



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS Y ODONTOLÓGICAS Y DE
LA SALUD**

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE CLORHIDRATO DE
METFORMINA A UN RÉGIMEN DE QUIMIOTERAPIA
ESTANDAR SOBRE EL PRONÓSTICO DE PACIENTES CON
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA Y SU ASOCIACION
CON LA EXPRESIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA A
DROGAS ABCB1**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**

PRESENTA:

Christian Omar Ramos Peñafiel

**Director de Tesis
Dr. Adolfo Martínez Tovar
Hospital General de México**

Ciudad Universitaria, Cd MX ,Octubre 2018



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.



Agradecimiento al Posgrado en Ciencias Médicas y Odontológicas UNAM", número de registro 99607537. Y a la Dirección de Investigación Hospital General México (HGM/DI/08/204/04/17, D1/15/103/03/57).

AGRADECIMIENTOS



A mi Tutor Adolfo Martínez y a mi co-tutora la Dra Irma Olarte por su paciencia y constancia para la finalización de cada uno de los proyectos



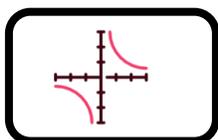
A mis compañeros del Laboratorio, Adrián, Anel, Rafael por su colaboración en todos los proyectos del laboratorio y más aún por su amistad



MI admiración y orgullo por nueva Thundera y por ese 0.05



Al Dr. Juan Julio Kassack por mantenerse de pie aun en la adversidad, a la Dra Guadalupe León por sus enojos que hacen sentir como en casa, a la Dra Rozen por dar siempre una sonrisa, al Dr. Collazo por tolerarme todos estos años, a Efreeen y al Dr. Martínez



A la Dra Queipo, al Dr. Fiacro, al Dr. Alvarenga y a todos los profesores tanto de la maestría como del Doctorado, por su ayuda y pasión por la investigación.



A la Licenciada Torres, a Aleithia y Magnolia por salvarme muchísimas veces de todos los trámites, gracias por su ayuda y en especial su paciencia.



A mis compañeros el Dr. Francisco Galván, el Dr. Erick Flores, el Dr. Ricardo Castañeda por tolerar mi computadora a altas horas de la noche y su ayuda en mis guardias cuando tenía que hacer tareas o exámenes



A todos mis Residentes a Lemy por mantenerme vivo y ayudarme en mi etapa de Profesor por seguir dándole sentido y fin a las cosas.

<ul style="list-style-type: none"> • Respuesta al tratamiento y su asociación con la expresión del gen ABCB1 • Resultados acordes a la expresión del gen ABCB1 	Página 40
Parte IV. Conclusión <ul style="list-style-type: none"> • Discusión y conclusiones 	Página 57
Tablas y Figuras <ul style="list-style-type: none"> • Cuadro 1.0 Tipo de Transportadores ABCB1 y los fármacos implicados • Tabla 2.0 Características generales de los pacientes • Tabla 3.0 Estimación del Riesgo de las diferentes variables • Tabla 4.0 Características de los pacientes acorde al grupo de tratamiento • Tabla 5.0 Modelo de riesgo de Falla o Recaída acorde a la expresión del gen ABCB1 • Figura 1.0 Estructura química de la Metformina • Figura 2.0 Efecto del clorhidrato de Metformina sobre diversas vías de señalización • Figura 3.0 Principales efectos antitumorales del Clorhidrato de Metformina acorde a los mecanismos de oncogénesis • Figura 4.0 Línea celular MOLT4 de Leucemia Linfoblástica Aguda • Figura 5.0 Vías implicadas con la acción de Metformina (dependientes e independientes de la insulina) • Figura 6.0 Supervivencia global acorde a la adición de Metformina • Figura 7.0 Supervivencia global en paciente con LLA • Figura 9.0 Supervivencia global en pacientes con LLA acorde a la adición de Metformina • Figura 10.0 Supervivencia global en pacientes con LLA acorde a la adición de Metformina en pacientes con sobreexpresión del gen ABCB1 	Página 19 Página 44 Página 47 Página 51 Página 55 Página 10 Página 13 Página 15 Página 16 Página 17 Página 46 Página 46 Página 53 Página 54

