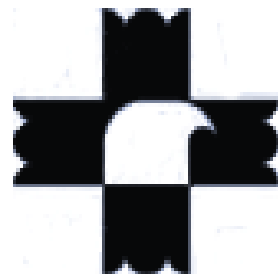




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-ZARAGOZA**



**HOSPITAL GENERAL DE LA CIUDAD DE MÉXICO
UNIDAD DE HEMATOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“EXPRESIÓN DE LOS GENES ABC-B1, ABC-C1 Y ABC-G2 Y SU
CORRELACIÓN CLÍNICA EN EL PRONÓSTICO DE LAS
LEUCEMIAS AGUDAS”**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:
SANCHEZ TELLEZ MARIA GUADALUPE

TUTOR:
**DR. ADOLFO MARTÍNEZ TOVAR
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**

ASESOR INTERNO:
DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA



MÉXICO, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDÍCE

1.- Resistencia a Multidrogas.....1

2.-Famimlia ABC.....2

3.-Los genes ABC en humanos.....4

3.1.- Subfamilia ABC-B.....4

3.1.1.- ABC-B1.....5

3.2.- Subfamilia ABC-C.....7

3.2.1.- ABC-C1.....7

3.3.-Subfamillia ABC-G.....9

3.3.1.- ABC-G2.....9

4.-Leucemia.....11

4.1.-Clasificación.....13

4.2.-Etiologia general.....14

4.3.-Factores Pronóstico.....15

4.4.-Tratamiento.....16

5.-Justificación.....19

6.-Hipotesis.....20

7.-Objetivo general.....21

7.1.-Objetivos particulares.....21

8.-Diseño de la investigación.....22

9.-Diagrama de trabajo y Metodología.....24

9.1.-Cultivo celular.....25

INDÍCE

9.2.-Separacion de poblaciones celulares por la técnica de Solución Lítica.....	25
9.3.-Aislamiento de RNA.....	26
9.3.1.-Técnica de Chomczynski y Sacchi.....	26
9.4.-Cuantificación de RNA.....	26
9.5.-Electroforesis en gel de Agarosa.....	27
9.6.-Síntesis de cDNA (Reverso transcripción) con Oligo dT.....	27
9.7.-Reacción en cadena polimerasa (PCR).....	28
9.8.-Secuenciación de ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2.....	29
10.-Resultados.....	30
10.1.-Expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en líneas celulares hematológicas.....	30
10.2.-Expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en donadores sanos del Banco de Sangre del Hospital General de México.....	31
10.2.1.-Integridad del RNA de donadores sanos.....	31
10.2.2.-Expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2.....	32
10.3.-Expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda.....	33
10.3.1.-Pacientes integrados al estudio.....	33
10.3.2.-Integridad de las muestras de pacientes.....	35
10.3.3.-Expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2.....	35
10.3.4.-Co-expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en pacientes con LLA.....	36
10.4.-Expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en pacientes con Leucemia Mieloblástica Aguda.....	37
10.4.1.-Pacientes integrados al estudio.....	37
10.4.2.-Integridad del RNA de los pacientes	39
10.4.3.-Expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2.....	39

INDÍCE

10.5.-Correlacion de la expresi3n de ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 y la respuesta hematol3gica en LLA.....	40
10.6.-Correlacion de la co-expesi3n de ABC's y la respuesta hematol3gica en pacientes con LLA.....	44
10.7.-Correlaci3n de la expresi3n de ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 entre donadores sanos y pacientes con LLA.....	48
11.-Discusi3n.....	49
12.-Conclusiones.....	57
13.-Perspectivas.....	58
14.-Literatura citada.....	59

ABREVIATURAS

ABC	Sitio de unión al ATP (ATP- binding cassette)
AMO	Aspirado de médula ósea
Ara-C	Arabinosido de Citocina
ATP	Adenosin trifosfato
BCRP	Proteína de resistencia a cáncer mama (Breast cancer resistance protein)
CD	Células dendríticas
CFTR	Proteína transmembrana de fibrosis quística (cystic fibrosis transmembrane)
dNTPS	Deoxinucleotido trifosfatos
FAB	Franco-Americano-Británico
FTC	Fumitremorgin C
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor)
HGM	Hospital General de México
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática
IL-3	Interleucina-3
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LMA	Leucemia Mieloblástica Aguda
LGC	Leucemia Granulocítica Crónica
LTC ₄	Leucotrienos C
LTD ₄	Leucotrienos D
LTE ₄	Leucotrienos E
MDR1	Resistencia a multidroga 1 (Multidrug resistance 1)
MRP1	Proteína de resistencia a multidroga 1 (Multidrug resistance protein 1)
MPM	Marcador de peso molecular
MXR	Resistencia a mitoxantrona (Mitoxantrona resistance)
NBD	Dominio de unión de nucleotidos (nucleotide binding domain)
OMS	Organización mundial de la salud
Pgp	P- glicoproteína
PBS	Solución tampón de fosfatos (solution buffer phosphates)
PCR	Reacción en cadena Polimerasa (Polymerase chain reaction)

ABREVIATURAS

PGA ₂	Prostaglandina 2
RC	Remisión completa
RPMI	Medio de cultivo (Roswell Park Memorial Institute médium)
RT-PCR	Reacción en cadena polimerasa por Retro-transcripción (reverse transcription-polymerase chain reaction)
SDM	Síndrome mielodisplásicos
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema nervioso central
SSA	Secretaria de salud
SP	Sangre periférica
TTM	Dominio Transmembrana

RESUMEN

El cáncer es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, en México de acuerdo a la SSA y el INEGI las leucemias son la segunda causa de muerte, siendo la Leucemia linfoblástica aguda el tipo más frecuente en la población (40%). Solo el 40-80% de los pacientes ingresados con leucemia aguda presentan remisión completa con los regímenes terapéuticos, sin embargo la mayoría presentan una recaída con enfermedad resistente, por lo tanto la tasa de supervivencia global a 5 años es solo del 35%.

La tasa de mortalidad y morbilidad atribuida al cáncer se encuentra en continuo crecimiento, siendo la falta de respuesta al tratamiento y la recaída de tumores inicialmente quimiosensibles los responsables de la muerte de los pacientes neoplásicos. Se ha descrito la sobreexpresión de proteínas responsables de la resistencia a fármacos en diversos tipos de cáncer. Las principales proteínas de resistencia a fármacos son codificadas por los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2, estas proteínas reconocen una amplia gama de quimioterapéuticos utilizados como primera elección para el tratamiento de las leucemias.

Este trabajo evalúa la relación entre la expresión y co-expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 con la respuesta hematológica de 35 pacientes con leucemia linfoblástica aguda que ingresaron al Hospital General de México, a los cuales les fueron evaluados factores pronóstico como edad, sexo, cuenta inicial de leucocitos, cuenta de plaquetas, infiltración a sistema nervioso, recaída y expresión del cromosoma Filadelfia.

Los resultados obtenidos muestran que la expresión de los genes ABC-B1 y ABC-C1 no tienen relación con los factores pronósticos, sin embargo existe una relación independiente ($p=0.004$) entre la expresión del gen ABC-G2 con respecto a la expresión del cromosoma Filadelfia. Respecto a la co-expresión de ABC-B1/ABC-C1/ABC-G2 y ABC-B1/ABC-C1 no se encontró relación con los factores pronóstico, sin embargo se observa una relación independiente ($p=0.017$) entre la expresión de ABC-B1/G2 con respecto a la edad, y la co-expresión de ABC-C1/ABC-G2 tiene una relación independiente ($p=0.006$) con respecto a la cuenta inicial de leucocitos.

Se evaluó la expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en 20 muestras de donadores sanos y fue comparada con la expresión de los pacientes con LLA. Se determino que existe una relación significativa ($p=0.026$) entre la expresión de los genes, es decir la frecuencia de expresión está relacionada con la leucemia linfoblástica aguda.

**OTORGA LA PRESENTE
C O N S T A N C I A**

AL CARTEL:

**FRECUENCIA DE EXPRESION DE LOS TRANSPORTADORES DE
DROGAS (ABC-B1, ABC-C1 Y ABC-G2) EN LA LEUCEMIA
AGUDA LINFOBLASTICA**

DE LOS AUTORES

DRS.

**SANCHEZ TELLEZ MG - OLARTE CARRILLO I - MENDOZA
SALAS I - RAMOS PEÑAFIEL C - ESQUIVEL ALEMAN B -
ZAMORA DOMINGUEZ J. - GUTIERREZ ROMERO M. - ROZEN
FÚLLER E. - COLLAZO JALOMA J. - MIRANDA PERALTA EI. -
KEVIN NACHO - MARTINEZ TOVAR A.**

**SERVICIO DE
HEMATOLOGIA**

**PRESENTADO EN LA XII MUESTRA DE CARTELES
DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO**

REALIZADA DEL 10 AL 14 DE DICIEMBRE DEL 2012

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO



DIRECCION DE ENSEÑANZA



**DR. J. FRANCISCO GONZALEZ MARTINEZ
DIRECTOR DE EDUCACION Y CAPACITACION EN SALUD**



OTORGA LA PRESENTE

C O N S T A N C I A

AL CARTEL:

**CORRELACION CLINICA DEL TRANSPORTADOR DE DROGAS
(ABC-G2) EN PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA
LINFOBLASTICA**

DE LOS AUTORES

DRS.

**OLARTE CARRILLO I - SANCHEZ TELLEZ MG - MENDOZA
SALAS I - RAMOS PEÑAFIEL C. - GUTIERREZ ROMERO M. -
COLLAJO JALOMA J. - MENDOZA GARCIA EMMA - ROZEN
FÚLLER E. - MIRANDA PERALTA EI. - NACHO K. MARTINEZ
TOVAR A.**

**SERVICIO DE
HEMATOLOGIA**

**PRESENTADO EN LA XII MUESTRA DE CARTELES
DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO**

REALIZADA DEL 10 AL 14 DE DICIEMBRE DEL 2012

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO



DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA



**DR. J. FRANCISCO GONZALEZ MARTINEZ
DIRECTOR DE EDUCACION Y CAPACITACION EN SALUD**



1. RESISTENCIA A MULTIDROGAS

La mayoría de los tumores sólidos de forma innata o adquirida, generan resistencia a múltiples agentes quimioterapéuticos, con estructura química y mecanismos de acción diferentes. Este fenómeno fue descrito experimentalmente y conocido como resistencia a múltiples drogas o MDR (“Multidrug Resistance”). La resistencia a múltiples fármacos es un factor importante en el fracaso de muchas formas de quimioterapia (Sanchez-Suarez, 2006).

En los últimos años ha sido ampliamente aceptado que esta resistencia se correlaciona con la sobreexpresión de proteínas que actúan como “bombas” que expulsan los fármacos de manera dependiente de ATP, esto significa que las células tumorales que se hacen resistentes a un medicamento, se hacen al mismo tiempo resistentes a otros medicamentos, las células con este fenotipo expresan en su superficie proteínas que se encargan del bombeo activo del medicamento fuera de la célula, estas proteínas son miembros de la superfamilia ABC (Sanchez-Suarez, 2006; Martinez,2011).

Las proteínas llamadas de “resistencia a múltiples fármacos” fueron descubiertas como transportadores de membrana produciendo resistencia a la quimioterapia en el cáncer. A mediados de los años 1970’s, los oncólogos clínicos se dieron cuenta de que ciertos tumores muestran un patrón de resistencia inherente, mientras que otros desarrollan la resistencia durante el curso del tratamiento contra una serie de compuestos quimioterapéuticos de otro modo altamente eficientes. Estas proteínas transportadoras pertenecen a una familia altamente conservada de manera evolutiva de las proteínas de unión al ATP (ABC por sus siglas en inglés “ATP Binding Cassette”) (Sarkadi, 2005).

2. FAMILIA ABC

Las proteínas transportadoras de membrana se pueden dividir en cuatro tipos: los canales iónicos, los transportistas, las acuaporinas y las bombas dependientes de ATP (Vasiliou, 2009). Estas últimas proteínas utilizan la energía liberada por la hidrólisis de ATP para mover los sustratos a través de membranas dentro o fuera de las células o en vesículas celulares, en contra de su gradiente electroquímico. La mayoría de los genes ABC codifica las proteínas de membrana que participan directamente en el transporte de un amplia gama de moléculas a través de las membranas, de manera general se clasifican en importadores y exportadores, en función de la dirección de transporte en relación con el citoplasma.

Las proteínas transportadoras acarrean diferentes tipos de moléculas como las grasas, azúcares, bloques que forman proteínas y los medicamentos, a través de las membranas celulares. En la mayoría de los casos, los transportadores mueven las moléculas en los compartimientos celulares específicos para que puedan ser procesados, o fuera de la célula para que puedan ser utilizados en otros lugares o excretadas por el cuerpo. Si las moléculas no se transportan correctamente pueden no estar disponibles donde más se necesitan para las funciones corporales. Las moléculas también se pueden acumular y dañar a las células. Defectos en estos transportadores causan enfermedades genéticas (Tabla 1) (Štefková, 2004)

Por definición, las proteínas ABC poseen un cassette de unión al ATP, también conocido como dominio de unión al nucleótido (NBD por sus siglas en inglés “Nucleotide Binding Domain”). El NBD contiene varios dominios altamente conservados, entre ellos las secuencias Walker A y Walker B, el bucle H y el circuito Q. Los transportadores ABC también contienen dominios transmembrana (TTM), cada uno de los cuales está compuesto por hélices hidrofóbicas. De manera general se compone de dos NBD's y dos TTM. Los dos NBD's se unen y juntos hidrolizan ATP (proporcionando así la fuerza que impulsa el transporte), mientras que el TTM participa en el reconocimiento del sustrato y la translocación a través de la membrana lipídica (Figura 1) (Vasiliou, 2009; Linton, 2007).

INTRODUCCIÓN

GEN	FUNCION	ENFERMEDAD
ABCB1	Transportador de colesterol y lípidos	Familia de lipoproteína
ABCA2	Resistencia Fármacos	Desconocido
ABCA4	Transportador de foto receptor de retinoideó	
ABCB1	Resistencia Fármacos	Desconocido
ABCB2	Transportador de péptidos	Deficiencia Inmune
ABCB3	Transportador de péptidos	Deficiencia Inmune
ABCB4	Transportador de acido biliar	Colestasis intrahepática progresiva
ABCB6	Transportador de metales	Desconocido
ABCB7	Transportador de metales	Sideroblastosis ligada al cromosoma X y anemia
ABCB1	Transportador de acido biliar	Colestasis intrahepática progresiva
ABCC1	Resistencia Fármacos	Desconocido
ABCC2	Transportador de acido biliar	Síndrome Dubin-Johnson
ABCC7	Canal iónico de Cloro	Fibrosis quística
ABCC8	Receptor Sulfonilurea	Desconocido
ABCE1	Proteína de Unión a Oligoadenilato	Desconocido
ABCG1	Transportador de colesterol	Desconocido
ABCG2	Resistencia a Fármacos	Desconocido
ABCG5	Transportador de esteroles	Sitosterolemia
ABCG8	Transportador de esteroles	Sitosterolemia

Tabla 1.- Genes de la familia ABC y su relación con algunas enfermedades (Tomado y modificado de Linton, 2007)

La comparación de la superfamilia ABC en los humanos y otros eucariotas secuenciados incluyendo *Drosophila* indicó que existe una alta tasa de encendido y apagado de genes ABC y que la mayoría de los miembros que llevan a cabo funciones muy específicas son aquellos que han sido conservados evolutivamente (Linton, 2007; Vasiliou, 2009).

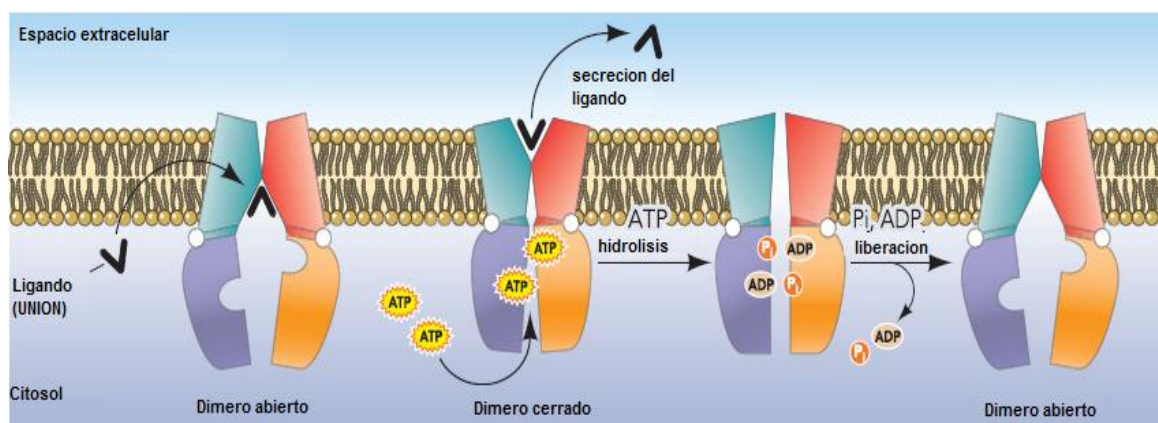


Figura1.- MECANISMO DE LOS TRANSPORTADORES ABC La alta afinidad de unión de los ligandos a los TTM induce un cambio conformacional en los NBD's resultando una alta afinidad para la molécula de ATP. Dos moléculas de ATP se unen a los NBD's, donde la energía liberada por la formación del dímero cerrado causa el cambio conformacional de los TTM. La hidrólisis del ATP provoca la disolución del dímero cerrado, provocando el cambio conformacional de los TTM y finalmente la liberación de P y ADP restauran la conformación del dímero abierto. (Tomado y modificado de Linton, 2007).

3. LOS GENES ABC EN HUMANOS

Esta diversa familia de transportadores desempeña un papel fundamental en muchos procesos celulares; por ejemplo, transportan una serie de sustratos incluyendo los iones metálicos, péptidos, aminoácidos, azúcares y un gran número de compuestos hidrofóbicos y metabólicos a través de la membrana plasmática y membranas celulares, sin embargo también son responsables de la resistencia a múltiples fármacos de las células cancerosas (Vasiliou, 2009)

El genoma humano tiene 48 genes ABC los cuales están distribuidos en siete subfamilias designados de la A a la G, definiendo que para cada gen, la ubicación del mapa preciso en los cromosomas humanos, los datos de expresión, y la localización dentro de la superfamilia han sido ya determinados. Estos datos permiten hacer predicciones en cuanto a la función potencial o fenotipo de la enfermedad asociada con cada proteína (Tabla 1) (Linton, 2007).

3.1. SUBFAMILIA ABC-B

Esta subfamilia tiene 11 genes y únicamente se expresan en mamíferos, varios de los miembros de la familia B se sabe confieren resistencia a múltiples fármacos en las células de cáncer (Tabla 2) (Glavinas, 2004).

FAMILIA	MIEMBRO	NOMBRE COMÚN	UBICACIÓN	FUNCIÓN
ABC B	ABCB1	MDR1(PGP)		
	ABCB2	TAP1		
	ABCB3	TAP2	Cerebro	Resistencia a drogas Transporte de péptidos dentro de retículo endoplásmico
	ABCB4	MDR3	Riñón	
	ABCB5	(PGP3)	Retículo	
	ABCB6	MTABC3	Endoplásmico	Transporte de fosfatidilcolina
	ABCB7	ABC7	Hígado	Transporte de hierro
	ABCB8	MABC1	Mitocondria	
	ABCB9		Corazón	
	ABCB10	MTABC2		
	ABCB11	SPGP (SEP)		

Tabla 2.- Subfamilia de genes ABC-B, su ubicación y su función principal (Glavinas, 2004).

INTRODUCCIÓN

3.1.1. ABC-B1

Este gen que codifica una proteína denominada MDR1/Pgp fue localizado en el cromosoma 7 en posición q21.1 (Figura 2) (Callen, 1987).

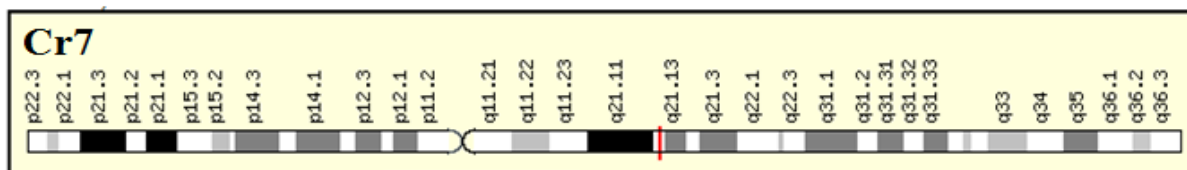


Figura 2.- Representación esquemática de localización del gen ABC-B1 en el cromosoma 7 (Genetics Cards, 2011).

