

00377

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS**

EVALUACION INVITRO DE LA QUIMIOSENSIBILIDAD A
METOTREXATE, CORRELACION MULTIFACTORIAL EN
PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA AGUDA
LINFOBLASTICA (LAL)

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO
ACADEMICO DE MAESTRIA EN
CIENCIAS, BIOLOGIA CELULAR
P R E S E N T A
IRMA ARACELI NAVARRO ALEGRIA

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ROBERTO RIVERA LUNA**

MEXICO, D.F.

JUNIO DE 2005.

m346551



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.

Autorizó a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: IRMA APACELI NAVARRO ALEGRIA

ÍNDICE:

FECHA: 03 AGO 05

FIRMA: 

Resumen	pag 1
Antecedentes	5
Mecanismos de acción del metotrexate	9
Farmacología celular del metotrexate	12
Transformación intracelular del metotrexate	18
Unión a dehidrofolatoreductasa (DHFR)	22
Consecuencias de la unión a DHFR	28
Metabolismo del metotrexate	30
Toxicidad del metotrexate	32
Mecanismos de apoptosis	33
Justificación	37
Hipótesis	38
Objetivos	39
Material y métodos	39
Separación de linfoblastos	40
Criopreservación	40
Método de descongelación	41
Método de eliminación de células muertas	42
Reducción de sales de Tetrazolium	42
Ensayos de quimiosensibilidad	43
Determinación de inmunofenotipos	43
Determinación de antígenos intracelulares	44
Determinación de índice de DNA (IDNA)	45
Calculo para IDNA	46
Determinación de la expresión de bcl-2	46
Preparación de muestras	46
Resultados	47
Discusión	62
Conclusiones	70
Bibliografía	71

RESUMEN:

La leucemia aguda linfoblástica es el padecimiento maligno más frecuente en los niños constituye un grupo proliferativo de entidades, originándose en la médula ósea, su etiología se desconoce, aun cuando se han documentado factores predisponentes. Esta enfermedad es ampliamente descrita en base a características clínicas, inmunológicas, genéticas y moleculares. En México el índice de frecuencia de LAL es elevado. En los últimos años, su pronóstico en términos generales ha mejorado hasta alcanzar una tasa de supervivencia y de curación del 75%. Sin embargo las recaídas medulares continúan siendo el mayor obstáculo para la cura de estos niños, esta recaída medular fue asociada invariablemente a segundas remisiones cortas y evolución fatal. En algunos casos las recaídas se deben al desarrollo de resistencia clínica.

La resistencia clínica a drogas es causada por numerosos factores diferentes, estos pueden funcionar a nivel fisiológico o a nivel celular. Se han realizado estudios de resistencia celular a drogas a nivel *in vitro* en líneas celulares, para aclarar el mecanismo de resistencia para diferentes clases de quimioterapias, estos mecanismos en células tumorales fueron caracterizados por inestabilidad genética o formación espontánea de formas variantes, como cambios a nivel de membrana celular que hace que disminuya la acumulación del fármaco propiciando un lento eflujo. Se ha mencionado que la resistencia a Metotrexato (MTX) en células tumorales puede ser por el incremento en el eflujo de la droga mediado por P-glicoproteínas. También la resistencia podría ser mediada por alteraciones del metabolismo, incremento en el número de genes que codifican para la enzima Dihidrofolato reductasa (DHFR).

Otros factores genéticos adicionales (bcl-2, bax y c-myc) que participan en el mecanismo de apoptosis (muerte celular programada) pueden causar también resistencia a medicamentos. Una proteína de 26 kD, BCL2, parece proteger a la célula del mecanismo de apoptosis cuando es tratada con varios estímulos. La proteína BCL2 es codificada por el gen bcl-2 (B-cell leukemia - linfoma 2) involucra la traslación cromosómica t(14; 18) [q 32; q 21] esta anomalía citogenética, esta presente frecuentemente en el 50% de los linfomas no Hodgkin (LNH) afectando al 80% de los pacientes con linfoma folicular y el 30% de los pacientes con linfoma difuso, la traslocación implica al gen de cadena pesada de las inmunoglobulinas en el cromosoma 14 (Jh) y el protooncogen bcl-2 en el cromosoma 18. La ruptura en el cromosoma 18 tiene lugar en la mayoría de los casos en dos regiones denominadas MBR y mcr. La traslocación t(14; 18) no es un requisito para la expresión de la proteína. La molécula de Bcl-2 es una proteína integral de la membrana, la cual tiene una tasa intracelular y otra en la superficie, esta proteína se asocia con la mitocondria, retículo endoplasmático liso y membrana perinuclear y tiene una función dentro del mecanismo de apoptosis. En su forma activa dentro de la célula suicida requiere típicamente adenosin trifosfato (ATP) involucrando síntesis de nuevo RNA y proteína y culmina usualmente con la activación de endonucleasas endógenas que degradan al DNA y por lo tanto destruyen los moldes o templates requeridos para la homeostasis celular.

En las células hematopoyéticas probablemente la apoptosis sea auxiliar de la excesiva tasa de producción celular en la médula ósea (alrededor de 10^9 células diarias para el humano) esto compensa la tasa commensurable de muerte celular en la sangre periférica.

Kamesaki y colaboradores transfectaron células B de ratón con un gen bcl-2. La expresión de bcl-2 abolió la citotoxicidad que de otra manera pudiera haber sido inducida por VP-16 e incluso en presencia de la formación de un complejo de separación inducida por medicamentos compatibles a la de células no transfectadas. La resistencia marcada por la expresión transgénica de timocitos a varios agentes inductores de apoptosis nos permiten seguir explorando la sensibilidad a agentes quimioterapéuticos.

Se ha mencionado el gran problema que representa la recaída en los pacientes pediátricos con LAL debido al desarrollo de resistencia a fármacos comúnmente empleados incluyendo al MTX como uno de los principales por lo que se hace indispensable conocer todos los mecanismos por los cuales las células neoplásicas desarrollan esta resistencia. Para dar una mejor opción de un régimen terapéutico efectivo a los pacientes con LAL.

En la actualidad se conocen algunos mecanismos de resistencia a MTX sin embargo pueden existir aun más factores que marquen un punto importantes o bien que actúen en conjunto sobre el desarrollo de resistencia a MTX, es necesario seguir explorando este campo tanto a nivel in vitro e in vivo.

Por lo anterior se plantea las siguientes Hipótesis.

-Los pacientes pediátricos con Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL) que presenten expresión elevada del gen bcl-2 tendrán una marcada resistencia a concentraciones in vitro de MTX.

-La expresión elevada del gen bcl-2 debe tener correlación con el inmunofenotipo y el Índice de DNA para poder causar una pobre sensibilidad a MTX.

-La expresión elevada del gen bcl-2 debe ser una de las causas principales de la resistencia a MTX en pacientes con LAL.

En el presente trabajo los objetivos principales fueron.-.

Determinar la expresión del gen bcl-2 mediante la presencia oncoproteína codificada por dicho gen utilizando citometría de flujo, en cepas aisladas de pacientes pediátricos con LAL y establecer si existe correlación con las cepas resistentes a MTX. Y determinar Si existe una coirrelación entre la resistencia a MTX y las variables: inmunofenotipo e índice de DNA.

Para cumplir con nuestros objetivos se realizó la siguiente metodología.

1.- Se obtuvieron linfoblastos de aspirado de Médula ósea de pacientes pediátricos de recién diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL). La muestra fue tratada con técnica de gradiente diferencial con Ficoll isopaque (1.077g/ml) y centrifugación durante 20 minutos a 1000g, posteriormente se retiró el "Buffy coat" y se diluyó en 3 ml de solución buffer fosfatos (PBS).

La contaminación con plaquetas se eliminó lavando dos veces con medio de cultivo RPMI 1640 , centrifugando durante 1 minuto a 750 g , ajustando la concentración celular de cultivo de 7 a 20×10^6 células / ml .

2.- La viabilidad de los linfoblastos se determinó resuspendiendo 2.5×10^5 células/ ml en medio fresco RPMI 1640 y mezclado con un volumen igual de PBS conteniendo 0.4% de Azul tripano , las células se contaron con hemocitometro manual .

3.- El inmunofenotipo de las células para el diagnostico así como el índice de DNA se realizó por citometría de flujo XL -2.

4.- Ensayos de quimiosensibilidad

Las células fueron preparadas con tripsina (0.05% tripsina w/v) en PBS, NaCl 0.15 M , Na_2PO_4 8 mM y 5nM de etilen diaminatetracetato) y resuspendidas en una concentración de 5.0×10^5 células / ml en medio de cultivo completo y fue vortexeada fuertemente . Se trabajaron las muestras con un volumen de 100µl cada una en tubos ependorff Posteriormente fue sustituido el medio de cultivo por las concentraciones de MTX 100, 10,1.0, 0.5, 0.01, 0.001 µg/l . Se dejaron incubar en cámara de CO_2 a 37 °C durante 72 horas, transcurridas las cuales se lavaron las células 3 veces con medio de cultivo fresco a 1000 g

Se hizo reaccionar las células con sales de tetrazolio MTT (Bromuro de 4,5 Dimetil - 2,5 Difenil tetrazolio) La cual es reducida por las deshidrogenasas de las células vivas , hasta un compuesto insoluble en agua o Formazan . La concentración utilizada de MTT fue de 5 mg / ml, aplicando 10 µl en un volumen de 100 µl . El formazan fue extraído de la célula por medio de isopropanol ácido (H Cl 0.04N) y cuantificadas las absorvancias con microlector de elisa a una λ 470 nm .

El porcentajes de células leucemicas sobrevivientes fueron cuantificados con la siguiente ecuación

$$\text{C.L.S} = (\text{D.O de las células tratadas} / \text{D.O. de las células control}) \times 100$$

5.- La expresión del gen bcl-2 fue determinada por medio de un anticuerpo monoclonal dirigido a la oncoproteína que codifica dicho gen , esta se demostró por inmunobloting e inmunopresipitacion y se analizó en un protocolo sencillo que detecta un solo tipo de fluorocromo (FITC) En el citometro de flujo XL-2.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Resultados: Los ensayos colorimétricos resultaron ser de gran sensibilidad, se demostró que no hay diferentas en la cinética de reducción de las sales de tetrazolio en diferentes aislados de linfoblastos. Por lo que respecta a la sensibilidad a MTX se obtuvo 97% de los aislados resistentes a la concentración más baja del MTX de 0.001 µg/ml , para la concentración de 0.1 µg/ ml fue de 91.42%, para 0.5µg/ ml fue de 62% , para 1 y 10 µg/ml 37.14% y para 100µg/ ml fue de 17.14 %.

Existen reportes en los que se menciona que las células neoplásicas hipodiploides tienden a tener una respuesta poco favorable a las quimioterapias, en este trabajo se encontraron únicamente tres aislados con hipodiploidia IDNA <0.925 los cuales presentaron buena supervivencia ante el MTX. Debido a que nuestra población de cepas hipodiploides es escasa no podemos asegurar que la ploidia este relacionada con la resistencia a MTX.

Por lo que respecta a la expresión del bcl-2 en los diferentes aislados en la concentración más alta del MTX se observa poco porcentaje de células leucémicas sobrevivientes con alta expresión de este gen. No se descarta todavía la posibilidad de que este gen tenga que ver con la resistencia a MTX. También encontramos 3 aislados con inmunofenotipo T el cual es considerado como mal pronóstico en estos la expresión de bcl-2 fue variable (66.7%, 39% y 27.6%) se puede sugerir que probablemente la resistencia sea un efecto combinado con el inmunofenotipo.

En conclusión en este trabajo no se descarta la posibilidad de que el bcl-2 juegue un papel importante en la resistencia a MTX en niños con LAL sin embargo son requeridas técnicas de evaluación más específicas para detección de la traslocación t(14-18) la cual está asociada con la expresión del gen antiapoptótico.

La resistencia al Metotrexate no solo está relacionada con la expresión desmedida de gen bcl-2, índice de DNA e inmunofenotipo. Deben existir otros factores que tienen que ser cuidadosamente estudiados para que los médicos tengan más herramientas y poder dar un tratamiento más eficaz a los pacientes con LAL.

ANTECEDENTES:

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es el padecimiento maligno más frecuente en los niños, constituye un grupo proliferativo de entidades, originándose en la médula ósea, su etiología se desconoce, aun cuando se han documentado factores predisponentes. Esta enfermedad es ampliamente descrita en base a características clínicas, inmunológicas, genéticas y moleculares (1).

En México el índice de frecuencia de LAL es elevado. En los últimos años, su pronóstico en términos generales ha mejorado hasta alcanzar una tasa de supervivencia y de curación del 75 % (2). Sin embargo las recaídas medulares continúan siendo el mayor obstáculo para la cura de estos niños, esta recaída medular fue asociada invariablemente a segundas remisiones cortas y evolución fatal, a estos pacientes se les intensifica la quimioterapia y en ocasiones se incluyen en programas de trasplante de médula ósea mejorando con este último la supervivencia libre de enfermedad en casos aislados, sobre todo en pacientes que presentan recaída (3).

La resistencia clínica a drogas es causada por numerosos factores diferentes, estos pueden funcionar a nivel fisiológico o a nivel celular. Al nivel del organismo, la disposición fisiológica del fármaco determina la biodisponibilidad de la citotoxicidad, dentro de tumores. La resistencia a fármacos a nivel fisiológico es modulado por cambios en la ruta de administración, la dosis y la hora en la cual se administra el medicamento. Un ejemplo de la modulación clínica es la infusión intra -arterial de medicamentos citotóxicos, altas dosis de quimioterapia seguida de un trasplante autólogo de médula ósea y una continua infusión de ciertos medicamentos, como por ejemplo el ara -C. En esta técnica se manejan concentraciones extracelulares de los fármacos en un sitio específico del tumor y exposición prolongada del fármaco. La resistencia ocurre a pesar de la alta concentración del fármaco citotóxico, esto es llamado resistencia celular a drogas (4).

Se han realizado estudios de resistencia celular a drogas a nivel in vitro en líneas celulares, para aclarar el mecanismo de resistencia para diferentes clases de quimioterapias, estos mecanismos en células tumorales fueron caracterizados por inestabilidad genética o formación espontánea de formas variantes, como cambios a nivel de membrana celular que hace que disminuya la acumulación del fármaco propiciando un lento flujo (5). Se ha mencionado que la resistencia a

Metotrexate (MTX) en células tumorales puede ser por el incremento en el eflujo de la droga mediado por P- glycoproteínas. También la resistencia podría ser mediada por alteraciones del metabolismo del fármaco que reduciría la formación de una prodroga, por ejemplo el ara -C tiene su forma activa como citarabina trifosfato (ara -CTP), o por el incremento del metabolismo de la droga dominando la detoxificación, un ejemplo de este último es incrementar la conjugación o alcalinización con agentes glutatión . Alterando la distribución de fármacos de manera intracelular puede alterar la vía metabólica ocasionando la resistencia . Cambios cuantitativos en el blanco del medicamento pueden aumentar los resultados en la reducción de la citotoxicidad del fármaco(6).

Puede ser que la resistencia también ocurra por una elevación de los mecanismos de reparación inducido por daños al DNA. Muchas de las quimioterapias usadas hoy en día actúan causando daño en el DNA .

Incremento de niveles de enzimas intracelulares tal como metilguanina metiltransferasa (MGMT) que son conocidos para reparar el daño inducido por nitrosureas (7,8). La reducción intracelular de los niveles de enzima o inhibición de su actividad muchas veces incrementa la efectividad de las drogas.

Uno o combinaciones de estos mecanismos pueden ocasionar la resistencia. Se cree que un solo mecanismo puede conferir resistencia a un solo tipo de droga. Alternativamente un mecanismo de resistencia puede conferir resistencia cruzada a múltiples drogas . ¿Habría un efectivo modulador que venza la resistencia celular a drogas? , nosotros tenemos que identificar los mecanismos de resistencia que es operativo para el paciente con leucemia y tumores sólidos.

Buscando estos moduladores encontramos el término Resistencia a Multidrogas (MDR) que describe el fenómeno por el cual el cáncer puede hacerse resistente a varios tipos de drogas .

La sobreexpresión a nivel de membrana asociado con glicoproteínas, P- glicoproteínas como fenotipo de gen mdr. Las drogas relacionadas en el fenotipo de MDR incluyen productos naturales como la Doxorubicina (DOX) Y los alcaloides de la Vinca , agentes sintéticos tales como la Mitoxantrona y Trimetrexate.

Las P- glicoproteínas son codificadas por el gen mdr y pertenece a una familia proteínas transportadoras en rangos amplios de sustrato, incluyendo péptidos, iones inorgánicos, esteroides y drogas citotóxicas, la presencia de estas P-glicoproteínas se pueden encontrar en

tejidos normales como el tubo proximal del glomerulo , corteza adrenal y canaliculos biliares del hígado, el sustrato natural y función normal de P- glicoproteinas es desconocido (9) .

Los niveles de P- glicoproteinas en la superficie de células cancerígenas es correlacionado con los niveles de MDR.(8, 10).

Ciertos métodos son desarrollados para la detección de las P- glicoproteinas en los especímenes clínicos , uno de estos métodos es la medición del RNA mensajero o de la proteína en sí . Se han reportado varios ensayos usando a las P-glicoproteinas en células hematopoyéticas y en tumores sólidos . Se aprovechan los moduladores que causan la resistencia a multidroga y la sobreexposición de las P-glicoproteinas. Estos incluyen las siguientes : 1) El uso de drogas citotóxicas para que las células MDR incrementen la sensibilidad. 2) El uso de agentes quimiosensibilizantes que son capaz de inhibir la función de P- glicoproteinas, como bloqueadores de canales de calcio 3) El uso de agentes inmunoterapéuticos los cuales, pueden ser anticuerpos monoclonales al blanco de P- glicoproteinas e inhibir esta función 4) La inhibición de la expresión del gen *mdr 1* por el uso de oligonucleótidos antisentido y 5) el uso de altas dosis de quimioterapia la cual es usada en trasplantes autólogos de médula ósea (11).

Combinaciones de varias clases de drogas son usadas para mejorar los resultados de los tratamientos contra el cáncer. El uso de combinaciones de quimioterapias es basado en la suposición que varias clases de drogas tienen diferentes mecanismos y que estos están ligados a diferentes mecanismos de resistencia y/o sinergismo . Un factor central de muchas drogas es que tienen una sensibilidad colateral en células MDR .En otros aspectos ciertas drogas pueden ser mucho más citotóxicas en células MDR en concentraciones mucho más bajas a las que son tóxicas sus progenitores. Un ejemplo de sensibilidad colateral en células MDR son descritas en las células de mielomas múltiples . Se ha reportado que los pacientes pueden hacerse resistentes a las quimioterapias estándar a causa de la alta sensibilidad al uso de esteroides. Estudios preclínicos exponen que células de mieloma múltiple MDR, son más sensibles a corticosteroides in vitro que células progenitoras sensibles a drogas. También se ha demostrado una sensibilidad colateral a las nitrosureas, streptozotocina y carmustina (BCNU) en células mieloma múltiple positivas a P- glicoproteinas (12).

El uso de quimioterapias para inhibir las P- glicoproteinas son reservadas, en gran detalle de atención por este laboratorio y más aun en la clínica. Son interesantes las observaciones que

reportan que el verapamil bloqueador de canales de calcio y además es capaz de bloquear la función de las P-glicoproteínas y vencer a las células leucémicas MDR de ratón. El mecanismo es desconocido probablemente el verapamil actúe por competitiva inhibición competitiva de la unión del citotóxico a P-glicoproteínas, bloqueando el flujo e incrementando la concentración intracelular del citotóxico (13).

Estudios clínicos reportan una eficaz quimiosensibilidad en pacientes con resistencia a drogas reversible. Miller y col. reportan que la trifluoroperazina es capaz de causar una segunda respuesta a doxorubicina en pacientes que fueron recientemente tratados con regímenes de drogas previamente (14).

La resistencia celular a drogas es causada por cambios en el sistema metabólico, el cual puede incrementar la facilidad de detoxificación o decrecer la formación de especies activas o inactivación de prodroga. Alteraciones en glutatión contenido en la célula es asociado con la represión enzimática o sistema metabólico y en muchos casos el decremento de la actividad de ciertas drogas por detoxificación.

Nandy .C. y colaboradores reportan que la proteína p53 puede tener alguna influencia sobre los pacientes con LAL que reciben quimioterapia ya que al revisar la presencia de dicha proteína en ratones más del 10% de estos tenían p53 mutante posteriormente en humanos también se encontró una tasa de más del 50% de esta proteína igualmente mutante.

La p53 está pasiva cuando se encuentra en forma tetramérica y muchas de las mutaciones se han encontrado en codones no esenciales.

Las mutaciones en la p53 usualmente son asociadas con resistencia a la quimioterapia y decremento en la supervivencia de los pacientes con leucemia.

En un estudio con 14 pacientes pediátricos no registraron niveles de p53 en la preinducción, ninguno de estos tuvieron incremento en los niveles de la p53 en la postquimioterapia. Esto sugiere que los blastos de estos pacientes no son sensibles a la quimioterapia (15) ¿cuál será la vía que medie la expresión de p53?

En otros estudios con 9 pacientes con niveles elevados de p53, solo uno expresó p21, también. En otros 12 pacientes midieron niveles de proteínas BCL-2 y solo en 5 de estos disminuyó y en cuatro de estos p53 se elevó. Cinco de los nueve pacientes se diagnosticaron con leucemia aguda no linfoblástica, 3 con LAL y uno con Linfoma (NHL)

En 4 de 6 pacientes estudiados los niveles de bcl-2 y p53 decrecieron después de la quimioterapia y el porcentaje de blastos de la médula ósea también disminuyó.

Es de gran interés el que la mitad de los pacientes que presentaron recaídas la tasa de p53 y bcl-2 se incrementara después del cuarto curso de quimioterapias hasta 20 veces más.

La función de la p53 se asocia clínicamente con la resistencia.

Funcionalmente p53 es necesaria, pero este es un factor insuficiente para predecir la respuesta a la quimioterapia. Los niveles de bcl-2 se relacionan con las recaídas a médula ósea en pacientes con LAL (15).