RESUMEN GENERAL DEL PROYECTO

El tratamiento actual de la leucemia aguda consiste esencialmente de un complicado e intensivo régimen de quimioterapia (Vincristina, Doxorrubicina, Prednisona y Metotrexato, por citar algunos de los esquemas más utilizados), llegando en algunos casos al trasplante de médula ósea. A pesar del tratamiento, la curación es de tan solo el 10 al 30%. El clorhidrato de Metformina es una biguanida que desde el 2006 se ha demostrado su utilidad para el tratamiento del cáncer. Este proyecto se fundamenta en la evidencia clínica y básica de la adición del clorhidrato de Metformina a un régimen de quimioterapia estándar en pacientes portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda. Debido a que la resistencia a drogas esta mediada por diferentes transportadores de flujo localizados en la membrana y para su funcionamiento se requiere el uso de energía, la adición de Metformina puede mejorar el pronóstico en pacientes los cuales sobre expresan este transportador.

Objetivo. Identificar el efecto de adicionar Clorhidrato de Metformina sobre el pronóstico en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda y su asociación con los niveles de expresión del gen de resistencia ABCB1

Resultados del ensayo clínico. De los 123 pacientes estudiados, a supervivencia global a 700 días fue del 43% con una supervivencia libre de enfermedad del 47%. Los pacientes que recibieron la adición del clorhidrato de Metformina mostraron una menor tasa de recaídas en comparación con el grupo de quimioterapia (6.5% versus 17.1%).

Resultados del estudio básico. Se estudiaron 102 pacientes, 26 recibieron tratamiento con Metformina plus quimioterapia y 76 casos solo con quimioterapia. Los pacientes con sobre expresión del gen ABCB1 mostraron una menor supervivencia en comparación con aquellos con niveles de expresión bajos ($p=0.030$). La adición de Metformina mejoro el pronóstico en especial en pacientes con alta expresión del gen ABCB1 ($p=0.025$).

Conclusión. La combinación de Metformina al régimen de quimioterapia reduce el porcentaje de recaídas en especial en pacientes que sobre expresan el gen de resistencia a drogas ABCB1.

PARTE I. MARCO TEÓRICO

1.0 ASPECTOS GENERALES DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es una neoplasia la cual acorde a la Organización Mundial de la Salud (OMS) se encuentra englobada dentro de las neoplasias de precursores linfoides (1). Para su diagnóstico se requiere tanto de hallazgos morfológicos en conjunto con los marcadores detectados mediante citometría de flujo o por biología molecular. El pronóstico de los pacientes ha mejorado drásticamente gracias al entendimiento de la biología molecular y la detección de diversos blancos moleculares principalmente inhibidores de cinasa de tirosina, al igual que la inmunoterapia (2). El tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda consiste actualmente en la combinación de múltiples agentes de quimioterapia, inmunoterapia, inhibidores de cinasa de tirosina y en caso de contar con un donador HLA-compatible ser sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos (3,4).

1.1 EPIDEMIOLOGÍA.

La incidencia acumulada de la Leucemia Linfoblástica Aguda ajustada a la edad en los Estados Unidos es de 1 por cada 100,000 personas con picos entre los 2 a 5 años y un segundo pico por encima de los 50 años (5). En un estudio reciente publicado por Dorey y colaboradores basándose en los registros desde el 2001-2007 en los Estados Unidos, estimaron que la incidencia de LLA en población hispana es mayor que en la población no latina (IR=10.2) (6). En México, acorde al registro mundial de Cáncer (Globocan, 2008) la incidencia acumulada de leucemia es de 6.3 casos por 100,000 personas, con una tasa de mortalidad de 4.8/100,000 personas (7). Acorde al Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, en el 2002 se registraron 1720 casos de LLA por encima de la Leucemia Mieloide Aguda con 944 nuevos casos, concluyendo que la prevalencia de LLA es mayor en comparación de otras regiones alrededor del mundo (8). En el Hospital General de México, un centro de referencia Nacional para la atención de Leucemias Agudas establecido en la Ciudad de México se observó en dos periodos de tiempo con intervalos de 16 años que la LLA es la variante que se atiende con mayor frecuencia de (62% versus 38%) (9).

