30
RESULTADOS.....	32
1. Efecto de Ara-C en la proliferación de WEHI-3 Parental y WEHI-3/Ara-CR25 y determinación de su IC <sub>50</sub> .....	32
2. Inducción de resistencia a Ara-C en WEHI-3/Ara-CR25 .....	33

3. Proliferación de las líneas celulares WEHI-3 parental, WEHI-3/Ara-CR25 y WEHI-3/Ara-CR50 expuestas a diferentes concentraciones de Ara-C. ....	34
4. Efecto de Ara-C en la proliferación de WEHI-3/Ara-CR50 y determinación de su IC <sub>50</sub> .....	36
5. Expresión de genes involucrados en la captación de Ara-C dentro de la célula y relacionados en la resistencia a fármacos mediante PCR en tiempo real.....	38
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIÓN .....	42
REFERENCIAS .....	43



## RESUMEN

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad hematológica del sistema hematopoyético que afecta principalmente a adultos mayores. Durante los últimos 50 años el tratamiento estándar ha sido la administración de citarabina (Ara-C) en combinación con antraciclinas, sin embargo, la principal dificultad durante este tratamiento es que los pacientes sufren una recaída a pesar de haber tenido una respuesta positiva al inicio. La principal causa de las recaídas es que reaparecen células leucémicas que se han vuelto resistentes a los fármacos. Tras esta problemática, existe la necesidad de estudiar más a fondo los mecanismos que están involucrados en la resistencia a los tratamientos, una estrategia para ello es el desarrollo de sublíneas celulares resistentes a drogas. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una sublínea celular murina resistente a Ara-C a partir de la línea parental de WEHI-3, a la cual llamamos WEHI-3/Ara.CR50. Esta sublínea celular, WEHI-3/Ara-CR50, presentó un incremento en la  $IC_{50}$  a Ara-C de 13.5 veces, manteniendo su capacidad de proliferación y viabilidad además de presentar cambios en la expresión de genes característicos de la resistencia a Ara-C (disminución en la expresión de ENT1 y dCK), lo anterior en comparación con la línea WEHI-3 parental. Esta línea celular resistente al principal fármaco usado para el tratamiento de la LMA, podrá servir en investigaciones futuras como modelo de estudio para conocer más sobre las rutas moleculares implicadas en la resistencia a Ara-C y la evaluación de nuevas propuestas de tratamiento para este tipo de leucemia tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*.

## 1. Introducción

El cáncer es la principal causa de muerte alrededor del mundo, en el año 2020 se le atribuyeron a esta enfermedad casi 10 millones de defunciones (OMS, 2022). En el año 2021, la American Cancer Society estimó que de los diferentes tipos de leucemia o cáncer en la sangre, la leucemia mieloide aguda (LMA) recién pronosticada es la más prevalente y la principal causa de muertes relacionadas a este tipo de cáncer. La LMA afecta a adultos de mediana edad y adultos mayores y >2/3 casos ocurren en paciente mayores de 50 años, con una edad media de diagnóstico de 68 años, además de que representa aproximadamente el 18% de los diagnósticos de leucemia infantil. (Floren y Gillette, 2021; Stubbins et al., 2022).

Las personas que sufren de esta enfermedad, generalmente son sometidas a una quimioterapia de inducción (basada en citarabina), lo que resulta que más del 65% de pacientes mayores de 60 años pueden lograr una remisión completa. Sin embargo, a pesar de la quimioterapia de consolidación y/o el trasplante alogénico de células hematopoyéticas, las recaídas o reapariciones de la enfermedad son comunes (hasta el 40% en jóvenes y el 60% en adultos mayores), y únicamente una minoría de los pacientes con LMA sobreviven a largo plazo (Russell et al, 2022; Meillon y Demichelis, 2020; Farge et al., 2017). Estudios poblacionales han descrito tasas de supervivencia a 5 años inferiores al 10% para pacientes mayores de 70 años, mientras que la supervivencia se acerca al 50% para las personas más jóvenes (Roloff et al., 2022). La citarabina o Ara-C, es el fármaco base en las diferentes etapas del tratamiento contra la LMA desde hace alrededor de 50 años. Actualmente la resistencia a fármacos sigue siendo el principal factor limitante para lograr una remisión completa en pacientes con cáncer, incluyendo pacientes con LMA (Vasan, Baselga y Hyman, 2019).

La resistencia a los fármacos quimioterapéuticos está muy asociada con factores tanto intrínsecos como adquiridos, a saber, las alteraciones en la orientación del fármaco y la transducción de señales de moléculas mediadas por diversos transportadores de fármacos (p. ej., glicoproteína p), proteínas asociadas a la resistencia, daños en el ADN y, finalmente, debido a evasiones apoptóticas (Nandi et al., 2020). Así, se ha decidido implementar diversos modelos para estudiar el fenómeno de resistencia a fármacos, partiendo con estudios *in vitro*, donde se expone a la línea celular a concentraciones crecientes y de manera constante a fármacos usados durante la terapia para tratar el cáncer y así poder observar cómo las moléculas que están presentes en la captación del fármaco dentro de la célula y moléculas involucradas en la resistencia a fármacos se ven modificadas ante estas condiciones. Por lo que el desarrollo de sublíneas celulares de LMA resistentes a fármacos, incluyendo a Ara-C, son de gran relevancia para seguir investigando el problema de recaídas en pacientes con este tipo de leucemia.

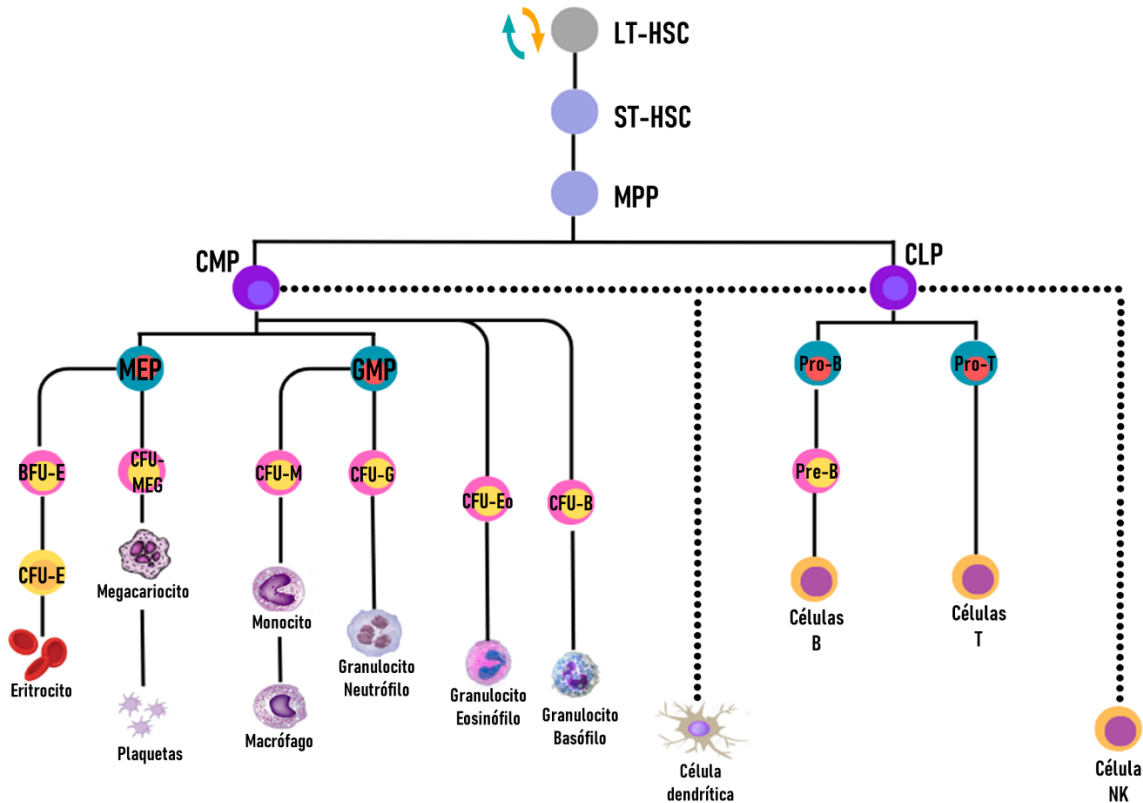
## 2. Hematopoyesis

Durante su vida, los seres humanos requieren una renovación continua de los diferentes tipos de células que conforman sus órganos. Las células encargadas de esta renovación son denominadas “Células Troncales” y son caracterizadas por su capacidad de autorrenovación, así mismo, tienen la característica de responder a estímulos generados en el ambiente donde se encuentren, comprometiéndose a su diferenciación hacia distintos linajes celulares con características y funciones especializadas de cada órgano. Estas características permiten mantener la homeostasis tisular durante el desarrollo, la vida adulta y en la reparación de tejidos tras alguna lesión (Pantoja-Ramírez y Alba, 2014; Chávez, 2017).

Las HSCs (*HSC por sus siglas en inglés*), son células multipotentes que generan células progenitoras, estas últimas generan precursores que se diferencian a los linajes de los glóbulos sanguíneos (eritrocitos, granulocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas), responsables de la renovación permanente de todos los linajes durante la vida útil de un organismo, este proceso de producción de células sanguíneas es llamado hematopoyesis (Li et al. 2015; Zhao et al., 2021; Dzierzak y Bigas, 2018; Mayani et al., 2007). Desde el descubrimiento de las HSCs en 1961 por Till y McCulloch en la médula ósea (MO), se ha avanzado considerablemente, y desde entonces, los científicos se han interesado en desarrollar métodos para comprender mejor la caracterización de sus propiedades funcionales y los mecanismos que controlan su destino. Estos procesos de decisión del destino deben ajustarse con precisión para mantener un nivel estable de HSCs funcionales en la MO y proporcionar constantemente progenitores para los diferentes linajes hematopoyéticos (Li et al., 2015; Cheng, Zheng y Cheng, 2020). Así, las HSCs son capaces de someterse a varias decisiones del destino celular, que incluyen autorrenovación, migración, diferenciación, supervivencia y muerte, que tienen un papel crítico en la regulación de su número y vida. Para ello, las HSCs están reguladas por factores de transcripción y factores de crecimiento, estos últimos producidos por células del microambiente y del nicho que las rodea (Li et al., 2015). En los mamíferos adultos, las HSCs residen en el nicho de la MO, sin embargo, su origen se remonta al período de la organogénesis embrionaria, cuando se especifican a muchos tipos de células diferentes (Dzierzak y Bigas, 2018).

El proceso de autorrenovación puede ser simétrico, generando dos HSCs hijas, o asimétrico, dando como resultados una HSC y otra progenitora aguas abajo que posee una capacidad reducida o nula de autorrenovación, estableciendo así una jerarquía para mantener la producción de sangre a lo largo del tiempo sin agotamiento. Por otro lado, las HSCs generan células troncales hematopoyéticas a largo plazo (LT-HSC, *por sus siglas en inglés*), las cuales son capaces de autorrenovarse indefinidamente, mientras que las células troncales hematopoyéticas a corto plazo (ST-HSC, *por sus siglas en inglés*) se autorrenuevan durante un intervalo definido. Las ST-HSC se diferencian en progenitores multipotentes no autorrenovables (MPP, *por sus siglas en inglés*) de los cuales se derivan los progenitores de linfocitos comunes (CLP, *por sus siglas en inglés*) y los progenitores mieloides comunes (CMP, *por sus siglas en inglés*), dos progenitores oligopotentes más

restringidos que finalmente dan lugar a una progenie diferencial a través de etapas de maduración funcionales irreversibles. Las CLP están restringidas a dar linfocitos T, linfocitos B y células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), mientras que las CMP dan lugar a progenitores de granulocitos/macrófagos (GMP, por sus siglas en inglés), que generan monocitos, macrófagos y granulocitos, y progenitores megariocitos/eritroides (MEP, por sus siglas en inglés), que producen megariocitos, plaquetas y eritrocitos. Los marcadores de superficie que distinguen a los diferentes tipos de progenitores y los factores de transcripción que son esenciales para cada paso de la diferenciación durante la cascada hematopoyética (Figura 1., Li et al., 2015).



**Figura 1.** Cascada hematopoyética. LT-HSC: célula troncal hematopoyética a largo plazo; ST-HSC: célula troncal hematopoyética a corto plazo; MPP: progenitores multipotentes; CMP: progenitor mieloide común; CLP: progenitor mieloide común; MEP: progenitor megacariocito-eritroide; GMP: progenitor mieloide granulocítico; BFU-E: unidad formadora de brotes de eritrocitos; CFU-Meg: unidad formadora de colonias de megacariocitos; CFU-M: unidad formadora de colonias de macrófagos; CFU-E: unidad formadora de colonias eritroides; CFU-G: unidad formadora de colonias de granulocitos; ; CFU-Eos: unidad formadora de colonias de eosinófilos; CFU-B: unidad formadora de colonias de basófilos; Pro-B: progenitor de células B; Pro-T: progenitor de células T. Tomado y modificado de Lara, 2021.

### 3. Leucemia

La leucemia es la disfunción de la hematopoyesis en la que los progenitores mutantes proliferan sin control y generan grandes cantidades de leucocitos anormales que se acumulan en la MO, sangre periférica, bazo y otros órganos. Suprime la producción de células sanguíneas normales y provoca anemia, alto riesgo de infección y trastornos de coagulación, etc. Los eventos de transformación ocurren en las células que conducen a la pérdida de control sobre las decisiones del destino celular pueden conducir al cáncer (Ci et al., 2022; Li et al., 2015). La leucemia representa el 2.5% de todos los casos de cáncer y en 2020 se diagnosticaron más de 470 000 de pacientes en todo el mundo, representando casi el 4.7% de todas las muertes relacionadas con cáncer, además de ser diagnosticada como el decimosexto cáncer más común, con más de 495 000 casos nuevos notificados en el 2020. Las leucemias generalmente se clasifican en subtipos definidos por el linaje celular (linfocítico o mieloide) y la etapa de detención de la maduración (aguda o crónica). Por lo general, los tipos de leucemia más comunes incluyen la leucemia mieloide aguda (LMA), la leucemia mieloide crónica (LMC), la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y la leucemia linfoblástica crónica (LLC) (Ci et al., 2022); además, a nivel mundial, la carga de morbilidad por leucemia es mayor entre los hombres que en las mujeres (Bispo et al., 2020; Amini, Sharma y Jani, 2023).