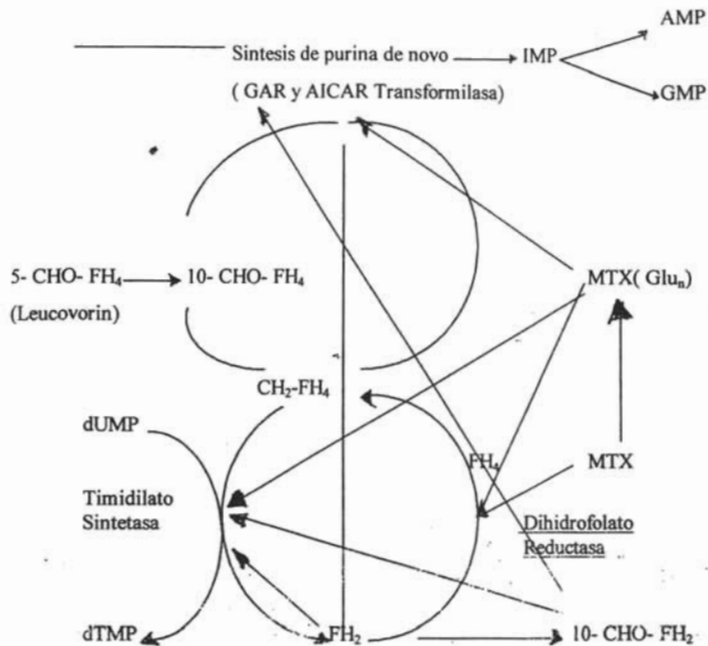
Los folatos dependientes de enzimas representan un blanco atractivo para la quimioterapia anti tumoral por que de esta unión se da la síntesis de los precursores de nucleotidos . En 1948 se presenta por primera vez el aminopterina o 4- amino ácido análogo del ácido folico que puede inhibir la proliferación de las células leucemicas y producir remisión en leucemia aguda . Este descubrimiento se acomodo dentro de las quimioterapias antimetabolicas y genero gran interés dentro de la clase de los antifolatos y fue ampliamente usado dentro de los tratamientos de la leucemia , cáncer de pulmón ,tumores de cabeza y cuello, linfomas y coriocarcinoma (16). Las aplicaciones clínicas se hicieron extensivas a desordenes no neoplásicos, incluyendo artritis reumatoides- enfermedad contra- huésped posterior al transplante de médula ósea (17) , psoriasis, infecciones bacterianas y plasmodial e infecciones asociadas con agentes oportunistas que activan el síndrome de inmunodeficiencia adquirida(VIH) (18)

MECANISMO DE ACCIÓN DEL METOTREXATE

El MTX actúa por sustracción y cambio de un grupo amino por un hidroxilo en la posición 4 del anillo de pteridina, es un cambio crítico en esta estructura del componente anti folato dirigido a la actividad antitumoral (19)

Este cambio transforma la molécula para inhibir la unión estrecha con el sustrato de dihidfolato reductasa (DHFR) Esta enzima es la llave de la homeostasis intracelular de los folatos . La importancia critica de DHFR es central desde el hecho de que el ácido fólico puede ser activado como coenzima solo en su completa forma reducida de tetrahidfolato. Los dos especificos tetrahidfolatos juegan un papel fundamental en un carbono - transportado relacionado en las síntesis de precursores de DNA. 10-Formiltetrahidfolatos proveen un grupo carbono para la

síntesis nueva de purinas, estas reacciones son mediadas por ribonucleotido glycinamida (GAR) Transformilasa y ribonucleotido aminoimidazol carboxamida (AICAR) Transformilasa . Un segundo cofactor 5, 10 - metilentetrahidrofolato ($\text{CH}_2 \text{FH}_4$) dona un grupo carbono a la reacción reductora de metilación convirtiendo deoxiuridilato (dUMP) a timidilato (dTMP). Al ceder a un grupo carbono, 5,10 metilene tetrahidrofolato es oxidado a dihidrofolato, el cual tiene que ser reducido a tetrahidrofolato por la enzima DHFR en orden por el pool de cofactores folatos reducidos activos. En la actividad proliferativa de células tumorales , la inhibición de DHFR por MTX (FIG) U otros 2,4- diamino folatos son dirigidos a una acumulación de folatos en la forma inactiva de dehidrofolatos con una disminución variable de folatos reducidos (20, 21)



Compuesto

Inhibición

MTX

Dihidrofolato reductasa

MTX(Glu_n)

Dihidrofolato reductasa
 Timidilato sintetasa
 AICAR Transformilasa
 GAR Transformilasa

FH₂ (Glu_n)

Dihidrofolato reductasa
 Timidilato sintetasa
 AICAR Transformilasa
 GAR Transformilasa

10-CHO-FH₂(Glu_n)

Timidilato sintetasa
 GAR Transformilasa

Fig 1.- Sitio de acción de MTX, en su forma poliglutamada MTX Glu_n y folato para producir la inhibición de la DHFR, incluyendo dihidrofolato (FH₂) y 10 formildihidrofolato (10-CHO-FH₂). Aumento de la presencia de 5, 10 metilentetrahidrofolato (CH₂-FH₄) el cofactor de folato requerido para timidilato sintetasa, 10 formil tetrahidrofolato (10-CHO-FH₄) que es intermediario para la síntesis de precursores de purina.

La disminución de folatos sin embargo no está completamente descrito para la inhibición metabólica asociada con tratamiento antifolato, desde este criterio el pool de folatos reducidos son igualmente preservados, aun en la presencia de concentraciones del citotóxico MTX. Adicionalmente muchos factores contribuyen a la citotoxicidad del MTX, incluyendo el metabolismo de los componentes primarios de derivados poliglutamato y de la acumulación de dihidrofolatos y 10- formildihidrofolatos poliglutamatos como una consecuencia de inhibición de DHFR (22). MTX poliglutamatos, dihidrofolato y metabolitos de 10- formildihidrofolatos representan una inhibición potencial directa del folato dependiente de enzimas , de timidilato y de biosíntesis de purina (23). Esta inhibición de biosíntesis de DNA por 2,4 - diamino folato es un proceso multifactorial ambos consistentes de baja parcial de sustrato folatos reducidos y de una directa inhibición de folatos dependientes de enzimas. Esta función relativa de cada uno de los mecanismos para determinar asociación - inhibición metabólica por antifolato dependiente de un factor celular, puede variar en diferentes tipos de cáncer.

Farmacología celular y mecanismos de resistencia a Metotrexate:

Transporte transmembranal:

El movimiento del MTX y de otros antifolatos a través de la membrana , es atendido después de la formación de anomalías de transporte y desarrollo de resistencia clínica a drogas . El MTX entra a la célula por mecanismos dependientes de energía, sensible a la temperatura y proceso concentrativo, los cuales dependen de proteínas intramembranales específicas (24). Los mecanismos anión - dependiente y glucosa- insensible . En esta trabajo nos referimos a los artículos de Antony (26) Para comprender el transporte de folatos a través de la célula, la corriente membranal responsable de transportar MTX en células de mamífero aumenta el transporte y naturalmente ocurre reducción de folatos, incluyendo el agente de rescate 5- formiltetrahidrofolato (leucovorin) (26). El MTX y folatos fisiológicos compiten por la entrada a la célula. En adición a través de un proceso conocido como heterointercambio, MTX libre intracelular es forzado a eflujo en las células que tienen altas concentraciones extracelulares de folatos reducidos que cruzan la membrana celular (27).

La corriente de influjo para MTX es comprendida en dos diferentes sistemas los cuales son : 1) Una corriente frecuentemente referida para los folatos reducidos que corren con alta afinidad por

folatos reducidos y MTX (afinidad constante = 0.7 o 6 μM) cuando comparamos con ácido fólico (afinidad constante = 200 μM) y 2) Folatos unidos a proteínas asociados a una membrana hidrofóbica (receptor humano de folat, hFR) estas son de 10 a 30 veces de más alta afinidad por el ácido fólico y los folatos reducidos (rangos nanomolares) que por el MTX (24).

Con poliglutamatos- MTX se demostró la afinidad 100 veces mayor que para los folatos unidos a proteínas, fueron comparados con las formas monoglutamadas de MTX (28).

Estos dos sistemas de transporte son directamente interrumpidos o funcionan separadamente esperando completar una caracterización molecular de cada uno de estos sistemas de transporte . Recientemente se describe un proceso referido como potocytosis, este es un mecanismo que distingue a un receptor mediador de endocitosis y es fundado o es asociado con folatos unidos a proteínas . Este mecanismo describe la acumulación de proteínas unidas en distintas regiones de la membrana conocida como caveola , esta forma vesículas intracelulares conteniendo proteínas unidas a folatos (29). Presumiblemente los folatos son relacionados con receptores humanos de folatos (hFRs) y entre cambios de pH que ocurre dentro de la caveola, muchos de estos folatos entran en los espacios intracelulares vía una corriente específica de membrana, quizás representando folato reducido característico.

Tales mecanismos de transporte transmembranal de folatos pueden aparecer o incorporarse a la función de ambos, el folato unido a proteínas y el folato reducido corriendo dentro de un proceso uniforme .

En la línea celular de carcinoma humano nasofarigio KB y en células de riñón de mono las proteínas unidas a folatos en membrana pueden ser altamente reguladas por el descenso de folatos correspondiendo a regulación negativa en un medio repleto de folatos. Adicionalmente los anticuerpos dirigidos a hFR bloquean transporte de ácido fólico y MTX , sugiriendo una función de esta unión proteica en la acumulación de folatos (30) . En contraste una baja afinidad de folatos reducidos apareados con un transportador pueden ser responsables ara la mayoría de transporte de folatos bajo condiciones de alta concentración de folatos extracelular no fisiológica. Los folatos unidos a proteína astan presentes en alto grado en células de cáncer de ovario, allí proveen reacciones bioquímicas de uso de folatos estas proteínas que son específicamente usadas para transporte celular en el tratamiento del cáncer ovárico (31).

Una proteína idéntica unida a folato es aislada en otros tejidos humanos, incluyendo placenta, donde se distinguen dos formas distintas representativas en el adulto y formas fetales respectivamente. Estas proteínas son detectadas usando un anticuerpo monoclonal dirigido a la proteínas unidas a los folatos, por la expresión en el ovario normal, pulmón, tiroides, riñón y plexo coroides (32). La localización lateral sugiere una posible función de estas proteínas en concentraciones de folatos en fluidos cerebrospinales. Recientemente se encontró en 1.1 kilobases cDNA codificando para aproximadamente 30 kDa de proteína unida a folatos de mamíferos, estos genes fueron mapeados en cromosoma 11q13 (33). Una subunidad proteolítica de hFR, es una proteína unida a folatos soluble e hidrofóbica, esta es identificada en la leche y el suero. Un producto soluble precursor relacionado fue demostrado por algunos laboratorios y también y otras formas que deben estar unidas a la membrana (34).

La función exacta de proteínas a las cuales esta unida el MTX y folatos, es atrapar los folatos uno a uno en la superficie de la célula o de transportarla a través de la membrana, sin embargo esto aun no es claro.

Transfecciones de células de cáncer de mama con carencia de proteínas unidas a folatos con hFR cDNA tienen un contradicción con respecto al MTX que permite la entrada y su citotoxicidad. Con este estudio se sugiere una función importante para las proteínas unidas a los folatos en el transporte de folatos fisiológicos, esta conclusión no ha sido corroborado ni la función que permite al MTX ser citotóxico, estos resultados en células de cáncer de mama demuestran una marcada dependencia del MTX al transporte de folatos reducido (35) En contraste con estudios que presentan expresión de proteínas transportadoras de folatos reducidos esta se correlaciona con el incremento de transporte de MTX y realización de citotoxicidad en leucemia (36).

La acumulación de MTX en las células tumorales puede ser influenciada por una variedad de agentes, incluyendo drogas antitumorales comúnmente utilizadas como el antifolatos y combinaciones de regímenes de quimioterapia. La Vincristina incrementa el MTX intracelular por inhibición de flujo de drogas. Las concentraciones de vincristina requeridos para la producción de este efecto es de (10 μ M), sin embargo muchas veces no tiene relevancia clínica, hay picos de niveles de vincristina en la sangre en concentración por abajo de 0.1 μ M que puede activarla fácilmente. Una quimioterapia experimental en células de leucemia murina L1210 en la cual se administró una secuencia de vincristina después de MTX se dice que no mejora la

sobrevida de animales portadores de tumores (37). Por inexplicables razones, vincristina de 8 a 48 horas después del MTX se dice que produce efecto de sinergismo terapéutico. El influjo de MTX es inhibido por ouabaina , glucocorticoides y cefalotina , aunque sus interacciones no fueron expuestas. Las sales biliares (cholate, tauro cholate y deoxicholate) Son causantes de disminuir el transporte hepático del MTX y la expansión del pool de las sales biliares considerando que son potencialmente aprovechados para disminuir la hepatotoxicidad de MTX . Uno de los mejores metabolitos del MTX es 7-OH- MTX formado por acción de aldehído oxidasa hepática , aumenta la competencia con el MTX por el transporte celular , eso disminuye la acumulación intracelular de MTX (38) .

La proliferación de células tumorales o estado cinético tiene fuerte influencia en la tasa de folatos y de transporte de MTX . En general rápidamente la gran tasa de proliferación celular lleva a una gran tasa de MTX y decremento en la tasa del eflujo de la droga comparado con células que están en fase estacionaria o que retrasan su crecimiento. En muchos experimentos en los cuales se induce la diferenciación de células tumorales , independiente de la tasa de crecimiento , decrece marcadamente el transporte de MTXZ (15 veces) (39) Defectos de transporte así como incremento en requerimiento de precursores de DNA, incrementa la actividad de timidilato sintetasa y aumenta la poliglutamación de MTX, todo esto contribuye al aumento de la citotoxicidad de MTX en las células tumorales que se dividen rápidamente (40).

Además del sistema de alta afinidad descrito arriba , un segundo mecanismo de transporte relativamente menos eficiente es descrito para la concentración de drogas en exceso más de 20 μM , este proceso representa una difusión pasiva y esta no presenta competitividad entre folatos y MTX o heterointercambio .

El eflujo de MTX a la célula se lleva a cabo entre múltiples mecanismos, uno de los cuales aparece hasta ser idéntica a la corriente de influjo . Un informe lateral para aumentar 70 % del eflujo de la droga en las células L1210 en ausencia de glucosa .En condiciones repletas de glucosa ocurre más eflujo con otras dos rutas dependientes de glucosa y ATP. Los pasos de estas rutas son inhibidos por biosulfophtalato (BSP), prostaglandina A y concentraciones altas de KCl y esto es accionado por ciclina nucleotidasa. Alternativamente el paso de eflujo de MTX en leucemia linfoblástica humana (células CCRF - CEM) son idénticas a lo descrito para la células murinas y la ruta sensible BSP es cuantitativamente insignificativa. Los trabajos sobre bombas de

eflujo para MTX son funcionalmente descritos a partir de P- glicoproteínas mediadoras, se describen sistema de resistencia a multidrogas para el transporte de agentes antineoplásicos de manera natural (41)

Experimentos *in vitro* e *in vivo* identifican los defectos en el transporte este es un mecanismo común de resistencia intrínseca o adquirida a MTX. Sin embargo hay otros factores en los que intervienen niveles intracelulares de DHFR, afinidad de DHFR por MTX poliglutamatos y niveles de Timidilato sintetasa (TS) los aumentos en esto influyen fuertemente en la actividad citotóxica del MTX y cuyo efecto no está completamente separado del transporte de drogas (42). Un número de líneas celulares resistentes a MTX tienen un defecto funcional en la reducción de los folatos que no son descritos, como la mayoría son establecidos por pasos singulares de selección en presencia de MTX. Las condiciones empleadas para generar líneas celulares mutantes *in vitro* frecuentemente son el uso de una alta concentración de folato (1 a 5 μM) que normalmente *in vitro* son 5 a 50 nM. Por lo tanto las células neoplásicas, pueden disminuir marcadamente la capacidad para reducir a los folatos, más no son capaces de sobrevivir *in vitro* a bajas concentraciones de folatos en su ambiente. Un ejemplo de esto es una línea celular de leucemia murina L1210 resistente a MTX revelando una importante habilidad de transporte de MTX, ácido fólico y de 5 - formiltetrahidrofolatos vía sistema corriente de folatos reducidos (43). Sin embargo el crecimiento de estas células resistentes fueron mantenidas por el uso de transporte secundario son incapaces de transportar más MTX cuya actividad es suficiente para permitir el crecimiento celular en el medio suplementado con folatos (2.2 μM). Las células de leucemia humanas CCRF- CEM / MTX establecida y conservada en concentraciones fisiológicas de folatos (2nM) carecen de folatos reducidos y de proteínas corrientes solo por esta razón hay resistencia a MTX. Sin embargo estas células retienen la unión de folatos a proteínas y usando este proceso eficiente de transporte, el crecimiento es mantenido normalmente en concentraciones de ácido fólico. Este estudio es de particular interés clínico después de comparar las concentraciones de folatos empleados con los rangos fisiológicos y los mecanismos de resistencia (44).

Algunos reportes señalan que el incremento en la disponibilidad de moléculas reactantes con el receptor humano de folatos, en líneas celulares selectas, el hFR contribuye al transporte y que cambios en hFR contribuyen al desarrollo de células resistentes al MTX. Nueve líneas celulares

de carcinoma humano epidermoide nosofarigeo humano (KB) resistente al MTX carecen de transporte de folatos reducidos estableciéndose y manteniéndose en un medio bajo de folatos (1 a 10 nM) Otras de las sublíneas resistentes al MTX son resultantes de un deteriorado transporte de MTX que fue correlacionado con decremento de la actividad y decremento de la expresión proteica del receptor humano de folatos. Estudios adicionales examinaron las bases moleculares del decremento de los niveles de hFR y revelaron que estos niveles específicos de mRNA hFR y copia del número de este gen se correlaciona con el decremento de la actividad (45).

Al empezar a identificar la resistencia clínica de MTX y el deterioro del transporte, se usa un ensayo sensitivo al desplazamiento competitivo usando un análogo fluorescente de MTX N-(4 amino - 4 deoxi N- metilpteril)- N- (4 fluorecein tiocarbamil) L lisina (PT430). En un análisis con 17 pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL) dos de 4 de estos pacientes siguieron tratamiento combinado a base de MTX después de esta quimioterapia se observó un transporte deficiente de la droga antineoplásica, este estudio sugiere evidencias de deterioro del transporte y propone un papel importante en el desarrollo de la resistencia clínica al MTX .

Existen significativas diferencias en las características de transporte de drogas antifoláticas es de interés en el desarrollo de nuevos análogos . Los antifolatos no glutamados como trimetrexate y piritrexate también glutamil ésteres de MTX no requieren del transporte celular y se han demostrado agentes activos mutantes resistentes por transporte. El dibutil éter de MTX inhibe la incorporación de timidina dentro del DNA , el efecto del transporte de timidina es aparentemente resultado de esta inhibición . Este compuesto es rápidamente hidrolizado al MTX original, en el plasma humano esto se convierte a α o γ monobutil derivados y después es un compuesto estable que inhibe efectivamente DHFR (46). El antifolato quinazolina tiene una alta tasa de eflujo y una baja tasa de influjo de MTX , mientras la aminopterina que tiene una tasa rápida de influjo, estas diferencias ocurren con la gran acumulación de quinazolona y aminopterina son comparados con el efecto de MTX en dosis equimolares in vivo . 10 Etil -10 desaminopterina (10 - EDAM) Es más ávidamente acumulado en células tumorales comparado con células de médula ósea normal o células de epitelio intestinal y estas son tolerantes a la actividad terapéutica y en sistemas experimentales es de baja toxicidad en médula . Este componente 10-EDAM es un agente esencial no inhibidor de la actividad de timidilato sintetasa, esta forma poliglutamato hace una inhibición significativa (47) . Este efecto de poliglutamatos es similar a lo

observado para MTX . En contraste para MTX con pobre afinidad relativa por los folatos unidos a proteínas, varios de los inhibidores de folatos recientemente sintetizados de timidilato sintetasa pueden ser CB3717 Y ZD1694 confían una alta afinidad a los folatos unidos a proteínas para el transporte celular. Desde que estos componentes son eficientemente transportados por cualquiera sistema de transporte de folatos , estos son pobremente susceptible al surgimiento de resistencia, resultado por alteraciones en el transporte membranal.

Homofolatos de DHFR inhiben el transporte primario de los folatos unidos a proteínas y estos fueron agentes potencialmente activos contra células malignas con sobre expresión de proteínas. Los análogos de antifolatos y los inhibidores de timidilato sintetasa son agentes particularmente interesantes para el tratamiento contra tumores solidos que desarrollan resistencia al MTX . Hoy en día componentes de estos agentes antifolatos son evaluados experimentalmente (48)

Transformación de MTX intracelular

Los folatos existentes naturalmente dentro de la célula como poliglutamatos , a través de la enzima folipoliglutamil sintetasa (FPGS) Adicionan 6 grupos glutamil ligados a la posición gama en el sustrato folato: 1) Facilitando la acumulación de folatos intracelulares, en la gran extensión del pool de monoglutamatos este es transportado dentro de la célula, 2) Este permite la retención intracelular de las grandes moléculas aniónicas. 3) Intensifica la afinidad por el cofactor de ciertos folatos dependientes de enzimas , incluyendo TS. y AICAR transformilasa. MTX y otros análogos con terminal glutamil, sufren aumento en la poliglutamación en células normales de hígado , precursores mieloides en la médula ósea, fibroblastos humanos y una línea celular de leucemia y carcinoma. La actividad de Folipoliglutamil sintetasa (FPGS) es especialmente activa en líneas de células leucemoicas linfoblásticas humanas, la eficiencia de la reacción de poliglutamación depende del sustrato folato particular y variedad amplia entre los componentes de los antifolatos . Muchos de los antifolatos como ZD1694 y 10EDAM son más rápidamente glutamizados que el MTX . La poliglutamación del MTX ocurre de 12 a 24 horas de exposición . En pocos estudios de poliglutamación in vitro 80% de MTX en tejido normal y maligno existe en forma de poliglutamato de igual forma (49).