Roninson y colaboradores (1986) encuentran que la resistencia a múltiples fármacos en humanos se relacionaba con la amplificación de dos secuencias de ADN homólogas a la secuencia del gen *mdr* en el Hámster Chino, y fueron denominadas MDR1 y MDR2. El gen MDR1 codifica un ARNm de 4.5 kb., es Ueda y colaboradores (1986) quienes confirman que este gen codifica una proteína a la que se denomina P-glicoproteína; sin embargo el ARNm correspondiente a MDR2 no fue detectado.

Se reporta que en los mamíferos la glicoproteína de membrana que se encuentra implicada en el fenómeno de la resistencia a múltiples fármacos en las células tumorales tienen homología a una clase de proteínas de transporte bien estudiado en bacterias, también fue reportada la secuencia del cDNA de MDR del ser humano y se informa la homología de la secuencia humana con la secuencia del ratón. (Chen,1986; Gros,1986).

Fojo y colaboradores (1987) midieron la expresión de MDR1 por ARNm en tumores y tejidos humanos normales, encontraron que el gen MDR1 se expresa en un nivel elevado en la glándula suprarrenal y en el riñón, en niveles intermedios en el pulmón y el hígado, bajos niveles en el yeyuno, colon y recto así como muchos otros tejidos. El gen MDR1 codifica una proteína transmembrana de gran tamaño que es expresada en diversos tumores humanos, sin embargo también es una parte integral de la barrera hemato-encefálica y funciona como una bomba de infusión de transporte de una variedad de drogas de la parte posterior del cerebro a la sangre (Figura 3).

Chan y colaboradores (1991) midieron los niveles de la P-glicoproteína por inmunohistoquímica en muestras de tumores en niños con neuroblastoma y concluyeron que la

INTRODUCCIÓN

expresión de P-glicoproteína antes del tratamiento predice el éxito o el fracaso de la terapia. La P-glicoproteína fue identificada por primera vez en células tumorales humanas, donde se encontró que se asocia con resistencia a múltiples fármacos pleiotrópicos a los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer (Roninson, 1986).

De manera normal este transportador de salida es altamente expresado en tejidos como el riñón, el hígado, el intestino, las células endoteliales capilares de la barrera hemato-encefálica y se encuentra en diversos linajes de leucocitos (Schinkel, 2003; Hoffmann, 2004).

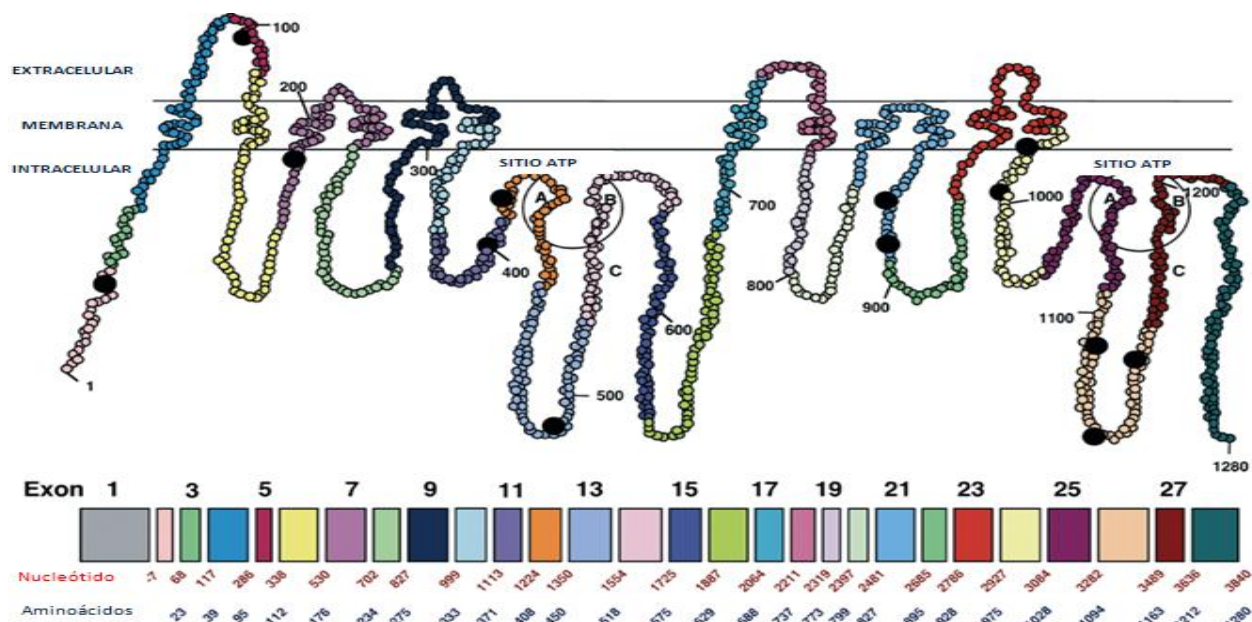


Figura 3.- Representación esquemática de la P-glicoproteína (Tomado de Ambudkar, 2003).

Alrededor del 20% de los pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC) no responden al tratamiento con Imatinib ya sea inicialmente o por la resistencia adquirida. Para estudiar el desarrollo de resistencia se generó *in vitro* líneas celulares con diferentes niveles de resistencia a Imatinib y Dasatinib; se midieron los niveles de expresión del mRNA de los genes ABC-B1, ABC-C1, ABC-G2 entre otros y se observó que en este tipo de leucemia los transportadores fueron sobre expresados en la mayoría de las líneas celulares, siendo su patrón de expresión dinámico, es decir, varía con el nivel de resistencia y la exposición crónica de drogas (Gromicho, 2011).

INTRODUCCIÓN

Svirnovski y colaboradores (2009) estudiaron células de adultos con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), Leucemia Mieloide Aguda (LMA) y Leucemia Linfocítica Crónica (LLC), donde observó que la expresión de los transportadores ABC-B1 y ABC-G2 se sobreexpresaban en células de pacientes con LLC que tenían un régimen de terapia agresivo; también se correlacionó la resistencia a Doxorrubicina, Rubomicina y L-asparaginina con la sobreexpresión de la proteína P-gp en las muestras de Leucemias Agudas. Una tendencia de disminución de actividad citotóxica de la Doxorrubicina fue demostrada en células que sobre expresaron la proteína BCRP, sugiriendo que los transportadores juegan un papel importante en la resistencia a fármacos.

3.2. SUBFAMILIA ABC-C

Esta subfamilia tiene 13 genes, dentro de los cuales está el gen de la fibrosis quística (CFTR, también llamado ABC-C7); codifican transportadores asociados con la resistencia a múltiples fármacos (Tabla3) (Glavinas, 2004).

FAMILIA	MIEMBRO	NOMBRE COMÚN	UBICACIÓN	FUNCIÓN
ABC C	ABCC1	MRP1		Resistencia a drogas Transporte de iones orgánicos Transporte de nucleótidos Transporte de ion cloro Receptores de sulfonilurea
	ABCC2	MMRP2		
	ABCC3	MRP3	Hígado	
	ABCC4	MRP4	Pulmón	
	ABCC5	MRP5	Próstata	
	ABCC6	MRP6	Intestino	
	ABCC7	CFTR	Riñón	
	ABCC8	SUR	Páncreas	
	ABCC9	SUR2	Corazón	
	ABCC10	MRP7	Musculo	
	ABCC11	MRP8		
	ABCC12	MRP9		

Tabla 3.- Subfamilia de genes ABC-C, su ubicación y su función principal (Glavinas, 2004).

3.2.1. ABC-C1

La proteína de resistencia a multidroga (MRP1/ABCC1) de 190kDa fue identificada originalmente por Cole y colaboradores en 1992 por su sobreexpresión en células de cáncer de pulmón, es mapeado y localizado el gen en el cromosoma 16p13.1 (Figura 4). Grant y colaboradores (1997) encuentran el gen MRP1 cerca del punto de corte de brazo corto de la inversión pericéntrica asociados a la Leucemia Mieloide Aguda subtipo M4Eo y en el lado de los telómeros de los genes MYH11.

INTRODUCCIÓN

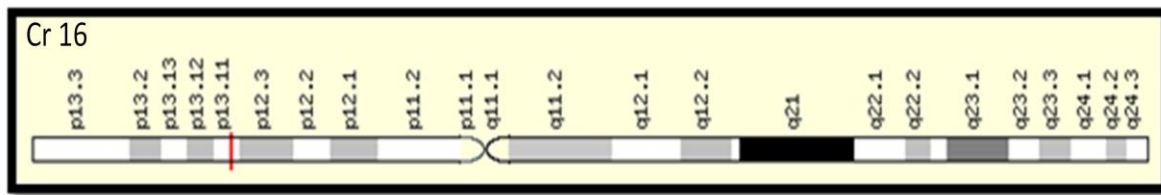


Figura 4.- Representación esquemática de localización del gen ABC-C1 en el bazo corto del cromosoma 16 en la posición 13.11 (Genetics Cards, 2011).

ABC C1 es un transportador miembro de la subfamilia MRP que participa en la resistencia a múltiples fármacos, la proteína MRP1 se encuentra en el pulmón, testículos, y las células mononucleares de sangre periférica; además de su capacidad para conferir resistencia en las células tumorales mediante la reducción de la acumulación del fármaco por la expulsión activa, Mrp1 se expresa en tejidos normales para la exportación de aniones orgánicos y drogas desde el citoplasma, es dependiente de ATP de transporte de glutatión y de conjugados de glutatión, C4 leucotrienos, estradiol-17-beta-o-glucurónido, el metotrexato, los medicamentos antivirales y otros xenobióticos.. (Leslie, 2001; Rosenberg, 2001).

Mrp1, Mrp2 y Mrp3 tiene un gran parecido estructural, confieren resistencia a una variedad de productos, como el metotrexato, y tiene la facilidad para el transporte de glutatión y los conjugados de glucoronato. Mrp1 es una bomba de desintoxicación de Xenobióticos, tiene una estructura básica que consiste en dos dominios que abarcan la membrana, cada una seguida por un dominio de unión de nucleótidos (Figura 5) (Rosenberg, 2001; Kruh, 2001).

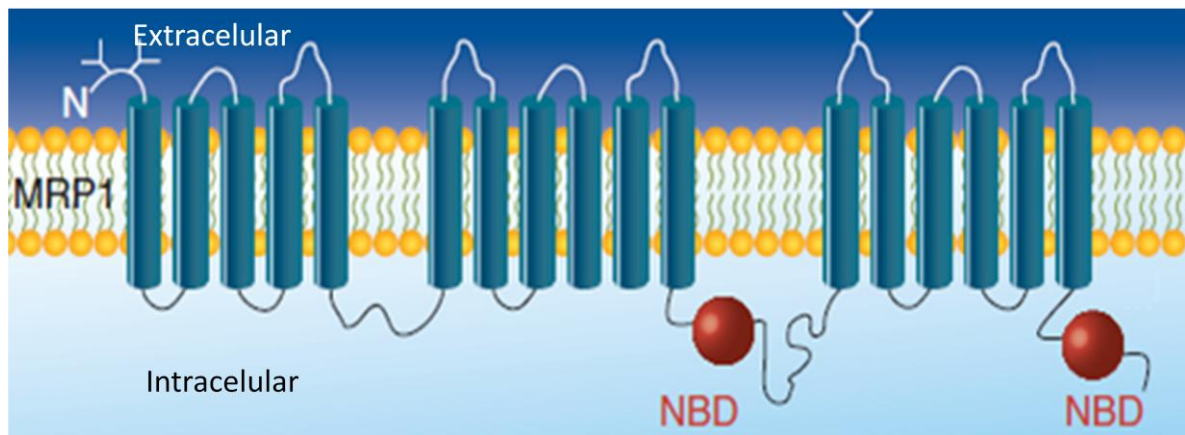


Figura 5.- Representación esquemática de forma estructural de la proteína MRP1 (Sharom, 2008).

INTRODUCCIÓN

3.3. SUBFAMILIA ABC-G

La subfamilia G comprende 5 genes que codifican el medio inverso de los transportistas, lo que significa que forman la segunda mitad de los heterodímeros (Tabla 4). Debido al corte y empalme alternativo, por lo menos se han identificado 18 proteínas distintas como productos de los cinco genes (Glavinas, 2004).

FAMILIA	MIEMBRO	NOMBRE COMÚN	UBICACIÓN	FUNCIÓN
ABC G	ABCG1	ABC8(Human, White)		
	ABCG2	ABCP (MXR, BCRP)	Placenta	Resistencia a drogas
	ABCG4	WHITE2	Hígado	Transporte de colesterol
	ABCG5	STEROLINE1	Intestino	Transporte de esteroides
	ABCG8	STEROLINE2		

Tabla 4.- Subfamilia de genes ABC-G, su ubicación y su función principal (Glavinas, 2004).

3.3.1. ABC-G2

Allikmets y colaboradores (1998) caracterizan un gen transportador de la familia ABC, que se designa ABCP, por estar altamente expresado en la placenta así como en una variedad de tejidos normales, incluyendo riñón, e intestinos, además de células endoteliales cerebrales y células madre hematopoyéticas. Su expresión es fuertemente inducida en glándulas mamarias durante el embarazo y lactancia. Similar a la Pgp, asume la función de proteger los tejidos de toxinas, y comúnmente juega un papel en la absorción intestinal, penetración cerebral y pasaje de medicamentos a la placenta. Se encuentra localizado en el cromosoma 4 en la posición q22.1 y codifica una proteína de 663 aminoácidos (Figura 6 y 7).

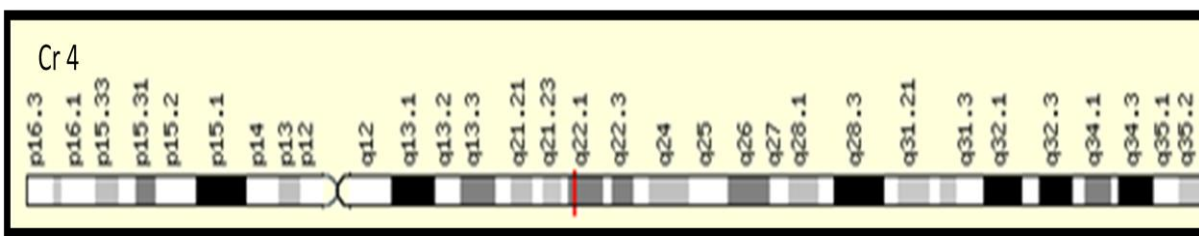


Figura 6.- Representación esquemática de localización del gen ABC-G2 en el en el brazo largo del cromosoma 4 en la posición 22.1 (Genetics Cards, 2011).

MCF-7/AdrVp es una sub-línea celular multi-resistente de cáncer de mama humano que demuestra una reducción dependiente de ATP en la acumulación intracelular de medicamento como antraciclina en ausencia de la sobreexpresión de transportadores de resistencia a múltiples

INTRODUCCIÓN

fármacos conocidos como la P-glicoproteína (PGY1), Doyle y colaboradores (1998) identificaron un mRNA de 2,4 kb que se sobreexpresa en las células de la sub-línea en relación a las células originales MCF-7, por lo que la llamaron proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP por sus sigla en inglés Breast Cancer Resistance Protein).

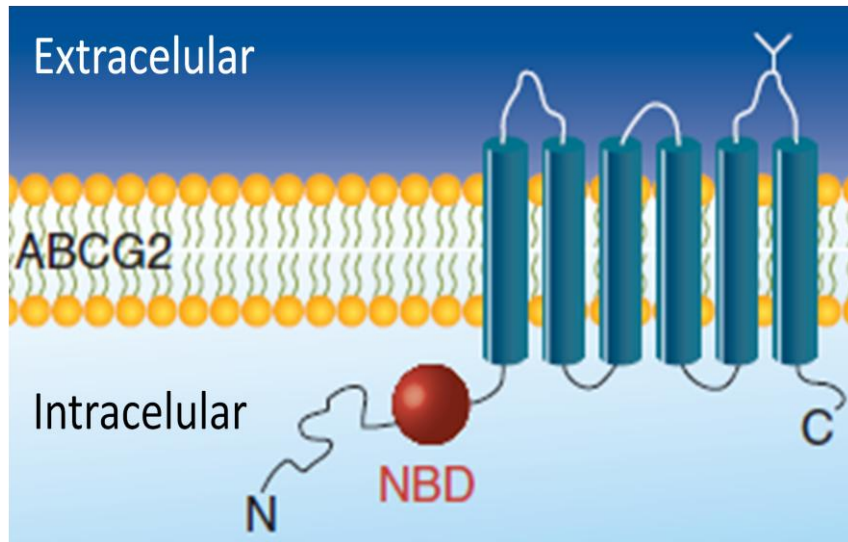


Figura 7.- Representación esquemática de la proteína BCRP (Sharom, 2008).

Miyake y colaboradores (1999) clonan dos cDNA de ABCG2, a los que llamaron MRX1 y MRX2, que se sobreexpresan en las células de carcinoma de colon seleccionadas por su resistencia a mitoxantrona. Mediante un análisis de Northern blot se confirmó la sobreexpresión del mRNA marcado en las células resistentes, utilizando células endoteliales de cerebro porcino como un modelo para la barrera hemato-encefálica.

Eisenblätter y colaboradores (2002) identifican en las células porcinas que el mRNA de ABCG2 es sobreexpresado en las células que son tratadas con hidrocortisona. Por lo tanto concluye que BCRP confiere resistencia a la mitoxantrona, doxorubicina y daunorrubicina, y reduce la acumulación y retención de daunorrubicina, por lo cual BCRP es un transportador de xenobióticos que parece desempeñar un papel importante en el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos en el cáncer de mama. ABC-G2 tiene funciones de transporte de múltiples fármacos generando resistencia, los esteroides (colesterol, estradiol, progesterona y testosterona) y ciertos metabolitos de clorofila, así como aniones orgánicos, son transportados por ABC-G2. (Vasiliou, 2009),

4. LEUCEMIA

El cáncer es la principal causa de mortalidad a escala mundial, se le atribuyen 7.6 millones de defunciones (aproximadamente el 13%) ocurridas en todo el mundo en 2008 (OMS, 2011).



Figura 8.- Relevancia de las Leucemias a Nivel Mundial, número de casos y muertes estimadas (Tomado de Jemal, 2011)

La leucemia representa el 3.2% de la causa de muerte en el caso de los hombre y 2.7% en mujeres a nivel mundial (Jemal, 2011) (Figura 8). En México de acuerdo a la Secretaría de Salud (SSA) y las estadísticas del INEGI en 2008 se reporta que del egreso hospitalario por cáncer, la leucemia tuvo mayor presencia (8.7%), afectando principalmente a los hombres 15.1%, mientras que las mujeres un 5.6% (Tabla 5), siendo LLA el tipo de leucemia más frecuente con alrededor del 40% (INEGI, 2008). La producción de células sanguíneas es un proceso complejo a través del cual las células troncales hematopoyéticas proliferan y se diferencian, dando lugar a los distintos tipos de células maduras circulantes (i.e, eritrocitos, granulocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas). La hematopoyesis tiene lugar en la médula ósea, en donde una intrincada red de células estromales y sus productos, regulan cada una de las etapas que conducen a la generación de células primitivas, intermedias y maduras (Figura 9) (Mayani, 2007).

El concepto de enfermedades hemato-oncológicas designa un grupo de neoplasias generadas por alteraciones en los mecanismos de la vida, del crecimiento, de la diferenciación y de la muerte de las células progenitoras hematopoyéticas. La importancia de las enfermedades

INTRODUCCIÓN

hemato-oncológicas radica en que algunas de ellas presentan elevada incidencia y mortalidad en población infantil o adulta joven (Tirado-Gómez, 2007).