1.2 PRONÓSTICO GENERAL Y ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO.

Alrededor del mundo, la mayoría de los pacientes con Leucemia son atendido mediante diferentes regímenes de quimioterapia, pero con la introducción de nuevos agentes (inmunoterapia, inhibidores de cinasa de tirosina) o la modificación química de medicamentos ya existentes (fármacos pegilados) se han mejorado drásticamente el pronóstico de este tipo de casos (10). En América Latina la mortalidad asociada a la leucemia ha disminuido especialmente en población pediátrica, pero desafortunadamente estos datos no se han reproducido en la población adulta (11). El porcentaje de Remisiones Completas (RC) en adultos es superior al 85% pero con una supervivencia a 5 años por debajo del 50% en la mayor parte de la población alrededor del mundo. En gran medida estos resultados son debido a que cerca del 75% de los pacientes adultos presentan marcadores de mal pronóstico al momento del diagnóstico, comprometiendo la supervivencia libre de enfermedad a solo un 25% a 5 años (12). En nuestro país Arteaga y colaboradores en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán describieron los resultados de una cohorte de seguimiento (n=40) entre 2003 -2007. El porcentaje de remisiones completas fue de 78% para los pacientes tratados con el protocolo institucional 0195 y 85% para aquellos tratados con el protocolo Hyper-CVAD. La mediana de la supervivencia libre de enfermedad fue de 11.6 meses con una supervivencia global de 15 meses (13). En el Hospital General de México, Ramos y colaboradores presentaron los resultados de 2 cohortes de estudio entre el 2007-09, siendo el porcentaje de Remisiones Completas del 61 y 51% respectivamente, con una supervivencia global y supervivencia libre de evento a 2 años de 32 y 30% respectivamente (14).

La estrategia general de tratamiento consiste en una etapa de inducción a la remisión, una etapa de post-inducción, una etapa de intensificación o consolidación en la que se incluye la profilaxis a Sistema Nervioso Central y una etapa de prolongada denominada mantenimiento (15). Los fármacos utilizados de forma más frecuente en la etapa de inducción a la remisión incluyen esteroides (Prednisona, Prednisolona, dexametasona), *Vincristina*, *antraciclinas* (Daunorrubicina) y *Asparginasa* en especial en pacientes pediátricos y adolescentes. Fármacos como la *Ciclofosfamida*, *Citarabina* y *Mercaptopurina* se utilizan generalmente en la etapa de post-inducción. La etapa de post-inducción consiste principalmente en la rotación secuencial de diferentes fármacos que combinan ciclos de dosis altas de quimioterapia con la finalidad de identificar los casos que se pueden beneficiar mediante un trasplante de progenitores hematopoyéticos (16). Posterior al

tratamiento estándar de 2 a 3 años se realiza la suspensión electiva de tratamiento. Aquellos que permanecen en Remisión Completa por encima de los 4 a 5 años se consideran curados (17). Algunos grupos multidisciplinarios han establecido estrategias semejantes a protocolos de población pediátrica como el protocolo italiano GIMEMA ALL0288 el cual incorpora un esquema de pretratamiento con esteroides en conjunto a un régimen de inducción de 4 fármacos. A pesar de dicha estrategia el porcentaje de recaídas fue del 60% (18).