FPGS es una proteína de 62 kDa dependiente de magnesio, ATP y potasio, es purificada de homogenados de bacterias y mamíferos. El sustrato de esta enzima es dihidrofolato ($K_m = 2 \mu M$) > tetrahydrofolato ($K_m = 6 \mu M$) > 10 formiltetrahydrofolato o 5- metiltetrahydrofolato > aminopterina > 5 - formiltetrahydrofolato > MTX. Después de la relativa tasa lenta de formación de MTX poliglutamatos esto comparado con el folato natural, la reducción en actividad de FPGS o niveles de glutamato celular tienen pequeños efectos en el pool de folatos poliglutamados, muchos tienen efectos críticos en los niveles de MTX poliglutamados y sobre citotoxicidad del MTX. Se postula que la relativa ineficiencia metabólica de 5 - metiltetrahydrofolato (el predominio de folato presente en el suero humano) a esta forma poliglutamada es responsable en gran parte de la disminución de folatos que ocurre con la deficiencia de vitamina B12. A falta de la vitamina B12 puede haber una inhibición de la metionina sintetasa la cual es la responsable de la demetilación de 5 -metil tetrahydrofolato a tetrahydrofolato, un excelente sustrato para FPGS (50). La acumulación de MTX poliglutamado en los niveles reducidos de poliglutamación de folatos normales en los tejidos y en mucho o en parte cuenta para la hepatotoxicidad crónica asociado con MTX. La inhibición potente de FPGS es sintetizado tal como los análogos de la ornitina aminopterina ($K_i = 0.15 \mu M$) estos componentes aumentan la inhibición de DHFR pero desafortunadamente esta pequeña citotoxicidad, presumiblemente de debida por el pobre transporte. Mientras que la avidez de poliglutamación representa un importante parámetro de selección de nuevos análogos de antifolatos, la interacción de formas di y triglutamatos de análogos, el metabolismo que lleva hasta las formas altamente poliglutamadas para ser esenciales durante la actividad antifolato .

El contenido intracelular de derivados poliglutamados representan el blanco entre las dos diferentes enzimas, FPGS y gamaglutamilhidrolasa (conjugasa). Posteriormente un gamaglutamil peptidasa específica, remueve el grupo glutamil terminal y regresa a MTX poliglutamado a una forma antecesora de monoglutamato .La actividad de hidrolasa es inducida por la exposición a MTX, y la inducción de enzimas es implicada en posibles mecanismos de disminución de folatos con neurotoxicidad resultante (51) .

El MTX poliglutamado existe unicamente dentro de la célula y escasamente entre las células. La forma diglutamina permite que aumente la velocidad de entrada a la célula sea mayor en un decimoquinto , con glutamación elevada la tasa de transporte es lenta. El MTX poliglutamado

es selectivamente retenido con preferencia de niveles extracelulares de MTX paterno, esto es ampliamente relacionado con la retención celular de MTX poliglutamados relativo a MTX con deterioro de los niveles de transporte transmembranal que son relacionados específicamente con el flujo. Sin embargo recientes estudios empleando sistema de membranas de vesículas revelan que el MTX y el MTX poliglutamado permanecen de igual forma por flujo entre la membrana plasmática. Los resultados sugieren una compartimentalización intracelular de MTX poliglutamados muchos lugares son críticos para funciones que determinan la acumulación intracelular final. Ciertos parámetros influyen en la habilidad celular de poliglutarar MTX, uno de estos parámetros es la tasa de crecimiento y los niveles intracelulares de folatos (52). Dentro del entorno celular los factores de crecimiento, insulina, dexametasona, tocoferol y esteroides que son responsables del aumento de la poliglutamación. Mientras que desproveer de aminoácidos causa la inhibición de poliglutamación. La metionina parece disminuir la poliglutamación en hepatocitos normales, mientras que se ha observado un pequeño efecto en las células de hepatoma. MTX y L-Asparaginasa son frecuentemente usados en combinación para el tratamiento de la leucemia. Convencionalmente MTX en forma poliglutamada puede ser fuertemente inhibido por preexposición a L- asparaginasa presumiblemente la falta del aminoácido directamente arresta el crecimiento

El incremento de pools de folatos intracelular en seguida de la exposiciones de altas concentraciones de 5- formiltetrahidrofolatos o 5- metiltertrahidrofolatos resulta en un decremento de MTX poliglutamato. Convencionalmente el proceso se hace en las células de hepatoma por incubaciones de estas células con medio libre de folatos o por disminución de las folatos intracelulares por prepermeabilización de la membrana celular con lisolectina en un ambiente libre de folatos (53).

Un factor importante en la naturaleza selectiva de citotoxicidad de MTX deriva de la disminución de la formación de poliglutamatos que es relativamente normal en los tejidos malignos. Un pobre metabolismo de poliglutamación es observado in vitro en células intestinales normales de murino, en células de leucemia murina de acitis de Eherlich y células tumorales que convierten eficientemente al MTX en formas altamente poliglutamadas. Aparentemente en las células progenitoras mieloides se presentó una pequeña cantidad de MTX poliglutamado comparado con las células de leucemia murina (54).

En las células progenitoras mieloides humano los niveles de poliglutamación de MTX son insuficientes para saturar DHFR después de 24 horas de exposición en la concentración de $1\mu\text{M}$ y resultando no toxica dicha concentración. La saturación de DHFR por MTX poliglutamados se da con exposición de $10\mu\text{M}$ de esta droga, este descubrimiento se relaciona con la citotoxicidad.

El incremento de la retención intracelular y la poliglutamación de MTX tiene un efecto inhibitorio en folato específico dependiente de enzimas. El pentaglutamato tiene una lenta tasa de disociación frente a DHFR que el MTX y este permita marcadamente la inhibición potencial de TS ($K_i = \text{nM}$), AICAR transformilasa ($K_i = 5\text{ nM}$) Y en baja dimensión, GAR transformilasa ($K_i = 2\mu\text{M}$) en la presencia de sustrato folato monoglutamado. Se sugiere que la inhibición directa enzimática de purina y timidilato sintetasa por MTX poliglutamado puede contribuir a la citotoxicidad de MTX. Este efecto aumenta la explicación de la naturaleza competitiva del leucovorin y el recurso selectivo de tejido normal contra tejido maligno, este recurso depende en gran medida de la habilidad del leucovorin y el derivado de tetrahidrofolato a competir con MTX poliglutamado en otro sitio diferente que DHFR.

La habilidad de análogos antifolatos a sufrir poliglutamación es una de las varias propiedades que influyen en la citotoxicidad. La aminopterina es mejor sustrato para la FPGS que el MTX y este es un potente agente citotóxico. El análogo fluorinado de MTX, PT430 es un débil sustrato para la enzima FPGS y es poco citotóxico. La habilidad generada de poliglutamación de MTX está relacionada con la sensibilidad al MTX. En un estudio con células tumorales humanas, células de murino y ciertas líneas celulares con resistencia al MTX una en concentraciones altas y moderadas de MTX, la resistencia a este fármaco se cree que fue solo por el deterioro de la poliglutamación y como resultado un bajo nivel de la actividad de la enzima FPGS. Ciertas evidencias de la función de la poliglutamación son determinadas por la sensibilidad a drogas usando un antifolato tal como GAR transformilasa que es un inhibidor de DDATHF (56). Poliglutamación de DDATHF es formada rápidamente en cultivo de líneas celulares de leucemia humanas y reteniendo por periodos de tiempo prolongados en condiciones libres de droga. La deficiente FPGS en la línea celular CCRF-CEM genera poca poliglutamación de DDATHF y puede insensibilizar la exposición a drogas. Una línea celular de hepatoblastoma resistente a MTX H 35 en la que puede deteriorarse los niveles de poliglutamato y permitir la activación de

los niveles de la enzima glutamilhidrolasa. Se demostró la resistencia cruzada a los análogos antifolicos 10 propargyl 5-8 dideazol folato (PDDF) Y un inhibidor de TS. En esta línea celular los niveles de PDDF poliglutamato son significativamente bajos cuando se comparó con células progenitoras de hepatoma H35 y los niveles de poliglutamato fueron determinados debido a los niveles de la enzima Gamaglutamilhidrolasa activada, se conoce relativamente poco la importancia de la poliglutamación para determinar la respuesta clínica a MTX. En un estudio de 6 pacientes con carcinoma de células pequeñas se demostró la resistencia después del tratamiento con MTX, solo 2 de los pacientes fueron resistentes por la capacidad disminuida de poliglutarar a MTX (57).

UNION A DIHIDROFOLATO REDUCTASA:

Las características físicas de la unión a NADPH y MTX a DHFR son descritas ampliamente por estudios de cristalografía de rayos -x , espectroscopia, secuencia de aminoácidos nativa , modificaciones químicas enzimáticas y mutagenesis en sitios directos . Se han estudiado en formas microbianas, pollos y mamíferos , secuencias homologas de aminoácidos , fueron involucradas en sustratos cofactores e inhibición de la unión . En general a lo largo de la unión hidrofóbica a MTX y esta formado en parte por isoileucina , alanina 7, aspartato 27, fenilalanina- 31 (Phe 31) , fenilalanina - 34 (Phe 34) y otros residuos de aminoácidos . Hay particular importancia sobre las interacciones combinadas de uniones potenciales del 4- amino antifolatos : 1) El carbonil oxígeno de isoleucina -5 es unido al hidrogeno o al grupo 4 -amino del inhibidor, 2) La unión a la sal esta entre el aspartato y la posición N-1 de MTX esta no esta involucrada en la unión al sustrato fisiológico , 3) La interacción hidrofóbica del inhibidor ocurre con DHFR, particularmente con Phe- 31 y Phe 34 , 4) La unión al hidrogeno de los dos grupos amino en aspartato 27 y en la estructura consistente unido con la molécula de agua y 5) la unión de hidrogeno con el glutamato terminal a un residuo invariable de arginina -70. Investigaciones recientes señalan la importancia de la interacción de MTX con Phe- 31 y Phe- 34 mutantes en estas posiciones resultaron en 100 y 80000 veces disminuida repetitivamente la

afinidad a MTX por la enzima receptiva (58). Mutantes en la arginina 70 resultaron en un decremento en la afinidad a MTX por el aumento de 22000 veces pero no altero la afinidad por el trimetrexate. Este descubrimiento soporta una función para la arginina -70 en la unión de inhibición la presencia de terminales de glutamato . Un estudio reciente demostró una mutación superficial de la enzima en un sitio muy activo aumenta en muchos los resultados de marcada reducción de los folatos y la actividad de los antifolatos. El sustrato fisiológico dihidrofolato es unido a la enzima de manera invertida o al rededor.

La unión optima de MTX a DHFR depende de una concentración de NADPH. El NADH aumenta en número y es un cofactor de NADPH , esta no promueve la unión de MTX a la enzima . La ración intracelular de NADPH /NADP Y NADPH/ NADH son muy importantes en la acción selectiva de MTX esta importancia es extensiva en muchos tejidos de diferentes neoplasias comparado con tejidos normales . En la presencia de exceso de NADPH (10 y 200 Pm) la unión de MTX para DHFR es afectada esta, alternativamente esta afinidad es significativamente alterada por el pH, la concentración de la sal y el estatus del grupo sulfhidril . Dentro de las condiciones del bajo pH y de la baja inhibición de la enzima, la unión es esencialmente estequiométrica , una molécula de MTX es unida a una molécula de DHFR (59).

La unión de MTX a DHRF aislada en bacterias y algunos mamíferos en presencia de NADPH genera disminución de formación de complejos ternarios . El proceso completo que pueden ser lentos , inhibir la unión angosta e involucra una rápida y débil inhibición enzimática, interacciona en partes por un bajo extremo de unión angosta e isomerización del complejo al final. La isomerización final probablemente involucra un cambio conformacional de la enzima con subsecuentes uniones de la parte amino benziloyl de la enzima. Otros analogos de los folatos como aminopterina son más lentos los procesos de unión sintética , en contraste con la pteridina y pirimetamina que pueden comportarse con una clásica inhibición de las enzimas bacterianas . El trimetopim es considerado como clásico, tiene una débil inhibición de la DHFR de mamífero. A partir de esta nota se experimento un proceso de isomerización que forma de los complejos ternarios.

En esta prueba terapéutico el MTX actúa estrechamente unido por una inhibición reversible . Dentro de las condiciones de concentraciones altas de sustrato competitivo (dihidrofolato) y una neutralización intracelular del pH un considerable exceso de droga libre es requerido para la

inhibición de la enzima . En cultivo de tejidos y en sistemas libres , ^3H - MTX unido a la enzima intracelular puede ser desplazada por exposición de la célula a drogas no lábil , dihidrofolatos o folatos reducidos tal como 5 - formiltetrahidrofolatos (leucovorin y 5 - metil tetrahidrofolato , indicando como “off rete” o disminución de MTX por la enzima (60).

El exceso de la droga libre o no unida es requerido para mantener totalmente inhibida a la DHFR y para parar la síntesis de timidilatos . Por ejemplo cuando las células tumorales son incubadas por breves periodos de tiempo puede aumentar la concentración de la droga o permitir una total tritiación de la enzima seguida por la remoción de la droga no unida en la solución, la enzima Timidilato sintetasa reasume inmediatamente a pesar de la persistencia de la droga intracelular unida a DHFR (61).

La poliglutamacion de MTX es igualmente potente en la unión estrecha en DHFR de mamíferos y el proceso tiene una tasa desacelerada de la enzima cuando comparamos con los componentes originales. .En un experimento usando células de cáncer de pulmón, el pentaglutamato MTX puede tener una disociación de la vida media de 120 min comparado con 12 min de los componentes primarios u originales. Experimentos utilizando células libres con preparaciones enzimáticas extraídas de mamíferos indican que la poliglutamacion de MTX tiene un efecto moderado que permite la unión y catalisa la inhibición (de 2 a 6 veces) de DHF. (62) El MTX poliglutamado unido a la enzima aumenta el desplazamiento por reducción de folatos y una alta concentración de dihidrofolatos (63) .

Estas observaciones indican una ausencia de droga libre, una fracción pequeña de DHFR, la nueva síntesis es quizás por disociación del inhibidor, se hace disponible por actividad catalítica esto es adecuado para permitir un metabolismo continuo de la célula. El requerimiento por exceso libre de droga inhibe completamente la actividad enzimática es extremadamente importante para la comprensión de los efectos clínicos y tóxicos de estos agentes y es fundamental en la relación entre farmacocinética y toxicidad.

Jackson y col . Reportan una correlación cerrada entre citotoxicidad y afinidad de la droga unida DHFR para una serie de leucemia murina con diferentes sensibilidades al MTX, en este caso la resistencia resulto ser por un decremento en la unión a DHFR afin por MTX. En células de hamster chino (64) y murino (65) Las enzimas mutantes redujo la afinidad por el MTX varios miles de veces, en general esta baja eficiencia fue catalisada por la reducción de DHFR .

Srimatandaka y col. aislaron una cepa de cáncer de colon resistente a MTX en esta se encontró incrementado 25 veces los genes que codifican para la enzima de DHFR. El análisis de c DNA DHFR aislado de estas líneas celulares revelan una mutación singular, es la sustitución de un amino ácido en la posición 31, phenilalanina→ serina. Otros estudios revelan que DHFR disminuye 8 veces su afinidad por el MTX comparando con la línea antecesora. (66) un descubrimiento similar de amplificación genética de gen DHFR que altera la afinidad de MTX fue observada en una línea de hamster chino con cáncer de ovario. Estudios a nivel molecular predicen la mutación por sustitución (phenilalanina→leucina- 22). Cuando DHFR reduce su afinidad por MTX se presentan mecanismos de resistencia clínica a MTX, esto se observo en 4 de 12 pacientes con leucemia mieloide con resistencia (67)

Nuevos análogos de MTX tienen de 50 a 80 veces más potencia que el MTX para poder inhibir a DHFR en células de leucemia murina.

Un descubrimiento común en células resistentes a MTX es que incrementa la expresión de proteína DHFR esto puede no estar asociado con los cambios de la afinidad enzimática a MTX. Los niveles elevados de la enzima DHFR es detectado por asociación de homogenados de células tumorales por enzima con derivados de MTX con fluorescencia. Los componentes laterales para la identificación de las clonas resistentes fue el aumento de genes DHFR por 2 veces copiados. Esta elevación de gen DHFR persiste en muchas generaciones de las células tumorales, en células de leucemia murina el incremento de la actividad de la DHFR resulta de una reduplicación de estos genes por un incremento de la concentración de MTX en cultivo (68).

La duplicación de rangos de estados homogéneos (HSR) de cromosomas o fragmentos no nitrogenados de DNA conocido como cromosomas doble minuto (*double- minute cromosomes*). Cuando HSRs confieren una resistencia a la célula con cromosoma doble mutante que son desigualmente distribuidas durante la división celular (69) y en su ausencia continua una selectiva presión de exposición en los niveles originalmente bajos de genes de DHFR. Las evidencias de amplificación genética ocurre inicialmente en forma de cromosoma doble minuto, desde este punto el predominio de anomalías se dan en un bajo nivel durante la resistencia celular, mientras que si existe HSRs ocurre una resistencia alta si contiene múltiples copias (70) Un de los mecanismos de amplificación genética fue definido recientemente en la cepa HeAL

10 BS con resistencia a MTX se cree que esta es debida a elementos submitocondriales extracromosomicos (Amplisomas) conteniendo clara amplificación del gen para DHFR , esta aparece en forma temprana y no se asocia doblemente en el cromosoma , alternativamente las amplificaciones pueden ser predichas por diluciones de elementos no replicados , en contraste con células malignas la amplificación de DNA no se reporta en células normales de pacientes con tratamientos prolongados con citotóxicos (71) Se observaron colonias de fibroblastos resistentes a MTX estos no presentaron amplificación genética de DHFR.

En muchos casos las propiedades físicas y cinéticas aisladas de DHFR en líneas celulares de carcinoma y leucemia humano son idénticas a las células wild- type (tipo silvestre) células sensibles a MTX . Sin embargo otros análisis moleculares demostraron otros genes que codifican para DHFR , estos revelaron diferencias significativas en algunas regiones que afectan a la expresión proteica , Durante los cambios de sensibilidad de células de hamster chino en las que se expresan dos formas de DHFR codificadas por dos alelos distintos (72) Las dos diferencias específicas son : el peso molecular y el punto isoeléctrico (21000 contra 20000 y 6.7 contra 6.5) estas diferencias resultan por la sustitución de un amino ácido de Asn por Asp de las posiciones 95 . Con estas observaciones cualquiera de los dos alelos son expresados en sub clonas de células progenitoras y los puntos mutantes resultan de una sustitución de Phe por Leu en la posición 22 en DHFR con una actividad catalítica semejante a la de la enzima original ., la sobreexpresión de las mutantes fue la causa probable de la resistencia a MTX en las subclonas . El aumento de estas observaciones ocurre en forma variable en diferentes tejidos , es decir existe un polimorfismo genético en muchos hospederos. A demás la amplificación genética se da más sutilmente cuando la célula se encuentra en dosis aumentadas de la droga estas observaciones se hicieron en células de cáncer de pulmón con dosis aumentada hasta cuatro veces (73).

La expresión de DHFR aparentemente fue controlada en parte por los niveles de transcripción del mRNA. Posteriormente se observaron cambios en la medida de DHFR mRNA y copias de genes de DHFR seguidas de la expresión MTX, encontrando que no había alteración en la estabilidad enzimática. Utilizando la movilidad del RNA en un gel se pudo recombinar la proteína DHFR unida específicamente en los correspondientes mRNA DHFR (74) . Incubando la proteína DHFR con sustrato normal Dihidrofolato o NADPH y complementando la expresión con MTX , esta combinación fue blanco de mRNA DHFR; el sistema de transcripción in vitro es

específica para la interacción entre DHFR y el mensajero asociado con la inhibición de la transcripción, estos estudios proporcionaron evidencias para la autorregulación de la transcripción del gen DHFR (ver figura 2) La presencia de exceso de MTX o de DHFR previene la formación de más DHFR en una autorregulación normal (75)

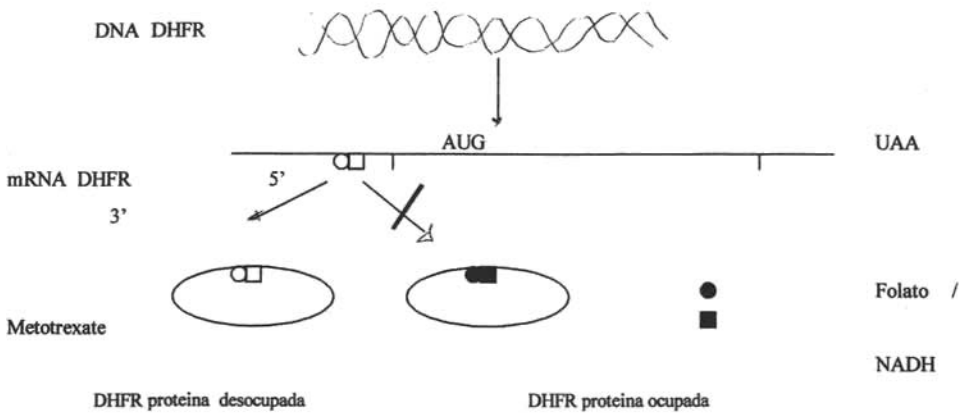


Fig 2.- Modelo propuesto para la autoregulación

La habilidad de regular la expresión de lo transcrito en células normales es manteniendo un estrés ya que representa un mecanismo donde la célula puede reaccionar o vencer la inhibición por MTX o por otros análogos antifolatos.