Tipo de Tumor Maligno	Total	Hombres	Mujeres
Total	100	100.0	100.0
Leucemias	8.7	15.2	5.6
Mama	5.8	0.4	8.3
Cuello del Útero	3.3	0.0	4.8
Ovario	2.1	0.0	3.1
Tráquea, bronquios y pulmón	20.0	4.1	1.0
Próstata	1.9	6.0	0.0
Estomago	1.8	3.1	1.1
Colon	1.8	3.2	1.2
Hígado	1.2	1.9	0.8
Recto igmoides, recto y ano	1.1	2.0	0.7
Vejiga	1.0	2.2	0.4
Labio, cavidad bucal y faringe	0.9	1.9	0.5
Páncreas	0.9	1.5	0.7
Cuerpo del Útero	0.8	0.0	1.1
Melanoma y otros tumores de la piel	0.5	0.6	0.3
Esófago	0.4	1.1	0.1
Otros	65.8	56.8	70.3

Tabla 5.- relevancia de las leucemias en México Fuente. SSA DGS (2008) Egresos hospitalarios 2008 Proceso INEGI

Por lo tanto la Leucemia se define como la proliferación neoplásica de células hematopoyéticas en una simple estirpe con posterior proliferación y expansión, cuya acumulación se acompaña de una disminución del tejido hematopoyético normal en médula ósea y posterior invasión de sangre periférica y otros tejidos (Tirado-Gómez, 2007)

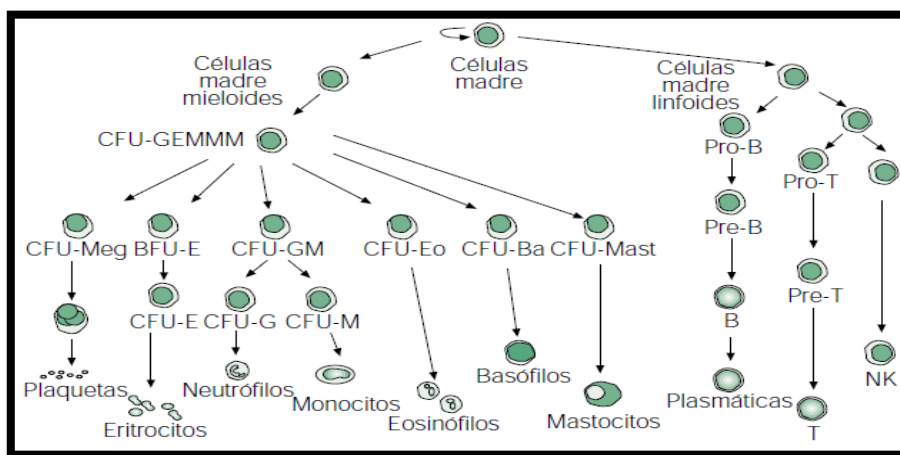


Figura 9.- Representación esquemática del proceso hematopoyético (Tomado de Ramírez, 2004)

4.1. CLASIFICACION

A partir de la década de los setenta, la leucemia aguda y los síndromes mielodisplásicos (SMD) se han definido y clasificado de acuerdo con las recomendaciones del grupo Franco-Americano-Británico (FAB). Actualmente, estas clasificaciones están siendo sustituidas por las de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicadas en 2001, las cuales son mucho más amplias en sus objetivos e incluyen trastornos mieloproliferativos y linfoproliferativos crónicos. La aplicación de los criterios de la OMS requiere conocer los resultados de los análisis de inmunofenotipificación y citogenéticos (Lewis, 2008).

Las LLA es un trastorno heterogéneo cuya clasificación se basa en criterios morfológicos e inmunológicos; según el sistema FAB divide esta enfermedad en tres grupos (Tabla 6) (Martínez-Murillo, 2007):

Subtipo	Marcador de superficie	Morfología
Células T (15 a 20%)	CD2 (Leu5) (+) CD7 (Leu9) (+) CD5 (Leu1) (+)	L1, L2
Células pre-B (75 a 80%)	Ia (HDLA_DR) (+) 100% CD19 (B4)(+) 95% CALLA (CD10)(+)75% Cadena m citoplasmica (+)15%	L1, L2
Células B (2 a 7%)	Ig de superficie en membrana (IgsM) CD20 (+) CD19(+) Ia (+)	L3

Tabla 6.- Clasificación de la Leucemia Linfocítica Aguda (Martínez-Murillo, 2007; OMS, 2011)

Las LMA son neoplasias hematológicas caracterizadas por la proliferación incontrolada de blastos de estirpe mieloide en la médula ósea y los tejidos periféricos. Se diferencian de acuerdo a las características citológicas, inmunofenotípicas y citogenéticas en ocho subtipos (Tabla 7) (Vardiman, 2009; OMS, 2011).

INTRODUCCIÓN

	Morfología	Histoquímica	Inmunofenotipo	Citogenética
M0	Indiferenciada	MPO + <3%. PAS y esterasa-	HLA-DR, CD13 CD33, CD34+; CD7 Y TdT +/-	11q13; cambios complejos en 5 o 7; t(9;22) ocasionalmente
M1	Mieloide	MPO + <3%. PAS y esterasa-	Similar a MO excepto CD15+/-	-5, -7, -17, del 3p, +21, +8
M2	Mieloide con diferenciación	MPO >10%; PAS y esterasa-	HLA-DR+; CD13 CD33+; (8;21); CD34+/-; CD15+	-5, -7, t(6,9), +8
M3	Promielocítica	MPO ++; esterasa y PAS -	HLA-DR-; CD13, CD15, CD33; (15;17); CD34+/- CD15+	
M4	Mielomonocítica	MPO y esterasa+; PAS -	HLA-DR, CD14, CD15 +/-; CD4 débil +; CD34+/-; CD33 >CD13; CD11b	Inv (16) 0 -16q, t(8,21) a veces -5, -7, +8
M5	Monocítica	MPO -; PAS y esterasa+	+ (9;11) (p21;p23), +8	
M6	Eritroleucemia	PAS ++; MPO y esterasa -	HLA-DR, CD13, CD33+/-; glicoforina A++	-7, o del (7q) y/o -5 o del -3, +8
M7	Megacarioblástica	PAS+/-; MPO y esterasa-	HLA-DR, CD34 +; CD33+/-; (12:21) CD41, CD61 + glicoproteína plaquetaria +	Hiperploidía; +8, +21

Tabla 7.- Clasificación de las Leucemias Mieloides Agudas (Tomado y modificado de Vardiman, 2009; Martínez-Murillo, 2007; OMS, 2011)

4.2. ETIOLOGIA GENERAL

La etiología de la Leucemia Aguda sigue siendo desconocida, sin embargo, una localización de especial interés en el caso de las LMA es el brazo largo del cromosoma 5, donde se encuentran varios factores de crecimiento (IL-3, GM-CSF, etc.), la anomalía citogenética sugiere que la delección de esta región podría ser importante en estas enfermedades clonales; la alteración molecular mejor caracterizada de las LMA es la translocación t(15:17) (q22;q11) de la LMA-M3 (promielocítica) (Sans-Sabrafen, 2006). De todas las leucemias, la LMA es la que muestra mayor asociación con la exposición a la radiación y a las toxinas. En las LLA la translocación más conocida es la t (8:14) (q24.q32) característica de la LLA-L3 y del linfoma de Burkitt, el oncogén *c-myc* sufre una translocación desde el cromosoma 8 al 14, donde se sitúa estratégicamente junto al locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina relacionándose con el desarrollo y progresión de la LLA. Se ha comprobado que la exposición a la radiación de los sobrevivientes de las bombas atómicas lanzadas en Japón se asocia a un mayor riesgo de LLA (Sans-Sabrafen, 2006).

4.3. FACTORES PRONÓSTICO

El pronóstico dependerá de la interrelación entre algunos factores como la edad, alteraciones citogenéticas, inmunofenotipo, leucocitos, e infiltración a sistema nervioso; el impacto de los factores pronóstico se ha relacionado con la eficacia terapéutica a través de mejores regímenes de tratamiento que toman en cuenta variables pronósticas.

La LLA-L1 representa el 78% de las leucemias infantiles pero la LLA-L2 es frecuente en el adulto. Con el uso de protocolos prolongados e intensivos de quimioterapia de combinación y profilaxis del SNC se ha logrado tasas de remisión del 60- 80% y supervivencias a largo plazo de 40% en adultos. Los factores pronóstico (Tabla 8) que identifican a los subgrupos de LLA de alto riesgo ayudan a individualizar el tratamiento y a definir el papel que desempeñan (Vardiman, 2009).

Variables	Riesgo habitual	Riesgo alto
Edad	< 35 años	>35 años
Cuenta leucocitaria inicial	< 30 x10 ³ /ul b <100 x10 ³ /ul t	> 30 x10 ³ /ul b >100 x10 ³ /ul t
Genética	normal hiperdiploidía (50 cr)	t(9:22), t(8:14) < 45 cr
Inmunofenotipo	linaje b	linaje t
Morfología	L1, L2	L3 Burkitt
Respuesta	remisión 4 semanas	no remisión 4 semanas
Infiltración SNC	ausente	Presente

Tabla 8.- Factores pronóstico de las Leucemia Aguda Linfoblástica.

El desarrollo de una LMA secundaria es una complicación grave de la quimioterapia, que presenta escasas posibilidades de curación en la actualidad. Múltiples estudios han demostrado que el principal factor pronóstico para conseguir la curación de la enfermedad es la ausencia de alteraciones citogenéticas desfavorables; otros pronósticos desfavorables incluyen la edad avanzada en el momento del diagnóstico (>60 años), los antecedentes de mielodisplasia, la expresión del gen de resistencia a multidroga MDR-1 y la presencia de blastos CD34+ (Tabla 9) (Martínez-Murillo, 2007; Sans-Sabrafen, 2009).

INTRODUCCIÓN

	FAVORABLE	INTERMEDIO	DESFAVORABLE
Edad	<60 años	<60 años	>60 años
Alteración cromosómica	t(8:21)(q22.1;q22.3) t(15;17)(q22;q11.2) Inv 16(p13.2;q22)/t(16:1) (p13;q22)	Cariotipo normal (>20 metafases)	Cariotipo complejo (3 o mas anomalías que No incluyan t(8:21), t(15;17), Inv 16, t(16:16) o t(9:11)
Re-arreglo balanceado	-----	T(9;11)(p22;q23) del (7q) del (9q) del (11q) del (20q)	Inv 3(q21;q26) /t(3:3) (q21;q26) t(6;9) (p23;q24) t(6;11) (q27;q23) t(11;19) (q23;p13.1)
Re-arreglo desbalanceado	-----	-Y +8 +11 +13 +21	del (5q)
Aberraciones numéricas	-----	-----	-5 -7
Otros factores	-----	-----	Anomalías 12p Haber padecido trastornos hematológicos por más de un mes antes del Dx de LAM como: anemia, trombocitopenia, leucopenia Leucositosis en el primer análisis (<50,000/uL) Enfermedades Crónicas o Recurrentes

Tabla 9.- Tabla de Factores pronóstico en las LMA (Martínez-Murillo, 2007; Rozen, 2005)

4.4. TRATAMIENTO

El objetivo de la quimioterapia consiste en erradicar todas las células neoplásicas dentro de la medula ósea para permitir la repoblación con precursores hematopoyéticos normales. El problema en este tipo de tratamiento consiste en que los fármacos usados no son específicos para las células leucémicas, por tanto, durante el tratamiento también mueren muchas células normales. La mayor parte de los fármacos utilizados son: antimetabolitos, agentes alquilantes y antibióticos. El procedimiento de quimioterapia incluye tres fases, inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento. El objetivo del tratamiento de inducción a la remisión es erradicar el 99% de la masa leucémica inicial, restaurar la hematopoyesis normal y alcanzar un estado funcional normal. Los medicamentos incluidos en los esquemas de inducción a la remisión son: glucocorticoides (prednisona o dexametasona), vincristina, antraciclina, L-asparginasa y la adición de ciclofosfamida en pacientes de alto riesgo como parte de una terapia intensiva. La terapéutica de inducción clásica de la LMA con una antraciclina (habitualmente idaurubicina) junto al arabinosido de citosina (Ara-C) presenta una actividad escasa en las

INTRODUCCIÓN

leucemias secundarias, alcanzándose la respuesta citogenética (RC) sólo en el 50% de los pacientes y habitualmente de corta duración (media de <5 meses). Este tratamiento solo puede considerarse estándar en aquellos casos con alteraciones genéticas favorables, e incluso en estos casos los resultados son peores que en las leucemias primarias (Díaz, 2003).

Las mejorías en los regímenes de tratamiento ha modificado el pronóstico de los pacientes. La terapia para la LLA es uno de los tratamientos más complejos en oncología, múltiples medicamentos se encuentran implicados, con dosis e intensidades progresivas con el objetivo de reconstituir la hematopoyesis normal, prevenir el desarrollo de subclonas resistentes, proveer una protección adecuada a diversos sitios denominados santuarios (ej. SNC, testículos) y eliminar la enfermedad mínima residual. Los protocolos de tratamiento de la LLA tanto en niños como en adulto se basan en la prolongada administración de fármacos y la profilaxis del SNC, es decir se aprovechan agentes quimioterapéuticos de distintas toxicidades y mecanismos de acción, siendo los fármacos más activos las antraciclinas, la vincristina, la prednisona, el metotrexate, la ciclofosfamida y la 6-mercaptopurina; la administración combinada sólo genera una remisión de 70-90%, pero la supervivencia global sólo llega entre 35-50% en un periodo de 5 años (Martínez-Murillo, 2011; Sans-Sabrafen, 2006).

Los esquemas que han mostrado mejores tasas de remisión completa son aquellos que han empleado dosis altas de quimioterapia combinada de diferentes agentes, un ejemplo es el esquema de tratamiento LAL 2007 que consiste en una fases de inducción basadas en vincristina, prednidsona, metrotexate, Ara-C y ciclofosfamida (dos ciclos con intervalo de 28 días), seguido de una fase de consolidación basada en metrotexate, etopósido y citarabina (dos ciclos con intervalo de 28 días) y una fase de mantenimiento basada en mercaptopurina, metrotexate, vincristina y prednidsona (duración de 2 años), también existen los esquemas alternativos como el HyperCVAD, AL-87 y el esquema IDA-FLAG que se basan en dosis más altas de quimioterapia para los pacientes que no respondan o tengan una recaída. Sin embargo los tratamientos actuales de las Leucemias en particular, presentan dos inconvenientes: el primero viene dado por su inespecificidad, no diferencian células tumorales de células normales y el segundo los mecanismos de resistencia conferida por los genes ABC's, los cuales presentan afinidad a los medicamentos anti-cancerígenos (Tabla 10) (Sharom, 2008; Hoffmann, 2004).

INTRODUCCIÓN

	ABCB1	ABCC1	ABCG2
Sinónimo	MDR-1	MRP-1	BCRP
mRNA	4.5 kb	4.3 kb	2.4 kb
Localización	Cromosoma 7 sitio q21.1	Cromosoma 16 sitio p13.11	Cromosoma 4 sitio q22.1
Proteína	170 kDa	160 kDa	72 kDa
Función	Proteccion Barrera Hemato-encefálica	Desintoxicación de Xenobióticos Transp. Glutación	Protege tejidos de toxinas, pasaje a placenta
Órgano principal	Barrera hemato-encefálica, hígado, riñón e intestino	Pulmón testículo, y CMN de sangre periférica	Placenta, riñón, intestino
Tipos de canceres	Leucemias,	Pulmón, Leucemia	Cáncer de Mama, Colón, Leucemias
Sustratos	Paclitaxel, Doxorubicina, Daunorrubicina, Imatinib, Vincristina, Vinblastina, Etoposido, etc.	Doxorrubicina, Daunorrubicina, Vincristina, Rodamina, Metotrexate, Mitoxantrona,	Topotecan, Doxorubicina, Daunorrubicina, Rodamina, Antraciclinas Metotrexate. Imatinib, Gefitinib.
Inhibidores	Verapamilo Ciclosporina A Ketokonazol	Ciclosporina A V-104	Fumitremorgin , GF120918

Tabla.- 10 Cuadro comparativo de las características de los genes ABC's y sus principales sustratos e inhibidores (Tomado y modificado de Sharom, 2008; Hoffmann, 2004; Roninson, 1986)

5. JUSTIFICACIÓN

Las principales proteínas de resistencia a múltiples fármacos son codificadas por los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2, se ha establecido que estas proteínas reconocen una amplia gama de sustratos de drogas utilizadas como quimioterapéuticos de primera elección para el tratamiento del cáncer.

Respecto a los cánceres hematológicos en particular en las leucemias agudas el 40-80% de los pacientes logran una remisión completa con los regímenes terapéuticos actuales, sin embargo la mayoría de estos pacientes presentan una recaída con enfermedad resistente, incluso con tratamiento intensivo, por lo tanto la tasa de supervivencia global a los 5 años es de solo el 35%.

Este trabajo pretende evaluar la participación de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en la Leucemia Aguda, su importancia como principal mecanismo de resistencia a drogas y su relación con el pronóstico de la enfermedad.

6. HIPOTESIS

Si los pacientes con Leucemia Aguda de *novo* que ingresan al servicio de Hematología del Hospital General de México presentan expresión o co-expresión de alguno de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2, entonces existirá una relación con la respuesta hematológica.

7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en pacientes con Leucemia Aguda del Hospital General de México y su relación con la respuesta hematológica.

7.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en las líneas celulares hematológicas K562, Jurkat, HL-60, Reh
- Evaluar la expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en donadores sanos del Banco de Sangre del Hospital General de México.
- Evaluar la expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en pacientes con la Leucemia Aguda Linfoblástica y Leucemia Aguda Mieloblástica
- Determinar si la expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 Y ABC-G2 tiene relación con la respuesta hematológica

8. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

a. TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo es un estudio de tipo: Experimental, Prospectivo, Longitudinal.

b. DEFINICION DEL UNIVERSO

Líneas celulares hematológicas K562, Jurkat, HL-60, Reh, muestras de Individuos sanos y pacientes con Leucemia Aguda de *novo*.

c. MUESTRA

En el estudio se incluirán 35 pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda y 10 pacientes con Leucemia Aguda Mieloblástica de *novo* del servicio de Hematología del Hospital General de México, en el periodo comprendido de Diciembre de 2011 a Agosto del 2012.

d. CRITERIOS DE SELECCIÓN

i. INCLUSIÓN

- Pacientes con Dx de Leucemia Aguda Mieloide o Linfoide confirmado
- Pacientes sin tratamiento
- Hombres y mujeres
- Mayores de 18 años
- Pacientes que al inicio se les haya tomado muestra de Medula Ósea
- Pacientes que tengan carta de consentimiento informado

ii. EXCLUSIÓN

- Pacientes con Leucemia Aguda Mieloide o Linfoide con tratamiento
- Menores de 18 años

iii. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Pacientes que abandonen el tratamiento
- Pacientes que no tengan expediente
- Pacientes que se cambien de clínica

e. VARIABLES

i. DEPENDIENTE

Respuesta hematológica al tratamiento.

ii. INDEPENDIENTE

Expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2

f. DEFINICIÓN DEL GRUPO CONTROL

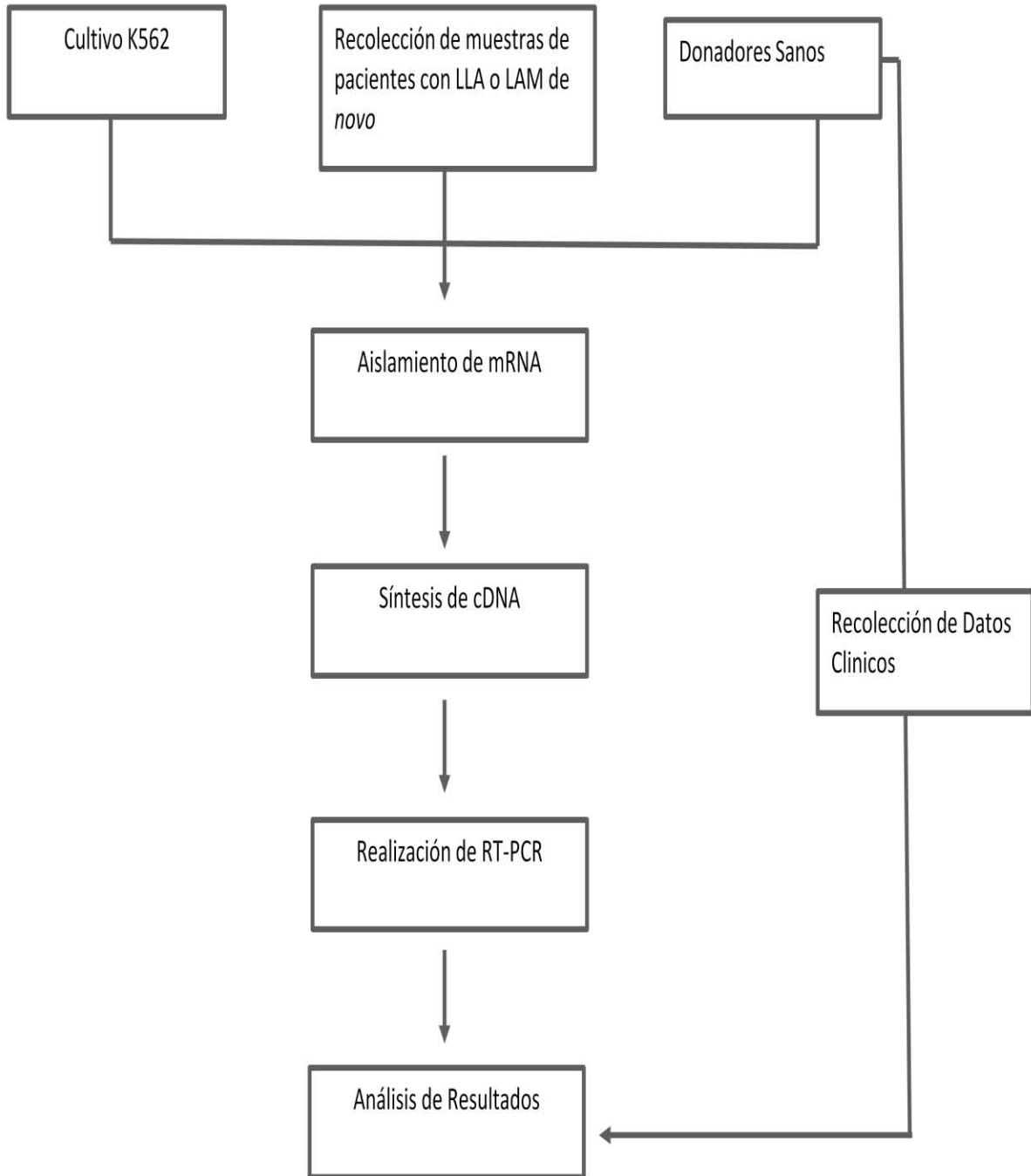
i. Positivo

K562, Línea celular, derivada por Lozzio y Lozzio, de una efusión pleural de paciente femenino de 65 años, con Leucemia Mieloide Crónica, en crisis blástica terminal; BCR-ABL positivo, rompimiento mayor (b3a2).

g. MANEJO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos obtenidos serán analizados mediante una prueba de X^2 . La significancia estadística será determinada como $p < 0.05$.