1.3 PRONÓSTICO POSTERIOR A UNA RECAÍDA.

Cerca de un 25% de los pacientes serán refractarios al primer esquema de tratamiento y el resto contarán con una supervivencia libre de enfermedad por debajo del 40% (19-22). Alrededor del 50% de los pacientes presentaran una recaída dentro de los primeros 5 años de tratamiento encontrándose relacionado directamente con anormalidades citogenéticas de mal pronóstico o por el tipo de riesgo (23,24). Fielding y colaboradores reportaron en 2007 la experiencia de un estudio prospectivo en pacientes con recaída a médula ósea del protocolo MRCUKALL12/ECOG 2993, la supervivencia global posterior a la recaída fue 7 % a 5 años, siendo tanto la edad al momento de la recaída como duración de la primera remisión completa los principales factores para una buena respuesta para el tratamiento de rescate (25). Semejante a esto Oriol y colaboradores del grupo PETHEMA en su ensayo prospectivo, longitudinal evaluaron la supervivencia de 263 adultos posterior a la primera recaída medular. La supervivencia global registrada posterior a la recaída fue de 4.5 meses (95% IC, 4 -5 meses) con una supervivencia global a 5 años de 10% (95%IC, 8-12%). Coincidiendo con Fielding los principales factores de buen pronóstico posterior a la recaída fueron la edad menor de 30 años y una mayor duración de la primera remisión completa (26). En nuestro país existen pocos registros de los resultados de los diferentes protocolos de recaída. En el Hospital General de México, en un estudio retrospectivo evaluamos los resultados de los diferentes protocolos de recaída (IDA-FLAG, Hyper-CVAD, protocolo institucional 2,3,5) registrándose un total de 15% de Segundas Remisiones Completas (2RC) y una supervivencia promedio de 113 días (27).

2.0 METFORMINA Y CÁNCER.

Características generales de la droga

La Metformina es una biguanida ampliamente utilizada para el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2 (28). Derivada de la hierba *Galega officinalis*, la Metformina fue desarrollada originalmente como una estrategia terapéutica en Paris, su estructura fue identificada inicialmente en Edinburg y sintetizada para su uso por primera vez en 1922 en Dublín (29). Metformina o *Glucophage* por su nombre comercial original (devorador de glucosa) se encuentra disponible para el tratamiento de la Diabetes Mellitus No Dependiente de Insulina (DMNID) desde la década de los años cincuenta (30). De forma general su estructura química se caracteriza por tener dos grupos metilo (CH₃) unidos a un nitrógeno del núcleo biguanida. Su absorción es de 1 -3 horas a través del tracto digestivo, pudiendo llegar a 6 horas. La biodisponibilidad es entre 50-60%. La dosis máxima con 500mg cada 12hrs/día o 1gr dosis única es de 3.25mcg/ml. Su volumen de distribución es de 9.9 litros. Muestra una unión nula a proteínas y cuenta con una excreción en un 90% renal. El tiempo de eliminación media es de 4 – 8 horas (31). La estructura química del clorhidrato de Metformina se presenta en la Figura 1.0