Mientras la resistencia a MTX a través de la amplificación genética de DHFR aparece después de prolongadas exposiciones a la droga y que la duplicación genética se da durante la fase temprana y trasciende al bloque de síntesis de otros genes bajos en reduplicación sintetizados durante esta fase del ciclo celular. La exposición de la célula a varios agentes físicos y químicos como MTX , hipoxia, agentes alquilantes, irradiaciones con luz ultra violeta , cis- diaminodicloro platino , adriamicina 5 - florodeoxiuridina inducen a la amplificación del gen DHFR lo cual subsecuentemente aumenta la proteína DHFR en las células tumorales (75)

Consecuencias de la inhibición de la enzima DHFR

Los eventos celulares asociados con la inhibición de dihidrofolato reductasa causado por MTX se ilustra en la siguiente figura 1.

Timidilato sintetasa (TS) caracterizada por una sola reacción bioquímica resultando en la oxidación de tetrahidrofolatos. 5,10-Metiltetrahidrofolatos es oxidado a dihidrofolatos , a lo largo con la transferencia de un grupo metileno o deoxiuridilato , hasta la transformación de timidilato. Una actividad continua de la reacción enzimática en presencia de la inhibición de DHFR resulta en una rápida acumulación de los niveles intracelulares de formas de dihidrofolatos y poliglutamatos. Esta acumulación es temporalmente asociada con el decremento de varios pools de folatos reducidos, más notablemente 5 - metiltetrahidrofolatos. Sin embargo en varias células estudiadas en sistemas in vitro, la reducción de folatos requiere cofactores para la nueva purina y timidilatosintetasa (10 - formiltetrahidrofolatos y 5, 10 metilentetrahidrofolatos) Estos son relativamente preservados con concentraciones citotóxicas de MTX (22) En estudios usando células de cáncer de pulmón , precursores mieloides normales humanos y células de leucemia murina, la exposición a concentraciones letales de MTX resultando de un 70 % a un 80 % de preservación de pools de 10 - formiltetrahidrofolatos comparado con los controles no tratados. Estudios adicionales usando células de cáncer de pulmón , células de leucemia promielocíticas, células progenitoras mieloides humanas , y células L 1210 de leucemia murina, crecidas en la cavidad peritoneal de ratones , confirman una preservación parcial de pools 5,10-metiltetrahidrofolato de un 50 a 70 %, durante la exposición a MTX produciendo una inhibición profunda de TS y la citotoxicidad , subsecuentemente computando el modelo de la bases de pools de folatos humanos, los datos experimentales confirman la importancia de la inhibición directa de varios folatos dependientes de enzimas asociadas con la exposición a MTX. En una tentativa de examinar la importancia del efecto de inhibidor de poliglutamación de MTX se diferencian, el efecto de disminución de los folatos y una inhibición directa de dihidrofolato , algunos investigadores han examinado el Trimetrexate que es un antifolico que no sufre poliglutamación y realiza una inhibición más potente de DHFR (76) . Algunos resultados de varios estudios con leucemia murina , con una relativa preservación de pools de folatos y

dihidrofolatos poliglutamados revelan que al parecer estos tienen una función esencial en la inhibición metabólica, en contraste con la disminución de folatos, este es el evento más grave de las células de hepatoma de rata. Presumiblemente la deficiencia intrínseca entre líneas celulares respetando los niveles de TS, Pools de folatos, regulación intrínseca de folatos, determina la función relativa de la inhibición directa enzimática contra la disminución de sustrato durante el efecto inhibitorio del metabolismo del MTX. La disminución parcial del cofactor de folato reductas contribuye a la inhibición de los pasos metabólicos, la acumulación de DHFR, de enzimas dependientes de folatos, en las purinas de novo y en TS.

También se mencionan los metabolitos que son inhibidores potentes de TS, AICAR Transformilasa, GAR Transformilasa y enzimas responsables de la interconversión de folatos incluyendo 5-10 metiltetrahidrofolatos reductasa, la inhibición constante por dichas enzimas es responsable de la interconversión de folatos incluyendo 5-10 metiltetrahidrofolato reductasa, la inhibición constante por dicha enzima (valores de K_i) son generalmente en los rangos 0.05 a 5 μM , dependiendo de la reacción específica y de las formas poliglutamadas del sustrato folato competente.

Adicionalmente el descubrimiento del decremento parcial de folatos reducidos, la importancia de la inhibición metabólica directa, particularmente por dihidrofolatos poliglutamados se sugiere por una correlación entre la acumulación de estos inhibidores metabólicos y la inhibición profunda de los pasos de la síntesis de purinas de novo.

Un nivel intracelular de folatos, 10 formiltetrahidrofolatos aumentados son descritos en células de cáncer de mama y de células mieloides humanas tratadas con MTX, los folatos surgen de una enzimática formilación, de acumulación de dihidrofolatos y es un potente inhibidor de GAR Transformilasa y TS (23).

Es interesante la composición del sustrato natural (10 formiltetrahidrofolato) que tiene fuertes evidencias de la dependencia de sustrato y esto no es el único mecanismo para la inhibición metabólica producida por MTX. Estudios recientes sugieren que el sitio primario de la inhibición de la síntesis de novo de purinas inducida por MTX reacciona antes con un catalizador para GAR Transformilasa, la enzima específica involucrada es la Anidofosforibosiltrasformilasa.

Estudios aislados con cinasas revelan que las formas poliglutamadas de dihidrofolatos y MTX puede inhibir potentemente a la enzima con un K_i aparente de 3.4 y 6 μM respectivamente .

La inhibición inducida por MTX es un proceso multifactorial que involucra varios pasos bioquímicos.

El folato reducido (leucovorin) rescata a las células tratadas con MTX con anticipación a una acumulación de folatos reducidos esto puede competir para vencer una inhibición directa enzimática. Esta característica explica la competencia natural del rescate con leucovorin in vitro y en la clínica . El aumento selectivo del efecto citotóxico de MTX y la selectividad del rescate con leucovorin depende en gran medida de poliglutamación de MTX y de dihidrofolato en células normales y malignas (77) .

METABOLISMO DEL METOTREXATE

Jacobs y col. indican que el 7 - hidroximetotrexate (7 - OH -MTX) En la orina de los pacientes con altas dosis de MTX contiene de un 20 a 46 % del metabolito en un intervalo de tiempo de entre 12 y 24 horas después de iniciar la infiltración . La fracción de este metabolito puede estimarse o ser muy alto hasta 86% en un periodo de tiempo de 24 a 48 horas . Un segundo metabolito 4- diamino N^{10} metil ácido ptericoico (DAMPA) que fue identificado en la orina y plasma 24 y 48 horas después de la administración de altas dosis de la droga .

Estos metabolitos pueden ser separados y cuantificados por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (78)

se ha reportado que DAMPA tiene reacción cruzada con anticuerpos , preparaciones con un conjugado de MTX con Glutamina y otro con la molécula de MTX con albúmina sérica , esta albúmina sérica puede ser usada en radioinmunoensayos de MTX para distinguir entre los componentes precursores y metabolitos de alta concentración en la circulación. Se ha estudiado la farmacocinética de 7-OH - MTX después de la dosis de MTX (12 g / m^2) En 93 ciclos en 19 pacientes con osteosarcoma, hay una monofase sérica de eliminación con una vida media de 5.5 horas y por 12 horas después de 4 horas de infusión de MTX, los niveles de 7-OH- MTX excedieron al MTX hasta 16 veces. En 8 pacientes se encontró 30 veces más los niveles del 7 - OH - MTX que los niveles de MTX en 24 horas seguidas de la administración de MTX .

En otros 37 pacientes tratados con dosis intermedia $100 \text{ mg} / \text{m}^2$ MTX, las concentraciones de 7-OH-MTX excedieron de $1 \mu\text{M}$ después de 6 y 8 horas y la eliminación media y la vida media fue de 13 horas. En estudios separados con 29 pacientes pediátricos con Leucemia aguda linfoblástica no se encontró ninguna asociación con los niveles de 7-OH-MTX y la respuesta tumoral, duración de la respuesta o la toxicidad. La concentración de 7-OH-MTX excedió en gran medida en los tejidos que en el suero. Los niveles de este metabolito en la médula ósea de pacientes con sarcoma osteogénico se presentan hasta 3 veces aumentados después de 24 y 48 horas después de que el 60 % fue metabolizado a 7-OH-MTX (79).

En fluidos cerebrospinales (CSF) la concentración de 7-OH-MTX es de aproximadamente de 1 % comparado con los niveles séricos. En determinado grado el 7OH-MTX compite con el MTX por el transporte poliglutamación y unión a la enzima (en forma mínima) Esto es responsable de la durabilidad de inducción a la remisión con MTX ciertos tipos de tumores, sin embargo estos factores no son estudiados en la clínica (80).

Alteraciones en el metabolismo del MTX son identificados. Es probable que entre la formación de 7-OH-MTX se forme aldehído oxidasa.

Los niveles de 7 OH- MTX son 700 veces más alto en la bilis que en el suero Esta reacción se ha caracterizado bien en conejos y ratones y aparentemente esto puede ser saturable (81) MTX , aminopterina, diclorometotrexate son sustratos de aldehído oxidasa de hígado de conejo, mientras que MTX poliglutamado aumentado puede estar hidroxilado y este es un pobre sustrato para el aldehído oxidasa comparado con MTX (82) Esto puede prolongar la retención intracelular, poliglutamación retardada y retraso en la degradación de MTX o una menor potencia de 7 OH- MTX. Diferencias en la tasa relativa de 7 hidroxilación y poliglutamación se han observado en tejidos normales y neoplásicos, por ejemplo un hepatocito normal de ratón hidroxila MTX fácilmente solo si es pobremente poliglutamado (83) La poliglutamación de 7 OH- MTX también se observa en células normales así como malignas siendo esto muy importante en la acción selectiva de MTX después el 7 OH poliglutamado es mediblemente afectado de manera crítica en algunos procesos intracelulares. La poliglutamación de 7 OH-MTX es inhibido por la enzima dependiente de folatos AICAR Transformilasa y Timidilato sintetasa que también pueden potencializar de manera similar la poliglutamación de MTX ($K_i =$

3 a 0.4 μM respectivamente) El metabolito puede unirse a DHFR y también puede inhibirla ($K_i = 9 \text{ nM}$) cuando es comparado con MTX .

El ácido pterico metabolito del DAMPA es probablemente formado por la acción de carboxipeptidasa bacteriana del tracto gastrointestinal, la enzima específica para el glutamato terminal del péptido puede ser caracterizado por fuentes bacterianas. DAMPA aumenta su producción por la unión enzimática de MTX en una nueva región , de prueba en el tratamiento de tumores de pulmón.

La función de metabolitos en la producción de citotoxicidad por MTX o sus influencias en la actividad terapéutica es incierta (84) .

TOXICIDAD

La toxicidad primaria de los analogos de folatos es la mielosupresion y mucositis gastrointestinal , la incidencia de toxicidad depende de la dosis específica , horario y de la ruta de administración . El epitelio intestinal y oral es un poco más sensible a granulaciones y precursores plaquetarios, en el horario de la droga se produce mucositis intensa (esto se puede prolongar en concentraciones bajas) En muchos casos se presenta supresion medular .

La concentración umbral de MTX requerida para la inhibición de la síntesis de DNA en la médula ósea fue estudiada y se encontró que hace falta 10 nM en epitelio gastrointestinal y en el plasma de 5 nM . La gran sensibilidad del epitelio gastrointestinal se cree que resulta de la acumulación y persistencia del medicamento . Los efectos primarios toxicos mielosupresion y mucositis orointestinal aparecen de 3 a 7 días después de la administración de la droga. El desarrollo de reacciones toxicas esta en relación directa de la concentración de la droga y la duración de la exposición. En pacientes con infusión de 6 horas de MTX, en una concentración de 1 mM /Lt fue asociada con el desarrollo de toxicidad significativa , esta puede ser prevenida con la administración adecuada de leucovorin . Con el uso de un monitoreo cuidadoso de las concentraciones de 0.01 $\mu\text{M/Lt}$ despues de la última administración de leucovorin puede ser tolerada por la mayoría de los pacientes .

La nefrotoxicidad observada con la administración de dosis altas de MTX puede retardar la depuración e incrementar el efecto adverso de otras drogas . El daño renal puede estar relacionado con precipitación de MTX y 7OHMTX en orina ácida o puede estar directamente relacionado con daño tubular para prevenir este daño se da hiperhidratación y alcalinización de

la orina. En pacientes con función renal comprometida pequeñas dosis en orden de 25 mg provee toxicidad en sangre, por arriba de 3 a 5 días y resulta en una toxicidad en médula ósea, mucositis y la mielosupresión.

La toxicidad hepática consiste de elevación de las transaminasas, hiperbilirrubinemia e incluso fibrosis hepática . Otros efectos adversos incluyen dermatitis con eritema y descamación , reacciones alérgicas y neumonitis aguda, neurotoxicidad aguda y crónica sobre todo cuando se relaciona con radiación (85, 86).

Mecanismos de Apoptosis

La Apoptosis es el resultado de una serie de pasos controlados genéticamente que llevan a la muerte celular programada , las células que van a sufrir apoptosis se encogen pierden el contacto intercelular presentan condensación de la cromatina y degradación del DNA internucleosómico (87) Diferentes agentes quimioterapéuticos causan este mecanismo frecuente de muerte celular lo que también sugiere que las células neoplásicas pueden ser resistentes a la quimioterapia por su incapacidad para activar la respuesta de apoptosis.

Es posible que esto pueda explicarse por el trabajo de fibroblastos de embriones de ratón realizado por Lowe y colaboradores, que encontraron que el gen supresor de tumores p53 es crucial en los efectos citotóxicos de los medicamentos que se sabe que se dirigen sobre la topoisomerasa II (VP-16 y doxorubicina) (88) . La ausencia de la proteína p 53 aumenta de forma importante la resistencia celular a la citotoxicidad de los agentes antineoplásicos (89).

Aun más se observan mecanismos puntiformes en la proteína p53 en muchas neoplasias humanas resistentes a quimioterapia (89). En LAL recurrente la resistencia de la enfermedad correlaciona con la presencia de mutaciones de p53 que o se observa en tumores primarios. El gen p53 mutado no puede realizar funciones normales críticas para la apoptosis por lo que la ausencia o

mutación del gen parece ser un determinante antigénico adicional de la resistencia a las quimioterapias dirigidas a topo II.

Otros factores genéticos adicionales (bcl-2, bax y c- mic) que participan en el mecanismo de apoptosis pueden causar también resistencia a medicamentos apoptóticos . Una proteína de 26 kD , BCL, parece proteger a la célula del mecanismo de apoptosis cuando se trata con varios estímulos. Además la mayor expresión de bcl-2 inhibe la citotoxicidad inducida por medicamentos (90)

La muerte celular programada se describió en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, en este se encontraron dos genes autosomales recesivos relacionados con la muerte durante el desarrollo estos son ced-3 y ced-4, otro gen autosómico dominante represor de la muerte es el ced-9, posteriormente en mamíferos se identifica al gen bcl-2 que como ya hemos mencionado se relaciona como represor de la muerte celular programada, este se aisló en el breakpoint de t(14;18) de linfoma folicular de células B.(91)

Timocitos que sobreexpresaron bcl-2 no resistieron tratamiento con glucocorticoides y irradiaciones y induciendo la apoptosis (92) En la delección clonal en células autorreactivas conocidas se argumentó que la apoptosis es independiente de bcl-2 (93) .

Se ha descubierto también que bcl-2 se encuentra como una protección primaria en células neuronales en cultivo (PC12) (94) El bcl-2 tiene una función importante en células de varios linajes.

Se ha revisado con microscopía confocal la localización de la proteína, encontrando que puede estar como integrante de la membrana mitocondrial previniendo la muerte de fibroblastos y no dañando el DNA mitocondrial ni modificando las proteínas del complejo de cadena respiratoria (95) La delección de C-terminal anclado redirigió a la proteína bcl-2 al citosol dando una protección parcial a la apoptosis (93)

En células mieloides (HL60) Se transfectó con un vector retroviral conteniendo un gen de resistencia a neomicina (neo cell) , en el mismo vector conteniendo un cDNA que codifica para

Bcl -2 , estas células presentaron resistencia a la apoptosis cuando se expusieron a arabino silicitosina (Ara -c) Etoposido y Mitoxantrona. Hidrocloro (96) .

Kamesaki y colaboradores transfectaron células B de ratón con un gen bcl-2 . La expresión de bcl-2 abolió la citotoxicidad que de otra manera pudiera haber sido inducida por VP- 16 e incluso en presencia de la formación de un complejo de separación inducida por medicamentos compatibles a la de células no transfectadas (97).

Por otra parte el desarrollo de la resistencia a MTX en pacientes con LAL después de una remisión completa muchos centros reportan recaídas en un 30 % y 40%, en estos pacientes se reportan alteraciones fenotípicas y genotípicas asociadas en sistemas experimentales , incluyendo alteraciones cromosómicas cualitativas y cuantitativas en los niveles de transporte a través de la membrana , poliuglutamilacion intracelular y Dihidrofolatoreductasa (DHFR) intracelular (98) . El MTX esta estrechamente asociado con la inhibición de la enzima DHFR y la concentración de MTX requiere la inhibición de la enzima en proporciones directas de la cantidad de la enzima en la célula blancas . Es de interés también establecer los mecanismos más importantes de resistencia celular al MTX . Muchos hamsters y humanos presentan resistencia a MTX y se describe con incremento de los niveles de DHFR activa debido a la amplificación de gen (99) . Después de este reporte, se publicaron cuatro casos incluyendo uno que tiene bajo nivel de amplificación de genes, tratados con MTX , estos bajos niveles de amplificación pudo haber causado la recaída clínica a esta droga sin embargo se pregunta la frecuencia con la que esto ocurre en los pacientes tratados y no tratados , esto no ha sido adecuadamente dirigido.

Se ha reportado la amplificación de gen DHFR en casos de resistencia al MTX y también ha sido asociado con mutaciones en el gen p53 en blastos de LAL con resistencia clínica a esta droga (100).

Los dos mecanismos comunes de resistencia a MTX observados in vivo e in vitro en sistemas experimentales con células tumorales presentaron un incremento y decremento en la amplificación del gen de DHFR y se asocio nuevamente con la resistencia a esta droga, en casi la mitad de las muestras con blastos de LAL no se reporto una amplificación de este gen en un 30

% de los pacientes con resistencia clínica al MTX , en muchos de estos casos se explica la resistencia por factores mecánicos (6)

Es interesante anotar que entre los pacientes con alto nivel de amplificación detectados (pacientes con con 4 copias) pueden aumentar niveles de DHFR mRNA y actividad aumentada de la enzima.

JUSTIFICACION:

Se ha mencionado el grave problema que representan las recaídas en los niños con LAL debido al desarrollo de resistencias a los diferentes fármacos comúnmente empleados en su tratamiento incluyendo al MTX como uno de los principales. También se ha planteado que es necesario conocer los mecanismos por los cuales las células de LAL desarrollan esta resistencia. Se le a dado gran importancia a la amplificación del gen que codifica para la enzima DHFR. Si embargo estos mecanismos de amplificación pueden estar relacionados con otros factores que aun se desconocen, seria prudente comenzar a explorar varios de estos factores. El interés desarrollado por estudios sobre resistencia multifactorial comienza por evaluar la quimiosensibilidad de células leucemicas a fármacos tradicionales como el MTX.

El implementar estudios de quimiosensibilidad a fármacos in vitro puede ser una herramienta importante para determinar un pronóstico de respuesta a fármacos así como también para la evaluación de la purga invitro que se da para el trasplante de médula ósea.

La resistencia a fármacos puede estar relacionada a otros factores que pueden ser utilizados como pronostico, tal es el caso de la cantidad de DNA de las células malignas y la expresión de genes tales como el bcl-2.

HIPÓTESIS

-Los pacientes pediátricos con Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL) que presenten expresión elevada del gen bcl-2 tendrán una marcada resistencia a concentraciones in vitro de MTX .

-La expresión elevada del gen bcl-2 debe tener correlación con el inmunofenotipo y el índice de DNA de aislados de células leucémicas para causar pobre sensibilidad a MTX in vitro

-La expresión elevada del gen bcl-2 podría ser una de las causas principales de la resistencia a MTX en pacientes con LAL.

OBJETIVOS:

- 1.- Detectar aislados de células leucemicas resistentes a MTX por medio de ensayos de quimiosensibilidad in vitro de pacientes pediátricos con Leucemia Aguda Linfoblastica (LAL).
- 2.- Determinar la expresión del gen bcl-2 mediante la presencia de la oncoproteína codificada por dicho gen utilizando citometría de flujo, en células leucemicas aisladas de pacientes pediátricos con LAL y establecer si existe correlación con la resistencia a MTX
- 3.- Determinar si existe una correlación entre la resistencia a MTX y las variables: inmunofenotipo e índice de DNA .
- 4.- Contribuir al conocimiento sobre los factores que causan resistencia a drogas antimetabolicas como MTX.

MATERIAL Y METODOS

Para el cumplimiento de nuestros objetivos, las células leucemicas o linfoblastos fueron obtenidas por aspirado de médula ósea de 35 pacientes con diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblastica (LAL) . Los cuales fueron captados en el departamento de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría (INP)

El diagnostico se estableció con ayuda de las pruebas de laboratorio : 1) Citomorfología de acuerdo a lo reportado por el grupo Franco-Americano-Británico (FAB) , realización de pruebas citoquímicas (mieloperoxidasa, ácido peryodico de Schiff) y determinación del inmunofenotipo por medio de citometría de flujo, cuya metodología se explica más adelante.

METODO DE SEPARACION DE LINFOBLASTOS CON FICOLL HYPAQUE

Los aspirados de médula ósea presentan células de otras series hematopoyéticas, son células normales que podrían influir en nuestros resultados, dado que nos interesa ver la respuesta del MTX en células leucémicas o blastos, los separamos de todo lo que puede existir en el aspirado de médula ósea por centrifugación diferencial con Ficoll isopaque (linphoprep) con densidad de 1.077 g/ml

Se centrifugó los tubos conteniendo la médula ósea heparinizada durante 10 minutos a 2000 rpm a temperatura ambiente

Se retiró el "buffy coat" o anillo de separación y se diluyó con volumen idéntico de PBS (Amortiguador salino de fosfatos)

Utilizando tubos de 5 ml, se depositaron 3 ml de la dilución anteriormente realizada sobre 1 ml de Ficoll Hypaque.