Aproximadamente el 4.8% de todos los casos de leucemia y linfoma se diagnosticaron en personas menores de 20 años. Como tal, constituyó aproximadamente entre el 20% y 30% de todos los cánceres de este grupo de edad. La LLA, que es más común en la infancia y la adolescencia, representa aproximadamente el 75% de todos los casos de leucemia en personas menores de 20 años y aproximadamente una cuarta parte de todos los cánceres pediátricos; su incidencia máxima se da en niños de 2 a 5 años. Por lo contrario, la LMA, con una incidencia global de 3 a 5 casos por 100.000 en la población general, es mucho más prevalente en adultos, con una incidencia de solo 7,7 por millón entre las edades de 0 a 14 años. De hecho, la edad promedio del diagnóstico de LMA es de 66 años, con un 54% de los pacientes diagnosticados después de los 65 años y un 33% adultos mayores de 75 años (Tebbi, 2021).

## 4. Leucemia Mieloide Aguda (LMA)

La LMA es una enfermedad hematológica caracterizada por la expansión clonal de células hematopoyéticas mieloides inmaduras (mieloblastos), que se acumulan en la MO y en la sangre, en la que resulta una hematopoyesis disfuncional, además de que pueden infiltrarse en tejidos como el bazo, hígado, piel, encías y sistema nervioso central (Fajardo *et al.*, 2021; Floren y Gillete, 2022). La LMA ocurre con mayor frecuencia en pacientes de edad avanzada y es la leucemia aguda más común en adultos, representando aproximadamente el 80% de los casos en este grupo. En Estados Unidos, la edad media en el momento del diagnóstico es de más de 65 años, y la incidencia aumenta progresivamente con la edad, de modo que más del 40% de los pacientes son diagnosticados actualmente con más de 70 años. Mientras que, en México, en un estudio de 525 pacientes, se reportó una edad media al diagnóstico de 47 años (rango de 14-95 años), teniendo un mayor número de incidencia en el género masculino (Webster y Pratz., 2018; Ferrara *et al.*, 2019; Arana, 2022; De Kouchkovsky y Abdul-Hay, 2016). De todos los tipos de leucemia, la LMA representa el porcentaje más alto (62%) de las muertes por esta enfermedad (Shallis *et al.*, 2019). Los pacientes en general con LMA no sobreviven más de 5 años, solo menos del 25% de pacientes con una edad de 60-65 y menos del 10% de pacientes con una edad de 70 años o más sobreviven, a comparación de los pacientes que tienen una edad de 50 años o menos, sobreviven el 50% (Venditti *et al.*, 2023).

Actualmente existen tres clasificaciones para la LMA, entre las que se encuentra la clasificación French-American-British (FAB). Esta clasificación fue la primera y propone ocho subtipos de LMA según las características morfológicas de las células y su madurez, sin embargo, aunque la clasificación FAB todavía se usa para agrupar a los pacientes en diferentes subtipos, el diagnóstico y el tratamiento están determinados por los sistemas de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la European LeukemiaNet (ELN) (Fajardo *et al.*, 2021). La OMS en sus pautas actualizadas de 2016 distingue seis grupos de LMA: (1) LMA con anomalías genéticas recurrentes, (2) LMA con cambios relacionados con la mielodisplasia, (3) Neoplasias mieloides relacionadas con la terapia, (4) LMA no especificada, (5) sarcoma mieloide y (6) proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down (Pelcovits y Niroula, 2020). Por otro lado, la clasificación del ELN propone tres grupos: riesgo favorable, riesgo intermedio y riesgo adverso, que se basan principalmente en anomalías citogenéticas previas al tratamiento en los genes NPM1, FLT3, CEBPA, RUNX1, ASXL y TP53 (Fajardo *et al.*, 2021). Estas tres clasificaciones para agrupar a la LMA se siguen ocupando actualmente (Short y Ravandi, 2016).

## 5. Tratamiento para la LMA

La elección del tratamiento inicial para tratar la LMA es cada vez más compleja y desafiante, especialmente para pacientes mayores de 60 años, ya que se ven involucrados más parámetros para esta elección, así como la condición física, edad, parámetros clínicos, perfil citogenético y perfil molecular de la enfermedad. Las opciones de tratamiento se han dividido en regímenes intensivos y no intensivos (Venditti et al., 2023), por lo que a continuación abordaremos el régimen intensivo.

La citarabina o Ara-C y su combinación con las antraciclinas ha sido la terapia base contra la LMA durante los últimos 50 años, la cual se conoce como “régimen 7+3”, el cual consiste en la administración de Ara-C durante 7 días + 3 días de una antraciclina (comúnmente usado daunorrubicina). Esta terapia de inducción conduce a una remisión completa (RC) en hasta el 80% de los pacientes con una enfermedad de riesgo favorable y entre el 50% y 60% a aquellos pacientes con enfermedad de riesgo adverso (Pelcovits y Niroula, 2020; Kantarjian et al., 2021); a pesar de todo, la mayoría de ellos no sobreviven a largo plazo (más de cinco años), y esto se debe en gran parte a la mortalidad relacionada con el tratamiento y la aparición de recaídas asociadas a la resistencia a fármacos (Fajardo et al., 2021). La supervivencia a largo plazo es reducida en un gran número de pacientes y el tratamiento no tiene un avance significativo en la esperanza de vida, por lo tanto, la LMA se continúa tratando con un tratamiento basado en el esquema de terapia combinada, el cual se divide en terapia de inducción, consolidación y mantenimiento, además de recurrir, cuando sea posible, a un trasplante de HSCs (Aguñiga et al., 2021; Gabra Salmena, 2017).

El objetivo principal de la terapia de inducción es lograr la RC, definida clínicamente como el recuento de blastos mieloides en la MO por debajo del 5%, o un estado de enfermedad residual, es decir, reducir la carga leucémica y restaurar la hematopoyesis normal, pero los pacientes generalmente necesitan un tratamiento más intensivo (consolidación) para lograr un control y/o cura de la enfermedad (Marin *et al.*, 2016; Gabra y Salmena, 2017).

Por otro lado, la etapa de consolidación tiene como objetivo prevenir la recaída (Fajardo *et al.*, 2021). Después de alcanzar la RC, lo ideal es que los pacientes se consoliden con regímenes que incluyan dosis intermedias de Ara-C, aunque en algunos centros todavía se utiliza Ara-C en dosis altas (3000 mg/m<sup>2</sup>), pero su alta toxicidad y su incapacidad para mejorar la supervivencia son argumentos en contra de su uso continuo (Döhner et al., 2022).

La FDA define la terapia de mantenimiento para la LMA como un curso de tratamiento prolongado, pero de duración limitada, que suele ser menos tóxico y se administra después de lograr la RC con el objetivo de reducir el riesgo de una recaída (Döhner et al., 2022). Después de recibir quimioterapia de inducción, los pacientes con características de enfermedad de riesgo favorable que logran la remisión generalmente se les recomienda continuar con quimioterapia de consolidación, con un régimen basado en dosis altas de Ara-C, mientras que los pacientes con características de enfermedad de riesgo adverso y los pacientes con características de riesgo inmediato, deben someterse para un trasplante alogénico de células troncales, ya que el riesgo de recaída para estos pacientes cuando se tratan con quimioterapia sola es inaceptablemente alto (Short *et al.*, 2020), de hecho, la

mayoría de los pacientes recaen y solo el trasplante alogénico de células troncales podría ser la única solución (Farge *et al.*, 2017).

Aquellos pacientes con enfermedad quimiosensible (pacientes más jóvenes y aquellos sin antecedentes de enfermedad hematológica, citogenética adversa o mutaciones deletéreas) tienen más probabilidades de obtener un beneficio de supervivencia con dosis más altas de quimioterapia citotóxica durante la inducción y la consolidación, a pesar de la posible toxicidad adicional de estos regímenes más intensos. Por lo tanto, para esta población, es razonable un refinamiento adicional del régimen de inducción a través de la modificación del tratamiento central de la inducción y la combinación de agentes quimioterapéuticos alternativos y estrategias de dosificación. Por el contrario, para aquellos pacientes con una enfermedad biológicamente más compleja y resistente a los fármacos, es probable que hayamos llegado al límite de la quimioterapia citotóxica. En este subgrupo de pacientes con enfermedad quimiorresistente, se necesitan nuevas estrategias de tratamiento (Short y Ravandi, 2016). El desarrollo de terapias adicionales centradas en subgrupos genómicos, moleculares o celulares dirigidos tiene como objetivo crear fármacos que sean más efectivos y menos tóxicos, sin embargo, aún no ha sido posible obtener mejoras significativas (Fajardo *et al.*, 2021).

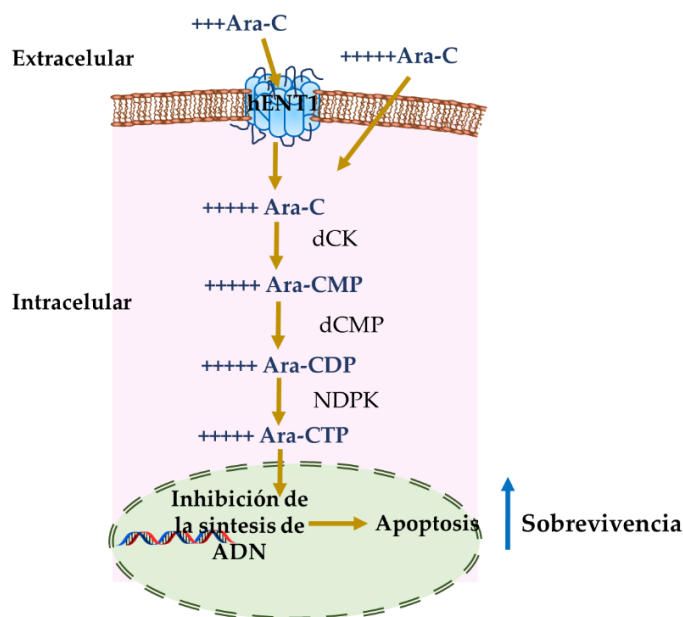
La LMA en la población de edad avanzada es un reto terapéutico especial, esto es debido al mal estado funcional de este grupo, lo que da como resultado el aumento de la toxicidad relacionada con la terapia, además, este grupo de pacientes también presenta una mayor resistencia al tratamiento (Fajardo *et al.*, 2021). Los regímenes basados en quimioterapia intensiva estándar siguen siendo fundamentales para inducir una RC en la LMA, con tasas de RC del 60% al 85% para adultos menores de 60 años y de un 40% a 60% para pacientes mayores de 60 años (Niu-Peng y Liu, 2022). Un obstáculo importante en el tratamiento de la LMA es la enfermedad refractaria o la recaída después de haber logrado la RC, ya que de este último surge de una de las pocas células resistentes a la terapia, sin embargo, cabe destacar que aproximadamente entre el 10% y el 40% de los pacientes con LMA recién diagnosticada no logran una RC (Stelmach y Tumpp, 2023; Li *et al.*, 2023). El origen de la recaída se remota a las células leucémicas resistentes a la terapia, y esta resistencia a los medicamentos, que incluye tanto a pacientes que no responden inicialmente al tratamiento como a los que recaen después de una respuesta inicial (Stelmach y Tumpp, 2023; Morales *et al.*, 2023). Desafortunadamente, a pesar de someterse a un régimen de quimioterapia tan agresivo con todas las toxicidades y efectos secundarios asociados, muchos pacientes aún recaen dentro de los 5 años (Gabra y Salmena, 2017).



## 6. Mecanismo de acción de Ara-C.

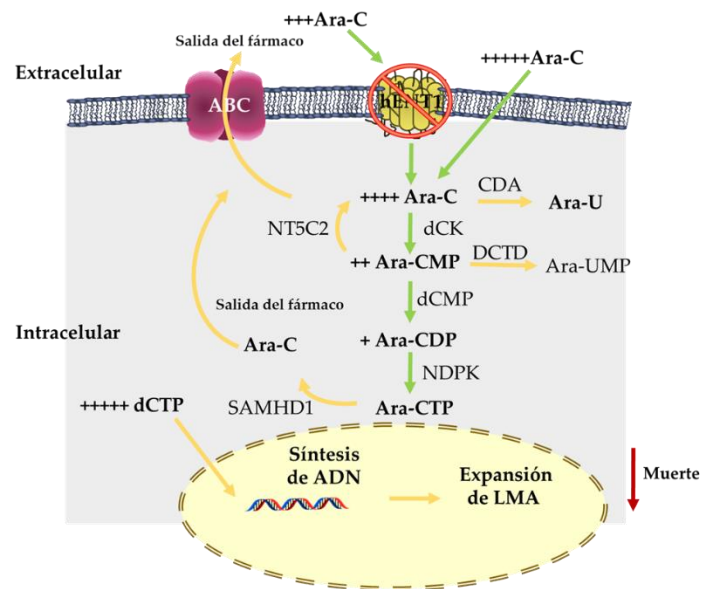
La Ara-C es un medicamento utilizado en el manejo y tratamiento de leucemias y linfomas. Perteneció al grupo de medicamentos antimetabólicos. Ara-C es un fármaco citotóxico de la fase celular, principalmente de la fase S, que es cuando las células se someten a la síntesis del ADN. Bajo ciertas circunstancias, puede bloquear la progresión de las células de la fase G1 a la fase S. A principios de la década de 1950, los investigadores descubrieron a Ara-C como nucleósido (que contiene azúcar arabinosa) en *Cryptotethia crypta*, una especie de esponja (Faruqi y Tadi, 2020; Murphy y Yee, 2017).

Para que pueda funcionar como un agente antitumoral, Ara-C ingresa a la célula por medio de la membrana con ayuda de proteínas, principalmente el transportador de nucleósidos equilibrante 1 (ENT1), posteriormente la enzima desoxicitidina quinasa (dCK) convierte a Ara-C en monofosfato de citarabina (Ara-CMP), Ara-C se fosforila en difosfato de citarabina y trifosfato de Ara-C mediante las enzimas desoxicitidina monofosfato quinasa (dCMPK) y nucleósido difosfato quinasa (NDPK). La forma de trifosfato de citarabina (Ara-CTP) es una forma activa que puede inhibir la acción de la ADN polimerasa. Ara-CTP compite con el trifosfato de desoxicitidina (dCTP) en el proceso de transcripción del ADN, después de cooperar con la cadena de ADN, Ara-CTP actúa como una cadena terminadora, inhibiendo así el alargamiento, la síntesis y la reparación del ADN. La consecuencia de esto es el bloqueo del ciclo celular desde la fase G1 y la fase S, provocando la muerte celular. (Figura 2.) (Arwanih, Louisa y Wanandi, 2022).