9. DIAGRAMA DE TRABAJO



9.1. CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares K562 derivada una LMC en crisis blástica, HL-60 derivada de una LAM-M3, Jurkat derivada de LAL infantil, y REH derivada de una LAL de adulto, fueron obtenidas del banco de líneas celulares del Laboratorio de Biología Molecular del servicio de Hematología (U-204 del Hospital General de México) y fueron cultivadas en condiciones de esterilidad, en medio RPMI-1640 (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA) suplementado al 10% con Suero Fetal Bovino (FBS, Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA), piruvato de sodio 1mM (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA), L- glutamina 2 mM (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA), Bicarbonato de sodio 1 mM (Sigma, Life Science) , Penicilina 100 u/ml (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA), Estreptomicina 100 µg/ml (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA), manteniendo la incubación a 37 °C en una atmósfera controlada al 5% de CO₂

9.2. SEPARACIÓN DE POBLACIONES CELULARES POR SOLUCIÓN LÍTICA

Las muestras de Aspirado de Médula Ósea de pacientes con LA, fueron obtenidas en jeringa previamente heparinizada para evitar la coagulación de la sangre (tomadas por médicos hematólogos). Las muestras de pacientes con LA, fueron diluidas con PBS 1X (Phosphates Buffer Solution), homogeneizando 3 veces por inversión. La mezcla PBS-sangre fue centrifugada a 2500 rpm durante 7 minutos a 4°C, se recuperó el anillo de células mononucleadas (CMN) y se añadió Solución Lítica (NH₄Cl 2X, EDTA 5M, NaHCO₃ 0.1M, pH 7.2) incubando por 15 minutos y transcurrido se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos, fue lavado el pellet con PBS 1X, a temperatura constante de 4°C. Las muestras se almacenaron -80 °C hasta su uso.

Para la separación de poblaciones en individuo sano, se colectaron 20 muestras de Individuo Sano, donadas por el Banco de Sangre del H.G.M., utilizando tubos al vacío con anticoagulante EDTA. Las muestras se procesaron de forma normal por Solución Lítica para aislar los monocitos y linfocitos.

9.3. AISLAMIENTO DE RNA

9.3.1. TÉCNICA DE CHOMCZYNSKI Y SACCHI

Para la extracción de RNA total de pacientes con LA y líneas celulares, al pellet obtenido, se agregó 500 µl de solución D (tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM, sarcosyl al 0.5% y 2-mercaptoetanol 0.1 M), mezclado por vortex hasta homogenizar completamente. Se adicionó 100 µL de acetato de sodio 2 M pH 4, se agitó vigorosamente. Se agregó 500 µL de fenol saturado homogenizado por inversión, posteriormente se adicionó 100 µL de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1) y fue homogeneizado por completo. Posteriormente se incubó a 4°C durante 15 minutos y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C, observando tres fases: la parte inferior (acetato de sodio y fenol saturado), la intermedia (DNA y proteínas) y la superior (RNA). La fase superior fue colectada y se agregó 1ml de etanol absoluto (99.9%) frio para precipitar el RNA mezclando por inversión. Posterior a una incubación a -20 °C durante toda la noche, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min, a 4°C, cuidadosamente fue decantado el sobrenadante, se adicionó 500 µl etanol al 75 %, y se centrifugó a 7500 rpm durante 10 min, a 4°C, el sobrenadante se decantó, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente aproximadamente 8 min. Por último fue disuelto el RNA total en agua inyectable estéril (de 10 a 40 µl, según el tamaño del pellet). Para linearizar el RNA se incubó a 70°C por 10 minutos. Fue cuantificado y se determinó su pureza. Las muestras se almacenaron a -80°C.

9.4. CUANTIFICACIÓN DE RNA

La cuantificación de RNA total se realizó por espectrofotometría, utilizando una dilución 1:500 de RNA total, se leyó las absorbancias a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm respectivamente. Para el cálculo de concentración fue utilizada la siguiente fórmula:

$$[\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L})] = A_{260} \times \text{Factor de dilución} \times 0.04 \mu\text{g}/\mu\text{L}^1$$

Después se calculó la pureza de las muestras, haciendo una relación entre los valores obtenidos de las absorbancias, de la siguiente manera:

$$\text{Pureza}^2 \text{ del RNA} = A_{260} / A_{280}$$

1.- 1 unidad de densidad óptica de RNA total corresponde a 0.04 µg/µL.

2.- Donde el rango de pureza es de 1.2 a 2.

9.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA:

La calidad del RNA, fue corroborada por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, y para el análisis de los productos de PCR, se utilizó un gel de agarosa al 2 %, ambos fueron teñidos con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) al 0.08 %, utilizando como solución amortiguadora TAE 1x pH 7.6 (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 10 % y EDTA 2 mM). Para el revelado de RNA se utilizó: 2 µl de colorante (Loading Buffer al 1%), 2 µl de TAE 1x (pH 7.6) y 2 µl de RNA, en una cámara de electroforesis (Electroforetic gel system, VWR) a voltaje constante de 60 Volts durante 20 minutos. Fueron observadas las bandas características de RNA ribosomal 28S y 18S y los fragmentos de amplificación de la PCR.

9.6. SÍNTESIS DE cDNA (REVERSO TRANSCRIPCIÓN) CON OLIGO dT

El Oligo dT está constituido únicamente por timinas las cuales se unen a la cola poli A de cada uno de los RNA mensajeros. La síntesis de cDNA de las línea celular y pacientes con LA para realizar RT-PCR fue realizada con una concentración inicial de 2 µg/µL,

Se utilizó un volumen final de 20 µl. El volumen de RNA fue ajustado a las concentraciones indicadas previamente, se adicionó a 0.8 µl (0.5 µg/µl) de oligo dT (PROMEGA, Madison WI, USA) y el volumen correspondiente de agua inyectable, se dejó incubar a 70°C durante 10 minutos. Se pasó la reacción a hielo se adicionó 4 µl de buffer de reacción 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 10mM DTT) (PROMEGA, Madison WI, USA), 2 µL de dNTPs 10 µM (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA), y se incubó a 37 °C durante 2 minutos, finalmente se agregó 0.8 µl de enzima reverso transcriptasa MMLV (200 U/µl), (PROMEGA, Madison WI, USA) incubando a 37 °C durante 50 min. La enzima fue inactivada a 70 °C durante 10 min. Se almacenó a -80 °C hasta su uso.

METODOLOGIA

9.7. REACCIÓN EN CADENA POLIMERASA (PCR)

Se utilizó al gen GAPDH como gen constitutivo, para corroborar la integridad de cada una de las muestras analizadas. La secuencia de los primers, el tamaño del producto y los exones a los que se une, se muestran en la Tabla 10.

GEN	SECUENCIA	AMPLICON	UNION	TM
GAPDH	5'-CGGGAGCTTGTCATCAATGG-3' 3'-GCAGTACCCACACTTGGTAC-5'	221PB	Exón 5 Exón 6	60°C
ABC-B1 (MDR-1)	5'-AAAGCGACTGAATGTTTCAGT-3' 3'-TCTGCATTCTGGATGGTGGGA-5'	420pb	Exón 27 Exón 29	60°C
ABC-B1	5'-GCTCCTGACTCTGCCAAAGC-3' 3'-TCTTCACCTCCAGGCTCAGT-5'	202pb	Exón 24 Exón 25	60°C
ABC-C1	5'-CTGGGCTTATTTTCGGATCAA-3' 3'-TGAATGGGTCCAGGTTTCATT-5'	173pb	Exón 28 Exón 29	60°C
ABC-G2	5'-CACCTTATTGGCCTCAGGAA-3' 3'-CCTGCTTGGAAGGCTCTATG-5'	206 pb	Exón 7 Exón 9	60°C

Tabla 10.- Muestra la secuencia de los primers, el producto de amplificación.

Fue utilizado un volumen final de 10 μ l, adicionando 2.5 μ l de Buffer de reacción 5X Gotaq Flexi (200 mM Tris HCl, pH 8.4, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂), 0.5 μ l de primer forward (700 pM/ μ L) y 0.5 μ l primer reverse (700 pM/ μ L), 0.7 μ l de MgCl₂, 0.5 μ l de dNTPs, 4.15 μ l de H₂O inyectable estéril, 0.15 μ l de Taq DNA polimerasa y 1 μ l de cDNA. Se llevó a cabo la desnaturalización en un ciclo de 94 °C durante 5 minutos, posteriormente 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, la elongación en 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos. Los productos obtenidos por la técnica de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Se colocaron 10 μ l del producto y 2 μ l de colorante (Loading Buffer al 1%) utilizando una cámara de electroforesis (Electroforetic gel system, VWR) a voltaje constante de 60 volts durante 35 minutos. El gel fue visualizado en transiluminador UV (High Performance, UV Transilluminator UVP).

9.8. SECUENCIACIÓN DE ABC-B1, ABC-C1 Y ABC-G2

Se realizó la amplificación del gen ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 por RT-PCR en la línea celular K562, los fragmentos amplificados se secuenciaron con el kit (ABI Prism Dye Terminator Cycle sequencing).

ABI Prism Dye Terminator Cycle sequencing se basa en la fluorescencia emitida por los nucleótidos en la síntesis de los fragmentos ADN en la PCR. La secuencia fue alineada en el programa BLAST del Gene-Bank.

10. RESULTADOS

10.1. Expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en las líneas celulares hematológicas

Se observó la expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2; en 4 líneas celulares hematológicas, HL-60 (LAM), Jurkat (LAL), K562 (LGC) y Reh (LAL). Se aisló el RNA, se hizo la síntesis de cDNA con Oligo dT y se llevó a cabo la PCR amplificando el gen constitutivo GAPDH de 221 pb, en cada una de ellas, así como también se realizó la PCR para los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 generando un fragmento de 202pb, 173pb y 206pb respectivamente (Figura 10).

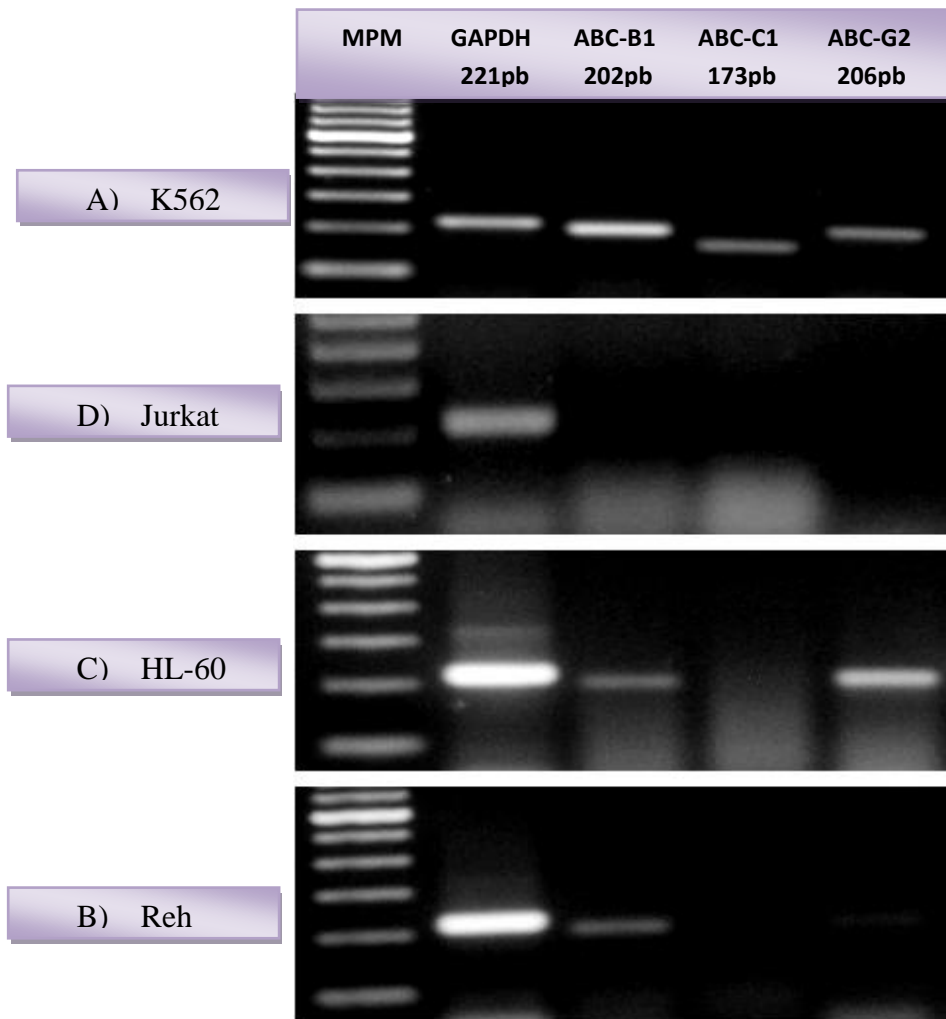


Figura 10.-LINEAS CELULARES, gel de agarosa al 2% en donde se observa la expresión del gen constitutivo GAPDH (221 pb) así como la expresión de los genes ABC-B1 (202 pb), ABC-C1 (173 pb) y ABC-G2 (206 pb) en las líneas celulares K562, Jurkat, HL-60 y Reh.

RESULTADOS

La expresión de los transportadores en las líneas celulares es reportado en la tabla 12 donde se observa que la línea celular HL-60 y Reh solo expresaron dos de los transportadores (ABC-B1 y ABC-G2), la línea celular Jurkat no tuvo expresión de ninguno de los transportadores, la línea celular K562 expresó todos los transportadores (ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2) por lo tanto se utilizó como control positivo para los experimentos posteriores.

Lineas Celulares	ABC-B1	ABC-C1	ABC-G2
K562	+	+	+
Jurkat	-	-	-
HL-60	+	-	+
Reh	+	-	+

Tabla 12.- EXPRESIÓN DE LOS GENES ABC's EN LÍNEAS CELULARES, se muestra la expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en las líneas celulares hematológicas K562, Jurkat, HL-60 y Reh.

10.2. Expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en donadores sanos del Banco de Sangre del Hospital General de México.

Fue observada la expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en una muestra de sangre periférica de 20 donadores sanos que fueron proporcionadas del Banco de Sangre del Hospital General de México.

10.2.1. Integridad del RNA de donadores sanos

El RNA de los donadores sanos extraído a partir de las células mononucleares fue visualizado en un gel de agarosa al 1% donde se observaron las bandas características de RNA ribosomal 28S y 18S que corroboran la integridad de la muestra (Figura 11).

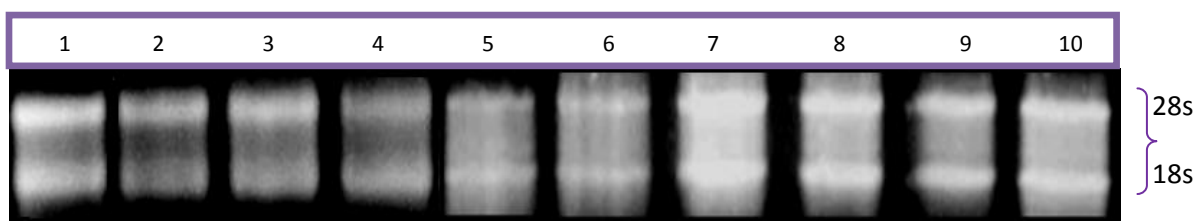


Figura 11.- INTEGRIDAD DEL RNA DE DONADORES SANOS, gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del RNA de los donadores sanos, se observan las bandas características del RNA 28S y 18S, los carriles del 1 al 10 corresponde a una muestra representativa de los 20 donadores sanos.

RESULTADOS

10.2.2. Expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en donadores sanos

La expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 para las muestras de los donadores sanos obtenidos del banco de sangre después de realizarse el cDNA, se realizó PCR del gen constitutivo GAPDH (221pb) para verificar la integridad (Figura 12). Una vez verificada la expresión del gen constitutivo se realizó la PCR para la amplificación de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 con un producto de 420 pb, 173pb y 206 pb respectivamente. (Figura 13).

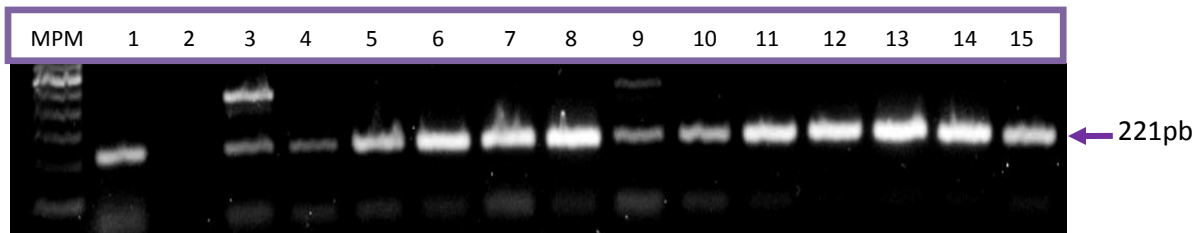
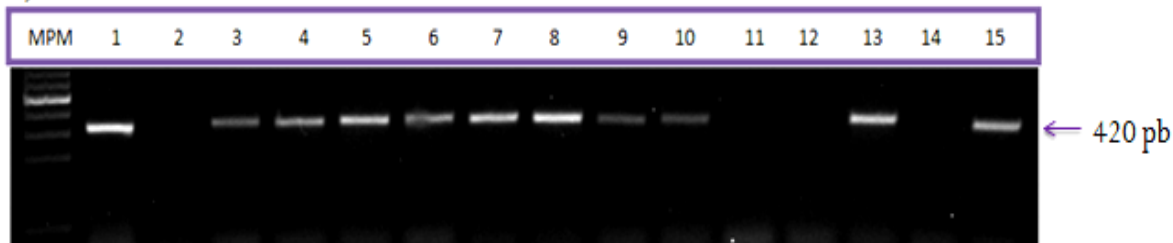


Figura 12.-GAPDH EN DONADORES SANOS, gel de agarosa al 2%, se observa la amplificación del gen constitutivo GAPDH (221pb), en el carril MPM e marcador de peso molecular (100pb), el carril 1 el control positivo (K562), el carril 2 el control negativo (H2O), del carril 3-15 donadores sanos (13/35 muestras representativas)

A) ABCB1



B) ABCC1



C) ABCG2



Figura 13.- EXPRESION DE LOS GENES ABC's DONADORES SANOS, gel de agarosa al 2% donde se observa la amplificación del gen A) ABC-B1 (420 pb), B) ABC-C1 (173pb), y C) ABC-G2 (206pb)se observa el carril MPM el marcador de peso molecular (de 100pb), en el carril 1 el control positivo (la línea celular K562), en el carril 2 el control negativo (reacción de H2O) del carril 3-15 donadores sanos (13/35 pacientes representativos).