Se centrifugó la mezcla durante 10 minutos a 2500 rpm.

Se extrajo las plaquetas lavando dos veces con medio de cultivo RPMI 1640. Centrifugando durante 1 minuto a 450 rpm y volviendo a extraer las plaquetas lavando dos veces.

Se ajustó la concentración de linfoblastos a 7 a 20×10^6 células por ml.

CONSERVACION DE LINFOBLASTOS POR CRIOPRESERVACION:

Dado que para realizar todos los ensayos de quimiosensibilidad a MTX es necesario tener los aislados de linfoblastos juntos y los pacientes de los cuales se obtuvieron llegaron en diferentes fechas al departamento de Oncología, los aislados tenían que ser conservados y la mejor y única opción es mediante la criopreservación, este método se ha convertido en una herramienta invaluable para muy diversos propósitos. Entre ellos esta la conservación de líneas celulares, tipificación por métodos celulares, transporte de muestras, etc.

Método:

1.- En un vaso de precipitado se colocó hielo picado y se enfrió dos tubos de ensayo por muestra.

Se colocó 1 ml de células previamente contadas (2 a 8×10^6 células / ml) que se han obtenido por separación con ficoll-hypaque.

2.- Por otra al mismo tiempo se preparó la mezcla de congelación, por cada ml de suspensión se preparó 1 ml que contiene:

0.6 ml medio RPMI 1640

0.2 ml suero fetal bovino

0.2 ml dimetilsulfoxido

La mezcla se maneja a 4°C para disminuir su toxicidad.

Se agregó 1 ml de la mezcla de congelación a cada criotubo manteniendolo en baño de hielo.

Se adiciono 1 ml de suspensión de la mezcla de congelación estratificando cuidadosamente para formar una interfase.

Los viales así preparados , se invirtieron lentamente para mezclar ambas capas.

De inmediato se introdujeron en alcohol a 4 ° C y se dejó en este sistema durante 2 horas a - 70° C.

Se pasó después al tanque de nitrógeno líquido a (-190 ° C) para almacenar hasta su uso.

METODO DE DESCONGELACION:

Este método fue empleado cuando se completo la cantidad de 35 aislados

Se preparó un baño María a 36 - 37 ° C

Se sacó inmediatamente el criotubo del nitrógeno líquido, para sumergirlo en el baño maría y se agitó.

Cuando desaparecieron casi por completo los cristales de hielo se vació el contenido lentamente y con agitación manual a un tubo de ensayo que contiene medio de cultivo RPMI con 10 % de suero fetal bovino a 4 ° C.

Se mezcló suavemente.

Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos.

Se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 10 ml de medio que contiene 10 % de suero fetal bovino .

Se centrifugó nuevamente a 1500 rpm por 5 minutos.

Se decantó y se resuspendió en 1 ml para sacar el porcentaje de viabilidad utilizando azul tripano y se ajusto a la concentración deseada

METODO DE ELIMINACION DE CÉLULAS MUERTAS

Los linfoblastos cosechados fueron criopreservados con medio RPMI 1640 suero fetal bovino y Dimetil sulfoxido (DMSO) a -190 °C hasta su uso .

Eliminación de células muertas posterior a la descongelación de las cepas:

Se realizó conteo de la viabilidad celular por medio de azul tripano, resuspendiendo en 0.5 ml de medio.

Se estratificó en tubos de Fisher con 0.5 ml de Ficoll- hypaque y la centrifugación se realizo por 5 minutos a 4800 rpm

Se separó la capa en otro tubo Fisher y se lavó en medio de cultivo a 3000 rpm por 1 minuto para posteriormente ajustar y contar la viabilidad .

Cuando se realizó la descongelación, se agregaron 20µl de heparina a la muestra durante el primer lavado.

La cepa fue separada en otro tubo Fisher y se lavaron con medio de cultivo a 1000 rpm por 1 min , posteriormente se ajustaron y se cuantifico la viabilidad nuevamente con azul tripano .

MÉTODO DE REDUCCION DE LAS SALES DE TETRAZOLIO (MTT) MODIFICADO.

Las sales de tetrazolio con compuestos cuaternarios de amonio solubles en agua que son convertidos por reducción a formazan insoluble en agua, pero si solubles en solventes orgánicos, no son auto-oxidables a causa de estas propiedades este grupo de compuestos ha sido en la medición de agentes reductores y como aceptores de electrones sobre catalizadores enzimáticos (101).

La producción de formazan insoluble por la reducción enzimática de las sales de tetrazolio a sido extensamente empleado para determinar la sobrevivencia de diferentes tipos de células neoplásicas por la actividad de las deshidrogenasas. Este método fué elegido por ser el más rapido y menos costoso para la determinación de la quimiosensibilidad al MTX de las células leucemicas.

Las células resuspendidas fueron cuantificadas y alicuotadas en tubos ependorff , ajustando en cada una de estas 200 , 500 , 1000 , 2000 , 3000 , 4000 , 5000 , 6000 , 1×10^6 células/ 100 µl

más 10 µl de bromuro de 4, 5 Dimetil - 2,5 Difenil tetrazolio (MTT) a una concentración de 5 mg /ml.

Los tubos fueron incubados a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ por 3 horas. Después de este periodo de incubación fueron centrifugados a 2500 rpm por 5 min, los botones celulares fueron resuspendidos en medio de cultivo fresco. Los cristales de formazan fueron disociados con 100µl de isopropanol - HCl 0.04N (isopropanol ácido), las soluciones coloridas se trasladaron a placas de 96 posas para su lectura. Las densidades opticas (D.O.) fueron medidas con equipo Minireader 2 Dinotech (laboratorio INC) Lector de microplacas a una longitud de onda de 540 nm. Cabe destacar que este método fue descrito originalmente por Mosman utilizando esta sal que es reducida solo por la actividad de la deshidrogenasa de las células vivas a un producto insoluble en agua o formazan (101, 102, 103).

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

ENSAYOS DE QUIMIOSENSIBILIDAD

Las células fueron resuspendidas en una concentración de 5.0×10^5 células / ml en medio de cultivo completo , se agregaron 0.5 µg / ml de mitomicina C (Sigma) y fue agitada en vortex . Se trabajaron las muestras con un volumen de 100µl cada una en tubos ependorff Posteriormente fue sustituido el medio de cultivo por las concentraciones de MTX 100, 10,1,0.1,0.01,.001µg/l .Se dejaron incubar en cámara de CO₂ a 37 ° C durante 72 horas, transcurridas las cuales se lavaron las células 3 veces con medio de cultivo fresco a 2000 rpm por 3 minutos.

Los porcentajes de células leucemicas sobrevivientes fueron cuantificados con la siguiente ecuación:

$$C.L.S = (D.O \text{ de las células tratadas} / D.O. \text{ de las células control}) \times 100$$

INMUNOFENOTIPO DE AISLADOS DE LINFOBLASTOS

La identificación del inmunofenotipo se realizó por medio de un panel de anticuerpos monoclonales (AcMo)conjugados a diferentes fluorocromos dirigidos contera el antígeno de membrana específicos para cada línea linfoide (T, B y NK). Para esto se colocaron 100µL de

aspirado de médula ósea (AMO) dentro de 15 tubos de 12 x75mm evitando que las paredes del tubo se contaminaran con glóbulos rojos. A cada tubo se le adiciono 20µL de los diferentes anticuerpos monoclonales , se trabajó por separado un tubo testigo el cual no lleva AcMo. Se utilizaron anticuerpos monoclonales que reconocen a las siguientes moléculas: HLADR, CD19, CD20, CD22, CD10, Cadenas μ ,Cadenas λ , Cadenas κ , CD2 CD3, CD5, CD7, ,TDT (Deoxinuclotidil transferasa), CD13, CD 33,conjugado con diferentes fluorocromos (dependiendo de la casa comercial por ejemplo ficoeritrina en el caso de Coulter) y se dejaron incubar a 4° C durante 20 minutos. Al termino del periodo de incubación, se adicionó 600 µL del reactivo de lisis (Coulter inmunoprep A: erythrocyte lytic agent) se mezcló en vortex durante 15 segundos y se le adicionó 265 µL de reactivo estabilizante B (Coulter inmunoprep B;leukocyte stabilizer) nuevamente se mezcló en vortex durante 15 segundos y se adicionaron 100 µL de reactivo fijador (Coulter inmunoprep C: cell membrane fixative) y finalmente, se mezcló durante 15 segundos. El análisis del inmunofenotipo de las células , con los diferentes AcMo se realizó en un citómetro de flujo EPICS-PROFILEX XL (Coulter Corporation) Los resultados se analizaron captando 5000 células /prueba, se utilizó como diluyente Isotón II de Coulter. Con un lápiz electrónico se creó una ventana para marginar los linfocitos totales distribuidos en una gráfica de puntos de acuerdo a su tamaño (forwar scatter) y granularidad o complejidad estructural (side scatter) Los resultados se expresan con el porcentaje de células positivas al fluorocromo conjugado con el marcador específico, dentro de la ventana de los linfocitos totales, el marcador se considera positivo cuando al menos el 25 % de las células lo expresan. La asociación de marcadores es lo que define la línea celular leucémica.

DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS INTRACELULARES CON LA REACCIÓN DE COULTER.

En 5 tubos (12 x75mm) se colocaron 50 µL de AMO más 100 µL del reactivo A (solución fijadora), se incuba durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente cada muestra se lava con solución buffer salino de fosfatos (PBS) y se centrifugo en frío a 3000 rpm durante 5 min, El paquete celular se resuspendió en 100 µL de reactivo B (Solución de permeabilización) y se les

adicionó 20 μL de cada uno de los AcMo TdT , CD10 , se tuvo como testigo a células que solo tenían buffer y no se les adiciono AcM . Todos los tubos se mezclaron en un vortex durante 2 segundos. Después de incubarlos 15 min a temperatura ambiente cada muestra fue lavada con PBS y se centrifugo a 300g y 4° C durante 5 minutos, el paquete celular fue resuspendido en 500 μL de isotón II. El análisis de las células con diferentes AcMo se realizó en el Citometro de Flujo EPICS- PROFILE XL, como se mostró anteriormente.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE DNA O INDICE DE DNA (IDNA) POR CITOMETRIA DE FLUJO

Para determinar el grado de confianza del IDNA de las células sanguíneas se tomaron muestras de sangre periférica de 30 niños sanos. Estas determinaciones se realizaron por la técnica Coulter.

En 15 tubos de 12 x 75mm se colocaron 100 μL de la muestra y se les adiciono 100 μL del reactivo de lisis coulter DNA – prep. (<0.1 % cianuro de potasio , <0.1% de azida de sodio, detergentes no iónicos, solución salina y estabilizadores) Se mezclaron en un vortex durante 15 seg y posteriormente se le agregaron 1000 μL de coulter DNA-Prep Satín (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de yoduro de propidio, RNAsa (tipo III A) 4 KU/ml de páncreas bovina, < de 0.1% de azida de sodio, solución salina y estabilizadores) se volvió a mezclar por 15 seg y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. La muestra fue analizada en el Citometro de Flujo EPICS-PROFILE XL, con rayo laser de argón .Los filtros fueron configurados para la colección de señales generadas por las células teñidas con yoduro de propidio. La alineación se hizo electrónicamente con las microesferas de DNA Check (Coulter) para que el canal modal para los núcleos en G0/G1 fuera de 200 (en la escala de fluorescencia de 0 a 1024) .

El equipo se ajusto para que en la mayoría de los experimentos se colocara un mínimo de 10,000 eventos a una velocidad de flujo de 50-70 eventos por segundo y subsecuentemente se analizó utilizando el programa de análisis específico para DNA : Multicycle Softwer, Phoenix Flow Systems, San Diego , CA. (103).

CALCULO PARA LA DETERMINACIÓN DEL INDICE DE DNA (IDNA).

El IDNA se calcula con el promedio del canal modal del pico G0/G1 de las células de la muestra a determinar (que podía ser o no aneuploide) entre el promedio del canal modal del pico G0/G1 de las células del testigo sano (diploides).

$$\text{IDNA} = \frac{\text{Contenido de DNA G0/G1 de población problema (aneuploide)}}{\text{Contenido de DNA G0/G1 de población diploide testigo}}$$

EXPRESIÓN DE bcl-2

Se cuantificó la expresión del gen bcl-2 en los cultivos y con tratamiento de MTX mediante anticuerpo monoclonal dirigidos contra la oncoproteína BCL -2 de 26 Kd, utilizando citometro de flujo EPICS- PROFILE XL Coulter en el cual se diseñó un protocolo con una ventana para aislar la población total de células homogéneas en cuanto a tamaño y complejidad (forward scatter y side scatter) y un gráfico cuadrático para discernir la población positiva y negativas de las células que tiñen con fluorocromo verde gam fitc (filtro FL 1 para citometria) y que por lo tanto sean positivas o negativas a dicha oncoproteína.

Como grupo control positivo se empleó un aislado de leucemia aguda mieloblastica tipo M3 diagnosticado y tipificado en el Laboratorio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría. Como grupo control normal se emplearon células de sangre periférica de niños sanos.

PROCEDIMIENTO DE LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS :

Las células fueron lavadas con PBS y centrifugadas manteniendo la temperatura a 37 ° C y 3000 rpm por 5 min para eliminar todo resto de medio de cultivo y tratamiento de las diferentes concentraciones de MTX a las que fueron expuestas. El botón celular fue resuspendido en 100µl

de PBS y se adicionó 20 µl de AcMo bcl-2 puro más 5 µl del fluorocromo fitcoeritina se agitó suavemente durante 10 segundos y se dejó reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente.

Para cuantificar la expresión de AcMo bcl-2 intracelular 50 µl de la muestra de cultivo previamente lavada y resuspendida en PBS como se describió antes, se adicionaron 100 µl de reactivo A (solución fijadora) se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las muestras con PBS y se centrifugaron a 300g durante 5 minutos a 37 °C, el botón celular resultante fue resuspendido en 100 µl de reactivo B (solución de permeabilización) y se les adicionó 20 µl del AcM bcl-2 más 5 µl del fluorocromo fitcoeritina. Se dejó reposar por 20 minutos a temperatura ambiente para que se uniera el AcMo con el fluorocromo y este a su vez con la proteína bcl-2.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en tubos de 12 X 75 mm .

RESULTADOS

Características de la población de niños con LAL.

De los 35 pacientes estudiados 12 fueron del sexo masculino y 23 fueron del sexo femenino. Los pacientes fueron clasificados por edades como se puede observar en la tabla 1. El grupo de edad más frecuente fue de 2 a 6 años.

INTERVALOS	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAJE
Menores de 1 año (lactante menor)	2	5.7
Entre 1 y 2 años (lactante mayor)	5	14.3
Entre 2 y 6 años (preescolar)	15	42.8
Entre 6 y 10 años (escolar)	9	25.7
Más de 10 años	4	11.4

TABLA 1. Frecuencias de edades de los 35 pacientes con diagnóstico de LAL estudiados.

Estudios Morfológicos

Con el análisis microscópico de las muestras de médula ósea se determinó el subtipo morfológico de las células leucémicas de acuerdo con los criterios del grupo FAB.

Los resultados revelaron un predominio de LAL tipo 1 (tabla 2)

Tipo morfológico de LAL	Número de casos	Porcentaje
L1	19	54.3
L2	14	40
L3	2	3.8

TABLA 2. Resultados morfológicos de acuerdo a FAB en los 35 pacientes estudiados.

RESULTADOS DE INMUNOFENOTIPOS

En la tabla 3 se resumen los resultados de inmunofenotipos de las células de los 35 pacientes (realizados por la técnica de detección de antígenos intracelulares), en donde se ve un marcado predominio de inmunofenotipo pre B con CD10 positivo. La presencia de este tipo de leucemia se ha reportado en 70% de los niños con LAL (San -Miguel y Duque, 1996) Seguido de la nula (CD10-). Dos de los pacientes presentaron inmunofenotipo B que concuerdan con la morfología de LAL 3.

Solo 3 de los 35 pacientes presentaron inmunofenotipo T.

SUBTIPO	Nó DE CASOS	PORCENTAJE (%)
Pre B calla positivo	21	60
Pre B calla negativo	9	25.7
B	2	5.7
T	3	8.6

TABLA 3. Clasificación inmunofenotípica de 35 pacientes pediátricos con LAL

RESULTADOS DE ÍNDICE DE DNA

PLOIDIA	TIPO	INTERVALO	Nó CASOS	% TOTAL
DIPLOIDE	DIPLOIDE	0.925-1.077	16 (45.7%)	57.2
ANEUPLOIDE	HIPODIPLOIDE	<0.925	3 (8.6%)	42.8
ANEUPLOIDE	HIPERDIPLOIDE A	1.07-1.16	7 (20%)	
ANEUPLOIDE	HIPERDIPLOIDE B	>1.16	9 (25.7%)	

Tabla 4.- Se muestra la distribución de los IDNA en 35 pacientes pediátricos con LAL. La mayoría de estos presentaron IDNA aneuploide del tipo hiperdiploide B, el tipo hipodiploide sólo se presentó en 3 pacientes.

Los valores de intervalos de confianza del índice de DNA (IDNA) fueron determinados en células de sangre periférica de niños sanos. Los resultados se pueden apreciar en la tabla 5, donde se observa el valor medio de IDNA de 80 niños sanos utilizados como población testigo. El valor medio de IDNA fue de 1.001 ± 0.038 , a partir de este valor se obtuvo un intervalo de confianza con dos desviaciones estándar que agrupa el 95 % de la población, que oscila de 0.925

a 1.077 y donde el valor medio de la intensidad de fluorescencia fue de $0.103.8 \pm 0.326$ con un coeficiente de variación (CV) de 4.88.

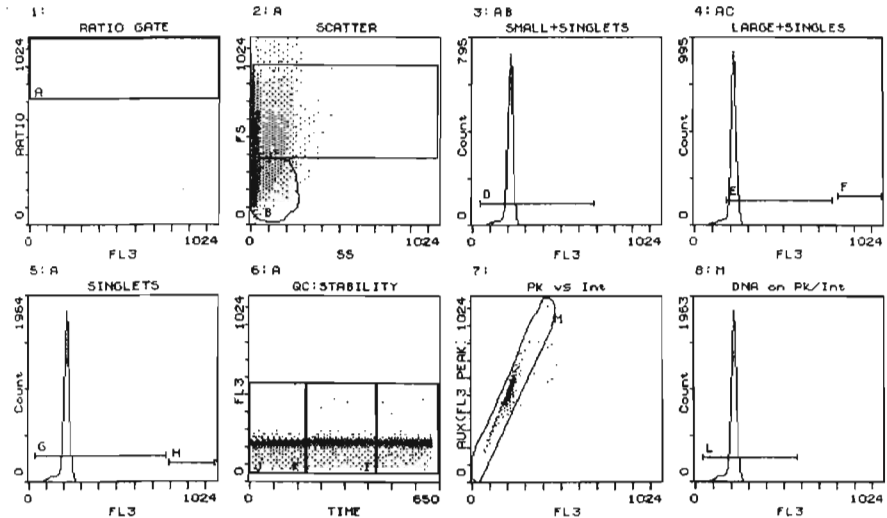
Tamaño de la población testigo	n = 50
Índice de DNA	1.001
Desviaciones estándar	0.03804
Intervalos de confianza ± 2 Desviaciones (95.4%)	0.925 –1.077
Media de intensidad de fluorescencia G0/G1	103.8 ± 0.326
Media del coeficiente de variación del pico G0/G1	4.8

Tabla 5.-Cuantificación de IDNA de el grupo testigo (niños sanos)

OP ID: LR

Stop Time: 650 seconds, 69040 events

Cytocentrings from protocol EVERY BODY DNA



Stats: Normalized.

Linkage: Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A A	100	69040	202.1	1016.0	208.0	1016.0	14647	14.37	0.12
2	B B	39.9	27560	55.6	237.8	16.0	208.0	260	85.32	31.15
	C C	48.2	33267	85.1	521.6	16.0	368.0	178	79.62	23.32
6	I I	30.1	20810	834.3	204.1	952.0	208.0	149	10.37	13.04
	J J	31.9	22014	146.7	197.6	128.0	208.0	155	59.02	15.00
	K K	38.0	26213	498.5	204.3	504.0	208.0	149	21.52	14.11
7	M M	99.8	68919	201.9	497.3	208.0	520.0	2010	13.75	14.01
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	D D	100	27560	205.0	209.2	211.0	795	5.91	40.0	656.0
4	E E	93.7	31169	213.8	213.3	211.0	995	5.47	170.0	746.0
	F F	0.0	1	864.0	864.0	864.0	1	0.05	778.0	1016.0
5	G G	100	69037	205.6	210.5	211.0	1964	5.74	36.0	734.0
	H H	0.0	1	864.0	864.0	864.0	1	0.05	764.0	1014.0
8	L L	100	68919	205.4	210.5	211.0	1963	5.74	46.0	552.0

Figura 1.- Protocolo del Programa multicyle de Citometría de Flujo, parte 1 ,ajuste de la región de células individuales. Parte 2, gráfica de la dispersión de celulas (tamaño contra cranularidad), Parte 3, localización del pico diploide , Parte 4 y 5 localización de la población del Gate C. Parte 6 y 7 linealidad de la cuantificación de núcleos con respecto al laser del Citometro de Flujo

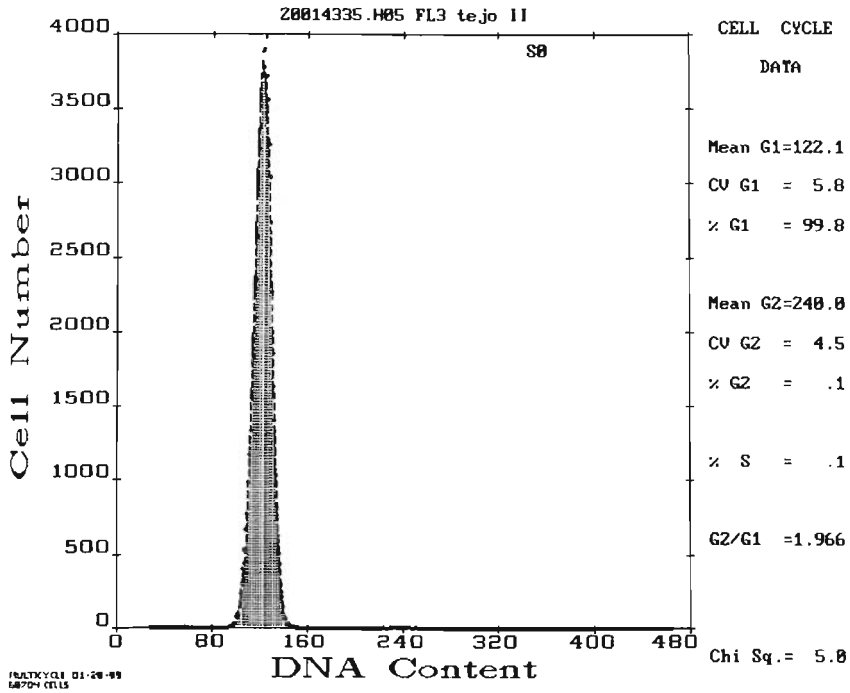


Figura 2 :Histograma representativo del contenido de DNA de una muestra de sangre periférica utilizada como testigo sano.