**Figura 2.** Mecanismo molecular y acción de Ara-C dentro de la célula. Ara-C es transportado dentro de la célula mediante ENT1; dentro de la célula Ara-C es fosforilado secuencialmente por las quinasas (dCK, dCMPK y NDPK) para activar el antimetabolito Ara-CTP, el cual se transloca al núcleo y bloquea la síntesis de ADN. Eventualmente la célula muere por apoptosis y el paciente sobrevive. Tomado y modificado de Fajardo et al., 2021.

Un estudio preliminar de las vías que desempeñan un papel en el mecanismo de transporte, activación y degradación de Ara-C en las células nos ayuda a comprender el mecanismo de resistencia de la LMA a este fármaco. Uno de los principales mecanismos de resistencia es causado por una deficiencia de la absorción de Ara-C dentro de las células, esto se debe a la actividad reducida de ENT1, que es causado por una mutación del gen SLC29A1, además de la alta actividad de las proteínas ABCC10 y ABCC11 que da como resultado que una cantidad significativa de Ara-C que ha estado en la célula sea bombeada fuera de la célula en exceso. La actividad reducida de las enzimas dCK, dCMK y NDPK también son la causa de la baja actividad de la fosforilación, por lo que el proceso de fosforilación de Ara-C disminuye, evitando que se intervenga en la síntesis del ADN. (Figura 3) (Fajardo et al., 2021).



**Figura 3.** Mecanismo de resistencia de Ara-C. Algunos mecanismos de resistencia se caracterizan por la disminución de ENT1 la cual no permite la entrada de Ara-C dentro de la célula, mientras que los niveles bajos de dCK no permiten la correcta fosforilación de Ara.C, por lo que las células leucémicas seguirán creciendo. Tomado y modificado de Fajardo et al., 2021.

## 7. Resistencia a fármacos en LMA

El National Cancer Institute define que la quimiorresistencia o resistencia a fármacos es una situación que se presenta cuando células cancerosas o microorganismos, como bacterias o virus, no responden al medicamento que suele debilitarlos o destruirlos. La resistencia farmacológica se presenta antes, durante o después de administrar el tratamiento, y este sigue siendo el principal factor limitante para lograr una remisión completa en pacientes con cáncer (NIH, s.f.; Vasan-Baselga y Hyeman, 2019). Datos estadísticos muestran que más del 90% de la mortalidad de los pacientes con cáncer se atribuyen a que generan una resistencia a los medicamentos (Bukowski, Kciuk y Kontek, 2020).

La recaída y la enfermedad refractaria (R/R) son problemas importantes que impiden una respuesta adecuada al tratamiento de la LMA. Debido a que la recaída se refiere a la reaparición de la enfermedad, está ampliamente relacionada con la enfermedad refractaria, lo que a su vez conduce a un mal pronóstico (Fajardo et al., 2021). La recaída sigue siendo un escenario común y frecuente durante el tratamiento de la LMA, el cual ocurre en entre el 10% y el 40% de los pacientes más jóvenes y en personas mayores de 60 años tiene una frecuencia entre del 40% al 60% en estos pacientes, siendo la principal causa del fracaso del tratamiento a largo plazo (Thol y Ganser, 2020; Kropp y Li, 2022). Sin embargo, con cada recaída, los pacientes experimentan una disminución de la respuesta al tratamiento (Atieh et al., 2021). A pesar del progreso en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, la (R/R) se asocia con malos resultados que todavía representa una necesidad médica sin ser cubierta; las opciones de tratamiento para estos pacientes incluyen someter al paciente a ensayos clínicos, alo-trasplante de células troncales o a una terapia dirigida (Brancati et al., 2021). La enfermedad refractaria se define como cualquier fracaso para lograr la remisión completa después de dos ciclos de terapia de inducción. La refractariedad a los medicamentos puede existir antes de la exposición a los agentes quimioterapéuticos (resistencia primaria o intrínseca) o puede desarrollarse o mejorarse durante el tratamiento farmacológico (resistencia secundaria o adquirida) (Marin *et al.*, 2016). La resistencia intrínseca significa que un cáncer sin tratamiento previo no responde al tratamiento desde el principio, mientras que en la resistencia adquirida hay una respuesta inicial a la terapia, pero la resistencia se va a desarrollando con el paso del tiempo (Rothenburger et al., 2021). De esta manera, la resistencia primaria es el fenómeno por el que las células tumorales, como las células en la fase no proliferativa G<sub>0</sub>, no son sensibles a los fármacos antes del uso de fármacos antitumorales. Mientras que la resistencia adquirida se refiere al fenómeno en que las células tumorales iniciales son sensibles a los medicamentos para la quimioterapia, pero el efecto de estos se reduce gradualmente y produce resistencia a los medicamentos después de la terapia de inducción (Zhang et al., 2019). Aproximadamente, un tercio de los pacientes con LMA que son adultos, son resistentes a la terapia de inducción inicial, o se producen recaídas en la mayoría de los pacientes que logran una remisión (Ma et al., 2019).

Debido a la importancia de la resistencia a fármacos en la LMA y la problemática que surge para tratar esa enfermedad, Short y colaboradores, han propuesto una nueva clasificación donde se puede dividir de manera clara a los pacientes con LMA en pacientes con

enfermedad quimiosensible o quimiorresistente, según la edad del paciente, las anomalías citogenéticas y moleculares y la presencia o ausencia de una neoplasia maligna hematológica anterior. Dicha distinción proporciona un panorama para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la LMA; los pacientes con enfermedad quimiosensible (pacientes más jóvenes y aquellos sin antecedentes de malignidad hematológica, citogenética adversa o mutaciones deletéreas) tienen más probabilidades de obtener un beneficio de supervivencia con dosis más altas de quimioterapia citotóxica durante la inducción y la consolidación (Tabla 1) (Short y Ravandi, 2016).

**Tabla 1.** Clasificación de la LMA dividida en enfermedad quimiosensible, quimiorresistente innata y quimiorresistencia adquirida.

Tipo de LMA	Características	Tratamiento
Quimiosensible	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin mutación KIT</li> <li>• Sin mutación FLT3</li> <li>• Pacientes jóvenes sin terapia relacionada a la LMA o antecedentes de trastorno hematológico</li> </ul>	Intensificación de la dosis de quimioterapia
Quimiorresistencia innata	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citogénética adversa</li> <li>• Mutación FLT3-ITD</li> <li>• Pacientes jóvenes o mayores con t-LMA o AHD.</li> </ul>	Nuevos agentes (p. ej., terapia molecular dirigida o basada en el sistema inmunitario)
Quimiorresistencia adquirida	Adaptación al nuevo entorno definido por la quimioterapia o nuevo tratamiento; cambio de perfil mutacional; supervivencia y proliferación.	Tratamientos existentes (quimioterapia y nuevos agentes) sin aumento significativo de la supervivencia

AHD=antecedente de trastorno hematológico; LMA=leucemia mieloide aguda; CBF=factor de unión central; ITD=duplicación interna en tándem; t-LMA=LMA relacionada con la terapia. Tomado y modificado de Short y Ravandi, 2016; Fajardo et al., 2021.

La resistencia a los fármacos quimioterapéuticos está muy asociada con factores tanto intrínsecos como adquiridos, a saber, las alteraciones en la orientación del fármaco y la transducción de señales de moléculas mediadas por diversos transportadores de fármacos (p. ej., glicoproteína p), proteínas asociadas a la resistencia, daños en el ADN y, finalmente, debido a evasiones apoptóticas (Nandi et al., 2020).

A lo largo del estudio de la LMA, se han ubicado ciertas moléculas que se ven involucradas en la resistencia a fármacos dentro de la célula. Al respecto, se han estudiado diversos genes asociados a la resistencia a Ara-C en la LMA, entre ellos, encontramos a dCK, la cual cataliza la fosforilación de Ara-C a Ara-CMP, primer paso y el más importante para la eventual incorporación de trifosfato de Ara-C en el ADN (Wu et al., 2021); además, es la enzima limitante de la velocidad de la vía de rescate que fosforila los análogos de nucleósidos, incluidos Ara-C, a los respectivos monofosfatos. Estos monofosfatos son fosforilados por diversas quinasas a difosfatos y trifosfatos, que a su vez se utilizan para la síntesis de ADN. Estos nucleótidos de Ara-C inhiben la replicación y transcripción del ADN al inhibir las polimerasas de ADN y ARN. Ara-C se convierte en su metabolito inactivo arauridina a través de la citidina desaminasa (CDA), mientras que Ara-CMP se convierte en un metabolito inactivo, Ara-UMP por la desoxicitidina monofosfato desaminasa (dCMPD). Los estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que los cambios en los niveles celulares de dCK, están relacionados con cambios en las concentraciones del fármaco a nivel intracelular (Kulsoom-Shamsi y Asfar, 2018). Algunos estudios han informado sobre mutaciones de dCK en personas con LMA y líneas celulares de leucemia murina (RCL/0) resistentes a Ara-C (Wu et al., 2021). La deficiencia de dCK está asociada con la resistencia a los agentes quimioterapéuticos antivirales y anticancerígenos. Por el contrario, el aumento de la actividad de la desoxicitidina quinasa se asocia con una mayor activación de estos compuestos a derivados de nucleósido trifosfato citotóxicos. Así mismo, dCK es clínicamente importante debido a su relación con la resistencia y la sensibilidad a los medicamentos (Genecards).

Por otro lado, los nucleósidos juegan un papel central en muchos procesos biológicos, desde el metabolismo hasta la señalización celular. En este contexto, desempeñan funciones críticas en el metabolismo, fisiología y farmacología (Wright y Lee, 2021). Igualmente, los transportadores de nucleósidos equilibrantes (ENT *por sus siglas en inglés*), que son una clase de transportadores de nucleósidos independientes del Na<sup>+</sup>, responsables de la captación de un gran número de nucleósidos y análogos de nucleósidos; aquí se incluyen nucleósidos de purina y pirimidina, y análogos como gemcitabina, Ara-C y fludarabina. Los ENT son las proteínas de membrana integrales responsables de la captación de una gran cantidad de nucleósidos ampliamente utilizados para el tratamiento contra el cáncer, como los fármacos mencionados anteriormente. Mientras tanto, la captación de Ara-C dentro de la célula está mediada principalmente por el nucleósido equilibrante 1 (ENT1), y la deficiencia de este gen se ha propuesto como un mecanismo que participa en la resistencia celular hacia Ara-C (Zimmerman et al., 2009; Macanas et al., 2012.).

Así mismo, la resistencia a múltiples fármacos (MDR *por sus siglas en inglés*) es un fenómeno en el que las células cancerosas presentan resistencia o resistencia cruzada a una amplia gama de fármacos quimioterapéuticos, siendo la principal causa del fracaso de la quimioterapia, lo que lleva a una reaparición del cáncer (Pan-Miao y Chen, 2018). El gen MDR1 codifica una proteína transportadora de membrana dependiente de ATP denominada glicoproteína P (P-gp), que es responsable de la salida de carcinógenos y fármacos fuera de las células, por lo que protege las células contra sustancias tóxicas, pero, la

sobreexpresión de este gen se puede asociar a un mal pronóstico y dando como resultado la resistencia a la quimioterapia. El producto de este gen afecta a las células, cambiando la farmacocinética del fármaco; esta función es muy importante durante la lucha contra las células cancerosas (Kaltoum et al., 2020; Yazdandoust et al., 2022). El gen MDR1 se considera como una de las moléculas clave que causan MDR en el cáncer (Pan-Miao y Chen, 2018).

Igualmente, la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1, *por sus siglas en inglés*) es un miembro de la familia de transportadores ABC, que se expresa principalmente en la membrana plasmática y elimina los agentes citotóxicos de la célula a través del transporte activo, además se ha asociado con la resistencia a varios agentes quimioterapéuticos. El aumento de la expresión de MRP1 conduce a una reducción en la concentración de los agentes quimioterapéuticos dentro de las células tumorales, provocando una disminución de la eficacia de estos agentes (Yi et al., 2018).

Otras moléculas de gran importancia involucradas en la resistencia a fármacos y en el desarrollo del cáncer es TP53, el cual es un gen supresor de tumores y codifica la proteína p53. P53 regula la transcripción de genes diana y responde al daño del ADN, lo que lleva a una detención del ciclo celular o apoptosis. P53 se activa en respuesta a diversas señales de estrés celular, como las que surgen del daño en el ADN, el estrés replicativo, expresión de oncogenes, la hipoxia, la privación de nutrientes o el estrés traslacional (Cao et al., 2020; Stiewe y Harán, 2018). P53 inhibe el crecimiento de las células cancerosas, bloqueando su proliferación o aduciendo su muerte por apoptosis, y así, de acuerdo con su función como “guardián del genoma”, p53 preserva la estabilidad genómica al prevenir alteraciones genómicas y regula la expresión de genes diana en respuesta al estrés celular y al daño del ADN. La función de p53 humana está estrictamente regulada por modificaciones postraduccionales como fosforilación, acetilación, metilación, ubiquitinación, sumoilación, neddilación y glicosilación en sitios específicos (Cao et al., 2020).

El estudio de todas las moléculas mencionadas anteriormente implica el desarrollo de sistemas experimentales para explorar su papel biológico en la resistencia a fármacos.

## 8. Desarrollo de sistemas de estudios de resistencia a fármacos.

El desarrollo de líneas celulares de cáncer resistentes a los medicamentos de quimioterapia es un enfoque establecido desde hace mucho tiempo para investigar los mecanismos de citotoxicidad y resistencia a los agentes quimioterapéuticos (McDermott et al., 2014). Las líneas celulares resistentes a la quimioterapia se han utilizado para investigar el problema de la resistencia a los medicamentos durante más de 20 años. Las ventajas de estos modelos incluyen una buena disponibilidad y cantidad ilimitada de material biológico, así como un mayor control sobre el tipo, la concentración y la duración del tratamiento. Además, la investigación realizada sobre modelos de líneas celulares permite realizar experimentos que no podrían llevarse a cabo en pacientes. Así mismo, un estudio *in vitro* preliminar puede identificar marcadores candidatos de resistencia a un agente quimioterapéutico en particular, que luego pueden validarse en un estudio clínico (Watson-Lind y Cawkwell, 2007).