RESULTADOS

La frecuencia de expresión de los genes transportadores en los donadores sanos para ABC-B1 fue de 90%(18/20), de ABC-C1 fue de 60% (12/20), el transportador con menor frecuencia es ABC-G2 con 30% (6/20) de expresión en la muestra. Los datos observados concuerdan con la literatura, siendo que ABC-B1 y ABC-C1 son expresados en linfocitos en sangre periférica, sin embargo la frecuencia de expresión baja de ABC-G2 se debe a que es principalmente expresado en células madre hematopoyéticas (Figura 14).

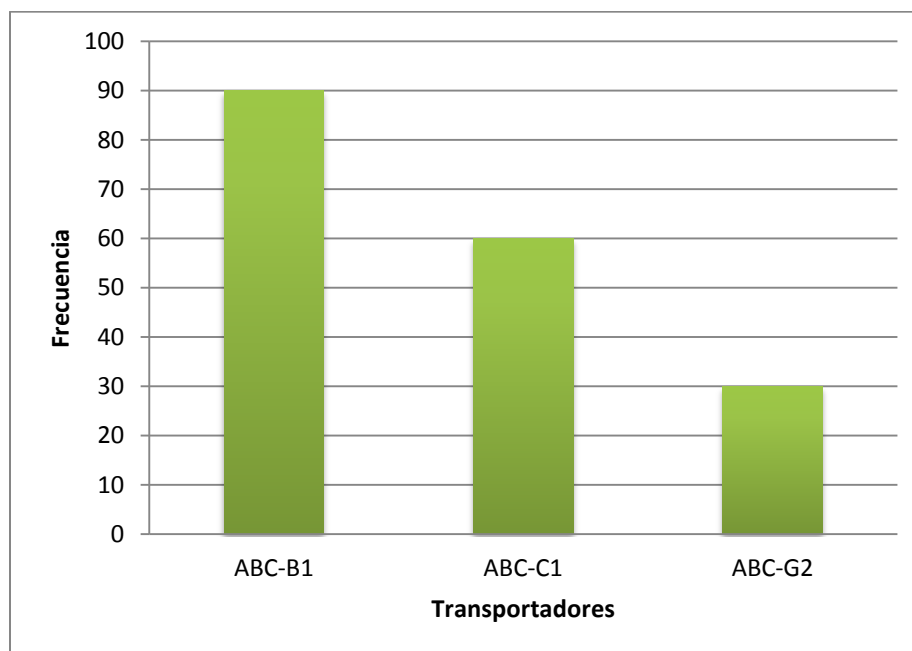


Figura 14.- FRECUENCIA DE EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES EN DONADORES SANOS. La grafica muestra que el porcentaje de expresión de los transportadores en donadores sanos es mayor para el gen ABC-B1 en comparación del ABC-G2 y ABC-C1.

10.3. Expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda

10.3.1. Pacientes integrados al estudio

Para observar la expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 se incluyeron 35 pacientes con LLA que ingresaron al servicio de Hematología del Hospital General de México, a los cuales se les corroboró el diagnóstico mediante inmunofenotipo, biometría hemática, aspirado de médula ósea y morfología celular, estos parámetros fueron realizados por el Servicio de Hematología e incorporados a los expedientes.

La edad promedio encontrada en el estudio fue de 36 años, el rango de edad en que más pacientes se encontraron fue de 18-25 (10/35) años y 26-33 (11/35) años. La frecuencia de edad observada concuerda con el anuario estadístico del HGM donde la frecuencia de edad en 2011 es mayor entre los 25-44 años (Figura 15).

RESULTADOS

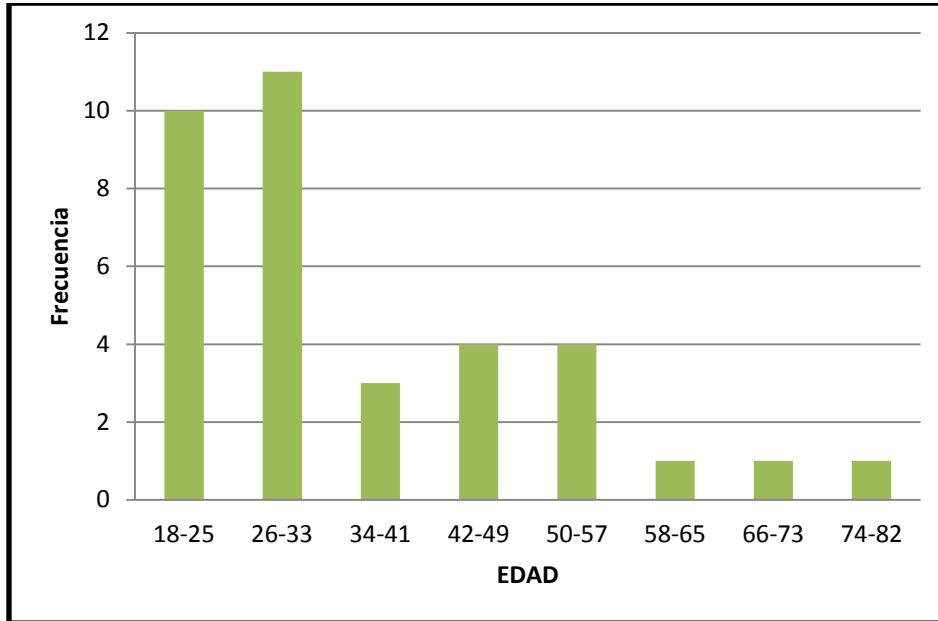


Figura 15.- FRECUENCIA DE EDAD EN PACIENTES CON LLA. La gráfica muestra la el rango de edad de los pacientes con leucemia Aguda Linfoblástica que se incluyeron en el estudio, siendo entre 18-25 y 26-33 el rango de edad con mayor frecuencia

En cuanto a las proporciones por sexo el 37% (13/35) de los pacientes corresponden al sexo masculino y el 63% (22/35) de pacientes corresponden al sexo femenino, lo cual, concuerda con el anuario estadístico del HGM del 2011 en el que hay una prevalencia del 60% para el sexo femenino con diagnostico de LLA. (Figura 16).

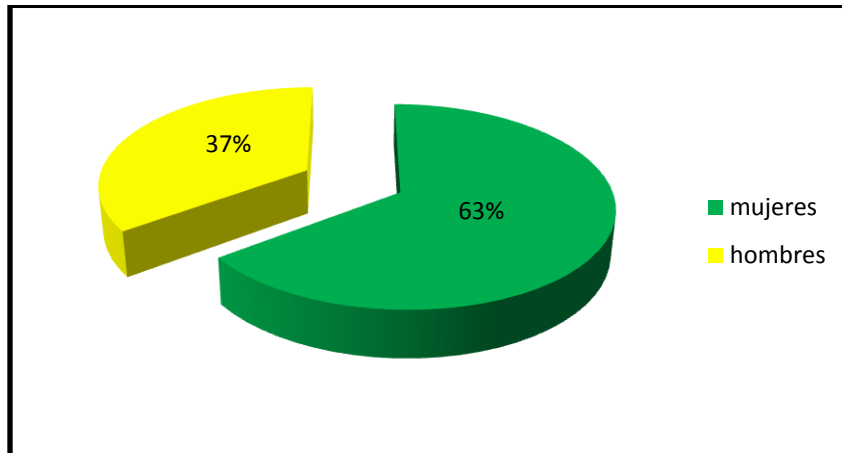


Figura 16.- FRECUENCIA POR GÉNERO EN PACIENTES CON LLA. El diagrama muestra que de los pacientes con Leucemia Aguda Incluidos en el estudio, la mayoría son del sexo femenino en comparación con el sexo masculino.

RESULTADOS

10.3.2. Integridad de las muestras de pacientes con LLA

A partir de las muestras de pacientes con LLA se obtuvo el RNA, se realizó el cDNA y se procedió a verificar la integridad realizandose una PCR del gen constitutivo GAPDH, el producto de 221pb fue visualizado en un gel de agarosa al 2% (Figura 17).

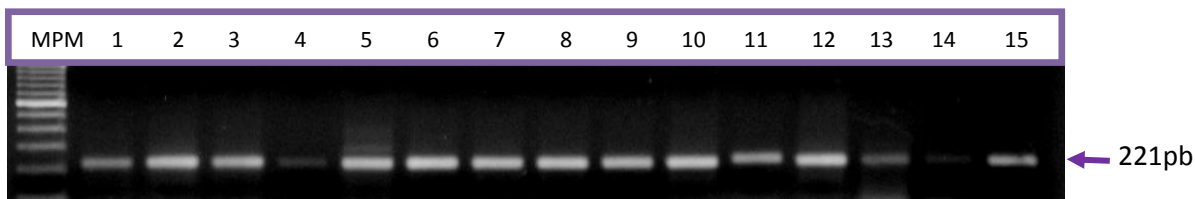


Figura 17.- INTEGRIDAD DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES LLA, gel de agarosa al 2%, donde se observa la amplificación del gen constitutivo GAPDH con un producto de 221pb, en carril MPM marcador de peso molecular (100pb), carril 1-15 pacientes representativos de LLA.

10.3.3. Expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en pacientes con LLA

De las muestras que llegaron al laboratorio de Biología Molecular del HGM de pacientes con LLA, se observó la expresión de los genes ABC-B1(202pb) , ABC-C1 (173pb) y ABC-G2 (206pb) que fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% (Figura 18).



Figura 18.- ABC's EN PACIENTES CON LLA , En A) se muestra la expresión del gen ABCB1, en B) se muestra la expresión de ABCC1 y en C) se muestra la expresión del gen ABCG2 de los pacientes con LLA carril 1 Control positivo línea celular K562, carril 2 control negativo, carril 3-15 pacientes con LLA (13 muestras representativas).

RESULTADOS

La frecuencia de expresión para los pacientes con LLA fue de 57.1% (20/35) para ABC-B1, frecuencia de expresión de 62.8% (22/35) para ABC-C1 y una frecuencia de expresión de 77% (27/35) ABC-G2 (Figura 19).

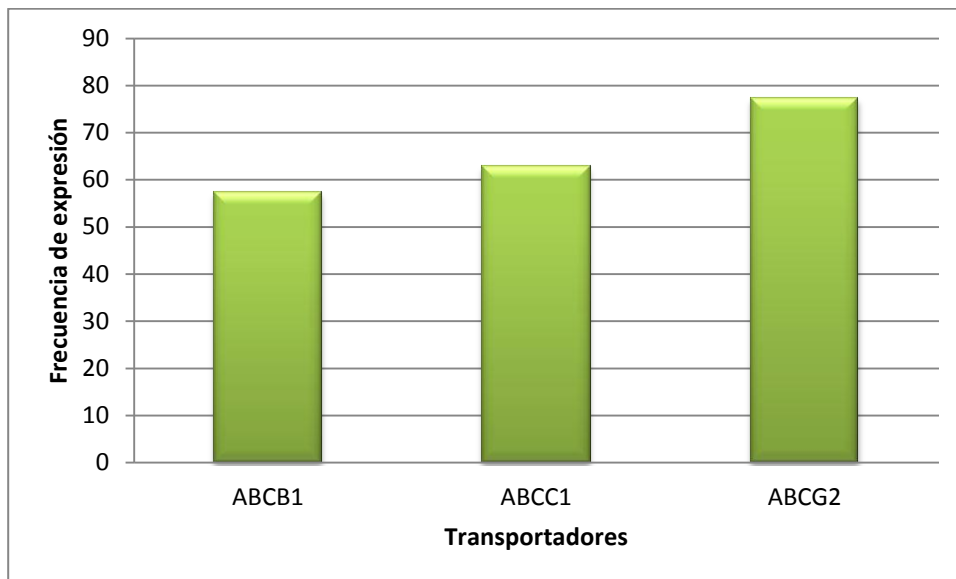


Figura 19.- FRECUENCIA DE EXPRESIÓN DE ABC's EN PACIENTES CON LLA. Representación gráfica del porcentaje de expresión, donde ABC-G2 tiene una mayor frecuencia de expresión con respecto a ABC-B1 y ABC-C1 en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda.

Nuestros datos obtenidos en los pacientes con LLA muestran que la frecuencia de expresión para el gen ABC-C1 son similares con las frecuencias obtenidas en los donadores sanos, sin embargo respecto a la frecuencia observada de ABC-G2 en los pacientes con LLA se encuentra elevada en comparación con los donadores sanos del HGM.

10.3.4. Co-expresion de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en pacientes con LLA

La frecuencia de co-expresión de los genes en los pacientes con LLA fue de un 48.5% (17/35) para dos transportadores de los cuales la co-expresión más frecuente es para ABC-C1/ABC-G2 con 20% (7/35), seguido de la co-expresión de ABC-B1/ABC-G2 con una frecuencia de 17.1% (6/35) y la frecuencia de ABC-B1/ABC-C1 fue de 11.4% (4/35); la frecuencia de co-expresión de los tres transportadores es de 28.5% (10/35) el 17.4% (6/35) de los pacientes sólo expresaron un transportador y 5.7% (2/35) de pacientes no expresaron ningún gen (Figura 20).

RESULTADOS

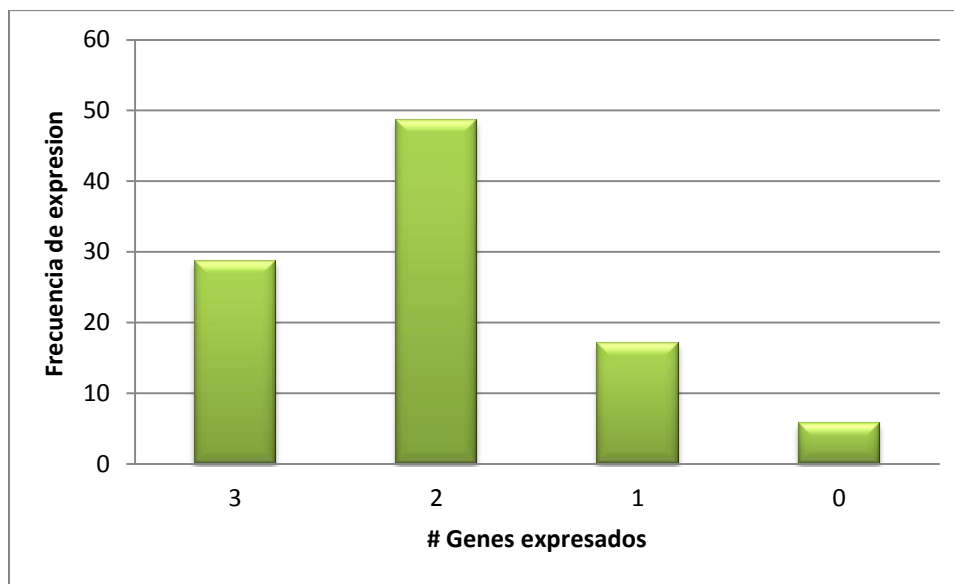


Figura 20.- CO-EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES. Representación grafica del porcentaje de co-expresión de los transportadores, se observa que es mas elevada la co-expresión de dos transportadores en los pacientes con LLA.

10.3. Expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en pacientes con Leucemia Mieloblástica Aguda

10.3.1. Pacientes integrados al estudio

Se incluyeron 10 pacientes con LMA que ingresaron al servicio de Hematología del HGM, se les corroboró el diagnóstico mediante inmunofenotipo, biometría hemática, aspirado de médula ósea y morfología celular, estos parámetros fueron realizados por el Servicio de Hematología e incorporados a los expedientes para observar la expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2.

La edad promedio encontrada en el estudio fue de 51 años, el rango de edad, se observa que la edad con mayor frecuencia está entre los 33-48 años, en cuanto a las proporciones por sexo el 30%(3/10) de los pacientes corresponden al sexo masculino y el 70%(7/10) de pacientes corresponden al sexo femenino (Figura 21). Los datos obtenidos concuerdan con el anuario estadístico del HGM que reportan una mayor prevalencia de diagnóstico de LMA en mujeres en un 65% entre 45-59 años.

RESULTADOS

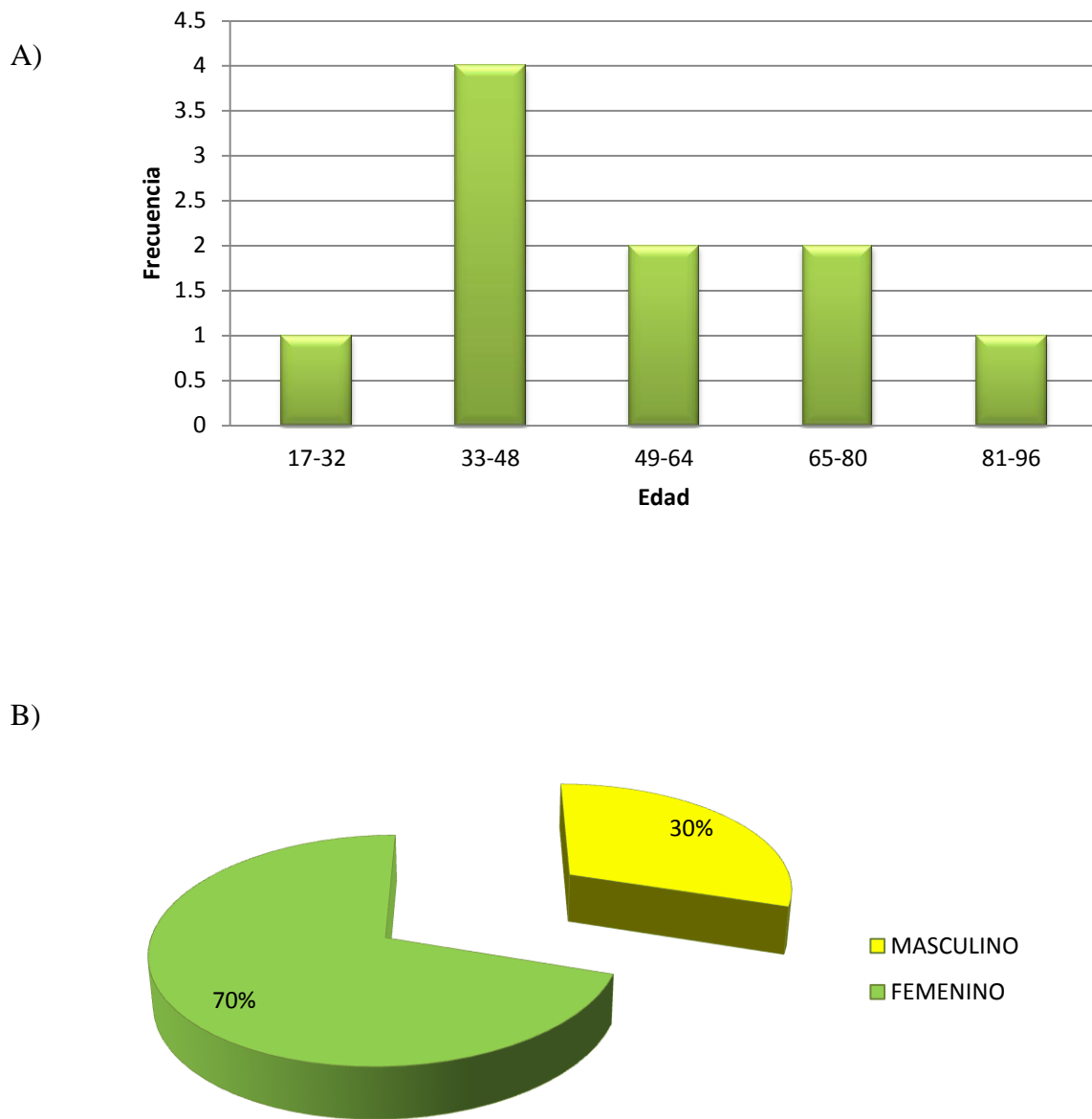


Figura 21.- . FRECUENCIA DE EDAD Y GÉNERO EN LMA En A) se observa la gráfica del rango de edad de los pacientes que se incluyeron en el estudio, siendo entre 33-48 el rango de edad con mayor frecuencia, en B) el diagrama muestra que de los pacientes incluidos, la mayoría son del sexo femenino.