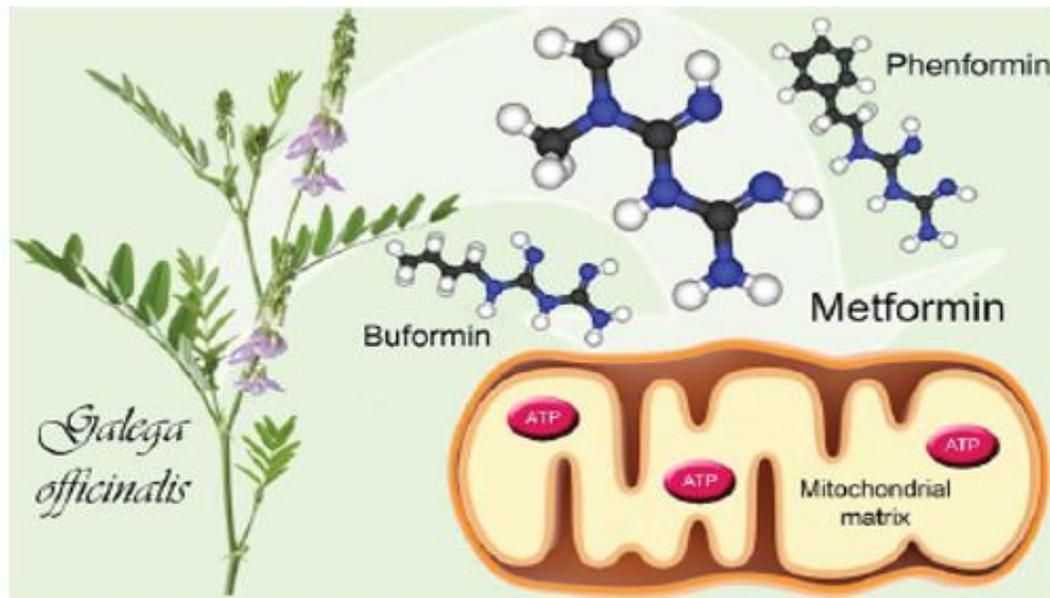


Figura 1.0 Metformina y sus derivados (Buformina y Phenformina) sintetizada de la planta *Galega Officinalis* (Lirio Francés) y su blanco celular principal (mitocondria). Tomado de Ramos y colaboradores. Usefulness of Metformin in Cancer Treatment: Teaching New Tricks to an Old Dog. *Endocrinol Diabetes Obes.* 2016; 4(1): 1079.

Usualmente se administra en conjunto con los alimentos o inmediatamente después de ellos, la dosis máxima diaria es de 3.0gr; dosis mayores generan el riesgo de desencadenar acidosis láctica por lo que dosis superiores a 1gr se administran de forma fraccionada (32,33). A pesar de que el principal evento adverso asociado a la Metformina es a nivel gastrointestinal, siempre se considera a la acidosis láctica como uno de los de mayor riesgo de muerte. Recientemente Renda y colaboradores evaluaron en su serie de 10 años de seguimiento la frecuencia de acidosis láctica en pacientes tratados con Metformina, el 18.2% de todos los eventos adversos serios fue asociado a acidosis láctica (34).

2.2 RELACIÓN ENTRE METFORMINA Y LA PREVALENCIA DE CÁNCER EN PACIENTES DIABÉTICOS

Gran parte de los conocimientos del efecto antitumoral de la Metformina fueron identificados de diversos estudios de cohorte de pacientes diabéticos asociados inicialmente este beneficio a su mecanismo de acción principal que es la activación de la cinasa de AMP (AMPK) (35). Dentro de los estudios en humanos, Monami y colaboradores reportaron en su estudio de casos y controles la reducción de la incidencia de cáncer en aquellos pacientes los cuales fueron expuestos a Metformina (periodo de seguimiento de 75.9 meses) en comparación con aquellos con uso de otras drogas hipoglucemiantes (OR 0.46 [95% CI 0.25 -0.85] (36). Semejante a este estudio, Liao y colaboradores en una cohorte de pacientes diabéticos evaluó el riesgo relativo de padecer cáncer colorrectal con los diferentes tratamientos para diabetes. El RR para aquellos que usaron sulfonilureas fue de 3.56 (95% IC, 2.02 – 6.72) en comparación a aquellas mujeres diabéticas que utilizaron Metformina (0.42, 95% IC, 0.28 – 0.64) (37). Bodmer y colaboradores en un estudio de casos –controles en pacientes diabéticos que utilizaron Metformina o sulfonilureas para determinar el riesgo de padecer cáncer de páncreas encontraron que el uso de Metformina se asoció a un decremento en el OR de padecer cáncer de en comparación de aquellos que utilizaron insulina (OR: 0.43 versus 2.29, IC 95% 0.23- 0.80 y 1.32- 2.74 respectivamente) (38). Este mismo autor, pero en una serie similar de cáncer de ovario concluyeron que el uso de Metformina se asoció a una tendencia de disminución del riesgo de padecer cáncer de ovario (OR,0.61,95% IC 0.3 -1.25) (39). Datos semejantes ya habían sido presentados por Bowker y colaboradores en 2006 en alrededor de 10,309 casos de pacientes diabéticos. Los pacientes que utilizaron Metformina mostraron un menor riesgo de carcinogénesis en comparación con aquellos que utilizaron sulfonilureas (RR 1.3 [95%

IC, 1.1 -1.6}; P= 0.001) (40). En otro estudio de la misma cohorte del Hospital Universitario de Alberta, Bowker y colaboradores identificaron que también el tiempo de exposición ya sea a Metformina, sulfonilureas o insulina, se asoció con el riesgo de carcinogénesis. En dicho estudio retrospectivo encontraron que el riesgo relativo para el desarrollo de cáncer en pacientes con insulina fue de 2.22, mientras que para aquellos que utilizan Metformina el Riesgo Relativo fue de 0.8 (95% IC 0.65- 0.98) (41).