Los datos de la derecha fueron obtenidos con el análisis del histograma, mediante el programa Multicycle, donde se muestra la media y el coeficiente de variación del pico G0/ G1.

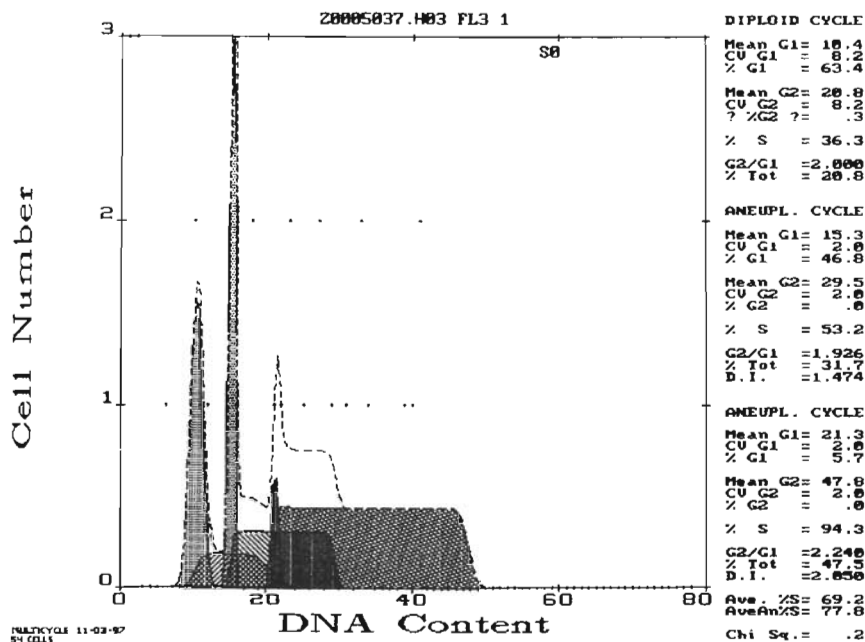


Figura 3.- Histograma representativo del contenido de DNA , el primer pico corresponde al estándar interno normal, los picos siguientes representan a los ciclos celulares de células mononucleares de médula ósea. Las mesetas son identificadas inespecíficamente entre dos picos que superponen al pico G2, los datos de la derecha se obtuvieron con el análisis de los histogramas del programa Multicycle.

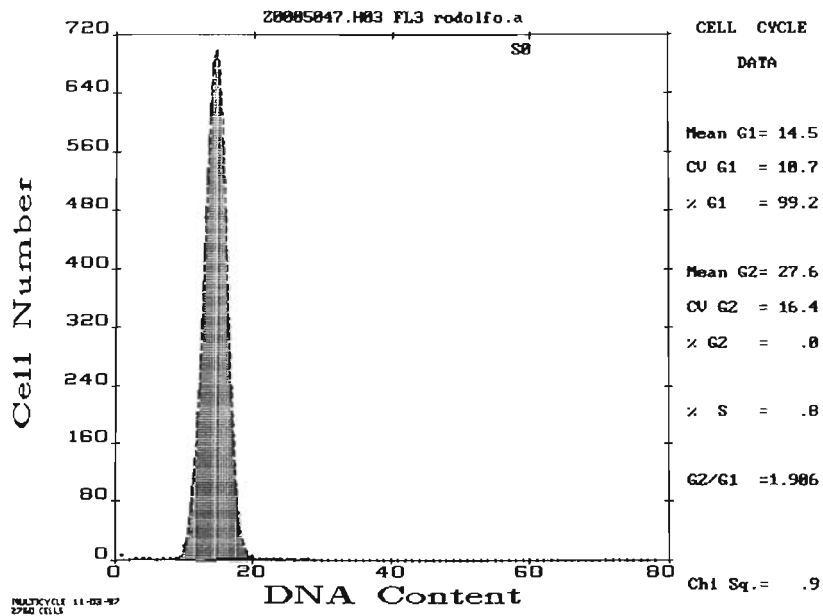


Figura 4.- Histograma representativo del contenido de DNA de células mononucleares estancadas en fase G1 del ciclo células , los datos de la derecha se obtuvieron por el análisis del histograma mediante el programa Multicycle , donde se muestra la media y el coeficiente de variación del pico G0/G1 .

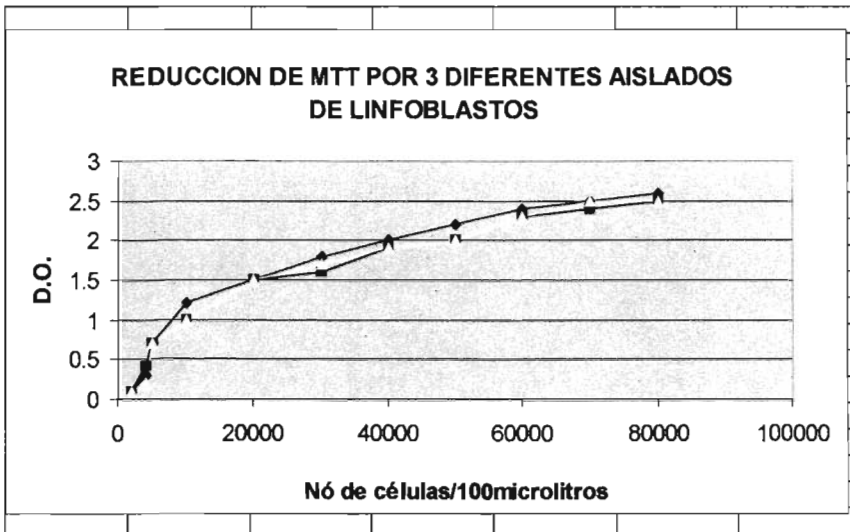
ENSAYO COLORIMETRICOS CON SALES DE TETRASOLIO

Estos ensayos demostraron ser de gran sensibilidad ya que se pudo detectar hasta el 1% de células vivas y esto es bastante claro en la curva que se muestra (grafica 1) este método puede ser una buena alternativa para medir viabilidad celular si no se cuentan con recursos como un citómetro de flujo. Además la técnica resulta ser sencilla y rápida pues el tiempo de reacción sin catalizador es de media hora , en el caso de emplear un catalizador como es el fenasin metosulfato los tiempos de reacción se reducen hasta 20 minutos , en este estudio no fue empleado dicho catalizador para dar un manipuleo más cuidadoso de las muestras.

Se usaron tres aislados de células neoplásicas diferentes para determinar la relación entre número de células y la cantidad de formazan generado durante la incubación con MTT. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Mosman en 1983 (101). En cada número de células la cantidad de formazan incrementó de manera no lineal.

Con las observaciones de Mosman se sugirió que el MTT podría reaccionar con las enzimas mitocondriales presentes en las células vivas, si se hipotetiza la relación entre los niveles de MTT reducidos y los tiempos de incubación prolongados se puede también relacionar con la muerte celular progresiva.

Estos estudios de Mosman y Green en 1984 prueban que la cinética proliferación y actividad celular son medibles con dichas sales y además que esto se ajusta a un modelo de cinética de Michaelis, siendo los valores de Km diferentes para cada tipo de línea celular. De acuerdo a los resultados de este trabajo se demostró que no hay diferencia en la cinética de reducción de las sales de MTT en diferentes aislados de linfoblastos, por lo tanto se decidió trabajar con 50000 células por ml como estándar para todos los aislados en los ensayos de quimiosensibilidad.



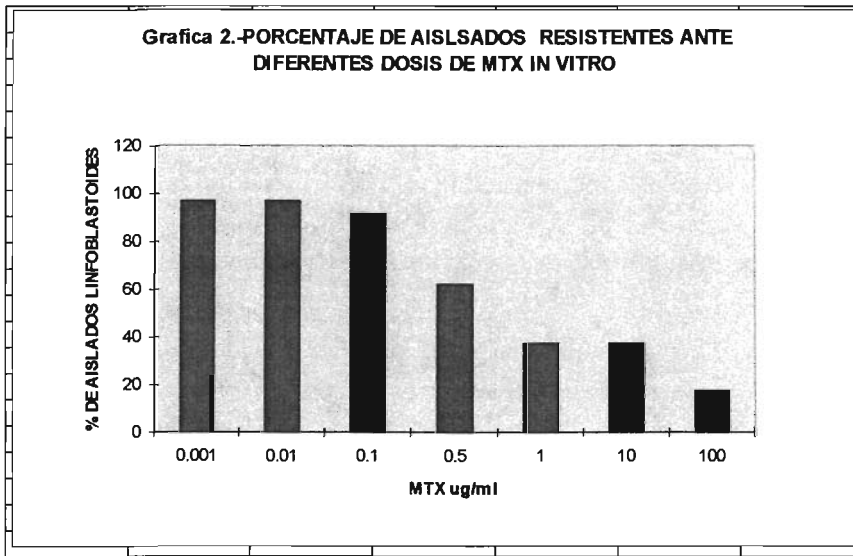
Grafica 1: Producción de formazan por tres diferentes aislados linfoblásticos. Se observa que no hay diferencias significativas en el comportamiento de los tres aislados ante el tetrazolium.

Quimiosensibilidad ante MTX.

En la grafica 2 se presentan los resultados del 35 aislados de linfoblastos y su respuesta a cada una de las concentraciones de MTX .

Se tomo como aislado resistente a aquellos que al ser expuestos a la concentración del fármaco el valor de células leucemicas sobrevivientes (CLS) sea superior al 50 %.

Se aprecia una clara resistencia de la totalidad 97% de los aislados en las concentraciones más bajas (0.001µg/ml); al igual que en la concentración de 0.01µg/ml; para la concentración de 0.1µg/ml la resistencia fue de 91.42%; para 0.5 µg/ml fue 62%; para 1µg/ml y 10 µg/ml hubo un resultado similar de 37.14%; por último la concentración más alta 100 µg/ml fue de 17.14%)



Gráfica 2.- Se observa la mayoría de los aislados de linfoblastos con una clara resistencia al MTX en las mas bajas concentraciones 0.001 y 0.01 µg/ml

Existen numerosos reportes en los que se menciona que la hiperploidia en pacientes pediátricos con diagnostico LAL es de muy buen pronóstico en las siguientes tablas 6,7,8 y 9 se presentan los resultados de quimiosensibilidad ante concentraciones crecientes de MTX y el valor obtenido de las determinaciones de IDNA Por citometría de flujo.

Aislado #	IDNA DIPLOIDE (0.923-1.077)	% DE CLS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MTX µg/ml						
		.001	0.01	0.1	0.5	1	10	100
1	0.92	100	100	91	28	19	15	10
2	1.018	100	90	21	17	16	3	0
5	0.932	100	100	100	90	60	31	0
10	1.026	100	100	80	20	40	30	21
12	0.992	100	100	100	30	18	10	0
16	1.067	100	98	74	10	6	6	0
17	1.071	100	100	100	88	60	83	78
19	1.023	100	100	100	98	38	22	49
20	1.075	100	100	100	100	68	40	16
22	1.069	100	100	80	80	60	60	27
23	1.073	100	100	80	65	40	34	21
24	1.036	100	100	100	80	80	60	50
26	1.049	100	100	75	25	10	7	0
27	1.062	100	100	63	40	40	39	0
31	0.994	100	70	58	55	34	11	0
33	1.027	100	100	78	49	21	5	0

Tabla 6 : Resultados de porcentaje de células leucémicas sobrevivientes con un IDNA Ddiploide en diferentes concentraciones de MTX

AISLADO	IDNA Hiperdiploide A (1.07 a 1.16)	% DE CLS ANTE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MTX µg/ml						
		.001	0.01	0.1	0.5	1	10	100
6	1.145	100	100	100	83	98	20	5
11	1.149	100	100	100	100	80	79	30
13	1.153	100	100	75	75	20	7	0
14	1.135	100	100	87	62	32	22	15
15	1.16	100	100	100	98	78	50	24
25	1.121	100	100	80	55	30	25	15
30	1.118	100	100	100	68	30	25	14

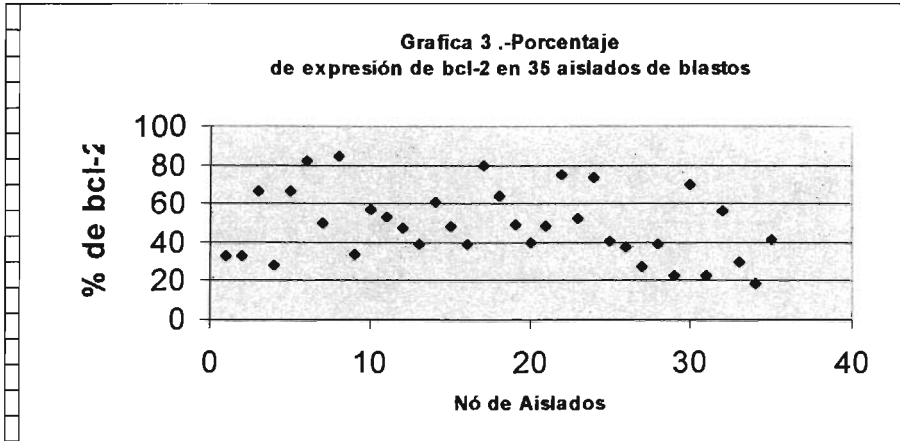
TABLA 7: Promedio células leucémicas sobrevivientes con IDNA hiperdiploide expuestas en concentraciones crecientes de MTX .

AISLADO	IDNA Hiperdiploide B (> 1.16)	% DE C.L.S . EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MTX ug/ ml						
		.001	0.01	0.1	0.5	1	10	100
3	1.236	100	100	90	86	81	72	50
7	1.556	39	32	25	25	23	20	18
9	1.293	88	78	55	65	44	22	14
18	1.175	100	94	31	26	30	19	10
28	1.267	100	96	50	30	18	19	0
29	1.168	100	79	40	40	36	10	0
32	1.334	100	100	100	70	56	27	13
34	1.191	100	100	87	63	25	18	11
35	1.184	100	90	82	67	50	40	21

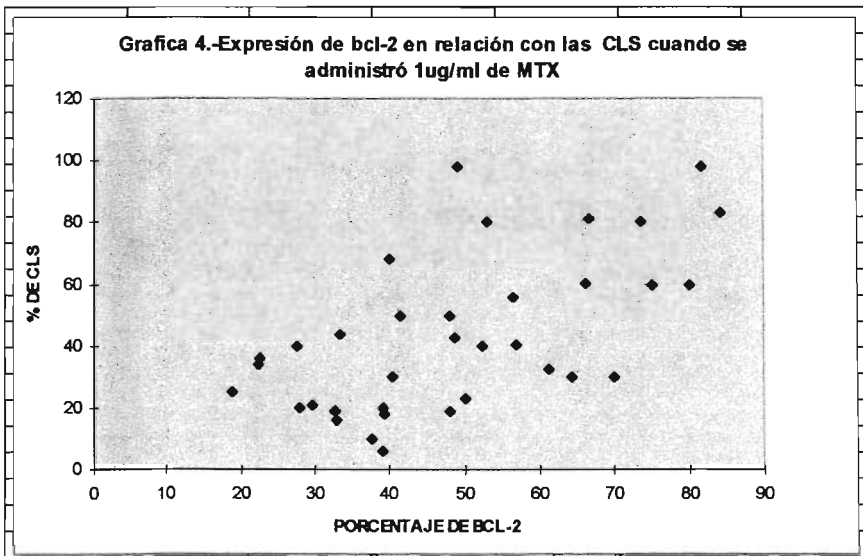
TABLA 8: Promedio de Células leucemicas sobrevivientes con índice de DNA Hiperdiploide B expuestas concentraciones crecientes de MTX

AISLADO	IDNA Hipodiploide(<.925)	% DE C.L.S . EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MTX ug/ ml						
		.001	0.01	0.1	0.5	1	10	100
4	0.496	100	100	97	22	19	12	0
21	0.871	80	78	65	55	43	22	15
32	0.559	100	100	100	70	56	27	12

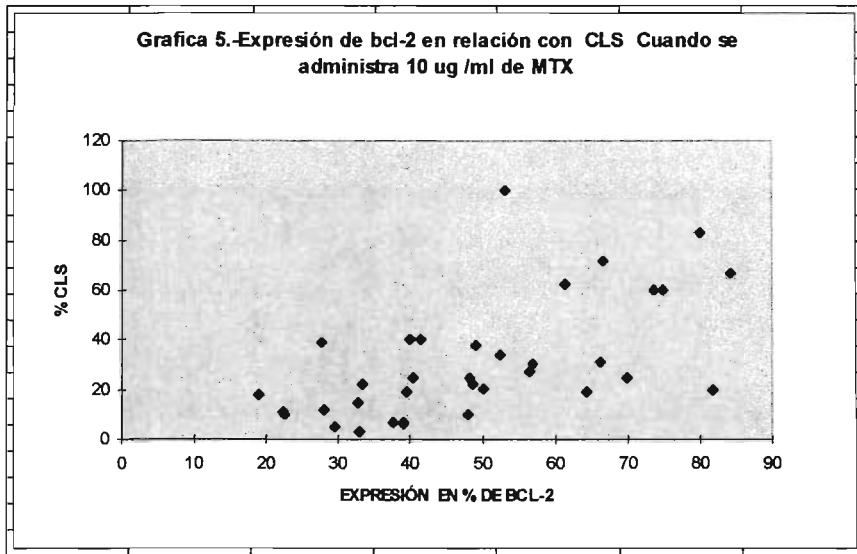
TABLA 9: Promedio de %Células leucemicas sobrevivientes con índice de DNA Hipodiploide , expuestas a concentraciones crecientes de MTX



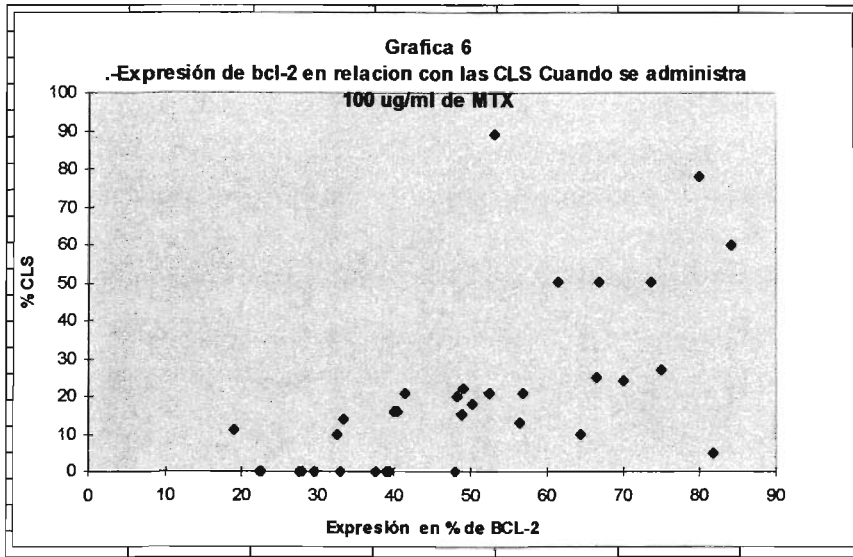
En este grafico 3 .-podemos apreciar que la expresión del gen bcl-2 en la mayoría de los aislados de linfoblastos fue de entre un 20 a 80%



Grafica 4.- se observa la dispersión de los puntos ligeramente a la derecha es decir que se presentan 45.7% de los aislados de linfoblastos con >50% de porcentaje BCL-2 y células leucémicas sobrevivientes cuando se administra 1 µg/ml



Grafica 5.- se observa la presencia de los puntos desviados hacia la parte inferior derecha de la grafica, indicando que existe un porcentaje menor de células leucemicas sobrevivientes. 42.8 % de los aislados de linfoblastos presentaron >50% de BCL-2 cuando fueron tratados con 10 µg/ ml de MTX..