RESULTADOS

10.3.2. Integridad del RNA de los pacientes con LMA

Se verificó la integridad de las muestras de los pacientes con LMA obtenidas, se realizó la extracción del RNA, se verificó en un gel de agarosa al 1% donde se observaron las bandas características 28S y 18S del RNA (Figura 22).

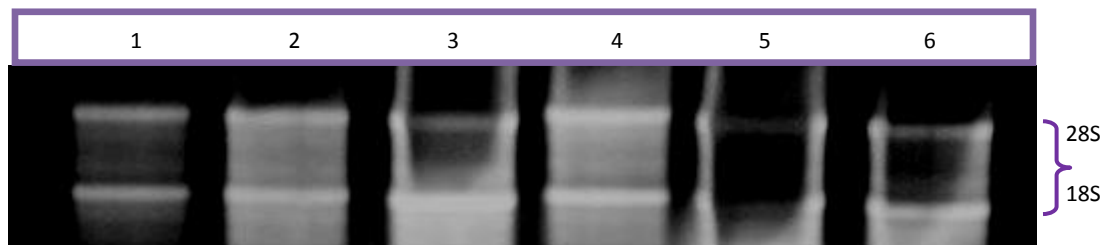


Figura 22.- INTEGRIDAD DE RNA DE PACIENTES CON LMA, gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del RNA, observándose las bandas características 28S y 18S del RNA. Del carril 1 al 6 se observan RNA's de pacientes con diagnóstico de LAM (6 pacientes representativos).

10.3.3. Expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en pacientes con LMA

La expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en las muestras que llegaron al laboratorio de Biología Molecular del HGM con diagnóstico de LMA, se realizó PCR del gen constitutivo GAPDH para verificar la integridad de las muestras, el fragmento de amplificación del gen es de 221pb (figura 23).

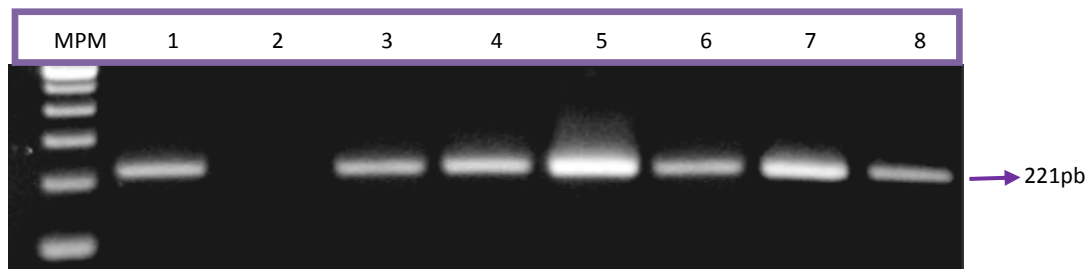


Figura 23.- INTEGRIDAD DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES CON LMA, gel de agarosa al 2%, se observa la amplificación del gen constitutivo GAPDH (221pb), en el carril MPM el marcador de peso molecular (100pb), el carril 1 el control positivo (K562), carril 2 el control negativo (H2O), el carril 3-8 pacientes con diagnóstico de LMA (6 pacientes representativos)

La expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 fue observada en los pacientes con LMA, todos los pacientes (10/10) presentaron expresión de los transportadores (figura 24).

RESULTADOS

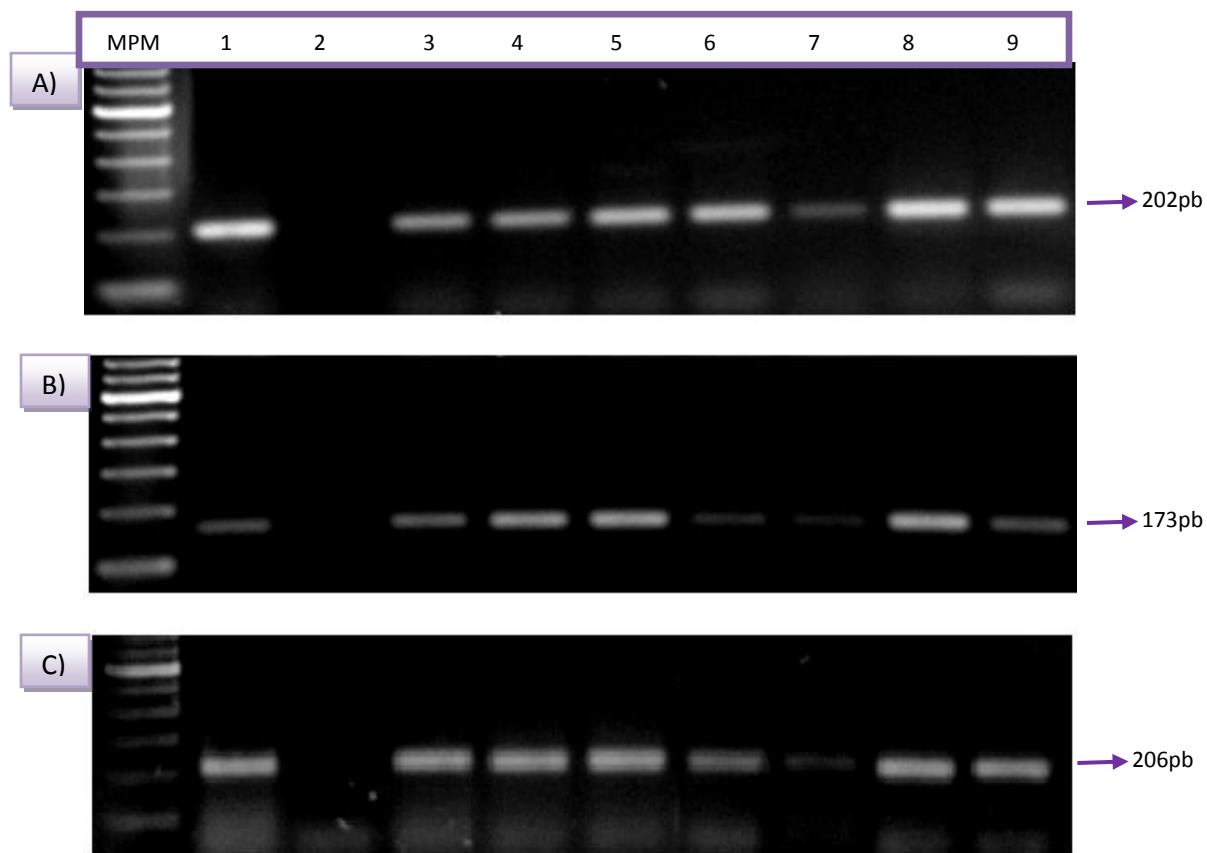


Figura 24.-EXPRESIÓN DE ABC's EN PACIENTES CON LMA, gel de agarosa al 2%, se observa la expresión de los genes (A) ABC-B1 (202 pb), (B) ABC-C1 (173pb) y (C) ABC-G2 (206 pb), en el carril MPM se ve el marcador de peso molecular (100pb), el carril 1 control positivo (línea celular K562), el carril 2 el control de reacción, del carril 3 al 9 las muestras de los pacientes con diagnóstico LMA .

10.4. Correlación de la expresión de ABC-B1, ABC-C1 Y ABC-G2 y la respuesta hematológica en LLA

Se correlacionó la expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 con los parámetros clínicos como edad, sexo, hemoglobina, cuenta inicial de leucositos, plaquetas, infiltración a sistema nervioso (ISN), presencia del cromosoma Filadelfia.

En el caso del gen ABC-B1 (Tabla 13), dentro de los parámetros se observa que la media de edad para pacientes positivos a ABC-B1 es de 34 ± 13 y para los pacientes negativos una media de 37 ± 18 ; el rango de edad es de 18-78 años; la proporción por sexo fue de un total de 57.1% (20/35) pacientes positivos para ABC-B1 de los cuales el 31.4% corresponde al sexo femenino y el 25.7% (9/35) al sexo masculino.

Respecto a los análisis de laboratorio para pacientes positivos a ABC-B1 se observa que la media del conteo de leucocitos es de $37.7 \pm 65.49 \times 10^3/\mu\text{L}$, para plaquetas es de $72.9 \pm 83.6 \times 10^3/\mu\text{L}$ y para la hemoglobina es de $9.96 \pm 3.09 \text{ g/dL}$.

RESULTADOS

Expresión	Media Total	Expresión del gen ABC-B1			p≤0.05
		positivo	negativo		
Edad	35±15		34±13	37±18	NS*
> 35 años		18	8	6	NS
≤ 35 años		17	12	9	
Leucos al Dx (x10 ³ /μL)	38±65.4	28	37.7±65.49	40.6±67.5	NS
< 50		7	17	11	
≥ 50			3	4	
Plaquetas al Dx (x10 ³ /μL)	58± 68.4		72.9±83.6	49.6±60.8	NS
< 80		26	14	12	
≥ 80		9	6	3	
Hemoglobina (g/dL)	9.11±3.1		9.96±3.09	7.97±2.83	NS*
Sexo					
Femenino		22	11	11	NS
Masculino		13	9	4	
Cromosoma Ph		2	1	1	NS
Positivo		33	19	14	
Negativo					
Infiltración a SNC		7	3	4	NS
Si		28	17	11	
No					
Recaída					
Si		12	7	5	NS
No		23	13	10	

TABLA 13 .- CORRELACIÓN DEL GEN ABC-B1 (MDR-1) CON FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PRONÓSTICO DE PACIENTES CON LLA. NS= No tienen significancia, Se realizó prueba de t (*) Fuente: Archivo de expedientes clínicos de pacientes tratados en el pabellón de Hematología (U-111) del Hospital General de México y resultado del análisis estadístico realizado para el presente estudio.

Los factores pronóstico como lo son presencia del Cromosoma Ph en los pacientes positivos a ABC-B1 solo el 2.87% (1/35) lo expresó, el 8.5% (3/35) presentaron infiltración a sistema nervioso y 20% (7/35) presentaron recaída de la enfermedad. No se observó significancia estadística entre los factores pronóstico y la expresión de ABC-B1.

Para pacientes positivos a ABC-C1(Tabla 14) la media de edad es de 38±17 y para los pacientes negativos una media de 31±11; el rango de edad es de 18-78 años; la proporción por sexo fue de un total de 62.8% (22/35) pacientes positivos para ABC-B1 de los cuales el 40% (14/35) corresponde al sexo femenino y el 22.8% (8/35) al sexo masculino.

RESULTADOS

Expresión	Media Total	Expresión del gen ABC-C1		
		positivo	Negativo	p≤0.05
Edad	35.8±15.4	38±17	31±11	NS*
> 35 años		11	3	NS
≤ 35 años		11	10	
Leucos al Dx (x10 ³ /μL)	38±65.4	52.1±78.7	16.6±20.1	NS
< 50		16	12	
≥ 50		6	1	
Plaquetas al Dx (x10 ³ /μL)	58± 68.4	52.7±49.2	67.0±94.2	NS
< 80		16	10	
≥ 80		6	3	
Hemoglobina (g/dL)	9.11±3.1	9.09±3.2	9.13±3.07	NS*
Sexo				
Femenino	22	14	8	NS
Masculino	13	8	5	
Cromosoma Ph				
Positivo	2	2	0	NS
Negativo	33	20	13	
Infiltración a SNC				
Si	7	5	2	NS
No	28	17	11	
Recaída				
Si	12	8	4	NS
No	23	14	9	

TABLA 14 .- CORRELACIÓN DEL GEN ABC-C1 (MRP-1) CON FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PRONÓSTICO DE PACIENTES CON LLA. NS= No tienen significancia, Se realizó prueba de t (*) Fuente: Archivo de expedientes clínicos de pacientes tratados en el pabellón de Hematología (U-111) del Hospital General de México y resultado del análisis estadístico realizado para el presente estudio.

Los análisis clínicos de los pacientes positivos a ABC-C1 mostraron que la media del conteo de leucocitos es de 52.1±78.7 x10³/μL, para plaquetas es de 52.7±49.2 x10³/μL y para la hemoglobina es de 9.09±3.2 g/dL. Los factores pronóstico como lo son presencia del Cromosoma Ph en los pacientes positivos a ABC-C1 sólo el 5.7% (2/35) lo expresó, el 14.2% (5/35) presentaron infiltración a sistema nervioso y 22.8% (8/35) presentaron recaída. Sin embargo, no se encontró significancia estadística entre la expresión del gen ABC-C1 y los factores pronóstico. Para pacientes positivos a ABC-G2 (Tabla 15) la media de edad es de 35±16 y para los pacientes negativos una media de 35±12; el rango de edad es de 18-78 años; la proporción por sexo fue de un total de 77.1% (27/35) pacientes positivos para ABC-B1 de los cuales el 48.5% (17/35) corresponde al sexo femenino y el 31.4% (11/35) al sexo masculino.

RESULTADOS

Expresión	Media Total	Expresión del gen ABC-G2			p≤0.05
		positivo	negativo		
Edad	35±15		35±16	35±12	NS*
> 35 años		14	11	3	NS
≤ 35 años		21	17	4	
Leucos al Dx (x10 ³ /μL)	38±65.4	28	45.0±71.7	14.8±14.9	NS
< 50		7	21	7	
≥ 50			7	0	
Plaquetas al Dx (x10 ³ /μL)	58± 68.4		52.8±68.0	78.7±71.3	NS
< 80		26	22	4	
≥ 80		9	6	3	
Hemoglobina (g/dL)	9.11±3.1		8.81±3.04	11.17±2.5	NS*
Sexo					
Femenino		22	17	5	NS
Masculino		13	11	2	
Cromosoma Ph					
Positivo		2	0	2	0.004
Negativo		33	28	5	
Infiltración a SNC					
Si		7	4	3	NS
No		28	24	4	
Recaída					
Si		12	9	3	NS
No		23	19	4	

TABLA 15 .- CORRELACIÓN DEL GEN ABC-G2 (BCRP) CON FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PRONÓSTICO DE PACIENTES CON LLA. NS= No tienen significancia, Se realizó prueba de t (*) Fuente: Archivo de expedientes clínicos de pacientes tratados en el pabellón de Hematología (U-111) del Hospital General de México y resultado del análisis estadístico realizado para el presente estudio.

Los análisis clínicos de los pacientes positivos a ABC-G2 mostraron que la media del conteo de leucocitos es de 45.0±71.7 x10³/μL, para plaquetas es de 52.8±68.0 x10³/μL y para la hemoglobina es de 8.81±3.04 g/dL. Los factores pronóstico como lo son presencia del Cromosoma Ph ninguno de los pacientes positivos a ABC-G2 lo expresó, el 11.4% (4/35) presentaron infiltración a sistema nervioso y 25.7% (9/35) presentaron recaída.

Existe una significancia estadística de p=0.004 entre la expresión de ABC-G2 y cromosoma Ph, observando que la expresión del gen ABC-G2 es independiente de la expresión del cromosoma Ph.

10.5.

RESULTADOS

10.6. Correlación de la co-expresión de ABC's en pacientes con LLA

Se realizó la correlación de los factores pronóstico con la co-expresión de los genes ABC en pacientes con LLA, el 28.5% (10/35) pacientes con LLA presentaron la co-expresión de los tres genes (ABC-B1/ABC-C1/ABC-G2), sin embargo, se observa que no hay una relación significativa entre la expresión de los tres genes con los factores pronóstico (Tabla 16).

Expresión	Media Total	n	Co-Expresión ABC-B1/ABC-C1/ABC-G2		
			positivo	negativo	p≤0.05
Edad					
> 35 años	35.8±1	14	4	10	NS
≤ 35 años	5.4	21	6	15	
Leucos al Dx (x10³/μL)					
< 50	38±65.4	28	8	20	NS
≥ 50		7	2	5	
Plaquetas al Dx (x10³/μL)					
< 80	58±	26	8	18	NS
≥ 80	68.4	9	2	7	
Sexo					
Femenino		22	4	9	NS
Masculino		13	6	16	
Cromosoma Ph					
Positivo		2	0	2	NS
Negativo		33	10	23	
Infiltración a SNC					
Si		7	4	8	NS
No		28	6	17	
Recaída					
Si		12	1	11	NS
No		23	7	16	

TABLA 16 .- CORRELACIÓN DE LOS GENES ABC-B1/ABC-C1/ABC-G2 CON FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PRONÓSTICO DE PACIENTES CON LLA. NS= No tienen significancia, Fuente: Archivo de expedientes clínicos de pacientes tratados en el pabellón de Hematología (U-111) del Hospital General de México y resultado del análisis estadístico realizado para el presente estudio.

RESULTADOS

Respecto a la co-expresión de 2 genes, el 17.1% (6/35) de los pacientes con LLA presentaron la co-expresión de ABC-B1/ABC-G2. En la correlación de la expresión de ABC-B1/ABC-G2 con los factores pronóstico, se observa que hay una correlación significativa ($p=0.017$) entre la edad y la co-expresión de los genes ABC-B1/ABC-G2 de manera independiente, sin embargo no hay correlación entre los demás factores pronóstico (Tabla 17).

Expresión	Media Total	n	Co-Expresión ABC-B1/ABC-G2		p≤0.05
			positivo	negativo	
Edad	35.8±15				
> 35 años		14	5	9	p=0.017
≤ 35 años		21	1	20	
Leucos al Dx (x10³/μL)	38±65.4				
< 50		28	5	23	NS
≥ 50		7	1	6	
Plaquetas al Dx (x10³/μL)	58± 68.4				
< 80		26	4	22	NS
≥ 80		9	2	7	
Sexo					
Femenino		22	2	20	NS
Masculino		13	4	9	
Cromosoma Ph					
Positivo		2	0	2	NS
Negativo		33	6	27	
Infiltración a SNC					
Si		7	0	7	NS
No		28	6	22	
Recaída					
Si		12	2	10	NS
No		23	4	19	

TABLA 17 .- CORRELACIÓN DE LOS GENES ABC-B1/ABC-G2 CON FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PRONÓSTICO DE PACIENTES CON LLA. NS= No tienen significancia, Fuente: Archivo de expedientes clínicos de pacientes tratados en el pabellón de Hematología (U-111) del Hospital General de México y resultado del análisis estadístico realizado para el presente estudio.

RESULTADOS

El 20% (7/35) de los pacientes con LLA presentaron la co-expresión de ABC-C1/ABC-G2. En la correlación de la expresión de ABC-C1/ABC-G2 con los factores pronóstico, se observa que hay una relación significativa ($p=0.006$) entre la expresión de los genes ABC-C1/ABC-G2 y la cuenta de leucocitos inicial, es decir, la expresión de los genes es independiente del conteo de leucocitos. Sin embargo, no hay relación entre la expresión de los genes ABC-C1/ABC-G2 con otros factores pronóstico (Tabla 18).

Expresión	Media Total	n	Co-Expresión ABC-C1/ABC-G2		p≤0.05
			positivo	negativo	
Edad	35.8±15.4				
> 35 años		14	4	10	NS
≤ 35 años		21	3	18	
Leucos al Dx (x10³/μL)	38±65.4				
< 50		28	3	25	p=0.006
≥ 50		7	4	3	
Plaquetas al Dx (x10³/μL)	58± 68.4				
< 80		26	6	20	NS
≥ 80		9	1	8	
Sexo					
Femenino		22	5	17	NS
Masculino		13	2	11	
Cromosoma Ph					
Positivo		2	0	2	NS
Negativo		33	7	26	
Infiltración a SNC					
Si		7	1	6	NS
No		28	6	22	
Recaída					
Si		12	2	10	NS
No		23	5	18	

TABLA 18 .- CORRELACIÓN DE LOS GENES ABC-C1/ABC-G2 CON FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PRONÓSTICO DE PACIENTES CON LLA. NS= No tienen significancia, Fuente: Archivo de expedientes clínicos de pacientes tratados en el pabellón de Hematología (U-111) del Hospital General de México y resultado del análisis estadístico realizado para el presente estudio

RESULTADOS

El 11.4% (4/35) de los pacientes con LLA presentaron la co-expresión de ABC-B1/ABC-C1. En la correlación de la expresión de los genes ABC-B1/ABC-C1 con los factores pronóstico, se observa que no hay una relación significativa entre la expresión de los genes ABC-B1/ABC-C1 con los parámetros clínicos evaluados (Tabla19)

Expresión	Media Total	n	Co-Expresión ABC-B1/ABC-C1		p≤0.05
			positivo	negativo	
Edad	35.8±15.4				
> 35 años		14	3	11	NS
≤ 35 años		21	1	20	
Leucos al Dx (x10³/μL)	38±65.4				
< 50		28	4	24	NS
≥ 50		7	0	7	
Plaquetas al Dx (x10³/μL)	58± 68.4				
< 80		26	2	24	NS
≥ 80		9	2	7	
Sexo				19	
Femenino		22	3	12	NS
Masculino		13	1		
Cromosoma Ph					
Positivo		2	1	1	NS
Negativo		33	3	30	
Infiltración a SNC					
Si		7	1	6	NS
No		28	3	25	
Recaída					
Si		12	1	11	NS
No		23	3	20	

TABLA 19 .- CORRELACIÓN DE LOS GENES ABC-B1/ABC-C1 CON FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PRONÓSTICO DE PACIENTES CON LLA. NS= No tienen significancia, Fuente: Archivo de expedientes clínicos de pacientes tratados en el pabellón de Hematología (U-111) del Hospital General de México y resultado del análisis estadístico realizado para el presente estudio

RESULTADOS

10.7. Correlación de la expresión de ABC-B1, ABC-C1 Y ABC-G2 entre donadores sanos y pacientes con LLA

Los resultados obtenidos entre los donadores sanos y los pacientes con LLA positivos a los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 fueron contrastados, el resultado obtenido es que la frecuencia de expresión es estadísticamente significativa ($p=0.029$) entre ambas muestras (Tabla 20). Por lo tanto la expresión de los transportadores ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 es relevante en los pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda.