2.3 METFORMINA Y LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER.

Acorde a las conclusiones del Consenso de Diabetes y Cáncer realizado en la ciudad de Nueva York en el 2012, se estableció que la Diabetes es un estado de riesgo para el desarrollo de cáncer. A pesar de que algunos efectos benéficos continúan en debate, existe un consenso de que Metformina cuenta con un efecto protector para la aparición de cáncer (42). Posterior a los diferentes estudios observacionales en pacientes diabéticos, la mayor parte de los mecanismos descritos en cáncer derivan de los hallazgos en líneas celulares (43).

El principal mecanismo de acción asociado al clorhidrato de Metformina es la inhibición de la acción mitocondrial mediante la obstrucción de sus mecanismos de obtención de ATP mediante el bloqueo de la AMPK (del inglés AMP protein-kinasa), incrementando los niveles de AMP y bloqueando la expresión de factores de diferentes factores de transcripción y transportadores celulares (factores de Yamanaka: OCT4, KLF4, SOX2, cMyc), recientemente se ha reportado que también regula la expresión de diferentes microRNAs (miRNA) que influyen con la expresión de diferentes factores de transcripción como FOXO o CREB (44). Este efecto sobre los miRNA ya ha sido descrito por Feng y colaboradores en la línea celular HCT 116 (cáncer de colon) en donde la adición de Metformina y fluoracilo (5-FU), incrementaron los niveles del gen supresor de tumores Spry2 mediante la supresión del micro RNA-21 (mir-21) (45).

Finalmente, el principal mecanismo se ha centra en la inhibición de procesos celulares que consumen energía mediante la activación vía AMPK. De forma normal AMPK fosforila a TSC2 estimulando la GTPasa reduciendo la actividad de la vía mTOR (indispensable para supervivencia celular) (46). La asociación de la activación de la AMPK sobre las diferentes vías de señalización celular se describe en la Figura 2.0