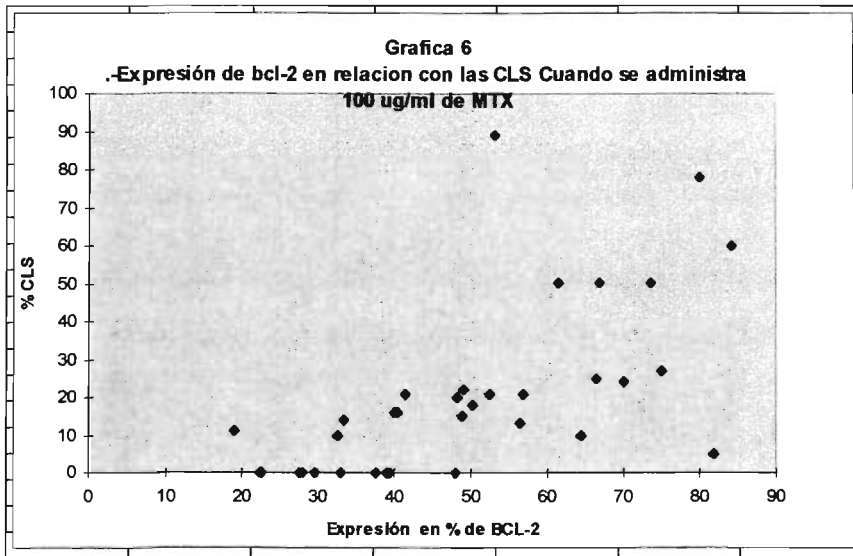
Grafica 6.- Se observa la presencia de los puntos hacia la parte inferior de la grafica, indicando un porcentaje de células leucemicas sobrevivientes menor y 42.8 % de los aislados con porcentaje >50% de BCL-2 cuando se aplicó 100µg/ml de MTX..

DISCUSIÓN:

ENSAYOS COLORIMERICOS

Los ensayos colorimétricos con sales de tetrazolio (MTT) resultaron ser una técnica adecuada para obtener los resultados deseados ya que estas sales se fijan a las células vivas, metabólicamente activas y en proliferación. La cuantificación de formazan generada es directamente proporcional al número de células en un rango amplio usando una población de células homogéneas. La actividad celular produce más formazan que detritos celulares y nos permite medir los eventos de actividad o la ausencia de proliferación celular. Esta propiedad se debe a la consistente fijación del MTT solamente en mitocondrias activas (102).

La ventaja de estos ensayos colorimétricos esta en que los sustratos no interfieren con la cuantificación de la producción de formazan y es comprobable que las condiciones y



Grafica 6.- Se observa la presencia de los puntos hacia la parte inferior de la grafica, indicando un porcentaje de células leucemicas sobrevivientes menor y 42.8 % de los aislados con porcentaje >50% de BCL-2 cuando se aplicó 100µg/ml de MTX..

DISCUSIÓN:

ENSAYOS COLORIMERICOS

Los ensayos colorimétricos con sales de tetrazolio (MTT) resultaron ser una técnica adecuada para obtener los resultados deseados ya que estas sales se fijan a las células vivas , metabolicamente activas y en proliferación .La cuantificación de formazan generada es directamente proporcional al número de células en un rango amplio usando una población de células homogéneas. La actividad celular produce más formazan que detritos celulares y nos permite medir los eventos de actividad o la ausencia de proliferación celular. Esta propiedad se debe a la consistente fijación del MTT solamente en mitocondrias activas (102) .

La ventaja de estos ensayos colorimétricos esta en que los sustratos no interfieren con la cuantificación de la producción de formazan y es comprobable que las condiciones y

componentes del medio RPMI no intervinieron con la medición del producto (101). En los ensayos de quimiosensibilidad se lavaron las células para quitar todos los residuos de MTX, por lo que se evitaron reacciones secundarias con el fármaco empleado en los pasos finales de los ensayos.

Los ensayos pueden ser analizados pocos minutos después de la adición de isopropanol – ácido. Además, el color extraído resulta ser estable a temperatura ambiente, se visualizan claramente y nos permite darnos una idea cualitativa del resultado .

Los ensayos con MTT ofrecen, además, otra ventaja. Esta sal no se intercala ente el DNA como lo hacen algunos elementos como el Timidita tritiada (³H-Thymidina) , lo que puede modificar de manera importante la cuantificación de DNA.

INMUNOFENOTIPO E INDICE DE DNA

Actualmente la mayoría de los investigadores que se dedican a estudiar las leucemias están de acuerdo en que es un error hacer un tratamiento uniforme para todos los pacientes con LAL , Esto es poco recomendable porque la LAL es una enfermedad muy heterogénea, es decir que los pacientes que presentar esta enfermedad pueden tener respuestas diferentes por numerosos factores que caracterizan a cada paciente, también se refiere a que la LAL es variable en forma de presentación morfológica, características inmunofenotípicas y citogenéticas. Todo esto influye de manera muy importante en el pronóstico y sobrevida de los pacientes, es por esto que los estudios que se implementen para mostrar las características iniciales al momento del diagnóstico de los niños con LAL deben darle una gran importancia, y así predecir con mayor precisión la respuesta a los tratamientos y ofrecer una mejor supervivencia y curación a estos pacientes .

Desde hace algunos años se a manejado que los cambios citogenéticos representan un factor muy confiable para poder determinar la quimioterapia específica para cada paciente. Entre los grupos que investigan estos factores y que sobretodo aportan más datos se encuentran St Jude Children's Research Hospital, Memphis (SJCHRHM) quienes inicialmente describen el valor pronóstico del IDNA en los blastos de pacientes con LAL de progenitores de células B(104). También se encuentra el grupo del Pediatric Oncology Grup (POG) Quienes confirmaron el valor

pronóstico del IDNA y que incluso a la fecha realizan estudios retrospectivos con los grandes grupos de pacientes que manejan (105). Desafortunadamente, en muchos lugares de nuestro país aun no se cuenta con la tecnología para obtener todos los datos pronósticos.

Primeramente en este estudio se realizó el análisis de la morfología e inmunofenotipo de los pacientes con LAL para incluirlos en el estudio.

Andreeff en 1992 menciona que el subgrupo de LAL con fenotipo B y con un pico de frecuencia casi siempre es de morfología L3, el cual tiene un mal pronóstico aun peor que el de inmunofenotipo T, respondiendo mal a las quimioterapias. La frecuencia en este grupo se menciona entre 1 y 2 % (106) para los casos particulares de LAL3. Además se observó una hipodiploidia con un IDNA de 0.496, esta hipodiploidia También es un factor de mal pronostico para los niños con LAL. Esto se ha asociado con la pérdida de cromosomas completos (número modal de 45) con una frecuencia alta de traslocaciones no balanceadas que involucran a las inmunoglobulinas y al gen *c-myc*, o la formación de cromosomas dicéntricos, lo que repercute en un mal pronóstico (107, 108).

Los pacientes con LAL presentaron diferentes tipos inmunológicos de blastos de los cuales sobresalen como grupo más frecuente LAL pre B con CD10+, este antígeno CALLA es uno de los marcadores más útiles para la clasificación inmunológica de las LAL (109) Se ha informado de una estrecha relación entre la presencia de hiperdiploidia y la expresión de antígeno CALLA..La asociación entre el contenido de DNA anormal y la expresión de antígeno de diferenciación en las células leucémicas podrían estar relacionadas con el proceso de transformación maligna, lo que probablemente se deba a que el progenitor de las células linfoides con este inmunofenotipo sea más susceptibles a la transformación que produce la hiperdiploidia o a la que la clona leucémica hiperdiploide que surge de la células tronco pluripotencial no puede diferenciarse más allá del estado fenotípico CALLA+, debido a las anomalías cromosómicas hiperdiploides. Sin embargo esta asociación y sus causas permanecen aun sin ser comprendidas..

Los grupos de investigación SJCRH y del POG mencionan un pronostico incierto para los pacientes con inmunofenotipo T y además con fenotipo hiperdiploided, mencionando la mala evolución clínica de estos grupos.

Debido a que se ha reportado inestabilidad en la medición del IDNA usando eritrocitos de pollo y trucha para determinar el intervalo de confianza de IDNA, en el presente trabajo se empleó

eritrocitos de niños sanos el cual permitió la estabilidad al determinar el IDNA y permitir la clasificación de los pacientes con LAL.

Los pacientes con IDNA por debajo de este intervalo se clasificaron como hipodiploides los pacientes con IDNA por arriba de este se clasificaron como hiperdiploides , los pacientes que presentaron IDNA dentro del rango 0.925 –1.077 se les clasificó como diploides.

Es importante mencionar que la cuantificación de DNA por citometría de flujo representa un método automatizado eficaz y confiable que aporta valiosa información pronóstica para los pacientes con LAL.

Se ha reportado que la incidencia total de aneuploidias detectadas por citometría de flujo oscila entre 25 y 40 % de los casos de LAL (110) siendo más alta en el caso pediátricos (109) La incidencia de aneuploidia en este trabajo fue de 42.8% .

Las hiperdiploidias detectadas fueron de tipo hiperdiploidie A (1.077- 1.16) y del tipo hiperdiploide B(>1.16) con 7 y 9 casos, respectivamente estos resultados concuerdan con la mayor frecuencia hiperdiploide reportada por los investigadores SJCHRH y del POG. Estos grupos demuestran que la presencia de hiperdiploidia con IDNA =1.16 (>53 cromosomas por célula leucémica) constituye el factor pronóstico individual más favorable en los pacientes con LAL (104) .Las células leucémicas generalmente muestran la adición simple de cromosomas sin alteraciones estructurales asociadas (111) Por otra parte estos casos suelen presentar un inmunofenotipo común (pre B CD10+) (112) que como es conocido es el grupo que mejor pronostico tiene en los niños con LAL (104)

Por otra parte cabe hacer mención que mediante la citometría de flujo es imposible la detección de las células pseudodiploides con traslocaciones cromosómicas desbalanceadas o anomalías numéricas simples ya que en estos casos la cantidad de DNA de las células leucémicas apenas se modifican (109, 113) También se ha mencionado que las diferencias en la detección de aneuploidias por citometría de flujo puede depender de los cromosomas involucrados ya que diversos cromosomas normales o traslocados tienen pequeñas diferencias de DNA imperceptibles por citometría de flujo (114) Otros factores menos probable que pueden afectar es la unión desmedida de fluorocromo al DNA de células malignas por el tipo de cromatina de los linfoblastos (115) Se ha informado sobre las alteraciones cromosómicas estudios en 329 pacientes con LAL

, que el cariotipo fue normal en 35 % de los pacientes y anormal en 65% , de estos últimos, el 31% presento alteraciones estructurales y 34% alteraciones numéricas (116).

El contenido de DNA determinado por citometría de flujo puede complementar el análisis de cariotipo. El IDNA puede ser medido aún cuando las células en metafase estén en una proporción baja. Es muy importante que en los pacientes con LAL se haga el estudio de cariotipo para detectar alteraciones estructurales y anormalidades numéricas específicas que pueden tener importancia pronóstica.

El porcentaje de células en la fase S también se ha relacionado con la respuesta terapéutica de los niños con LAL con una remisión media más corta en el grupo de pacientes que presentan más del 6% de células en fase S. Se ha encontrado que los pacientes con LAL que presentan una hiperdiploidia relacionada con el inmunofenotipo común T presentan un porcentaje más alto de fase S que los pacientes diploides, lo cual es el efecto de las dos variables .

QUIMIORESISTENCIA E INDICE DE DNA

Ya hemos hablado de la importancia como valor pronóstico del IDNA. En este trabajo nosotros quisimos también visualizar la respuesta de linfoblastos ante uno de los fármacos más comunes para combatir la LAL me refiero al Metotrexate , de este se conocen algunas posibilidades de mecanismos de resistencia pero aun es un campo interesante de estudio ya que no se ha descrito por completo.

De acuerdo a lo discutido en la sección anterior y observando los resultados de la tabla 6 podemos apreciar que aparentemente el IDNA entra en los rangos diploide , se menciona que una de las limitantes de la citometria de flujo es que no cuantifica anormalidades numéricas ni alteraciones estructurales , por lo que estaríamos en presencia de cepas pseudodiploides que probablemente tienen estas alteraciones , lo anterior pudiese ser una de las causas de la baja mortalidad in vitro , aunque dentro de las anormalidades se pensaría que el gen bcl-2 tuviese algo que ver con este efecto de resistencia al MTX in vitro.

Cabe mencionar que sería de interés continuar la investigación con estudios más profundos de identificación de otras anormalidades genéticas.

Analicemos ahora lo que se presenta en los aislados con IDNA hiperdiploide tipo A (1.07 a 1.16) aunque solo 7 de los 35 pacientes presentaron este índice es muy claro que los blastos tienen resistencia, lo mismo ocurre con las cepas que se demostraron con índice DNA hiperdiploide tipo B (> 1.16).

Dado que nuestra población de cepas hipodiploide es escasa no podemos asegurar que la ploidía se este tipo este relacionada con la resistencia a MTX. Sin embargo los resultados indican que aun en concentraciones altas de 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ existen células leucemicas vivas con capacidad proliferativa.

La cinética del MTX induce cambios que fueron similares a lo reportado por Huschitscha . L. Y. 1996 después de la exposición a Fluorouracilo y MTX (117) Después de 4 hrs se observo la acumulación de las células en la fase G1 del ciclo celular (Datos observados con Citometría de Flujo) Las características apoptoticas se reconocieron morfológicamente después de 24 horas de tratamiento con MTX también observo una aparente presencia de anclaje intranucleosomal al DNA. Probablemente esto hace que se impida la transcripción de los genes contenidos dentro de los nucleosomas haciendo más prolongada la fase del ciclo celular sin iniciar un evento letal , como lo observa el mismo autor cuando experimenta con fluorouracilo .

En otros estudios se menciona que la aparición temprana de fragmentos de 50 Kpb , detectados utilizando electroforesis por gel de filtración por inversión son característicos de la apoptosis (118)

Además en células tronco la muerte por apoptosis fue similar a concentraciones altas de MTX, sin embargo no se detecto anclaje de DNA a las 48 horas de exposición en bajas concentraciones de MTX (10 M) Es posible que la baja concentración de MTX desencadene el mecanismo de apoptosis en cascada de manera lenta . Es probable que por esta razón la mayoría de los aislados en el presente trabajo se presenta C.L.S en la concentración de 1 , 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$.

En otros estudios se menciona a la amplificación genética utilizando sincronización de ciclo celulares Roberty y colaboradores presentan a la expresión de dihidrofolato reductasa (DHFR) disminuida durante la fase G1 y que incrementa marcadamente durante la segunda hora de la fase S. Se trato a esas células con hydroxantina (en concentración suficiente para reducir la incorporación de timidilato hasta un 95% en la fase S de colonias celulares) no se altero la frecuencia de amplificación de genes de DHFR (6).

Extensivamente se vio una replicación abierta de DNA monitoreada por incorporación de deoxibromouridina, en efecto después del bloqueo de la fase S se vio que la replicación de DNA envolvía no solo al gen de DHFR, la replicación se normalizo después de 2 horas (117).

En este estudio si se notó que la mayoría de los aislados tenían un entascamiento en la fase G1 (ver fig 4) sin embargo si la replicación de genes de DHFR se ve disminuida durante esta fase G1 del ciclo, no puede ser atribuida la resistencia a la amplificación genética de DHFR. Además si la replicación no se altera en la fase S puede ser que la amplificación de DHFR este acompañada por la amplificación de otros genes que podría ser el bcl-2 o mdr.

EXPRESIÓN DE bcl-2

Si observamos de manera continua las graficas 4,5 y 6 expuestas en la sección de resultados, los puntos que representan a cada cepa de linfoblastos son constantes en las tres gráficas lo que esta nos señalaría que dichos aislados presentan resistencia al MTX, además las células sobrevivientes son similares en las concentraciones de 10 y 100 µg / ml (20% y 17.1% respectivamente) De acuerdo a la cantidad de la proteína BCL-2, esto nos estaría sugiriendo de algún modo que al menos en estas cepas de linfoblastos la cantidad de expresión del gen bcl-2 si estaría teniendo un efecto importante para evitar la apoptosis causada por altas concentraciones de MTX.

Cabe mencionar que el gen bcl-2 ha sido muy relacionado con la traslocación t(14: 18) La cual produce que haya desregulación de bcl-2-Ig en células linfoides y en células de linfoma.

En muchas neoplasias hematológicas se desconocen evidencias de estas traslocaciones. Seria de gran importancia la determinación de esta alteración numérica en los aislados que presentaron una expresión elevada del gen bcl-2 y un numero de CLS apreciablemente alto y poder definir también si los índices de DNA son pseudodploidies. Desafortunadamente en el presente trabajo la población de células que presentaron características de elevada expresión de bcl-2 y CLS no son significativos pero podría dar pie a más investigaciones al respecto en nuestro país y a que son pocos los estudios que tanto a nivel mundial y nacional se dedican a ver respuestas de tratamientos involucrando a este gen que aun tiene mucho que mostrarnos en cuanto a su topología y regulación

Al respecto se reporta que la proteína codificada por el gen *bcl-2* puede estar presente en distintas regiones de poblaciones de linfocitos sobrevivientes en centros germinales y timocitos.

También se ha buscado el rearreglo de *bcl-2* en regiones de *mbr-mcr-5'* con altos niveles de expresión de *bcl-2*. Sin embargo no se detectaron rearreglos en sitios clásicos de alta expresión de este gen. La falta de la detección de rearreglos da pie a pensar que existen otros mecanismos de traslocación, en otras regiones breakpoint (punto de ruptura) o mutaciones somáticas en la región 5' del gen *bcl-2* (119).

Otros estudios en células de leucemia crónica y linfoma linfoblástico indican que las células con bajo índice proliferativo presentan rearreglos en la región 5' de *bcl-2*, y que la proteína BCL-2 en linfoma de células T refleja el estado correspondiente de desarrollo de las células T.

En linfoma linfoblástico con tipo inmaduro de células T (CD3, CD4 y CD8+) Fracasa la expresión de *bcl-2*, muchos tejidos normales Tdt +, CD1 + tienen falta de expresión de *bcl-2* (120).

Podría ser tal vez que las células inmaduras T en general presenten baja expresión de *bcl-2*?

En el presente trabajo solo encontramos 3 pacientes con inmunofenotipo T en los cuales la expresión de *bcl-2* fue variable (66.7%, 39% y 27.6%) se puede sugerir que la expresión del gen *bcl-2* no sólo tenga que ver con el inmunofenotipo sino que también en con el tipo de padecimiento maligno para su expresión y efecto antiapoptótico, o bien que su efecto sea causado sólo si se encuentra activado con la presencia de otro gen como *bax*.

Zoltan N y colaboradores (1993) mencionan la resistencia a apoptosis en timocitos CD4,CD8+ expuestos a glucocorticoides en correlación de presencia de la proteína Bcl-2 . Este grupo demostró que existe una coordinación de *bcl-2* y *bax* ya que si este último se presenta sobreexpresado en la membrana celular puede inhibir el efecto de *bcl-2* y si por el contrario sólo se expresa en demasva *bcl-2* es más probable la sobrevivencia de las células timicas(121).

El contar con métodos automatizados como es la citometría de Flujo para medir expresión de genes como el *bcl-2* mediante anticuerpos es una gran ventaja. Sin embargo aun no es completamente confiable tener esta medida como valor pronóstico en los niños con LAL puesto que la resistencia a fármacos sigue siendo un conjunto de variables genéticas que deben ser ampliamente estudiadas.

CONCLUSIONES:

1.- Los ensayos colorimétricos con MTT fueron de gran utilidad para detectar la sensibilidad in vitro a MTX ya que este método demostró ser de alta sensibilidad, especificidad y de gran rapidez

2.- Un porcentaje importante de los pacientes pediátricos con LAL tienen un índice de DNA aneuploide siendo lo más común que se presente hiperdiploidia que hipodiploidia.

3.- La determinación de índice de DNA por citometría de flujo representa una valiosa herramienta para detectar aneuploidia y debe ser complementario de técnicas cariotípicas para poder ser prueba de pronóstico más concreto para pacientes pediátricos con LAL.

4.- La resistencia a MTX no esta relacionada con un solo factor (Inmunofenotipo, índice de DNA, expresión desmedida de bcl-2), si no que sigue habiendo un sinnúmero de factores que pueden influir en la respuesta a los tratamientos antileucemia.

5.- No se descarta la posibilidad de que bcl-2 juegue un papel importante en la resistencia a MTX en niños con LAL. Sin embargo son requeriran técnicas de evaluación más específicas para detección de la traslocación t(14-18) la cual está asociada con la expresión del gen antiapoptotico.

6.-Se deben continuar reuniendo evidencias sobre quimioresistencia a fármacos para poder dar un panorama aun más prometedor a los pacientes con LAL.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Rivera Luna Roberto . Diagnostico del niño con cáncer . Mosby / doyma . México. 285, 1995
- 2.- Rivera Luna Roberto; Cardenas Cardos Rocio ; Leal Leal Carlos ; Navarro Alegría Irma ; Meza Coria Clemente; Gomez Martinez Ricardo and Vega Vega Lourdes. B- lineage acute linphoblastic leukimia of childhood an Institutional experience. Archives of Medical Research; 28, 2 : 233. 1997.
- 3.- Rivera Luna Roberto ;Martinez G . G . Leucemia Aguda Linfoblastica conceptos importantes para el pediatra . Rev Mex Ped.; 5463, 1987.
- 4.-Rodman H. John; Relling V. Mary ; Stewart F. Clinton; Synold W. Timothy; McLeod Howard; Kearns christiane; Stute Norbert; Crom R. Willam; and Evans E. Willam. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anticancer Drugs in children. Seminars in Oncology, 20, 1 :18 , 1993.
- 5.-Van Triest B; Pinedo H. M; Telleman F; Van Dre Wilt C. L; Jansen G; Peters G.J. Cross-resistance to antifolate in multidrug resistant cell lines with P-glycoprotein or multidrug resistance protein expression. Biochem Pharmacol. 53:1855,1997.
- 6.-Dalton Willam S. Drug Resistance Modulation in the laboratory and the clinic.Seminars in Oncology. 20, 1:64,1993.
- 7.- Schimke Robert T; Beverley Stephen ; Brown Peter ; Casini Richard; Fedespiel Nancy; Gasser Charles; Hill Anna; et al . Drug Resistance and gene amplification in eukaryotic cells . The Departament of Biological Science Stanford Univerdity . Academic Press Inc. USA. ; 107. 1983.

8.-Rothenberg Mace L; Mickley Lyn A; Cole E. Diane, Balis Frank; Takashi Tsuruo; Poplack David G; and Fojo Antonio T. Expression of the mdr-1/ P-170 gene in patients With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 74; 4: 1388, 1989.