La elección de una línea celular parental es muy importante ya que es la base de todos los experimentos posteriores. La línea celular original debería ser muy fácil de mantener en cultivo celular, ya que las variantes resistentes suelen ser más difíciles de cultivar. Idealmente, los investigadores que realizan la selección resistente a los medicamentos en el laboratorio deben estar muy familiarizados con el cultivo de células parentales. Los modelos de células resistentes a los medicamentos se desarrollan en el laboratorio al exponer repetidamente a los medicamentos las células cancerosas que crecen en cultivos celulares. Las células hijas resistentes supervivientes se comparan luego con las células parentales sensibles usando ensayos combinados de viabilidad/proliferación celular como MTT, fosfatasa ácida o ensayos clonogénicos. La sensibilidad de estas líneas celulares emparejadas generalmente se determina exponiéndolas a un rango de concentraciones de fármacos y luego evaluando la viabilidad celular (McDermott et al., 2014).

Uno de los métodos mejor establecidos para cultivar líneas celulares resistentes a los medicamentos es utilizar un enfoque de baja concentración/larga duración. Las células se cultivan en medios estándar que contienen concentraciones bajas (subletales) del fármaco elegido. En puntos específicos, esta concentración se incrementa de forma escalonada. Las metodologías exactas varían, pero este enfoque puede llevar entre 6 y 16 meses para establecer una línea celular resistente a los medicamentos. Las líneas celulares pueden ser genéticamente inestables y esto debe ser considerado y controlado cuidadosamente en tratamientos experimentales a largo plazo (Watson-Lind y Cawkwell, 2007).

El valor de la  $IC_{50}$  indica la concentración del inhibidor que se requiere para inhibir a la mitad una determinada función biológica o bioquímica. Es decir, los valores grandes de  $IC_{50}$  indican inhibidores que interactúan menos eficazmente con una enzima que los inhibidores que tienen valores pequeños de  $IC_{50}$ . El concepto de  $IC_{50}$  también se puede utilizar para ensayos *in vitro* o *in vivo* donde una comparación entre un conjunto de antagonistas o agonistas no marcados (es decir, inhibidores) se clasifica frente a un ligando enzimático selectivo marcado o no marcado conocido (es decir, sustratos) (Caldwell et al., 2012). La

sensibilidad de estas líneas emparejadas generalmente se determina exponiéndolas a un rango de concentraciones de fármacos para posteriormente evaluar la viabilidad celular. La  $IC_{50}$  para estas líneas se puede utilizar para determinar el aumento de resistencia, conocido como doble resistencia. La resistencia clínicamente relevante es un aumento de dos a cinco veces el valor de la  $IC_{50}$  de la línea celular original, esto tiene como objetivo tratar de imitar las condiciones que experimentan los pacientes con cáncer durante la quimioterapia. Las desventajas de los modelos clínicamente relevantes pueden incluir resistencia inestable, resistencia de muy bajo nivel y pequeños cambios moleculares (McDermott et. al., 2014).

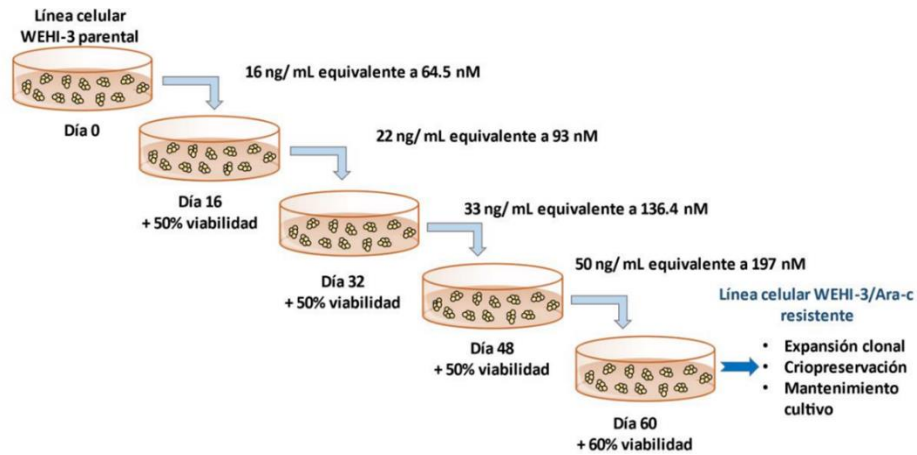
Los marcadores putativos de resistencia a la quimioterapia incluyen moléculas responsables de la desintoxicación de fármacos o su eliminación de la célula, los implicados en las vías celulares (como la apoptosis o la reparación del ADN) que se producen aguas abajo del tratamiento citotóxico o los relacionados con el mecanismo de acción específico del fármaco individual (Watson-Lind y Cawkwell, 2007).

Actualmente, se busca desarrollar modelos de laboratorio de alto nivel con el objetivo de comprender posibles mecanismos de toxicidad y resistencia a los agentes quimioterapéuticos. Las dosis del fármaco suelen ser altas y estas dosis pueden ir incrementando con el tiempo. Con frecuencia, las células se cultivan continuamente en presencia de fármaco. Los modelos de alto nivel suelen ser más estables y resistentes y, por lo tanto, más fáciles de mantener en cultivo para proyectos de investigación que esté en curso. Los niveles de resistencia suelen ser más altos y, como tales, los cambios moleculares asociados con el mecanismo de resistencia son mayores más fáciles de identificar (McDermott et. al., 2014). Muchos estudios también han establecido células que son resistentes a los medicamentos contra el cáncer utilizan el  $IC_{50}$  como indicador de evaluación de la resistencia (Yu et al., 2021)

En este sentido, WEHI-3, una línea de leucemia mielomonocítica aguda de ratón de la cepa BALB/c (American Type Cell Culture) ha sido ampliamente ocupada por ser un gran modelo de estudio en experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* (Lin et al., 2021; Taghiloo et al., 2022; Shang et al., 2021). Como antecedente, previamente en nuestro laboratorio se inició con la generación de un modelo resistente a múltiples fármacos, se inició con un ensayo dosis respuesta de Ara-C en la línea WEHI-3 parental para poder calcular su  $IC_{50}$ , la cual fue de 352.78 nM. Se comenzó a exponer a la línea a 64.5 nM, concentración que no dañaba a las células y así permitió seguir con las células viables para las siguientes resiembras y poder ir aumentando la concentración de manera paulatina de Ara-C hasta llegar a la concentración de 197 nM, a esta sublínea celular se le llamó WEHI-3/Ara-CR25, y durante este proceso de aumento de concentración las células mostraban cambios en su comportamiento tales como disminución en la proliferación, las células no crecían de forma típica como lo es la formación de racimos y se observaba un aumento en el tamaño celular. Poco a poco las células comenzaron a recuperar su comportamiento habitual a pesar de seguir con la administración de esa dosis a más de 200 días. Pasados estos días se comenzó a hacer la criopreservación y expansión para los experimentos posteriores (Figura 3). Se realizó el ensayo de dosis-respuesta para la sublínea resistente de WEHI-3 Parental, para posteriormente evaluar la  $IC_{50}$ , la cual fue de 2538 nM. Se calculó el aumento de resistencia, el cual fue de 7.19 veces, lo cual aún se encuentra en un aumento de resistencia



clínicamente relevante. (Lambarry, tesis de licenciatura, 2022). A pesar de que se mantuvo en esta concentración, no se logró llegar a concentraciones más altas del fármaco, por lo que se presenta un nuevo reto para la generación de una línea celular WEHI-3 resistente a Ara-C como modelo de laboratorio de alto nivel.



**Figura 4.** Diagrama de la metodología empleada en el desarrollo de la línea celular WEHI-3 resistente a 197 nM de concentración de Ara-C (WEHI-3/Ara-CR25) (Tomado de Lambarry, 2022).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La LMA es la forma más común de leucemia aguda en adultos mayores. El tratamiento para esta enfermedad incluye el uso de Ara-C como principal fármaco. El obstáculo para lograr una remisión completa es la recaída de la enfermedad relacionada con la resistencia a Ara-C, por lo cual, la vida del paciente con LMA se compromete por la ausencia inicial de respuesta a la quimioterapia (resistencia intrínseca) o por el desarrollo de resistencia a la misma (resistencia extrínseca). Para poder estudiar el problema de resistencia a Ara-C y desarrollar nuevas opciones de tratamientos que puedan evadir o superar la quimioresistencia, es necesario establecer modelos de estudio *in vitro*. Al respecto, contar con una línea celular resistente a Ara-C es de gran importancia para que en un futuro se pueda usar como un modelo de estudio de nuevas moléculas con el objetivo de eliminar la resistencia a este fármaco.

## JUSTIFICACIÓN

La importancia de este trabajo se basa en que no hay reportes previos de una línea celular murina resistente a Ara-C clínicamente relevante. Así mismo, a pesar de que en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio se generó la sublínea WEHI-3/Ara-CR25, ésta no llegó a generar resistencia al valor de la IC50, lo que es necesario para ser clínicamente relevante y de alto nivel. La generación de esta línea resistente de alto nivel, permitirá y facilitará los estudios futuros sobre diversos mecanismos relacionados a la resistencia a este fármaco, el cual es el más utilizado en las diferentes etapas para tratar la LMA. Así mismo, el desarrollo de esta línea celular murina resistente a Ara-C, permitirá evaluar *in vitro* nuevas propuestas de tratamiento que aborden diferentes rutas moleculares para la generación de nuevos tratamientos que ayuden a solucionar el problema de la resistencia a este fármaco y su posterior evaluación *in vivo* usando estas células en modelos murinos los cuales son accesibles y de gran importancia en las investigaciones previas a su uso en pacientes.

## **HIPÓTESIS**

La exposición de células de la línea leucémica WEHI-3 de ratón a concentraciones crecientes de manera paulatina de Ara-C, promoverá la generación de una sublínea WEHI-3 resistente a dicho fármaco (WEHI-3/Ara-CR).

# OBJETIVOS

## Objetivo general

Desarrollo de una sublínea celular resistente a citarabina a partir de la línea de leucemia mieloide aguda WEHI-3.

## Objetivos particulares

- 1) Evaluar el efecto de Ara-C en la proliferación de WEHI-Parental y WEHI-3/Ara-CR25 y determinar su  $IC_{50}$ .
- 2) Incrementar la resistencia a Ara-C en WEHI-3/Ara-CR25 mediante su exposición a concentraciones crecientes del fármaco hasta llegar a una concentración de 443.25 nM (WEHI-3/Ara-CR50)
- 3) Evaluar la proliferación de las líneas celulares WEHI-3 parental, WEHI-3/Ara-CR25 y WEHI-3/Ara-CR50 expuestas a diferentes concentraciones de Ara-C.
- 4) Evaluar el efecto de Ara-C en la proliferación de WEHI-3/Ara-CR50 y determinar su  $IC_{50}$ .
- 5) Evaluar el nivel de expresión de genes relacionados a la resistencia a Ara-C dentro de la célula (ENT1 y dCK) y genes relacionados a la resistencia a fármacos (MRP1 y MDR1) en las células WEHI-3 Parental, WEHI-3/Ara-CR25 y WEHI-3/Ara-CR50.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cultivo celular.** La línea de leucemia mieloide aguda de ratón WEHI-3 obtenida del ATCC, se cultivó en medio de cultivo IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium Gibco BRL, USA) al 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL, USA) y 1.1  $\mu\text{M}$  de betamercaptoetanol (Gibco, BRL, USA) a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/ml, 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$  con resiembra cada 48 h.

**Desarrollo de la sublíneas resistentes a Ara-C.** Para el desarrollo de la sublínea WEHI-3/Ara-CR25, células de la línea parental WEHI-3 se cultivaron en concentraciones crecientes de Ara-C hasta que la proliferación fue similar que el de las células parentales en ausencia de Ara-C (Lambarry, 2022). Los cultivos se mantuvieron durante 6 meses aproximadamente y se resembraron cada 48 horas durante ese tiempo. Para la generación de la línea WEHI-3/Ara-CR50 en este trabajo, se expuso a la línea WEHI-3/Ara-CR25 a concentraciones crecientes de Ara-C hasta llegar a la concentración de 443.25 nM, asegurando que su proliferación y viabilidad fuese similar a las células de la línea WEHI-3 parental (Figura 4).

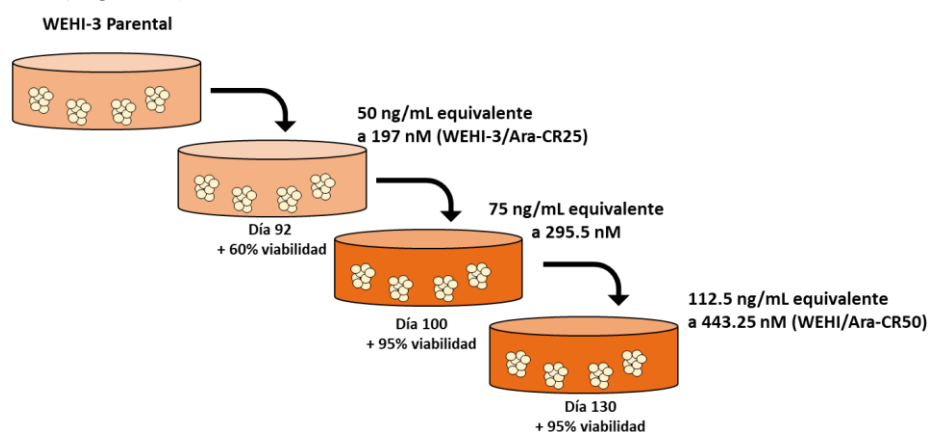


Figura 4. Diagrama de la metodología empleada para la generación de la línea WEHI-3/Ara-CR50 nM mediante el aumento en la concentración de Ara-C en la línea WEHI-3/Ara-CR25 nM.