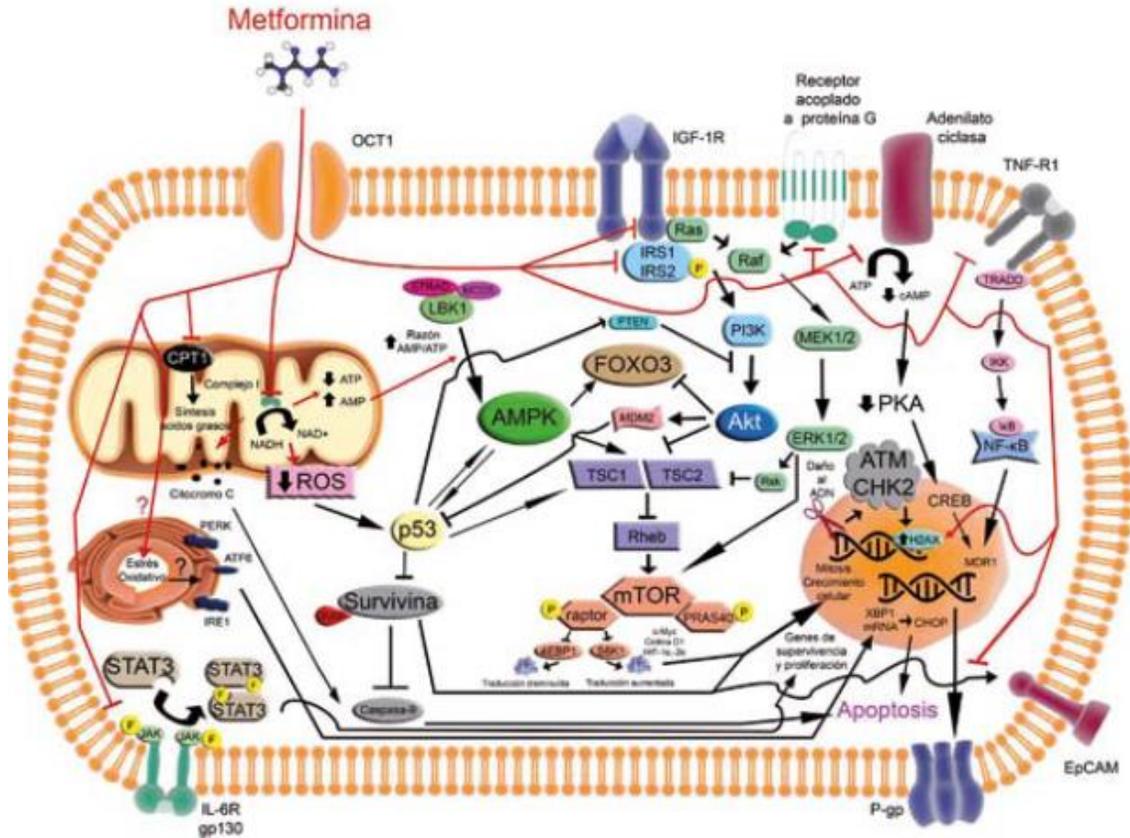


Figura 2.0 Efectos del clorhidrato de Metformina sobre diferentes vías de señalización celular (mTOR, JAK-STAT, MEK 1/2, ERK 1/2). Tomado de Ramos y colaboradores. State of the art: Metformin, cancer and Leukemia. Rev Hematol Mex 2015;16:168-178.

Otros mecanismos asociados son la reducción la síntesis de proteínas y la gluconeogénesis en la célula tumoral (47). Dicho efecto no solamente se ha descrito en células tumorales sino también a células las cuales muestran cambios neoplásicos tempranos (48). Esto fue corroborado por Memmott y colaboradores en 2010 en un ensayo en ratones a los cuales se le expuso al carcinógeno de tabaco 4-methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)- 1-butanona y fueron tratados posteriormente con Metformina.

En dicho modelo *in vivo*, Metformina activo a AMPK inhibiendo la vía mTOR, pero en pulmón, Metformina inhibió la fosforilación del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1R/1R), Akt y la vía ERK (*del inglés* extracelular signaling factor) (49). Xie y colaboradores reportaron el efecto de la adición de Metformina sobre líneas de cáncer de endometrio. La adición del fármaco aumento la expresión del receptor de progesterona el cual es regulado por el factor de crecimiento semejante a la insulina (50). La fosforilación de mTOR también ha adquirido importancia ya que esta incrementa la traducción de

diversas proteínas que codifican reguladores del ciclo celular como lo son c-Myc y la ciclina D1 (51). Otros efectos que se han descrito son sobre proteínas relacionadas a la activación de AMPK como lo es LKB1 (serine/threonine kinase 1) (52). Al analizar los efectos en la membrana celular Rozengurt y colaboradores describieron en células de cáncer de páncreas que la adición de Metformina al cultivo celular inhibe la actividad de los receptores acoplados a proteínas G asociados al receptor semejante a la Insulina IGF-1 (53).

2.4 Metformina y quimioterapia.

Petrushev y colaboradores describieron recientemente en células de cáncer de hígado el efecto de Metformina en conjunto con quimioterapia. Tanto de forma unitaria como en conjunto con quimioterapia, Metformina incrementó el stress oxidativo celular mediante un incremento en la peroxidación de lípidos disminuyendo el nivel del glutatión reducido (54). Soritau y colaboradores en glioblastoma multiforme estadios III y IV evaluaron el efecto de la adición de Metformina y temozolomide (TMZ) encontrando que en 6 de 8 casos mostro un efecto benéfico para el control del crecimiento tumoral (55). Los diferentes efectos del clorhidrato de Metformina sobre las células tumorales se describe en la Figura 3.0