	DONADORES SANOS	PACIENTES CON LAL	p(0.05)
ABC-B1	18	20	0.029
ABC-C1	12	22	
ABC-G2	6	28	

TABLA 20 .- CORRELACIÓN DE ABC-B1, ABC-C1 Y ABC-G2 ENTRE PACIENTES CON LLA Y DONADORES SANOS. Se observa la diferencia entre la expresión de los transportadores de las dos muestras, se observa una diferencia significativa.

11. DISCUSIÓN

De acuerdo al Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE), indica que la leucemia aguda es el tipo de cáncer más recurrente en México, representa alrededor del 40% de todas las neoplasias; de acuerdo al Anuario Estadístico del Hospital General de México en el año 2011, se reporta que para la Leucemia Linfoblástica Aguda representan la primer causa de mortalidad en el servicio de Hematología, con un total de 38 defunciones, 60% (23/38) para el sexo femenino con prevalencia de edad de 25-44 años y 40% (15/38) defunciones para el sexo masculino con prevalencia de edad de 15-44 años. En cuanto a la Leucemia Mieloblástica Aguda representan la segunda causa de mortalidad con 20 defunciones, 65% (13/20) para el sexo femenino con prevalencia de edad 45-59 años y 35% (7/20) defunciones para el sexo masculino con prevalencia de edad de 25-44 años. En el presente estudio encontramos que en la LLA el 63% (22/35) pacientes pertenecen al sexo femenino y el 37% (13/35) del sexo masculino, ambos sexos con prevalencia de edad de 18-33 años, respecto a los datos observados en las LMA el 70% (7/10) son del sexo femenino y 30% (3/10) son de sexo masculino con prevalencia de edad de 25-44 años para ambos casos, nuestros datos obtenidos concuerdan con los presentados por el Hospital General de México.

Los pacientes que padecen algún tipo de cáncer hematológico son tratados con quimioterapia, inmunoterapia y agentes que modifican la respuesta biológica, de estos tratamientos la quimioterapia es el más efectivo; sin embargo, algunas células cancerosas generan simultáneamente resistencia a diferentes medicamentos (resistencia a multidroga), por lo tanto, hay un impedimento para una respuesta exitosa a la quimioterapia (Gottesman, 2002). La resistencia a multidroga generalmente resulta de la expresión de bombas de flujo dependientes de ATP, también llamados transportadores ABC.

La resistencia es el resultado del incremento del flujo extracelular del medicamento y por ende de un bajo nivel intracelular del mismo, los medicamentos que generalmente son los sustratos de estos transportadores son los alcaloides vinca (vinblastina y vincristina), los antracíclicos (doxorubicina y daunorrubicina), agentes alquilantes (ciclofosfamida) y

DISCUSIÓN

agentes antimetabólicos (metotrexate y citarabina) que son utilizados como quimioterapia de primera línea, por lo tanto, los transportadores ABC constituyen un mecanismo importante de la resistencia a multidroga en la mayoría de los cánceres humanos (Gottesman, 2002; Sharom, 2008, Hoffmann, 2004, Pei-Rong, 2011). Existen múltiples ensayos referentes a los transportadores por su papel en la resistencia a multidroga, principalmente para **ABC-B1 (MDR-1)**, **ABC-C1 (MRP-1)** y **ABC-G2 (BCRP O MXR)**, estos transportadores de manera normal se encuentran en el organismo, tienen una función de protección contra metabolitos, xenobióticos y compuestos citotóxicos; sin embargo se sabe que en el 40 al 50% de los cánceres se encuentran sobreexpresados (Sarkadi, 2004; Pei-Rong, 2011).

De manera *in vitro* se ha observado la expresión de los transportadores ABC en líneas celulares de diversos tipos de cáncer, Szakács y colaboradores (2004) realizaron un análisis de la expresión de los transportadores en 60 líneas celulares de diferentes tipos de cáncer (leucemias, melanomas, cáncer de ovario, de mama, de próstata, de colon, de sistema nervioso, etc.), los resultados de la expresión de los transportadores a nivel de mRNA, de proteína (expresión y funcionalidad) y de la sensibilidad de las células a algunos quimioterapéuticos, indican que existe una correlación entre la expresión de los transportadores y la respuesta a los fármacos quimioterapéuticos, particularmente para la sobreexpresión de ABC-B1 (MDR1), ABC-C1 (MRP1) y ABC-G2 (BCRP-MXR). Dentro del equipo de trabajo Salazar-Terán (2011) determinó que la expresión de ABC-B1 en K562 disminuía de manera proporcional a la inhibición del oncogén BCR-ABL en presencia de Imatinib a concentración de 0.3 $\mu\text{M/L}$, por lo tanto se concluyó que la expresión de MDR-1 depende del gen BCR-ABL en Leucemia Mieloide Cronica (LMC). Sen R. y colaboradores (2012) determinaron no sólo la presencia de los transportadores ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en la línea celular K562, sino que además determinaron que el fármaco Ponatinib a concentraciones de 0.04 a 0.63mmol/L reducía la actividad de ABC-B1 Y ABC-G2 generando una actividad de los fármacos quimioterapéuticos aumentando la apoptosis, sin embargo no afecta a ABC-C1. En este trabajo se analizó la expresión de los transportadores ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 a nivel de mRNA en 4 líneas celulares leucémicas K562 (LMC, crisis blástica) HL-60 (LMA, promielocítica), Jurkat (LLA,

DISCUSIÓN

células T) y Reh (LLA, células B), se observó la expresión de los transportadores ABC-B1 y ABC-G2 en las líneas HL-60 y Reh, siendo Jurkat la única línea celular que no expresó ninguno de los transportadores y la línea celular K562 expresó ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2, concordando con la literatura, se tomó como nuestro control positivo.

DONADORES SANOS

El gen **ABCB1 (MDR1)** se expresa en individuos sanos en muchos tejidos normales como hígado, barrera hemato-encefálica, intestino y riñón; en el cáncer juega un papel importante en la distribución y excreción de los fármacos, está implicado en la resistencia intrínseca y adquirida, la P-gp codificada por ABC-B1 (MDR-1) es una vía que genera una falla al tratamiento de tumores que lo sobreexpresan (Cooke, 2005; Chen KG, 2012). Respecto a los niveles de expresión de los transportadores en muestras de donadores sanos Turriziani y colaboradores (2008) describen que al analizar la expresión de los transportadores de ABC-B1, ABC-C1, ABC-C4 y ABC-C5 en 98 pacientes VIH positivos y 20 donadores sanos por qRT-PCR, observaron que existe una alta variabilidad entre individuos en ambos casos (VIH positivos y donadores), sin embargo, los niveles de expresión principalmente de ABC-B1 a nivel de mRNA fueron significativamente elevados para los pacientes de VIH positivos en comparación de los donadores sanos. Se ha reportado que la expresión de ABC-B1 analizada por qRT-PCR es más alta en hombres que en mujeres a razón de 1.3-1.48 copias en linfocitos de sangre periférica (Chandler, 2007; Sudchada, 2010). En nuestro caso se analizó la expresión de mRNA de ABC-B1 en 20 muestras de sangre periférica de donadores sanos observándose que hay un 90% (18/20) de frecuencia de expresión, esto podría deberse a que el gen se expresa en los leucocitos principalmente en células Natural killer (CD56+) y Linfocitos T (CD8+, CD4+), también se conoce juega un papel en el transporte de citocinas como IL-2, IL-4 e $INF\gamma$, por lo tanto indica que también podría tener funciones inmunológicas (Hiztl, 2001; Fellay, 2002; Oselin, 2003; Machado, 2003)

Respecto al gen **ABC-C1 (MRP1)**, se encuentra expresado en pulmones, hígado intestinos y próstata, de manera normal su función es proteger a estos órganos; juega un papel importante en el cáncer; se ha observado su expresión en sangre periférica y en muestras de médula ósea de donadores sanos, reportándose niveles de expresión bajos en

DISCUSIÓN

comparación con la líneas celulares resistentes H69/AR y HL-60/AR, (Schneider 1995; Abbaszadegan, 1995). En nuestro caso se analizó la expresión de ABC-C1 a nivel de mRNA en 20 donadores sanos observándose que existe una frecuencia de expresión del 60% (12/20), esto puede deberse a que el gen es expresado en células linfoides ya que la función fisiológica de MRP1 (ABC-C1) es transportar leucotrienos, prostaglandina e interviene en el flujo de disulfuro de glutatión, además de transportar aniones orgánicos y otras sustancias conjugadas del glutatión, estudios previos han demostrado que los leucotrienos (LTC₄, LTD₄ y LTE₄) y prostaglandinas (PGA₂) pueden participar en la señalización intracelular involucrada en la proliferación, diferenciación y selección de células T dentro del timo (Mahjoubi, 2008; Budulac, 2010). Rieneke van de Ven y colaboradores (2006) encontraron que el gen ABC-C1 así como el gen ABC-B1 se expresan en las células dendríticas (CD). Funcionalmente, ambos transportadores han sido descritos para la eficiente migración de las células T y CD; sin embargo ABCB1 es antagónico de ABC-C1, juega un papel importante debido a que interviene no solo en la migración sino en la diferenciación de las CD y se encuentra sobreexpresado en pacientes con algún tipo de leucemia aguda, ya sea Mieloblástica o Linfoblástica en recaída y en el cáncer de pulmón (Echeverria-Lima, 2007; Leslie, 2001; Renes, 2000; Jedlitschky, 1996).

La expresión del gen **ABCG2 (BCRP/MXR)** se encuentra de manera normal en placenta, hígado e intestino donde su función es proteger a la placenta del paso de medicamentos así como está implicado en la absorción intestinal. En nuestro caso se analizó la expresión a nivel de mRNA de ABC-G2 en una muestra de 20 donadores sanos observándose que sólo el 30% (6/20) expresó el gen, la frecuencia de expresión concuerda con lo reportado por Abbott en 2006 quien concluye que la expresión es baja en sangre periférica en comparación con médula ósea. Asi mismo observó que de las muestras analizadas de Leucemias Agudas el 78% tiene alta expresión del gen ABC-G2 en comparación con sangre periférica por lo tanto también es congruente con la frecuencia de expresión que observamos del gen ABC-G2 en las LLA con un 78.3% (28/35) y el 100% en LAM. La baja frecuencia de expresión del gen ABC-G2 en la muestra de donadores sanos puede deberse a que su expresión en el sistema hematopoyético se encuentra

DISCUSIÓN

principalmente en las células madre donde su función es como crioprotector (Abbott, 2006& 2002; Scharenberg, 2002).

En nuestros resultados se observa que existe una relación significativa ($p=0.029$) entre la frecuencia de expresión de ABC-B1, ABC-C1 Y ABC-G2 de los donadores sanos y los pacientes con LLA, es decir la frecuencia de expresión es dependiente de la enfermedad. Existen múltiples trabajos que comparan la frecuencia y los niveles de expresión de los transportadores de pacientes con LMA o LLA y donadores sanos sin un análisis estadístico, sin embargo Sauerbrey y colaboradores en 2001 demuestra que hay una relación significativa ($p=0.011$) entre los niveles de expresión de ABC-G2 en pacientes con LLA y donadores sanos (sangre periférica y médula ósea). Sin embargo no hay un estudio sobre la frecuencia de expresión y su importancia en la población mexicana.

PACIENTES CON LLA y LMA

Se ha observado la sobreexpresión de los transportadores **ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2** en las leucemias, existen numerosos trabajos enfocados en el papel de éstos en la resistencia a multidroga y como posibles factores pronóstico; Norwood y colaboradores (2004) reportan que la expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1, ABC-G2, así como ABC-A3 y LRP está asociada con la recaída en la Leucemia Mieloide Aguda, debido a su alta expresión en comparación de las líneas celulares K562 (Leucemia Mieloide Crónica, en crisis blástica) y HL-60 (Leucemia Mieloide Aguda, promielocítica), indica que los transportadores están asociados en la progresión de la enfermedad, por lo tanto los colocan como posibles blancos terapéuticos.

Se analizó la expresión de ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 a nivel de mRNA en 35 pacientes con LLA con diagnóstico de *novo* y fue correlacionada su expresión con factores pronóstico como son edad, sexo, cuenta leucocitaria inicial, conteo de plaquetas, hemoglobina, expresión de cromosoma Filadelfia, infiltración a sistema nervioso y recaída de la enfermedad ninguno de los parámetros pronósticos tuvo significancia estadística con respecto a la expresión de los genes ABC-B1 y ABC-C1. Plasschaert y colaboradores (2005) analizaron la expresión de ABC-C1 entre otros genes en 105 pacientes con LLA (49 adultos y 56 niños), reportando que la expresión de MRP1 es significativamente ($p=0.005$)

DISCUSIÓN

importante en relación con la supervivencia libre de enfermedad tanto en niños como en adultos, sin embargo no se encontró diferencia estadísticamente significativa con factores pronóstico como edad, cuenta inicial de leucocitos y translocaciones cromosómicas desfavorables, lo que concuerda con nuestros datos. Tafuri y colaboradores (2002) mediante el protocolo GIMEMA ALL 0496 analizan la expresión de ABC-B1 en 203 pacientes adultos con diagnóstico de LLA, indican que la detección de expresión de ABC-B1 representa un factor pronóstico, al observar una tasa de remisión estadísticamente significativa ($p=0.044$ en linfocitos B, $p=0.081$ en linfocitos T) en los pacientes MDR1 negativos, sin embargo no se encuentra significancia con factores como la edad, el sexo, y citogenética; el esquema del tratamiento del protocolo GIMEMA ALL 0496 se basa en altas dosis de daunorrubicina en fase temprana seguido de altas dosis de Ara-C después de la remisión. Por lo tanto la variabilidad de nuestros datos puede deberse a la diferencia del protocolo de tratamiento (LAL 2007) que llevan los pacientes en el HGM. En nuestro estudio nuestros datos refieren que no existe relación significativa entre los factores pronóstico y la frecuencia de expresión de los genes ABC-B1 y ABC-C1 en los pacientes con LLA.

Respecto a la expresión ABC-G2 no se encontró una relación con factores como edad, sexo, cuenta de leucocitos, plaquetas, hemoglobina, infiltración a sistema nervioso o recaída, sin embargo se observó que existe una relación significativa ($p= 0.004$) con la expresión del cromosoma Filadelfia (Cr Ph'). Al realizar el análisis se observó que solo el 5% (2/35) expresan el Cr Ph'; sin embargo el 80%(28/35) de los pacientes que expresaron ABC-G2 no tienen presencia del Cr Ph', por lo tanto la expresión de ABC-G2 es un factor independiente de la expresión de Cr Ph'. Sauerbrey y colaboradores en 2001 observa que el nivel de expresión de ABC-G2 a nivel de mRNA es significativamente ($p=0.044$) más alto en LLA de linaje B, también observan que el nivel de expresión es significativamente ($p=0.011$) mayor en pacientes con LLA (rango de 0.146) en comparación con sangre periférica (rango 0.003) y médula ósea (rango 0.029) de donadores sanos. Plasschaert y colaboradores (2003) confirman que la expresión de ABC-G2 a nivel de proteína aumenta en las LLA linaje B en comparación al linaje T, al agregar un inhibidor de ABC-G2 (fumitremorgin C, FTC) se genera un aumento de concentración intracelular de

DISCUSIÓN

mitroxantona, por lo tanto concluye que el gen es altamente expresado y activo en las LLA, y que genera resistencia a las células cancerígenas.

Ambos autores no encontraron correlación con factores pronóstico como edad, cuenta inicial de leucocitos, plaquetas o una recaída. Esto concuerda con nuestros resultados ya que los 35 pacientes de LLA son linaje tipo B, y la frecuencia de expresión de ABC-G2 es más alta en comparación con los donadores sanos, sin embargo no se cuentan con estudios que relacionen la expresión de ABC-G2 y el Cr Ph'.

La co-expresión de los transportadores ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 ha sido observada en múltiples ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, en el caso de las leucemias se ha correlacionado el aumento de co-expresión de MDR1/BCRP con una peor tasa de remisión completa y peor tasa de supervivencia global ($p=0.01$ para ambos casos) en pacientes con LMA (van den Heuvel-Eibrink, 2007). En nuestros resultados observamos que la frecuencia de co-expresión para los pacientes con LLA se expresan ABC-C1/ABC-G2 con 20% (7/35), seguido de la co-expresión de ABC-B1/ABC-G2 con una frecuencia de 17.1% (6/35) y la frecuencia de ABC-B1/ABC-C1 fue de 11.4% (4/35), nuestros resultados difieren con lo presentado por van den Heuvel-Eibrink debido a el tipo de leucemia, el tratamiento y grupo de riesgo de los pacientes.

En el caso de la expresión de ABC-B1 (MDR1), ABC-C1 (MRP1) y ABC-G2 (MXR/BCRP) en los pacientes con LMA se observó que la frecuencia de expresión de los 3 transportadores fue del 100% (10/10). Dentro del grupo de trabajo Lopez-Lopez (2011) observó que la expresión de MDR-1 tiene una relación significativa ($p=0.019$) respecto al tiempo de la respuesta hematológica. Schaich y colaboradores (2004) determinan que la expresión de ABC-B1 en pacientes con LMA tiene una influencia pronóstica significativa ($p=0.03$) en la sobrevida del paciente (13% MDR1 positivos vs 29% MDR1 negativos en un periodo de 6 años), independiente de los factores de riesgo conocidos como edad, estado de la enfermedad, mutaciones y la citogenética. Leith y colaboradores (1994) correlacionan que la expresión de MDR1 está asociada con una menor tasa de remisión completa ($p=0.012$) y con una recaída con enfermedad resistente ($p=0.0007$), además indica que la expresión y funcionalidad de la proteína del gen ABC-B1(MDR1) está relacionada con la

DISCUSIÓN

edad ($p=0.010$). Van der Kolk y colaboradores (2000), observan que en 11 pacientes con LMA que presentan la inversión 16 la expresión de ABC-C1 aunque se encuentra a nivel de mRNA disminuye a nivel de proteína MRP1, sin embargo no tiene relación con los factores pronóstico. Mahjoubi (2008) observaron por qRT-PCR que el nivel de expresión de MRP1 es significativa ($p>0.05$) en pacientes con LMA que presentan recaída (rango=0.422) o que no han logrado una remisión (rango=0.619) en comparación con los pacientes que tienen una respuesta favorable al tratamiento (rango=0.032), además de que existe una relación entre el nivel de expresión de MRP1 con la clasificación FAB y los grupos de riesgo de la LMA. En el caso de la expresión de ABC-G2 en pacientes con LMA Damiani y colaboradores (2006) observó que existe una relación significativa ($p=0.006$) en la frecuencia de co-expresión del 54% (13/24) de genes ABC-B1/ABC-G2, la expresión de ABC-G2 es significativa ($p=0.027$) en el impacto en la vida libre de enfermedad en un seguimiento de 27 meses, lo cual también está asociada con la respuesta a la inducción de remisión, edad, conteo elevado de leucocitos. Múltiples ensayos correlacionan la expresión de ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 como factores pronóstico en la LMA, en nuestro caso el bajo número de pacientes incluidos no es suficiente para determinar si existe una correlación con la respuesta hematológica.

12. CONCLUSIONES

- **GENERAL**

La expresión o co-expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 no tienen relación con la respuesta hematológica en los pacientes con LLA.