**Viabilidad celular.** La viabilidad celular se determinó mediante ensayos de exclusión de azul tripano (Sigma, St. Louis, MO) en una cámara Neubauer. Las células no teñidas fueron consideradas viables, mientras que las teñidas en color azul se tomaron como células muertas.

**Proliferación celular.** Las células WEHI-3 Parental se cultivaron en placas de 96 pozos a la densidad de  $1 \times 10^5$ , con o sin la adición de diferentes concentraciones de Ara-C (0, 123, 184, 245.5, 307, 368, 429.5, 497, 593, 654.5, 716 nM) durante 72 horas. Así mismo se

cultivó la línea WEHI-3/Ara-CR25 en presencia de concentraciones crecientes de Ara-C (0-17440.4 nM). Por último, se repitió el mismo ensayo cultivando la línea WEHI-3/Ara-CR50 en presencia de concentraciones crecientes de Ara-C (0-6785.3 nM) Los cultivos se realizaron por triplicado. Para evaluar la proliferación celular después del crecimiento, se le evaluó mediante la técnica MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, USA), añadiendo 10 µl y se dejó durante 4 horas. Se leyó a una densidad óptica a 490 nm y se determinaron los niveles de absorbancia utilizando un lector de placas (Multiskan go).

**Determinación de la IC50.** Se llevó a cabo la evaluación de la absorbancia mediante la técnica MTS, tal como se indica en el párrafo anterior. El valor de la IC<sub>50</sub> se determinó por regresión lineal de los datos obtenidos de la lectura a 490 nm, mediante el uso del software Microsoft Office Excel 365 donde los resultados se mostrarán como los porcentajes medios de viabilidad celular con su desviación estándar (SD).

**Extracción, cuantificación e integridad de RNA.** 1x10<sup>6</sup> células de las líneas WEHI-3 Parental, WEHI-3/Ara-CR25 y WEHI-3/Ara-CR50 se usaron para la extracción de RNA mediante el RNeasy Mini Kit (250) (Quiagen, Hilden, Alemania). Se cuantificó el RNA con ayuda de un µDrop™ (Thermo Scientific, Singapore) y se determinó su integridad en un gel de agarosa al 1% y se leyó en un foto-documentador.

**Diseño de oligos.** Los oligos que se emplearon se diseñaron con ayuda de la plataforma NCBI → Gene y se corroboraron en el programa Word 365. En la tabla 2 se describen los genes utilizados en los experimentos posteriores.

**Tabla 2.** Secuencia de Primers para los genes β-Actina, ENT1, dCK, MRP1 y MDR1.

Gen	Secuencia del Primer (Forward)	Secuencia del Primer (Reverse)
β-actina	5'-CAC TGT CGA GTC GCG TCC-3'	5'-CGC AGC GAT ATC GTC ATC CA-3'
ENT1	5'-CTG GAA AGG CGT AGA GGC TG-3'	5'-CTT CCC TTC GCA GAC TGC TT-3'
dCK	5'-AGC AGG GAG TCT GGA GGT AG-3'	5'-GAG AAG GCA GAG AAG GCT GG-3'
MRP1	5'-CAG TGG TTC AGG GAA GGA GTC A-3'	5'-CAC TGT GGG AAG ACG AGT TGC T-3'
MDR1	5'-GGT GGT GTC ATT GTG GAG CAA G -3'	5'-GCA TCA GTG TCA CTC TGG GAT C-3'

**Análisis de PCR en tiempo real.** Cada muestra se realizó por triplicado. El ensayo de RT-PCR se llevó a cabo en con el QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Kit (Quiagen, Hilden, Alemania), en un termociclador de Applied Biosystems a cuarenta ciclos con las siguientes condiciones: 95°C durante 10s; 60°C durante 30s; 72°C durante 15s. Posteriormente los datos se analizaron mediante el método 2-ΔΔCt.

**Análisis estadístico.** Se realizaron 3 experimentos independientes y se analizaron los datos obtenidos de cada experimento de WEHI-3 parental y las sub líneas de WEHI-3/Ara-CR25 y WEHI-3/Ara-CR50 para obtener promedios ± error estándar ó desviación estandar.

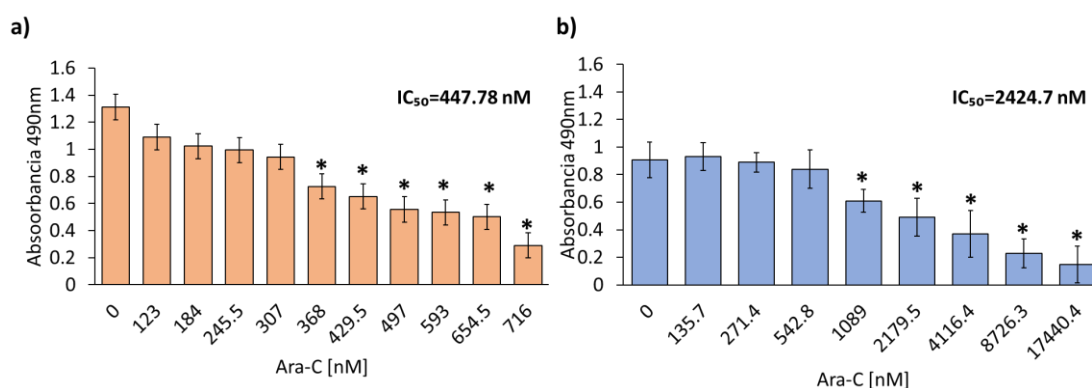
Se graficaron los valores y se realizó el análisis estadístico con la prueba Tukey mediante el programa IB SPSS Statistics.



# RESULTADOS

## 1. Efecto de Ara-C en la proliferación de WEHI-3 Parental y WEHI-3/Ara-CR25 y determinación de su IC<sub>50</sub>

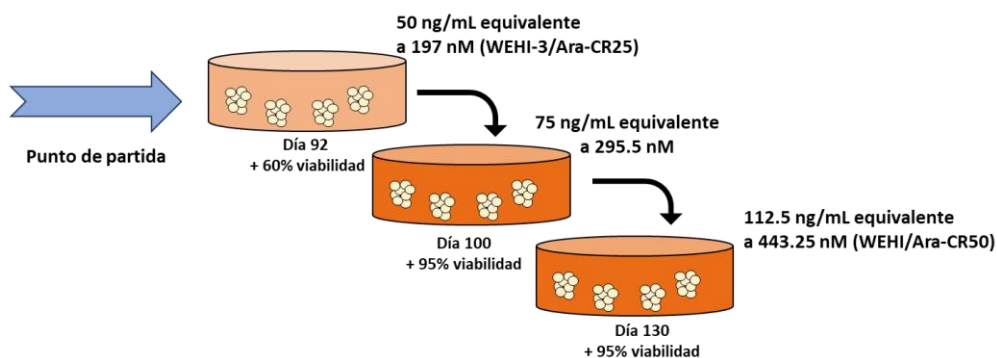
Con el objetivo de desarrollar una sublínea resistente a Ara-C a partir de la línea de leucemia mieloide aguda WEHI-3 Parental, previamente se comenzó con la inducción de resistencia a Ara-C mediante su exposición a concentraciones crecientes del fármaco hasta llegar a una concentración aproximada a la IC<sub>25</sub> de la línea parental. A esta sublínea se le llamó WEHI-3/Ara-CR25. Para determinar que la sublínea WEHI-3/ara-CR25 adquirió resistencia a Ara-C, se evaluó el efecto de Ara-C en la proliferación de WEHI-3 Parental y WEHI-3/Ara-CR25 y se confirmó la IC<sub>50</sub> en ambas líneas celulares. Para lo cual se realizaron cultivos en placas de 96 pozos en IMDM, SFB al 10% y 1.1 μM de betamercaptoetanol, 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, con concentraciones crecientes de Ara-C, partiendo de 0 nM a 716 nM; se mantuvieron durante 72 horas para posteriormente ser evaluados por la técnica MTS. En el caso de WEHI-3 Parental, se observó que Ara-C comienza a afectar la proliferación de las células, provocando que su crecimiento disminuya de manera significativa a partir de la concentración de 368 nM (Figura 1 a). Respecto a WEHI-3/Ara-CR25, se observó un decaimiento en la proliferación de las células a partir de la concentración de 1089 nM de Ara-C (Figura 1 b). Usando los datos obtenidos de este ensayo, se calculó la concentración de inhibición media (IC<sub>50</sub>) para Ara-C en ambas líneas, la cual fue de 447.78 nM para WEHI-3 Parental y 2427.5 nM para WEHI-3/Ara-CR25 nM. Así mismo, se determinó el incremento en veces de resistencia a Ara-C, utilizando el método empleado por McDemortt y colaboradores (2014), donde se divide el valor de la de WEHI-3/Ara-CR25 entre el valor de la de WEHI-3 Parental. En donde WEHI-3/Ara-CR25 nM presentó un incremento de resistencia de 5.4 veces más en comparación con la línea parental.



**Figura 1.** Proliferación celular de WEHI-3 parental y WEHI-3/Ara-CR25 tratadas con diferentes concentraciones de Ara-C. a) WEHI-3 Parental y b) WEHI-3/Ara-CR25 medidas a 490 nm mediante la técnica de MTS luego de 72 horas expuestas a concentraciones crecientes de Ara-C, como vehículo se usó PBS. Los datos se muestran en promedio  $\pm$  desviación estándar, n=3. Los datos se analizaron con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). \* diferencia estadísticamente significativa con respecto a la concentración 0.

## 2. Inducción de resistencia a Ara-C en WEHI-3/Ara-CR25

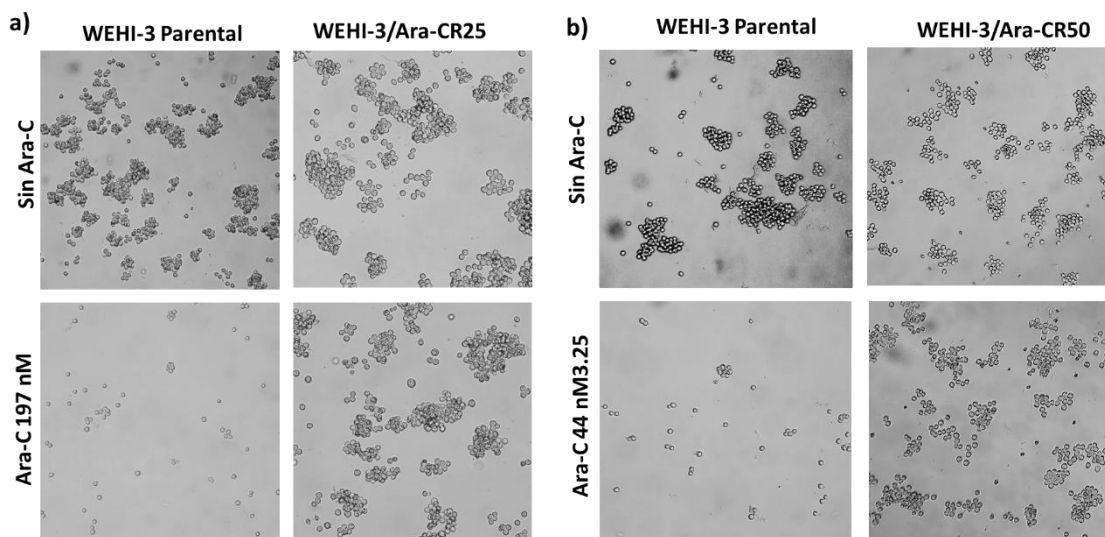
Para desarrollar una sublínea con mayor resistencia a Ara-C, se expuso a la línea WEHI-3/Ara-CR25 a concentraciones crecientes de Ara-C hasta llegar a una concentración similar a la  $IC_{50}$  de la línea parental (Figura 2). Para lo cual se cultivaron células de la línea WEHI-3/Ara-CR25 en IMDM al 10 % de SFB y 1.1  $\mu$ M de betamercaptoetanol a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/mL, 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> con resiembra cada 48 h. En cada resiembra se le agregó 295.5 nM de Ara-C, así durante aproximadamente 30 días. Una vez que la proliferación y viabilidad celular igualaron a la línea parental y a la sublínea WEHI-3/Ara-CR25, se incrementó la concentración del fármaco a 443.25 nM. El cultivo se mantuvo con esta concentración durante 30 días más, donde se comparó con la línea parental y la línea WEHI-3/Ara-CR25. A esta nueva sublínea resistente a Ara-C se le llamó WEHI-3/Ara-CR50.



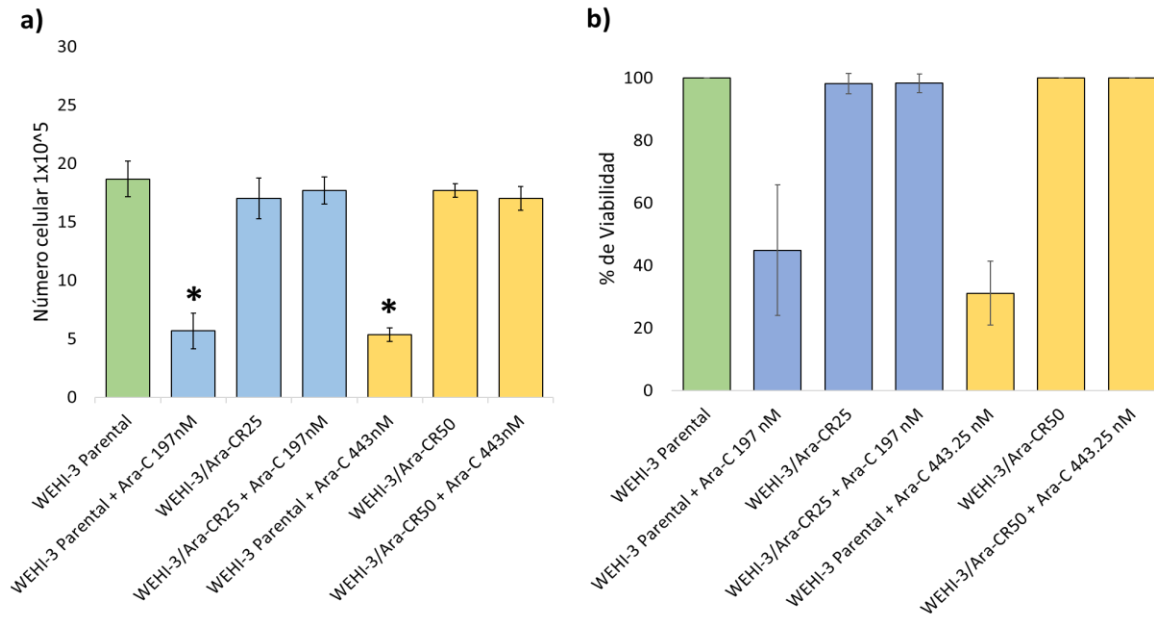
**Figura 2.** Inducción de resistencia a Ara-C a partir de la sublínea previamente expuesta al fármaco (WEHI-3/Ara-CR25). Se expuso la sublínea WEHI-3/Ara-CR25 a concentraciones crecientes del fármaco y de manera paulatina hasta que la proliferación y viabilidad alcanzaron números iguales o parecidos a la línea parental. La sublínea expuesta hasta la concentración de 443.25 nM de Ara-C fue llamada WEHI-3/Ara-CR50.