9.-Dalton W.S; Grogan T.M; Durie B.G.M. Drug resistance in multiple myeloma and non-Hodkin's lymphoma: Detection of P- glycoprotein and potential circumvention by addition of verapamil to chemotherapy. *J Clin Oncol*.7:415, 1989.

10.- Beck T. Willam. Mechanism of multidrug resistance in human tumor cells.The roles of P glycoprotein, DNA topoisomerase II, and other factors. *Cancer treatment Reviews* 17 : 11, 1990.

11.-Chain S.I; DeBoer Gerrit; et al. Multidrug Resistance.*New Drug Therapy*. 8,2:383.1994.

12.-Grogan T; Dalton W; Rybski J. Optimization of immunocytochemical P- glycoprotein assessment in multidrug- resistant plasma cell myeloma using three antibodies. *Lab Invest*. 63:815 ,1990.

13.- McClean S; Hill B. T; Posttranslational regulation of P glycoprotein in mammalian tumour cell expressing a distinctive multiple drug resistant phenotype after exposure to fractionated X-irradiation. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*. 34.313, 1993.

14.- Miller T.P; Grogan T.M; Dalton W.S. P- glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high- dose verapamil. *J Clin Oncol*. 9:17,1991.

15.-Nandy C H; Fu S E; Siegel V I. Increase in the bcl-2 to p53 ratio in leukemic cells from patients (PTS) associated with relapsed leukemia. Abstract in *American Society of Clinical Oncology XXXIV Annual Meeting* . California. 16:8, 1998.

16.-De Vita VT; Hellman S; Rosenberg SA; *Cancer principles and practice of oncology* 4ed. Philadelphia; JB Lippincott.1993.

17.-Storb R; Deeg J ; Fisher L. Cyclosporine vs methotrexate for graft vs host disease prevention given marrow grafts for leukemia long-term follow –up of three controlled trials .*Blood*. 71:293,1988.

- 18.- Allegra C J ; Chabner B A; Tuazon C U . Trimetrexate, a novel and effective agent for the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med. 317:978,1987.
- 19.- Allegra C J ; Chabner B A, Drake J C. Enhanced inhibition of thymidylate synthase methotrexate polyglutamates. J Biol Chem. 260:9720, 1985.
- 20.-Allegra C J; Fine R L. The effect of methotrexate on intracellular folate pools in human MCF-7 breast cancer cells evidence for direct inhibition of purine synthesis. J Biol Chem. 261: 6478, 1986.
- 21.-Prest D G; Bunni M; Sirotiak F M. Relationship of reduced folate changes to inhibition of DNA synthesis induced by methotrexate in L1210 cell in vitro. Cancer Res 49:4204, 1989.
- 22.-Matherly L H; Barlowe C K; and Phillips V M. The effect of 4 amino-antifolates on 5-formyltetrahydrofolate metabolism in L1210 cell. J Biol Chem, 262: 710,1987.
- 23.-Lyons S D; Sant M E; Christopherson R I. Cytotoxic mechanism of glutamine antagonists in mouse L1210 Leukemia. J Biol Chem 265: 11377,1990.
- 24.- Knight CB; Elwood PC; Chabner B A. Future directions for antifolate drug development. Adv Enzymol, 29:3,1989.
- 25.-Kaman B A and Capdevila A. Receptor mediated folate accumulation regulated by the cellular folate content. Proc Natl Acad Sci USA, 83:5983,1986.
- 26.-Antony AC. The biological chemistry of folate receptors. Blood, 79:2807,1992.
- 27.-Goldman I D. A model system for the study of heteroexchange diffusion: methotrexate- folate interactions in L1210 leukemia and Erlich ascites tumor cell. Biochem Biophys Act, 233:624,1971.

- 28.- Elwood PC; Kane MA; Portillo R A. The isolation characterization and comparison of the membrane-associated and soluble folate-binding proteins from human KB cell. *J Biol Chem* 261: 15416,1986.
- 29.-Anderson R G W; Kamen B A; Rothberg K G; et al. Potocytosis :sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science*, 255:410,1992.
- 30.- Kane M A; Portillo R M; Elwood PC; et al. The influence of extracellular folate concentration on methotrexate uptake by human KB cells; partial characterization of a membrane-associated methotrexate binding protein. *J Biol Chem*, 261:44, 1986.
- 31.- Campbell I G; Jones T A; and Foulkes W D. Folate- binding proteing is a marker for ovarian cancer. *Cancer Res*, 51: 5329, 1991.
- 32.- Weitman SD; Lark R H; Cone L R. et al. Distribution of the folate reseptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues .*Cancer Res*, 52: 3396,1992.
- 33.- Elwood P.C; Molecular cloning and caracterization of the human folate binding protein c DNA fromplacent and malignant tissue culture (KB) Cell. *J.Biol Chem*.264:14893. 1989.
- 34- Elwood PC; Deutsch JC; Kolhouse J.F. The conversion of the soluble folatebinding protein (folate reseptor) to te soluble folate binding protein by associate a metalloproteasa.*J Biol Chem* 266: 2346. 1991.
- 35.- Matherly L H ; Angeles SM; Czajkowski CA .Catracterization of transport- mediated methotrexate resiostance in human tumor cells with antibodies to the membrane carrier for methotrexate and tetrahydrofolate cofactirs . *J Biol Chem* 267: 23253. 1992.
- 36.- Chello PL; Sirotnak FM; Dorick DM . Different effets of vincristine on methotrexate uptake by L1210 Cell and mouse internal epithelial in vitro and in vivo . *Cancer Res*. 39 :2106. 1979.
- 37.-Gewirtz DA; Randolph JK; Goldman ID . Potent bile salt and organic anion inhibition of methotrexate upyake and accumulation in the freshly isolated rat hepatocygte. *Cancer Res* 40. 1852. 1980.
- 38.- Faber G ; Matherly LH; Fabre I; et al . In vitro formation of polyglutamyl derivatives of methotrexate and 7- hidroximethotrexate in human lymphoblastic leukemia cell. *Cancer Res*. 43:4648. 1983.
- 39.- Cotino RE, Haspel H C; and Sonenberg M.Transport of the folate compound methotrexate decreased during differentiation of murine erytroleukemia cell. *J Biol Chem* 259: 206,1984.

- 40.-Sirotnak F M; Moccio D M; Yang C H. Similar characteristics of folate analogue transport in vitro in contrast to varying dihydrofolate reductase levels epithelial cell at different stages of maturation in mouse small intestine. *Cancer Res*, 44: 5204,1984.
- 41.-Sirotnak F M; Moccio D M; Young C W. Increased accumulation of methotrexate by murine tumor cell in vitro the presence of probenecid by a preferential inhibition of efflux. *Cancer Res*, 41: 966, 1981.
- 42.-Schuetz JD; Westin E L; Matherly L H, et al . Membrane protein changes in an L1210 leukemia cell line with a translocation defect in the methotrexate –tetrahydrofolate cofactor transport carrier. *J Biol Chem* 264:16261,1989.
- 43.- Henderson G B; Strauss B P. Characteristics of a novel transport system for folate compounds in wild –type and methotrexate resistant L1210 cell . *Cancer Res*, 50: 1709, 1990.
- 44.- Jansen G; Westerhof G R; Kathmann I; et al. Identification of a membrane associated folate-binding protein in human leukemic CCRE- CEM cells with transport –related methotrexate resistance. *Cancer Res*, 49:2455,1989.
- 45.- Mini E; Moroson B A; Franco C T , et al. Cytotoxic effects of folate antagonists against methotrexate –resistant human leukemic lymphoblast CCRF-CEM cell lines. *Cancer Res*,45: 325, 1985.
- 46.-Rosewsky A; Berdley G P; and Ensminger W D. Methotrexate analogues II. Unambiguous chemical synthesis and in vitro biological evaluation of α - and γ - monoesteres as potential prodrugs. *J Med Chem*, 21: 380, 1978.
- 47.- Nair M G ; Nanavati N I; and Kumar P. Synthesis and biological evaluation of polyglutamyl metabolites of 10- deazaaminopterin and 10 ethyl-10- dezaaminopterin .*J Med Chem*, 31: 181, 1988.
- 48.-Lin J T, Cashmore A R; Baker M. Phase I studies with trimetrexate. *Clinical pharmacology, analytical methodology, and pharmacokinetics. Cancer Res*, 47: 609, 1987.
- 49.- Whitehead V M; Rosenblatt D S; Vuchich M J; et al. Methotrexate polyglutamate synthesis in lymphoblasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Dev Pharmacol Ther*, 10:443,1987.
- 50.-Cook J D; Cichowiez D J; George S; et al. Mammalian folypoly- glutamate synthetase: 4. In vitro and in vivo metabolism of folate and analogues and regulation of folate homeostasis. *Biochemistry* , 26: 539, 1987.
- 51.-Winick N J; Kamen B A; Balis F M; et al . Folate and methotrexate polyglutamate tissue levels in rhesus monkeys following chronic low- dose methotrexate. *Cancer Drug Delivery*, 4:25, 19887.

- 52.-Kennedy D G; Van der Berg H W; Clarke R. The effect of the rate of cell proliferation on the synthesis of cell proliferation on the synthesis of methotrexate polyglutamates in two human breast cancer cell lines. *Biochem Pharmacol.* 34: 3087, 1985.
- 53.- Galvan J; Nimec Z; Effects of folinic acid on hepatoma cells containing methotrexate polyglutamates. *Cancer Res.* 43:551, 1983.
- 54.- Koizumi S; Curt G A; Fine R L; et al. Formation of methotrexate polyglutamates in purified myeloid precursor cell from normal human bone marrow. *J Clin Invest.* 75: 1008, 1985.
- 55.- Whithead V M. Synthesis of methotrexate polyglutamate in L1210 murine leukemia cell. *Cancer Res.* 37: 408, 1977.
- 56.- Pizzorno G; Sokolosky J A; Cashmore A R; et al. Intracellular metabolism of 5, 10-dideazatetrahydrofolic acid in human leukemia cell lines. *Mol Pharmacol.* 39: 85, 1991.
- 57.- Curt J A; Jolivet J; Caney D N; et al. Determinants of the sensitivity of human small-cell lung cancer cell lines to methotrexate. *J Clin Invest.* 76: 1323, 1985.
- 58.- Schweitzer B I; Srimatkandada S; Gritsman H; et al. Probing the role of two hydrophobic active site residues in the human dihydrofolate reductase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 264: 20786, 1989.
- 59.- Stone S R; Morrison J F. Mechanism of inhibition of DHFRs from bacterial sources by various classes of analogues. *Biochem Biophys Acta.* 869: 275, 1986.
- 60.- Cohen M; Bender B A; Donehower R C. Reversibility of high affinity binding of methotrexate in L1210 murine leukemia cell. *Cancer Res.* 38:2866, 1978.
- 61.- Appleman J R; Prendergast N, Delcamp T J; et al. Kinetics of the formation and isomerization of methotrexate complexes of recombinant human dihydrofolate reductase. *J Biol Chem.* 254: 10889, 1979.
- 62.- Kumar P; Kisliuk R L; Gaumont Y. Interaction of polyglutamyl derivatives of methotrexate, <10>-dezaaminopterin, and dihydrofolate with dihydrofolate reductase. *Cancer Res.* 46:5020, 1986.
- 63.- Boarman D M; Baram J; Allegra C J. Mechanism of leucovorin reversal of methotrexate cytotoxicity in human MCF-7 breast cancer cell. *Biochem Pharmacol.* 40: 2651, 1990.
- 64.- Jackson R C; Hart L I; Harrap K R. Intrinsic resistance to methotrexate of cultured mammalian cell relation to the inhibition kinetics of their dihydrofolate reductase. *Cancer Res* 36: 1991, 1980.

65.-Dicker A P; Waltham M C; Volkenandt M, et al. Methotrexate resistance in an in vitro mouse tumor due to a non – active site dihydrofolate reductase mutation. Proc Natl Acad Sci USA. 90: 11797, 1993.

66.-Srimatandaka S; Schweitzer B J; Moroson B A. Amplification of a polymorphic dihydrofolate reductase gene expressing an enzyme with decreased binding to methotrexate in a human colon carcinoma cell line, HCT 8R4, resistant to this drug. J Biol Chem. 264:3524. 1989.

67.- Dicker A P; Volkenandt M; Schweitzer B J; et al. Identification and characterization of a mutation in the dihydrofolate reductase gene from the methotrexate resistant Chinese hamster ovary cell line Pro³ MTX^{RM}. J Biol Chem 265: 8317, 1990.

68.- Meltzer P S; Cheng Y C; Trent J M. Analysis of dihydrofolate reductase gene amplification in a methotrexate resistant human tumor cell line. Cancer Genet Cytogenet . 17:289, 1985.

69.- Kaufman R J; Brown P C; Schimke R T. Loos and stabilization of amplified dihydrofolate reductase genes in mouse sarcoma S-180 cell lines. Mol Cell Biol. 1: 1084, 1981.

70.- Wright J A; Smith H S; Watt F M ; et al. DNA amplification is rare in normal human cells. Proc Natl Acad Sci USA. 87:1791, 1990.

71.- Cowan K H, Goldsmith M E; Levine R M ; et al . Dihydrofolate reductase gene amplification and possible rearrangement in estrogen – responsive methotrexate resistant human breast cancer cells. J Biol Chem. 257: 15079, 1982.

72.- Cowan K H; Goldsmith M E; Rieciardone M D; et al . Regulation of dihydrofolate reductase in human breast cancer cells and in mutant hamster cells transfected with a human dihydrofolate reductase minigene. Mol Pharmacol. 30:69, 1986.

73.- Chu E; Takimoto C H; Voeller D; et al. Specific binding of human dihydrofolate reductase protein to dihydrofolate reductase messenger RNA in vitro. Biochemistry. 32:4756, 1993.

74.- Hoy C A; Rice G C; Kovacs M; et al. Overreplication of DNA in S- phase Chinese hamster ovary cells after DNA synthesis inhibition. J Biol Chem. 262:11927, 1987.

75.- Schuetz J D; Gorse K M; Goldman I D; et al . Transient inhibition of DNA synthesis by 5-fluorodeoxyuridine leads to overexpression of dihydrofolate reductase with increased frequency of methotrexate resistance. J Biol Chem. 263:7708, 1988.

76.- Sant M E; Lyons D S; Phillips L; et al. Antifolates induced inhibition of amino phosphoribosyltransferase in leukemia cells. J Biol Chem. 267: 11038, 1992.

- 77.-Rhee MS, Coward K J; Galvan J. Depletion of 5,10- methylenetetrahydrofolate and 10-formyltetrahydrofolate by methotrexate in cultured hepatoma cell. *Mol Pharmacol* 42:909,1992.
- 78.- Jacobs S A; Stoller R G; Chabner B A; et al 7- Hydroxymethotrexate as a urinary metabolite in human subjects and rhesus monkeys reserving high-dose methotrexate. *J Clin Invest.* 57:534, 1976.
- 79.- Samuels L L; Feinberg A; Moccio D M; et al. Detection by high performance liquid chromatography of methotrexate and its metabolites in tumor tissue from osteosarcoma patients treated with high- dose methotrexate/ leucovorin rescue. *Biochem Pharmacol.* 33:2711,1984.
- 80.-Sonneveld P; Schultz F W; Nooter K; et al. Pharmacokinetics of methotrexate and 7-Hydroxymethotrexate in plasma and bone marrow of children receiving low- dose oral methotrexate . *Cancer Chemother Pharmacol.* 18:111.1986.
- 81.- Bremnes R M; Slordal L; Wist E. Formation and elimination of 7- Hydroxymethotrexate administration. *Cancer Res.* 49: 2460,1989.
- 82.-Rosowsky A;Wright J E; Holden S A; et al. Influence of lipophilicity and carboxyl group content on the rate of hydroxylation of methotrexate derivatives by aldehyde oxidase . *Biochem Pharmacol.* 40: 851, 1990.
- 83.- Rhee M S; Galivan J. Conversion of methotrexate to 7- hydroxymethotrexate polyglutamates in cultured rat hepatic cell. *Cancer Res.* 46:3793,1988.
- 84.-Faber G ; Matherly LH; Fabre I; et al. Synthesis and properties of 7- hidroxymethotrexate polyglutamyl derivatives in Ehrlich ascites tumor cell in vitro *J.Biol Chem .* 259:5066 , 1984.
- 85.-Cristensen M L; Rivera GK. Effect of hydration on methotrexate plasma concentrations in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin oncol.*6:797,1988.
- 86.-Packer R J; Grossman R I. High dose methotrexate- associate acute neurologic dysfunction. *Med Oed Oncol.* 11:158,1983
- 87.- Willams G T; Smith C A. Molecular regulation of apoptosis:genetic controls on cell death. *Cell.*74:777, 1993.
- 88.- Lowe S W; Ruley H E; Jacks T; et al . p53- Dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agent. *Cell.* 74:957, 1993.

- 89.- Felix C A; Xau M M; Takahashi T. Hereditary and acquired p53 gene mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Inv.* 89:640, 1992.
- 90.-Miyashita T; Reed J C. bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI 7.2 lymphoid cell to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs . *Cancer Res.* 52: 5407, 1992.
- 91.- Kamesaki S; Kamesaki H; Jorgensen T J, et al . bcl-2 protein inhibits etoposide- induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase II- induced DNA strand breaks and their repair. *Cancer Res.* 53:4251, 1993.
- 92- Pierre Golstein . Controlling cell death . *Science* . 275 (21): 1081, 1997
- 93.-Sentman C L; Shutter J R; Hockenbery D. Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell.* 67:879, 1991.
- 94.-Hockenbery D M; Zutter M; Hickey W. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 88: 6961, 1991.
- 95.-Garcia I; Martinou I; Tsujimoto Y. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the Bcl-2 proto-oncogene. *Science.* 258:302, 1992.
- 96.-Chen- Levy Z; Nourse J; and Cleary M L. The Bcl-2 candidate proto- oncogene product is a 24- kilodalton integral- membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14-18). *Mol Cell Biol.* 9:701, 1989.
- 97.- Kamesaki S; Kamesaki H; Jorgensen T. J ; et al . Bcl-2 protein inhibits etoposide induced apoptosis through its effects on event subsequent to topoisomerase II induced DNA strand breaks and their repair . *Cancer Res.* 53: 4251,1993
- 98.- Henderson E S; Hoelzer D; Freeman A L. The treatment of acute lymphoblastic leukemia, in Henderson E S, Lister TA (eds) : *Leukemia*(ed 5) Philadelphia. PA, Saunders. 443. 1990.
- 99.- Schimke R T. Gene amplification in cultured cell. *J Biol Chem.*263:5989, 1988.

- 100.- Gôker E; Waltham M; Kheradpour A; et al. Amplification of Dihydrofolate Reductase gen is a mechanism of acquired resistance to Methotrexate in patients with acute lymphoblastic leukemia and is correlated with p53 gen mutations. *Blood* 86 (2):677, 1995.
- 101.-Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65: 55, 1983.
- 102.- Shoemaker R H ; Kenneth D; Scudiero D A. Evaluation of soluble tetrazolium/ formazan Assay for cell growth and drug sensivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research.* 48:4827, 1988.
- 103.- Carmichel J; DeGraff W; Gazdar Adi F. Evaluation of a tetrazolium- based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testig. *Cncr Research.* 47: 939, 1987.
- 104.- Rabinovich P S. Basic guidelines for DNA content and cell cycle analysis. En : *Multicycle: a program for DNA content and cell cycle analysis. Phoenix flow system. San Diego, C A.* 3.1 –8 34, 1993.
- 105.-Ching- Hon P; Boyett JM; Relling M V; et al. Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 17:818, 1999.
- 106.- Andreeff M; Assing G ; Cirrincioone C. Clinical cytometry. *Ann New York. Acad Sci.* 468:1 ,1986.
- 107.- Look AT; Roberson P K ; Willams D L ; et al. Pronostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 65:1079, 1985.
- 108.- Ronald D R; Rivera G K. *Quimioterapia delas leucemias agudas linfoblásticas.* En Ruiz Argüelles A, G J ; San- Miguel JF. *Actualización en leucemia 1ª ed. Panamericana. México D.F:* 49 , 1996.

109.- Look A T; Melvin SL; Willams D L; et al. Aneuploidy and percentage of S-phase cells determined by flow cytometry correlate with cell phenotype in childhood acute leukemia. *Blood*. 63: 959, 1982.

110.- Barlogie B; Drewinko B; Schumann J, et al. Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. *Am J Medicine*. 69:195, 1980.

111.-Look A T. The emerging genetics of acute lymphoblastic leukemia: clinical and biologic implications. *Semin Oncol*. 12: 92, 1985.

112.-Look A T; Roberson P K; Murphy S B. Prognostic value of cellular DNA content in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *N Engl J Med*. 314:1666, 1987.

113.- Barlogie B; Raber N M; Schumann J; et al. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Research*. 43: 3982, 1983.

114.-Carrano AV; Gray J W; Langlois R G; et al. Measurement and purification of human chromosomes by flow cytometry and sorting. *Proc Natl Acad Sci USA*.76:1382, 1979.

115.-Taylor I W; Milthorpe B K. An evaluation of DNA fluorochromes, staining techniques, and analysis for flow cytometry. *J Histochem Cytochem*. 28:1224, 1980.

116.-Third international workshop on chromosomes in leukemia. Clinical significance of chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 4:111, 1981.

117.-Huschtscha L I; Bartier C E; Tattersall M H N . Characteristics of cancer cell death after exposure to cytotoxic drugs in vitro. *British Journal of Cancer*. 73: 54, 1996.

118.- Oberhammer F; Wilson J W; Dive C; et al. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and or 50 kb fragment prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. EMBO J. 12:3679, 1993.

119.-Mc Donnell T J; Nuñez G ; Platt F M; et al . Deregulated Bcl-2-Ig transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B- cell population . Mol Cell Biol. 10: 1901, 1990.

120.-Zutter B M; Hockenbery D; Silverman G A. Immunolocalization of the Bcl-2 protein within hematopoietic neoplasms. Blood. 78(4) :1062, 1991.

121.- Zoltán N; Oltval Curt L; Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerized in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. Cell. 74:609, 1993.