- **PARTICULARES**

- ✓ Existe expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en la línea celular K562, solo hay expresión de ABC-B1 y ABC-G2 en las líneas celulares HL-60 y Reh, y no existe expresión de los transportadores en la línea celular Jurkat.
- ✓ Existe expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en donadores sanos del banco de sangre del HGM con una frecuencia del 90% para ABC-B1, 60% para ABC-C1 y 30% para ABC-G2
- ✓ Existe expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en pacientes con Leucemia Aguda, siendo la frecuencia de expresión del 57.1% para ABC-B1, 62.8% para ABC-C1 y 80% para ABC-G2 en pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica, además existe expresión del 100% para los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en pacientes con Leucemia Aguda Mieloblástica.
- ✓ No hay relación entre la expresión de ABC-B1 y ABC-C1 con la respuesta hematológica en los pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica, la expresión de ABC-G2 es independiente de la expresión de Cromosoma Ph⁺. No hay relación entre la expresión de ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en pacientes con Leucemia Aguda Mieloblástica.
- ✓ La expresión de ABC-G2 es independiente de la presencia del Cr Ph⁺.
- ✓ No se encontró relevancia entre la expresión de los genes con los pacientes con LMA.
- ✓ La expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 está relacionada con la enfermedad (LLA).

13. PERSPECTIVAS

- ✓ Analizar la expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 de sangre periférica y médula ósea de los mismos pacientes de LA
- ✓ Se propone analizar cuantitativamente por medio de qRT-PCR la expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en donadores sanos de Banco de Sangre del Hospital General de México.
- ✓ Analizar cuantitativamente por medio de qRT-PCR la expresión de los genes ABC-B1, ABC-C1 y ABC-G2 en pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica
- ✓ Realizar el análisis estadístico para determinar la relación entre los niveles de expresión de ABC's en donadores y pacientes con LLA
- ✓ Aumentar el número de pacientes con LLA, LMA y realizar un seguimiento clínico

14. LITERATURA CITADA

- ✓ Abbott, BL., Colaprietro, AM., Barnes, Y., Marini, F., Andreeff, M., Sorrentino, BP. “**Low levels of ABCG2 expression in adult AML blast samples**”. Blood, (2002) Vol. 100; pp 4594-4601
- ✓ Abbott, BL. “**ABCG2 (BCRP): A Cytoprotectant in Normal and Malignant Stem Cells**”. Clinical Advances in Hematology & Oncology, (2006) Vol. 4; pp 63-72
- ✓ Abbaszadegan, MR., Futscher, BW., Klimecki, WT., List, A., Dalton, WS. “**Analysis of multidrug resistance-associated protein (MRP) messenger RNA in normal and malignant hematopoietic cells**”. Cancer research, (1994) Vol. 54: pp 4676-4679
- ✓ Allikmets, R., Schriml, L. M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V., Dean, M. “**A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance**”. Cancer research (1998.) Vol. 58, pp 5337-5339
- ✓ Ambudkar, S.V., Kimichi-Sarfaty, G., Sauna, Z.E., Gottesman, M.M. “**P-glycoprotein: from genomics to mechanism**”. Oncogene, (2003) Vol. 22; pp 7468–7485
- ✓ **Anuario Estadístico del Hospital general de México.** 2011
http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/planeacion/anuario_2011.pdf
- ✓ Budulac, SE., Postma, DS., Hiemstra, PS, Kunz, LIZ., Siedlinski, M., Smit, HA., Vonk, JM., Rutgers, B., Timens, W., Boezen, HM. “**Multidrug resistance-associated protein-1 (MRP1) genetic variants, MRP-1 protein levels and severity of COPD**”. Respiratory research, (2010) Vol. 10; pp 1-11
- ✓ Callen, D.F., Baker, E., Simmers, R. N., Seshadri, R., Roninson, I. B. “**Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1**”. Human Genetic, (1987), Vol. 77: pp 142-144
- ✓ Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE); “**Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México**”. Secretaria de Salud SSA, 2011
- ✓ Chan, H. S. L., Haddad, G., Thorner, P. S., DeBoer, G., Lin, Y. P., Ondrusek, N., Yeager, H., Ling, V. “**P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma**”. New England Journal Medicine (1991) Vol. 325: pp 1608-1614

LITERATURA CITADA

- ✓ Chandler, B., Detsika, M., Khoo, SH., Williams, J. **“Factors impacting the expression of membrane-bound proteins in lymphocytes from HIV-positive subjects”**. Antimicrobial Chemotherapy, (2007) Vol. 60 (3): pp 685-689
- ✓ Chen, C., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., Roninson, I. B. **“Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells”**. Cell, (1986) Vol. 47; pp 381-389
- ✓ Chen KG, Sikic BI. **“Molecular pathways. Regulation and therapeutic implications of multidrug resistance”** Cancer research, (2012) Vol. 18: pp 1863-1869
- ✓ Cole, S. P. C., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M. V., Deeley, R. G. **“Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line”**. Science, (1992) Vol. 258: pp 1650-1654
- ✓ Cooke, L., Grill, M., Shirahatti, N., Mahadevan, D. **“MDR transporters as therapeutic targets in cancer”**. Science&Medicine, (2005) Vol. 10: pp 30-41
- ✓ Damiani, D., Tiribelli, M., Calistri, E., Geromin, A., Chiarvesio, A., Michelutti, A., Cavallin, M., Fanin, R. **“The prognostic value of P-glycoprotein (ABCB) and breast cancer resistance protein (ABCG2) in adults with de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype”**. Journal hematology, (2006) Vol. 91; pp 825-828
- ✓ Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. **“The Human ATP-Binding Cassette (ABC) transporter superfamily”**. Journal of Lipid Research, (2001) Vol. 42; pp 1007-1017
- ✓ Díaz Beveridge R, Aparicio Urtasun J. **“Leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos secundarios al tratamiento oncológico”**. An Medicine Internal Madrid (2003) Vol. 20(5); pp 257-268
- ✓ Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., Ross, D. D. **“A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells”** National academy of science, (1998) Vol. 95(26); pp 15665–15670
- ✓ Echeverria-Lima, J., Kyle-Cezar, F., Leite, DFP., capella, L., Capella, MAM., Rumjanek, VM. **“Expression and activity of multidrug resistance protein 1 in a murine thymoma cell line”**. Immunology, (2006) Vol 114; pp 468-475

LITERATURA CITADA

- ✓ Eisenblatter, T., Galla, H.-J. **“A new multidrug resistance protein at the blood-brain barrier”**. Biochemical and Biophysical Research Communications (2002) Vol. 293; pp 1273–1278
- ✓ Fellay, J., Marzolini, C., Meaden, ER., Back, DJ. **“Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study”**. Lancet, (2002) Vol. 359; pp 30–36
- ✓ Fojo, A. T., Ueda, K., Slamon, D. J., Poplack, D. G., Gottesman, M. M., Pastan, I. **“Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues”**. National Academy of Science, (1987) Vol. 84(1); pp 265-269
- ✓ Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J., Sarkadi B. **“The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity”**. Current drug delivery, (2004) Vol. 1; pp 1-16
- ✓ Gottesman M.M., Fojo T., Bates E.S. **“Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters”**. Nature, (2002) Vol. 2; pp 48-58
- ✓ Grant, C. E., Kurz, E. U., Cole, S. P. C., Deeley, R. G. **“Analysis of the intron-exon organization of the human multidrug-resistance protein gene (MRP) and alternative splicing of its mRNA”**. Genomics, (1997) Vol.45(2); pp 368-378
- ✓ Gromicho, M., Dinis, J., Magalhaes, M., Fernandes, A.R., Tavares, P., Laires, A., Rueff, J., Rodriguez, A.S. **“Development of imatinib and dasatinib resistance: dynamics of expression of drug transporters ABCB1, ABCC1, ACCG2, MVP and SLC22A1”**. Leukemia & Lymphoma, (2011) Vol.52(10); pp 1980-1990
- ✓ Gros, P., Croop, J., Housman, D. **“Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins”**. Cell, (1986) Vol. 47(3): pp 371-380
- ✓ Hitzli, M., Drescher, S., van der kulp, H., Schaffeler, E., Fischer, J., Schwab, M., Eichelbaum, M., Fromm, MF. **“The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells”**. Pharmacogenetics, (2001) Vol. 11(4); pp 293-29
- ✓ Hoffmann V. and Kroemer H.K. **“The ABC transporters MDR-1 and MRP2: Multiple Functions in Disposition of Xenobiotics and drug Resistance”**. Drug metabolics, (2004) Vol. 36(3-4); pp 669-701

LITERATURA CITADA

- ✓ Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática INEGI. **“Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer”**. México, 2008
- ✓ Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U., Barnouin, K., Kurz, G., Keppler, D. **“Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump”**. Drug Resistance (1997) Vol. 327, pp 305-310.
- ✓ Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. **“Cancer statistics”**. American Cancer Society Journal, (2010) Vol. 60: pp 277–300
- ✓ Klugbauer, N., Hofmann, F. **“Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localization on the band encoding the multidrug resistance-associated protein”**. FEBS letter, (1996) Vol. 391(1–2); pp 61–65
- ✓ Kruh GD., Zeng, H., Rea, P.A., Liu, G., Chen, Z., Lee, K., Belinsky, M.G. **“MRP subfamily transporters and resistance to Anticancer Agents”**. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, (2001) Vol 33(6); pp 493-501
- ✓ Leith, CP., Kopecky, KJ., Chen, I., Eijdem, L., Slovak, ML., McConnell, TS., Head, DR., Weick, J., Grever, MR., Appelbaum, FR., Willman, CL. **“Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-Glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia. A southwest oncology group study”**. Blood, (1999) Vol 94: 1086-1099
- ✓ Leslie EM., Deeley RG, Cole S.P.C. **“Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters”**. Toxicology (2001) Vol.167; pp 3-23
- ✓ Linton, K J. **“Structure and Function of ABC Transporters”**. Physiology, (2007) Vol 22, pp 122-130
- ✓ Lopez-Lopez, A. **“Correlación clínica del gen de Resistencia a multidroga MDR-1 con factores que influyen en el pronóstico del paciente con Leucemia Aguda Mieloblástica del Hospital General de México”**. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Medicina; Tesis de Licenciatura, 2011
- ✓ Mahjoubi, F., Golalipour, M., Ghavamzadeh, A., Alimoghaddam, K. **“Expression of MRP1 gene in acute leukemia”**. Sao Paulo Journal Medicinal, (2008) Vol. 126; pp 172-179

LITERATURA CITADA

- ✓ Machado, CG., Calado, RT., Garcia, AB., Falcao, RP. **“Age-related changes of the multidrug resistance P-glycoprotein function in normal human peripheral blood T lymphocytes”**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, (2003) Vol. 136; pp1653-1657
- ✓ Martinez-Murrillo, C., Ramos, C.P., Montañó, E. H.F. **“Quimioterapia en Hematología y Oncología”**. Editorial HGB Press Division, México 2011
- ✓ Mayani, H., Flores-Figueroa, E., Pelayo, R., Montesinos, JJ., Flores-Guzmán, P., Chávez-Gonzalez, A. **“Hematopoyesis”**. Cancerología, (2007) Vol. 2: pp 95-107
- ✓ Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T., Bates, S. E. **“Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes”**. Cancer research. Vol 59: pp 8-13, 1999.
- ✓ Norwood, K., Wang, RY., Hirschmann-Jax, C., Andreeff, M., Brenner, MK., Goodell, MA., Wulf, GG. **“An in vivo propagated human acute myeloid leukemia expressing ABCA3”**. Leukemia research, (2004) Vol. 28: pp 295-299
- ✓ **Organización Mundial de la Salud OMS.** 2011
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>
- ✓ Oselin, K., Nowakowski-Gashaw, I., Mrozikiewicz, PM., Wolbergs, D. **“Quantitative determination of MDR-1 mRNA expression in peripheral blood lymphocytes: a possible role of genetic polymorphisms in the MDR1 gene”**. Europe Journal Clinical Investigation, (2003) Vol.33(3); pp261–267
- ✓ Pei-Rong D, Amit K.T., Shinobu O., Jeferson W.K.K. L., Xin A., CChun-Ling D. **“The Phosphodiesterase-5 Inhibitor Vardenafil Is a Potent Inhibitor of ABCB1/P-Glycoprotein Transporter”**. PLoS ONE, (2011) Vol. 6; pp 1-10
- ✓ Plasschaert, SLA., van der Kolk, DM., de Bont, ESJM., Kamps, WA., Morisaki, K., Bates, SE., Scheffer, GL., Scheper, RJ., Vellega, E., de Vries, EGE. **“The role of breast cancer resistance protein in acute lymphoblastic leukemia”**. Cancer research (2003) Vol 9; pp 5171-5177

LITERATURA CITADA

- ✓ Plasschaert, SLA., de Bont, ESJM., Boezen, M., van der Kolk, DM., Daenen, SMJG., Faber, KN., Kamps, WA., Vellega, E., de Vries, EGE. **“Expression of multidrug resistance-associated proteins predicts prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia”**. Cancer Research, (2005) Vol 11; pp 8661-8668
- ✓ Ramírez, M.O., Cornejo, A.M.G. **“Fisiología de la Hematopoyesis”**. Oncología Pediátrica Integral, 2004
- ✓ Renes, J., de Vries, EGE., Jansen, PLM., Müller, M. **“The (patho)physiological functions of the MRP family”**. Drug Resistance, (2000) Vol. 3; pp 289-302
- ✓ Rieneken van de Ven., Mariska C. de Jong, Anneke W. Reurs, George L. Scheffer, Tanja D. de Grujil, Rik J. Scheper. **“Dendritic Cells Require Multidrug Resistance Protein 1 (ABCC1) Transporter Activity for Differentiation”**. Journal of Immunology, (2006) Vol. 176: pp 5191-5198
- ✓ Roninson, I. B., Chin, J. E., Choi, K., Gros, P., Housman, D. E., Fojo, A., Shen, D., Gottesman, M. M., Pastan, I. **“Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells”**. National academy science. (1986) Vol. 83: pp 4538-4542
- ✓ Rosenberg MF, Mao Q, Holzenburg A, Ford RC, Deeley RG, Cole SP. **“The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1), crystallization and single-particle analysis”**. Journal Biological Chemical (2001) Vol 276; pp. 16076–16082
- ✓ Salazar-Terán, IV. **“Evaluación del efecto del oncogén BCR-ABL sobre la expresión del gen MDR-1 en la línea celular K562 en pacientes con Leucemia Granulocítica Crónica”**. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias; Tesis de Licenciatura, 2011
- ✓ Sanchez–Suarez Patricia, Benitez-Bribiesca Luis. **“Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Drogas”**. Cancerología (2006), Vol. 1; pp 187-199
- ✓ Sans-Sabrafen, J., Besses, R.C. **“Hematología clínica”**. 5º Edición, Editorial Elsevier, España 2006
- ✓ Sauerbrey, A., Sell, W., Steinbach, D., Voigt, A., Zintl, F. **“Expression of the BCRP gene (ABCG2/MXR/ABCP) in childhood acute lymphoblastic leukemia”**. Hematology, (2002) Vol 118; pp 147-150

LITERATURA CITADA

- ✓ Sarkadi, B., Homolya, L., Szakács, G., Váradi, A. **“Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in Chemoimmunity Defense System”**. Physiology, (2006) Vol. 86: pp 1179–1236
- ✓ Schaich, M., Soucek, S., Thiede, C., Ehninger, G., Illmer, T. **“MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia”**. British Journal of Hematology, (2004) Vol 128; pp 324-332
- ✓ Schneider, E., Cowan, KH., Bader, H., Toomey, S., Schwartz, GN., Karp, JE., Burke, PJ., Kaufmann, SH. **“Increased expression of the multidrug resistance-associated protein gene in relapsed acute leukemia”**. Blood, (1995) Vol 85: pp 186-193
- ✓ Scharenberg, CW.,Harkey, MA., Torok-Storb, B. **“The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors”**. Blood, (2002) vol. 99(2); pp 507-512
- ✓ Szakács, G., Annereau, JP., Lababidi, L., Shankavaram, U., Arciello, A., Bussey, KJ., Reinhold, W., Guo, Y., Kruh, GD., Reimers, M., Weinstein, JN., Gottesman, MM; **“Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells”**. Cancer Cell, (2004) Vol. 6, pp 129-137
- ✓ Sen, R., Natarajan, K., Bhullar, J., Shukla, S., Fang, HB., Cai, L., Chen, ZC., Ambdukar, SV., Baer, MR. **“The novel BCR-ABL and FLT3 inhibitor Ponatinib is a potent inhibitor of the MDR-associated ATP-binding cassette transporter ABCG2”**. Molecular Cancer Therapeutics, (2012) Vol. 11: pp 2033-2044
- ✓ Sharom, FJ. **“ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance”**. Future Medicine (2008) Vol. 9; pp 105-127
- ✓ Schinkel AH and Jonker JW. **“Mammalian Drug Efflux transporters of the ATP Binding Cassette (ABC) family. An overview”**. Advance Drug Delivery, (2003) Vol. 64; pp 138–153
- ✓ Štefková J, POledne R., HUBÁČEK J.A. **“ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters in Human Metabolism and Diseases”**. Physiology Research, (2004) Vol. 53: pp 235-243
- ✓ Sudchada, S., Oo-puthinan, OK., Saelim, N. **“ABCB1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells in healthy Thai males and females”**. Genetics and Molecular Research, (2010) Vol. 9 (2): pp 1177-1185

LITERATURA CITADA

- ✓ Svirnovski, A., Shman, T., Serhiyenka, T., Savitski, V., Smolnikova, V., Fedasenka, U; **“ABCB1 and ABCG2 proteins, their functional activity and gene expression in concert with drug sensitivity of leukemia cells”**. Hematology, (2009) Vol. 14(9); pp. 204-212
- ✓ Synold, T. W., Dussault, I., Forman, B. M. **“The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux”**. Nature Medicine, (2001) Vol. 7; pp 584 - 590
- ✓ Tafuri, A., Gregorj, C., Petrucci, MT., Ricciardi, MR., Mancini, M., Cimino, G., Mercucci, C., Tedeschi, A. **“MDR1 protein expression is an independent predictor of complete remission in newly diagnosed adulta cute lymphoblastic leukemia”**. Blood, (2002) Vol 100; pp 974-981
- ✓ Tirado-Gomez LL, Mohar AB. **“Epidemiologia de las neoplasias Hemato-Oncologicas”**. INCAN, 2007
- ✓ Tiwari AK, Sodani K, Wang SR, Kuang YH, Ashby CJ, Chen X, Chen ZC. **“Nilotinib (AMN107, Tassigna®) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters”**. Biochemical Pharmacology, (2009) Vol. 78; pp 153–161
- ✓ Turriziani, O., Gianotti, N., Falasca, R., Zoccoli, A., Lazzarin, A., Antonelli, G. **“Expression levels of MDR-1, MRP1, MRP4 and MRP5 in peripheral blood mononuclear cells from HIV infected patients failing antiretroviral therapy”**. Journal of Medical Virology, (2008) Vol. 80(5); pp 766–771
- ✓ Ueda, K., Cornwell, M. M., Gottesman, M. M., Pastan, I., Roninson, I. B., Ling, V., Riordan, J. R. **“The mdr1 gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein”**. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1986
- ✓ Van den Heuvel-Eibrink, MM., Van der Holt, B., Burnett, AK., Knauf, WU., Vellenga, E., Ossenkope, GJ., Löwenberg, B., Sonneveld, P. **“CD34-related coexpression of MDR1 and BCRP indicates a clinically resistant phenotype in patients with acute myeloid leukemia (AML) of older age”**. Hematology, (2007) Vol 16; pp 833–839
- ✓ Van der Kolk, DM., Vallenga, E., Van der Veen, AY., Noordhoek, L., Timmer-Bosscha, H., Ossenkoppele, GJ., Raymakers, RA., Müller, M., Van den Berg, E., de Vries, EGE. **“Deletion of the multidrug resistance protein MRP1 gene in acute myeloid leukemia: the impact on MRP activity”**. Blood, (2000) Vol 95; pp 3514-3519

LITERATURA CITADA

- ✓ Vardiman James W, Thiele Jürgen, Arber Daniel A, brunning Richard D, Borowitz Michael J. **“The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes”**. Blood, (2009) Vol. 114(5); pp 937-951
- ✓ Vasiliou, V., Vasiliou, K., Nebert, D.W. **“Human ATP-Binding Cassette (ABC) transporter family”**. Human Genomics, (2009) Vol. 3; pp 281-290