### 3. Proliferación de las líneas celulares WEHI-3 parental, WEHI-3/Ara-CR25 y WEHI-3/Ara-CR50 expuestas a diferentes concentraciones de Ara-C.

Se comparó la proliferación y viabilidad de WEHI-3 Parental y las sublíneas WEHI-3/Ara-CR25 y WEHI-3/Ara-CR50 en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de Ara-C. Para lo cual se realizaron cultivos de las 3 líneas celulares en una placa de 24 pozos, partiendo de la misma densidad. Se cultivaron en IMDM al 10 % de SFB y 1.1  $\mu$ M de betamercaptoetanol, 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> con resiembra cada 48 hr en ausencia o presencia de Ara-C (197 nM y 443.25 nM). Se determinó su proliferación y viabilidad mediante conteo celular en el hemocitómetro con ayuda de azul de tripano cada 48 horas. En ausencia de Ara-C, las células de la línea WEHI-3 parental presentaron una proliferación normal, sin embargo, en presencia de las concentraciones 197 nM y 443.25 nM de Ara-C, las células disminuyeron su proliferación y viabilidad (Figuras 3 y 4). Siendo significativamente menor en comparación a cultivos en ausencia de Ara-C. Por el contrario, la proliferación y viabilidad no se afectó en las sublíneas WEHI-3/Ara-CR25 y WEHI-3/Ara-CR50 en presencia de las diferentes concentraciones de Ara-C (Figuras 3 y 4). La sublínea WEHI-3/Ara-CR50, presentó una viabilidad y proliferación similar a la línea parental y a WEHI-3/Ara-CR25, obteniendo así una nueva sublínea resistente a Ara-C. Se observó que esta nueva línea generada, a pesar de estar constantemente expuesta a concentraciones altas del fármaco, éste ya no cumplía su función de inhibir la proliferación de las células leucémicas.



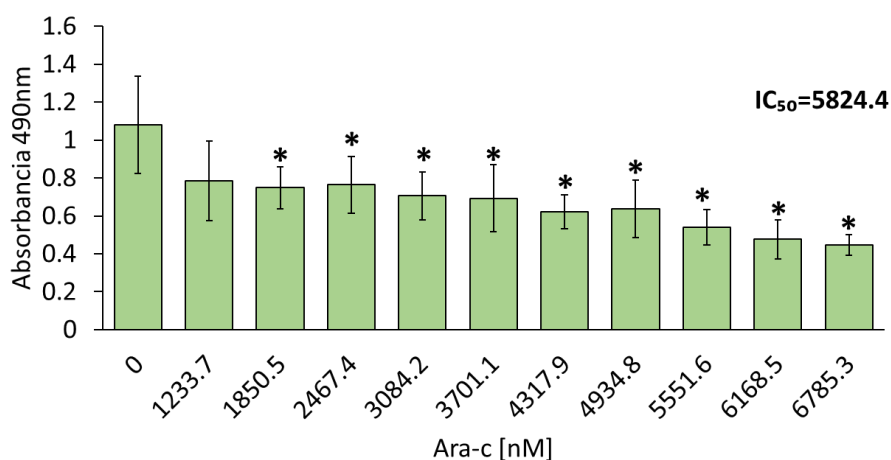
**Figura 3.** Líneas celulares WEHI-3 parental, WEHI-3/Ara-CR25 y WEHI-3/Ara-CR50 cultivadas en presencia o ausencia de Ara-C. A) WEHI-3 parental y WEHI-3/Ara-CR25 cultivadas sin Ara-C o con Ara-C 197 nM después de 48 horas de cultivo. B) WEHI-3 parental y WEHI-3/Ara-CR50 cultivadas sin Ara-C o con Ara-C 443.25 nM después de 48 horas de cultivo. Imágenes representativas tomadas con un microscopio invertido tomadas a 10x



**Figura 4.** Proliferación y viabilidad de células de la línea WEHI-3 Parental, WEHI-3/Ara-CR25 y WEHI-3/Ara-CR50 cultivadas en ausencia o presencia de Ara-C. a) Proliferación y b) Viabilidad de WEHI-3 Parental sin Ara-C o con Ara-C 197 nM y 443 nM, WEHI-3/Ara-CR25 sin Ara-C o con Ara-C 197 nM y WEHI-3/Ara-CR50 sin Ara-C o con Ara-C 443 nM. La proliferación se determinó mediante conteo celular en un hemocitómetro y la viabilidad mediante la tinción con azul de tripano, ambos observados en un microscopio. Los datos se muestran en promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ . Los datos se analizaron con la prueba de Tukey ( $p. \leq 0.05$ ). \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto a WEHI-3 parental.

#### 4. Efecto de Ara-C en la proliferación de WEHI-3/Ara-CR50 y determinación de su IC<sub>50</sub>

Para confirmar el incremento de la resistencia a Ara-C en la línea WEHI-3/Ara-CR50, se evaluó la proliferación y se determinó la IC<sub>50</sub>, para lo cual se realizaron cultivos de esta sublínea, como se indica previamente, fue expuesta a diferentes concentraciones de Ara-C, partiendo de 0 nM a 6785.3 nM. Los cultivos se mantuvieron durante 72 horas para posteriormente ser evaluados por la técnica MTS. Posteriormente se calculó su IC<sub>50</sub> (Figura 5). Se observó que Ara-C comenzó a afectar la proliferación de WEHI-3/Ara-CR50 de manera significativa a partir de la concentración de 1233.7 nM. Una vez obtenido los resultados de este ensayo, se calculó su IC<sub>50</sub> de Ara-C sobre la sublínea, la cual resultó de 5824.4 nM. Para evaluar el incremento en veces de la resistencia, se dividió el valor de la IC<sub>50</sub> de la línea resistente entre la IC<sub>50</sub> de la línea parental, método empleado por McDermott y colaboradores (2014). Teniendo como resultado un incremento en la resistencia de 13 veces mayor con relación a WEHI-3 Parental, observando que el nivel de resistencia de WEHI-3/Ara-CR50 es mayor que el de WEHI-3/Ara-CR25 (Tabla 1).



**Figura 5.** Proliferación celular de WEHI-3/Ara-CR50 tratadas con diferentes concentraciones de Ara-C. WEHI-3/Ara-CR50 medidas a 490 nm mediante la técnica de MTS luego de 72 horas expuestas a concentraciones crecientes de Ara-C (0, 1233.7, 1850.5, 2467.4, 3084.2, 3701.1, 4317.9, 4934.8, 5551.6, 6168.5, 6785.3 mM) como vehículo se usó PBS. Los datos se muestran en promedio  $\pm$  desviación estándar, n=3. Los datos se analizaron con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). \* diferencia estadísticamente significativa con respecto a la concentración 0.

<b>Ara-C</b>	<b>WEHI-3 Parental</b>	<b>WEHI-3/Ara-CR25</b>	<b>WEHI-3/Ara-CR50</b>
IC <sub>50</sub> [nM]	447.78	2424.7	58244
Incremento en veces de la resistencia a Ara-C		5.4	13

Tabla 1. Concentración inhibitoria media de Ara-C en WEHI-3 Parental, WEHI-3/Ara-CR25 y WEHI-3/Ara-CR50 y su incremento de resistencia al fármaco.

## 5. Expresión de genes involucrados en la captación de Ara-C dentro de la célula y relacionados en la resistencia a fármacos mediante PCR en tiempo real.

Para determinar si las sublíneas resistentes a Ara-C modifican su expresión de genes involucrados en la captación de Ara-C dentro de la célula y genes relacionados a la resistencia a múltiples fármacos, se evaluó la expresión de ENT1 y dCK, involucrados en la captación y fosforilación de Ara-C dentro de la célula, así como de MRP1 y MDR1 respectivamente. La expresión de genes se realizó mediante RT-PCR en tiempo real. La extracción de RNA se llevó a cabo con el RNeasy Mini Kit (250) Quiagen. Se confirmó la integridad del RNA obtenido y la pureza del mismo, para posteriormente realizar el ensayo con ayuda del QuantiTec SYBR Green RT-PCR Kit (200) QuantiFast® Probe siguiendo las condiciones preestablecidas por el kit. Usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  se procesaron los datos. La expresión de ENT1 y dCK fue significativamente menor en WEHI-3/Ara-CR25 y WEHI-3/Ara-CR50 en comparación con la línea parental (Figura 6). Por otro lado, la expresión de MRP1 disminuyó significativamente en la sublínea WEHI-3/Ara-CR25, sin embargo, su expresión en WEHI-3/Ara-CR50 no se modificó. Mientras que la expresión de MDR1 disminuyó de manera significativa en ambas sublíneas resistentes en comparación con la línea parental (Figura 7).

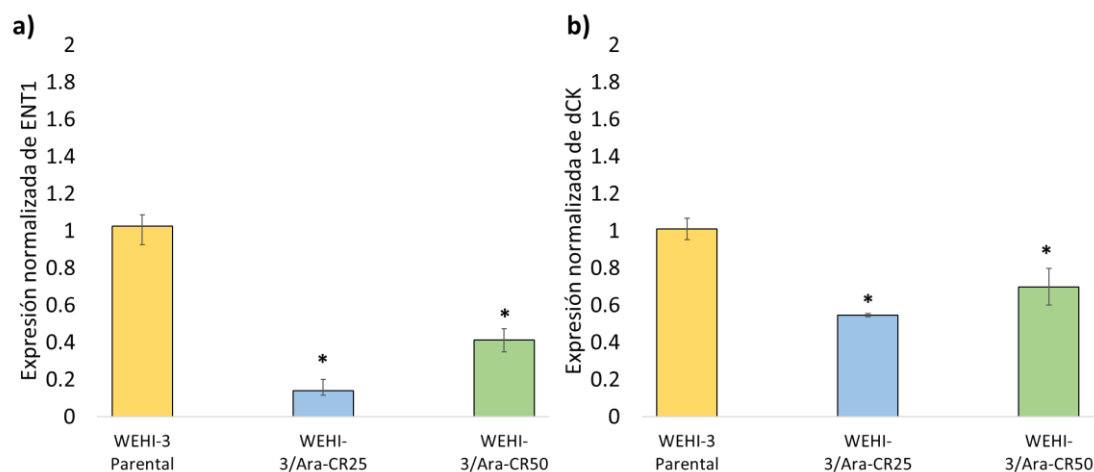


Figura 6. Expresión de ARNm de MRP1 y MDR1, genes involucrados en la resistencia a multidrogas, en WEHI-3/Ara-CR25 y WEHI-3/Ara-CR50. Expresión de a) MRP1 y b) MDR1 detectados mediante PCR en tiempo real. La expresión es relativa a  $\beta$ -actina y normalizada a la expresión en WEHI-3 Parental. Los datos se muestran en promedio  $\pm$  error estándar,  $n=3$ . Los datos se analizaron con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la concentración WEHI-3 Parental.

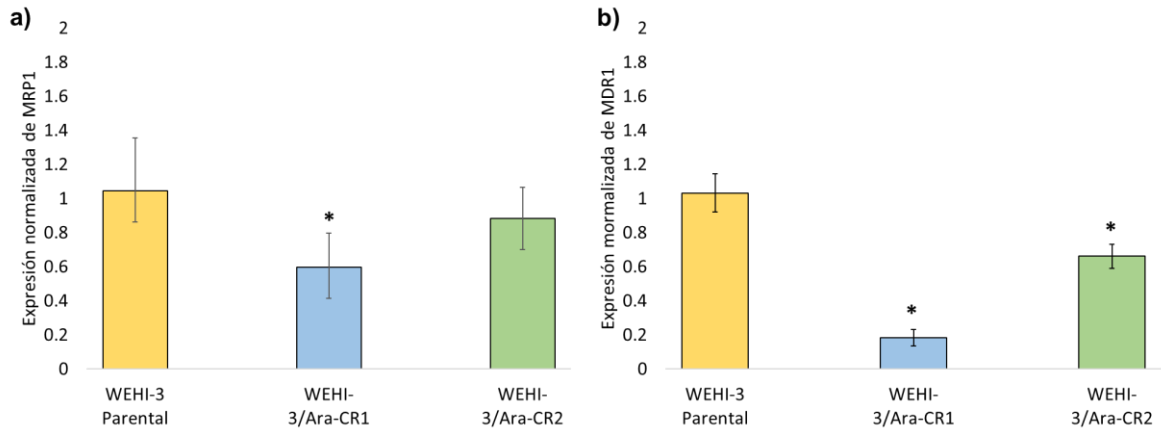


Figura 7. Expresión de ARNm de ENT1 y dCK, genes involucrados en el metabolismo y resistencia a Ara-C, en WEHI-3/Ara-CR25 y WEHI-3/Ara-CR50. Expresión de a) ENT1 y b) dCK detectados mediante PCR en tiempo real. La expresión es relativa a  $\beta$ -actina y normalizados a la expresión en WEHI-3 Parental. Los datos se muestran en promedio  $\pm$  error estándar, n=3. Los datos se analizaron con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la concentración WHEI-3 Parental.



## DISCUSIÓN

A pesar de que aproximadamente el 60% de los pacientes con LMA responde de manera favorable al tratamiento, la mayoría de ellos eventualmente recaen, desarrollan una enfermedad refractaria o resistencia a fármacos, por lo que no sobreviven por más de 5 años, siendo que, la resistencia a fármacos que aparece antes, durante o después de administrar el tratamiento sigue siendo el principal factor limitante para lograr una remisión completa en pacientes con cáncer (Vasan-Baselga y Hyeman, 2019). A pesar de los estudios que se han llevado a cabo por diferentes investigadores para explorar más sobre los mecanismos de resistencia a Ara-C, principal fármaco usado en el tratamiento de LMA, aún no se cuenta con el conocimiento necesario para poder dar resolución a este problema en los pacientes.

Para investigar los mecanismos de resistencia a Ara-C es necesario desarrollar diferentes modelos de estudio. Una opción es el caso de líneas celulares resistentes a este fármaco. Actualmente, se ha reportado el desarrollo de líneas celulares de LMA de humano resistentes a Ara-C (Gabra y Salmena, 2017). Sin embargo, líneas celulares resistentes a este fármaco que provengan de un origen murino son escasas, y particularmente, no se ha desarrollado una línea celular de ratón resistente a Ara-C. En este trabajo continuó con el desarrollo de una sublínea celular de ratón resistente a Ara-C a partir de la línea celular WEHI-3 parental que corresponde a una leucemia mielomonocítica, la cual podrá permitir en estudios posteriores entender más a fondo los procesos y mecanismos de resistencia a Ara-C en modelos *in vivo*.

Para el desarrollo de la sublínea celular resistente a Ara-C, tomamos en cuenta el proceso reportado por McDermortt y colaboradores en el año 2014, el cual consisten en exponer a las células a concentraciones crecientes del fármaco, así mismo, los autores dividen en dos categorías los modelos de las líneas celulares resistentes a fármacos: modelo clínicamente relevante y modelo de laboratorio de alto nivel. Al respecto, en un trabajo previo desarrollado en nuestro laboratorio, se comenzó con la generación de resistencia a Ara-C en la línea WEHI-3 parental (Lambarry, 2022). A esta sublínea inicialmente expuesta hasta 197 nM de Ara-C se le denominó WEHI-3/Ara-CR25, ya que esa concentración de Ara-C es similar a la  $IC_{25}$  en la línea parental. Al comparar la WEHI-3 parental se observó que Ara-C comienza a afectar de manera significativa la proliferación de las células a partir de la concentración de 368 nM, además, mientras que para WEHI-3/Ara-CR25, Ara-C comienza a afectar la línea celular desde la concentración 1089 nM. Como McDermortt y colaboradores mencionan en su artículo, para calcular el nivel de resistencia se dividió el valor de  $IC_{50}$  de WEHI-3/Ara-CR25 (2,424.7 nM) entre el valor de  $IC_{50}$  de WEHI-3 Parental (447.7 nM), teniendo un incremento de resistencia de 5.4 veces, definiendo esta sublínea celular en un modelo clínicamente relevante. Sin embargo, según lo descrito por McDermortt, este modelo suele tener una resistencia inestable, además de que los cambios moleculares pueden ser menos notorios (McDermortt et. al., 2017). Siguiendo los puntos clave descritos por McDermortt y la metodología empleada por Lambarry (2022), partiendo de WEHI-3/Ara-CR25 se estuvo exponiendo esta línea a concentraciones superiores de

Ara-C hasta una concentración de 443.25 nM. Después de aproximadamente 130 días de suministrarle Ara-C en cada resiembra al cultivo, la proliferación celular y viabilidad fue similar a la línea parental, obteniendo así una sublínea mayormente resistente, denominada WEHI-3/Ara-CR50. Al analizar la IC<sub>50</sub> de Ara-C obtenida en la sublínea WEHI-3/Ara-CR50, esta fue de 5,824.4 nM, representando un incremento de 13 veces la resistencia de la línea WEHI-3 parental, pudiendo clasificarla como un modelo de laboratorio de alto nivel, tal como lo define McDemott.

Para poder confirmar si la línea celular WEHI-3/Ara-CR50 observa cambios moleculares más marcados en comparación con la línea WEHI-3/Ara-CR25, evaluamos la expresión de RNAm de moléculas involucradas en la captación y fosforilación de Ara-C dentro de la célula (ENT1 y dCK) y otras involucradas en resistencia a fármacos múltiples (MDR1 y MRP). Encontramos niveles significativamente menores en la expresión de ENT1 y dCK en ambas líneas en comparación con la línea WEHI-3 parental. Estos genes importantes por estar implicados en el transporte y la biotransformación de Ara-C dentro de la célula, contribuyen en la variación en la sensibilidad de Ara-C en pacientes con LMA. Así mismo, estudios previos han demostrado que la disminución de la expresión de ENT1 se correlaciona con una disminución de la respuesta a Ara-C, además de que la disminución de la expresión y la actividad de dCK en LMA se ha informado como un mecanismo de resistencia clínica a este fármaco (Abraham et al., 2015). De igual forma estudios *in vitro* han demostrado que las células deficientes en ENT1 y dCK son altamente resistentes a Ara-C (Galmarini et al., 2002). También se ha reportado que la deficiencia de ENT1 confiere un alto nivel de resistencia a Ara-C en células de leucemia, debido a que es responsable de hasta el 80 % de la entrada de Ara-C en las células leucémicas humanas (Macanas et al., 2012). Por lo que, tal como se ha reportado en células humanas, la disminución de ENT1 y de dCK en la línea WEHI-3/Ara-CR25 y WEHI-3/Ara-CR50 está relacionado con un incremento en la resistencia a Ara-C.

Por otro lado, la resistencia a fármacos a menudo se asocia con la sobreexpresión de transportadores ABC, representados por MDR1 y MRP1, que expulsan una amplia variedad de quimioterapéuticos fuera de la célula, lo que resulta una disminución de la concentración intracelular del fármaco y su biodisponibilidad (Wang et al., 2016). Sin embargo, luego de evaluar los genes MDR1 y MRP1 por RT-PCR en las líneas WEHI-3/Ara-CR25 y WEHI-3/Ara-CR50, se observó que se encuentran con niveles de expresión bajos. Al respecto, el incremento de MDR1 y MRP1 se ha reportado en células leucémicas resistentes a antraciclinas y no se ha asociado a células resistentes únicamente a Ara-C. Por lo que la resistencia a Ara-C en células leucémicas podría estar asociado únicamente a moléculas asociadas a su metabolismo y no a transportadores ABC. Al respecto, estudios reportan que a pesar de que MDR1 y MRP1 se encuentran sobre expresadas en el fenómeno de la resistencia, hay un número significativo de pacientes que puede no mostrar una diferencia significativa o baja expresión de estos genes tanto al momento del diagnóstico como al momento de una recaída, lo que sugiere que hay otros mecanismos relacionados a la resistencia a Ara-C (Funato et al., 2004; van et al., 2002).

## CONCLUSIÓN

En este trabajo se llevó a cabo el desarrollo de una sublínea celular de LMA murina resistente a Ara-C. Esta sublínea celular llamada WEHI-3/Ara-CR50, presentó un incremento en la  $IC_{50}$  a Ara-C manteniendo su capacidad de proliferación y viabilidad además de presentar cambios en la expresión de genes característicos de la resistencia a Ara-C, lo anterior en comparación con la línea WEHI-3 parental. Esta línea celular resistente al principal fármaco usado para el tratamiento de la LMA, podrá servir como modelo de estudio para conocer más sobre las rutas moleculares implicadas en la resistencia a Ara-C y la evaluación de nuevas propuestas de tratamiento para este tipo de leucemia.

## REFERENCIAS

- Abraham, A., Varatharajan, S., Karathedath, S., Philip, C., Lakshmi, K. M., Jayavelu, A. K., Mohanan, E., Janet, N. B., Srivastava, V. M., Shaji, R. V., Zhang, W., Abraham, A., Viswabandya, A., George, B., Chandy, M., Srivastava, A., Mathews, V., & Balasubramanian, P. (2015). RNA expression of genes involved in cytarabine metabolism and transport predicts cytarabine response in acute myeloid leukemia. *Pharmacogenomics*, 16(8), 877–890.
- Aguiñiga-Sánchez, I., Meléndez-Ibarra, F. M., Ledesma-Martínez, E., Weiss-Steider, B., Fajardo-Orduña, G. R., Rangel-Corona, R., García-Gervasio, S. N., Ramírez-Padilla, M. G., Lara-Castañeda, J. L., & Santiago-Osorio, E. (2021). Improved Survival of Leukemic Mice Treated with Sodium Caseinate in Combination with Daunorubicin without Toxicity. *Journal of oncology*, 2021, 6635650.
- Amaral, M., DE Sousa Portilho, A. J., DA Silva, E. L., DE Oliveira Sales, L., DA Silva Maués, J. H., DE Moraes, M., & Moreira-Nunes, C. A. (2019). Establishment of Drug-resistant Cell Lines as a Model in Experimental Oncology: A Review. *Anticancer research*, 39(12), 6443–6455.
- Amini, M., Sharma, R. y Jani, C. (2023). Diferencias de género en los resultados de la leucemia según los gastos de atención médica utilizando estimaciones de GLOBOCAN 2020. *Archives of Public Health*, 81 (1), 1-16.
- Arana-Luna, L. L., Alvarado-Ibarra, M., Silva-Michel, L. G., Morales-Maravilla, A., González-Rubio, M., Chávez-Aguilar, L. A., Tena-Iturralde, M. F., Mojica-Balceras, L., Zapata-Canto, N., Galindo-Delgado, P., Miranda-Madrado, M. R., Morales-Hernández, A. E., Silva-Vera, K., Grimaldo-Gómez, F. A., Hernández-Caballero, Á., Bates-Martin, R. A., Álvarez-Vera, J. L., Tepepa-Flores, F., Teomitzi-Sánchez, Ó., Fermín-Caminero, D. J., ... Ramírez-Romero, E. F. (2022). Consensus in acute myeloid leukemia in Mexico. Consenso de leucemia mieloide aguda en México. *Gaceta medica de Mexico*, 158(M3), M1–M48.
- Arwanih, E. Y., Louisa, M., Rinaldi, I., & Wanandi, S. I. (2022). Resistance Mechanism of Acute Myeloid Leukemia Cells Against Daunorubicin and Cytarabine: A Literature Review. *Cureus*, 14(12), e33165.
- Atieh, T., Atrash, S., Mohan, M., Shune, L., Mahmoudjafari, Z., Quick, J., ... & Wishna, A. (2021). Belantamab in combination with dexamethasone in patients with triple-class relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood*, 138, 1642.
- Bergman, A. M., Pinedo, H. M., Jongsma, A. P., Brouwer, M., Ruiz van Haperen, V. W., Veerman, G., Leyva, A., Eriksson, S., & Peters, G. J. (1999). Decreased resistance to gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine) of cytosine arabinoside-resistant myeloblastic murine and rat leukemia cell lines: role of altered activity and substrate specificity of deoxycytidine kinase. *Biochemical pharmacology*, 57(4), 397–406.

- Bispo, J. A. B., Pinheiro, P. S., & Kobetz, E. K. (2020). Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 10(6), a034819.
- Bose, P., Vachhani, P., & Cortes, J. E. (2017). Treatment of Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Current treatment options in oncology*, 18(3), 17.
- Brancati, S., Gozzo, L., Romano, G. L., Vetro, C., Dulcamare, I., Maugeri, C., ... & Drago, F. (2021). Venetoclax in relapsed/refractory acute myeloid leukemia: Are supporting evidences enough?. *Cancers*, 14(1), 22.
- Bray, F., *et al.* (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424
- Bukowski, K., Kciuk, M., & Kontek, R. (2020). Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3233.
- Caldwell-Gary W., Yan-Zhengyin, Lang-Wensheng & Masucci-John A. (2012). The IC50 Concept Revisited. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12, 1282-1290.
- Cao, X., Hou, J., An, Q., Assaraf, Y. G., & Wang, X. (2020). Towards the overcoming of anticancer drug resistance mediated by p53 mutations. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 49, 100671.
- Chávez-González, M. A., Chimal-Monroy, J., Flores-Figueroa, E., Lamas, M. (2017). *Células troncales: biología y aplicaciones en la biomedicina*. Grañén Porrúa.
- Chen, X., Sun, K., Jiao, S., Cai, N., Zhao, X., Zou, H., Xie, Y., Wang, Z., Zhong, M., & Wei, L. (2014). High levels of SIRT1 expression enhance tumorigenesis and associate with a poor prognosis of colorectal carcinoma patients. *Scientific reports*, 4, 7481.
- Cheng, H., Zheng, Z., & Cheng, T. (2020). New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein & cell*, 11(1), 34–44.
- Ci, T., Zhang, W., Qiao, Y., Li, H., Zang, J., Li, H., ... & Gu, Z. (2022). Delivery strategies in treatments of leukemia. *Chemical Society Reviews*, 51(6), 2121-2144.
- De Kouchkovsky, I., & Abdul-Hay, M. (2016). 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood cancer journal*, 6(7), e441.
- Döhner, H., Wei, A. H., Appelbaum, F. R., Craddock, C., DiNardo, C. D., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Godley, L. A., Hasserjian, R. P., Larson, R. A., Levine, R. L., Miyazaki, Y., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G., Röllig, C., Sierra, J., Stein, E. M., Tallman, M. S., Tien, H. F., ... Löwenberg, B. (2022). Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*, 140(12), 1345–1377.
- Dzierzak, E., & Bigas, A. (2018). Blood Development: Hematopoietic Stem Cell Dependence and Independence. *Cell stem cell*, 22(5), 639–651.

Fajardo-Orduña, G. R., Ledesma-Martínez, E., Aguiñiga-Sánchez, I., Mora-García, M. L., Weiss-Steider, B., & Santiago-Osorio, E. (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.

Farge, T., Saland, E., de Toni, F., Aroua, N., Hosseini, M., Perry, R., Bosc, C., Sugita, M., Stuani, L., Fraisse, M., Scotland, S., Larrue, C., Boutzen, H., Féliu, V., Nicolau-Travers, M. L., Cassant-Sourdy, S., Broin, N., David, M., Serhan, N., Sarry, A., ... Sarry, J. E. (2017). Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer discovery*, 7(7), 716–735.

Faruqi, A., & Tadi, P. (2023). Cytarabine.

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.

Floren, M., & Gillette, J. M. (2021). Acute myeloid leukemia: Therapy resistance and a potential role for tetraspanin membrane scaffolds. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 137, 106029.

Funato, Tadao et al. "Assessment of drug resistance in acute myeloid leukemia." *Expert review of molecular diagnostics* vol. 4,5 (2004): 705-13.

Gabra, M. M., & Salmena, L. (2017). microRNAs and Acute Myeloid Leukemia Chemoresistance: A Mechanistic Overview. *Frontiers in oncology*, 7, 255.

Galmarini, C. M., Thomas, X., Calvo, F., Rousselot, P., Rabilloud, M., El Jaffari, A., Cros, E., & Dumontet, C. (2002). In vivo mechanisms of resistance to cytarabine in acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology*, 117(4), 860–868.

Instituto Nacional del Cáncer. (2021). Key Statistics for Acute Myeloid Leukemia (AML). Recuperado de <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/about/key-statistics.html> el 12 de septiembre de 2022.

Kaltoum, A. B. O., 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.

Kantarjian, H., Kadia, T., DiNardo, C., Daver, N., Borthakur, G., Jabbour, E., Garcia-Manero, G., Konopleva, M., & Ravandi, F. (2021). Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. *Blood cancer journal*, 11(2), 41.

Kropp, E. M., & Li, Q. (2022). Mechanisms of resistance to targeted therapies for relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology*, 111, 13-24.

Kulsoom, B., Shamsi, T. S., & Afsar, N. A. (2018). Gene expression of hENT1, dCK, CDA, dCMPD and topoisomerase II $\alpha$  as an indicator of chemotherapy response in AML treated with cytarabine and daunorubicin. *Cancer management and research*, 10, 5573–5589.

Lambarry Castillo, B. J. (2022). Eje SIRT1-p53 en resistencia a citarabina en la línea de leucemia mieloide aguda WEHI-3. Universidad Nacional Autónoma de México .

Li, K., Du, Y., Cai, Y., Liu, W., Lv, Y., Huang, B., Zhang, L., Wang, Z., Liu, P., Sun, Q., Li, N., Zhu, M., Bosco, B., Li, L., Wu, W., Wu, L., Li, J., Wang, Q., Hong, M., & Qian, S. (2023). Single-cell analysis reveals the chemotherapy-induced cellular reprogramming and novel therapeutic targets in relapsed/refractory acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 37(2), 308–325.

Li, X. L., Xue, Y., Yang, Y. J., Zhang, C. X., Wang, Y., Duan, Y. Y., Meng, Y. N., & Fu, J. (2015). Hematopoietic stem cells: cancer involvement and myeloid leukemia. *European review for medical and pharmacological sciences*, 19(10), 1829–1836.

Lin, Y. J., Chen, C. J., Hsueh, S. C., Lee, M. H., Peng, S. F., Lu, H. F., Lu, K. W., Huang, W. W., Liu, K. C., Chen, Y. L., Shih, Y. L., & Lien, J. C. (2021). Demethoxycurcumin Promotes Macrophage Cell Population and Phagocytosis in WEHI-3 Cell-generated Leukemia BALB/c Mice In Vivo. *In vivo (Athens, Greece)*, 35(6), 3253–3260.

Lo, Yu-Li, and Yu Liu. “Reversing multidrug resistance in Caco-2 by silencing MDR1, MRP1, MRP2, and BCL-2/BCL-xL using liposomal antisense oligonucleotides.” *PloS one* vol. 9,3 e90180. 17 Mar. 2014,

Ma, Y. Y., Zhao, M., Liu, Y., Zhao, D. F., Wang, L. X., Chen, X. P., & Li, L. (2019). Use of decitabine for patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Hematology*, 24(1), 507-515.

Macanas-Pirard, P., Leisewitz, A., Broekhuizen, R., Cautivo, K., Barriga, F. M., Leisewitz, F., Gidi, V., Riquelme, E., Montecinos, V. P., Swett, P., Besa, P., Ramirez, P., Ocqueteau, M., Kalergis, A. M., Holt, M., Rettig, M., DiPersio, J. F., & Nervi, B. (2012). Bone marrow stromal cells modulate mouse ENT1 activity and protect leukemia cells from cytarabine induced apoptosis. *PloS one*, 7(5), e37203.

Marin, J. J., Briz, O., Rodríguez-Macias, G., Díez-Martín, J. L., & Macias, R. I. (2016). Role of drug transport and metabolism in the chemoresistance of acute myeloid leukemia. *Blood reviews*, 30(1), 55–64.

McDermott, M., Eustace, A. J., Busschots, S., Breen, L., Crown, J., Clynes, M., ... & 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.

Meillon-Garcia, L. A., & Demichelis-Gómez, R. (2020). Access to Therapy for Acute Myeloid Leukemia in the Developing World: Barriers and Solutions. *Current oncology reports*, 22(12), 125.

Molica, M., Breccia, M., Foa, R., Jabbour, E., & Kadia, T. M. (2019). Maintenance therapy in AML: The past, the present and the future. *American journal of hematology*, 94(11), 1254–1265.

Morales, M. L., García-Vicente, R., Rodríguez-García, A., Reyes-Palomares, A., Vincelle-Nieto, Á., Álvarez, N., Ortiz-Ruiz, A., Garrido-García, V., Giménez, A., Carreño-Tarragona, G., Sánchez, R., Ayala, R., Martínez-López, J., & Linares, M. (2023). Posttranslational splicing modifications as a key mechanism in cytarabine resistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 37(8), 1649–1659.

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

Nandi, S., Kale, N. R., Takale, V., Chate, G. C., Bhave, M., Banerjee, S. S., & Khandare, J. J. (2020). Cell deformation and acquired drug resistance: elucidating the major influence of drug-nanocarrier delivery systems. *Journal of materials chemistry. B*, 8(9), 1852–1862.

National Cancer Institute (s.f.). Definition of drug resistance. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/drug-resistance>

Niu, J., Peng, D., & Liu, L. (2022). Drug Resistance Mechanisms of Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Frontiers in oncology*, 12, 896426.

Organización Mundial de la Salud. (2022). *Cáncer*. Recuperado el 11 de julio del 2022: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Pan, J., Miao, D., & Chen, L. (2018). Germacrone reverses adriamycin resistance in human chronic myelogenous leukemia K562/ADM cells by suppressing MDR1 gene/P-glycoprotein expression. *Chemico-biological interactions*, 288, 32–37.

Pelcovits, A., & Niroula, R. (2020). Acute Myeloid Leukemia: A Review. *Rhode Island medical journal* (2013), 103(3), 38–40.

Ramos-Mandujano, G., Weiss-Steider, B., Melo, B., Córdova, Y., Ledesma-Martínez, E., Bustos, S., ... & Sánchez, L. (2008). Alpha-, beta-and kappa-caseins inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32D cl3 and WEHI-3 and exhibit different differentiation properties. *Immunobiology*, 213(2), 133-141.

Rebucci, M., & Michiels, C. (2013). Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochemical pharmacology*, 85(9), 1219–1226.

Roloff, G. W., Odenike, O., Bajel, A., Wei, A. H., Foley, N., & Uy, G. L. (2022). Contemporary Approach to Acute Myeloid Leukemia Therapy in 2022. *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, 42, 1–16.

Rothenburger, T., Thomas, D., Schreiber, Y., Wratil, P. R., Pflantz, T., Knecht, K., Digianantonio, K., Temple, J., Schneider, C., Baldauf, H. M., McLaughlin, K. M., Rothweiler, F., Bilen, B., Farmand, S., Bojkova, D., Costa, R., Ferreirós, N., Geisslinger, G., Oellerich, T., Xiong, Y., ... Cinatl, J., Jr (2021). Differences between intrinsic and acquired nucleoside analogue resistance in acute myeloid leukaemia cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 40(1), 317.



- Russell, N. H., Hills, R. K., Thomas, A., Thomas, I., Kjeldsen, L., Dennis, M., Craddock, C., Freeman, S., Clark, R. E., & Burnett, A. K. (2022). Outcomes of older patients aged 60 to 70 years undergoing reduced intensity transplant for acute myeloblastic leukemia: results of the NCRI acute myeloid leukemia 16 trial. *Haematologica*, 107(7), 1518–1527.
- Shallis, R. M., Wang, R., Davidoff, A., Ma, X., & Zeidan, A. M. (2019). Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood reviews*, 36, 70–87.
- Shang, H. S., Chen, C. J., Shih, Y. L., Peng, S. F., Chen, Y. L., Liu, K. C., Huang, H. C., Hsueh, S. C., Chen, K. W., Lu, H. F., Lee, M. H., Lee, M. Z., & Lu, K. W. (2021). Mangiferin induces immune responses and evaluates the survival rate in WEHI-3 cell generated mouse leukemia in vivo. *Environmental toxicology*, 36(1), 77–85.
- Short, N. J., & Ravandi, F. (2016). Acute Myeloid Leukemia: Past, Present, and Prospects for the Future. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*, 16 Suppl, S25–S29.
- Short, N. J., Konopleva, M., Kadia, T. M., Borthakur, G., Ravandi, F., DiNardo, C. D., & Daver, N. (2020). Advances in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: New Drugs and New Challenges. *Advances in AML Therapeutics. Cancer discovery*, 10(4), 506-525.
- Stegmann, A. P., Honders, M. W., Hagemeijer, A., Hoebee, B., Willemze, R., & Landegent, J. E. (1995). In vitro-induced resistance to the deoxycytidine analogues cytarabine (AraC) and 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) in a rat model for acute myeloid leukemia is mediated by mutations in the deoxycytidine kinase (dck) gene. *Annals of hematology*, 71(1), 41–47.
- Stelmach, P., & Trumpp, A. (2023). Leukemic stem cells and therapy resistance in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 108(2), 353–366.
- Stiewe, T., & Haran, T. E. (2018). How mutations shape p53 interactions with the genome to promote tumorigenesis and drug resistance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 38, 27–43.
- Stubbins, R. J., Francis, A., Kuchenbauer, F., & Sanford, D. (2022). Management of Acute Myeloid Leukemia: A Review for General Practitioners in Oncology. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 29(9), 6245–6259.
- Taghiloo, S., Ajami, A., Alizadeh-Navaei, R., Zaboli, E., & Asgarian-Omran, H. (2022). Treatment by PI3K/mTOR Inhibitor BEZ235 Combined with TLR-7/8 Agonist Interfere with Immune Evasion Mechanisms of WEHI-3 Mouse Leukemia Cells. *Iranian journal of immunology : IJI*, 19(1), 6.
- Tebbi C. K. (2021). Etiology of Acute Leukemia: A Review. *Cancers*, 13(9), 2256.
- Thol, F., & Ganser, A. (2020). Treatment of relapsed acute myeloid leukemia. *Current Treatment Options in Oncology*, 21, 1-11.
- Vasan, N., Baselga, J., & Hyman, D. M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 575(7782), 299–309.

- Venditti, A., Cairoli, R., Caira, M., Finsinger, P., Finocchiaro, F., Neri, B., De Benedittis, D., Rossi, G., & Ferrara, F. (2023). Assessing eligibility for treatment in acute myeloid leukemia in 2023. *Expert review of hematology*, 16(3), 181–190.
- Veuger, M. J., Heemskerk, M. H., Honders, M. W., Willemze, R., & Barge, R. M. (2002). Functional role of alternatively spliced deoxycytidine kinase in sensitivity to cytarabine of acute myeloid leukemic cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 99(4), 1373-1380.
- Wang, H., Jia, X. H., Chen, J. R., Yi, Y. J., Wang, J. Y., Li, Y. J., & Xie, S. Y. (2016). HOXB4 knockdown reverses multidrug resistance of human myelogenous leukemia K562/ADM cells by downregulating P-gp, MRP1 and BCRP expression via PI3K/Akt signaling pathway. *International journal of oncology*, 49(6), 2529–2537.
- Watson, M. B., Lind, M. J., & Cawkwell, L. (2007). Establishment of in-vitro models of chemotherapy resistance. *Anti-cancer drugs*, 18(7), 749–754.
- Webster, J. A., & Pratz, K. W. (2018). Acute myeloid leukemia in the elderly: therapeutic options and choice. *Leukemia & lymphoma*, 59(2), 274–287.
- Wright, N. J., & Lee, S. Y. (2021). Toward a Molecular Basis of Cellular Nucleoside Transport in Humans. *Chemical reviews*, 121(9), 5336–5358.
- Wu, B., Mao, Z. J., Wang, Z., Wu, P., Huang, H., Zhao, W., Zhang, L., Zhang, Z., Yin, H., Gale, R. P., & Yin, B. (2021). Deoxycytidine Kinase (DCK) Mutations in Human Acute Myeloid Leukemia Resistant to Cytarabine. *Acta haematologica*, 144(5), 534–541.
- Yazdandoust, E., Sadeghian, M. H., Shams, S. F., Ayatollahi, H., Saadatpour, Y., Siyadat, P., Sheikhi, M., & Afzalghaee, M. (2022). Evaluation of FLT3-ITD Mutations and MDR1 Gene Expression in AML Patients. *Iranian journal of pathology*, 17(4), 419–426.
- Yi, Y. J., Jia, X. H., Zhu, C., Wang, J. Y., Chen, J. R., Wang, H., & Li, Y. J. (2018). Solanine reverses multidrug resistance in human myelogenous leukemia K562/ADM cells by downregulating MRP1 expression. *Oncology letters*, 15(6), 10070–10076.
- Yousafzai, N. A., Jin, H., Ullah, M., & Wang, X. (2021). Recent advances of SIRT1 and implications in chemotherapeutics resistance in cancer. *American journal of cancer research*, 11(11), 5233–5248.
- Yu, H., Kim, D. J., Choi, H. Y., Kim, S. M., Rahaman, M. I., Kim, Y. H., & Kim, S. W. (2021). Prospective pharmacological methodology for establishing and evaluating anti-cancer drug resistant cell lines. *BMC cancer*, 21(1), 1049.
- Zhang, J., Gu, Y., & Chen, B. (2019). Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. *OncoTargets and therapy*, 12, 1937–1945.
- Zhao, X., Zhang, C., Cui, X., & Liang, Y. (2021). Interactions of Hematopoietic Stem Cells with Bone Marrow Niche. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2346, 21–34.

Zimmerman, E. I., Huang, M., Leisewitz, A. V., Wang, Y., Yang, J., & Graves, L. M. (2009). Identification of a novel point mutation in ENT1 that confers resistance to Ara-C in human T cell leukemia CCRF-CEM cells. *FEBS letters*, 583(2), 425–429.