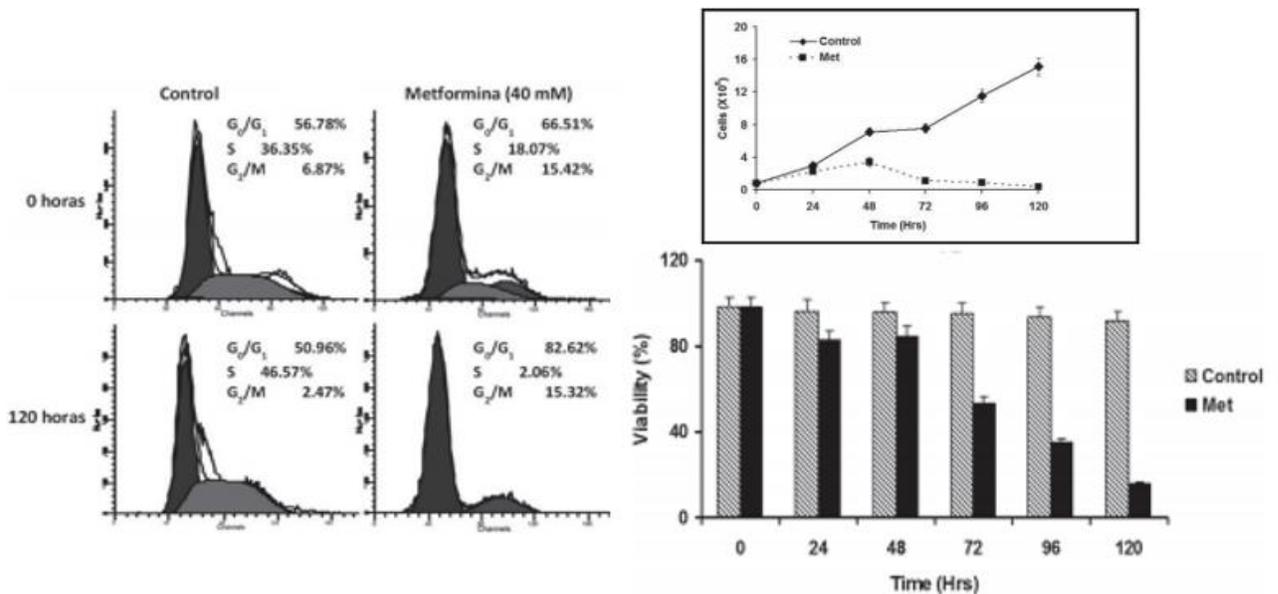


Figura 4.0. Efecto de la adición del clorhidrato de Metformina en la línea celular de leucemia T MOLT4: Secuestro celular (Figura de lado izquierdo) en G₀/G₁, reducción en la viabilidad celular (Inferior y superior derecho). Tomado de Ramos y colaboradores. Effect of Metformin to a pretreatment with steroids in adult patients with acute lymphoblastic leukemia and in the viability of the MOLT-4 cell line. MÉD.UIS. 2014;27(1):221-228.

Posteriormente al adicionar el clorhidrato de Metformina a dosis de 850mg tres veces al día a pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda de novo en la etapa de pretratamiento con esteroides (días -7 al día -1) incrementó la cifra de Respuestas Temprana a Esteroides en comparación con nuestro registro histórico (27 versus 56%) (56). Otras de las vías de señalización implicadas con la resistencia y la proliferación celular es la vía RAS/Raf ya que tanto su sobre expresión como su mutación se encuentran expresadas en una gran cantidad de líneas celulares de cáncer (cáncer de seno, cáncer de próstata, células hematopoyéticas) (57). Recientemente Iglesias y colaboradores (reporte en trámite de publicación) en su reporte de línea celular de cáncer endometrial, la adición de Metformina redujo considerablemente el acoplamiento de la forma activa de K-Ras a la vía de señalización MAPK.

Los principales mecanismos involucrados en la actividad de la Metformina tanto dependiente como independiente al mecanismo de la insulina se describen en la Figura 5.0

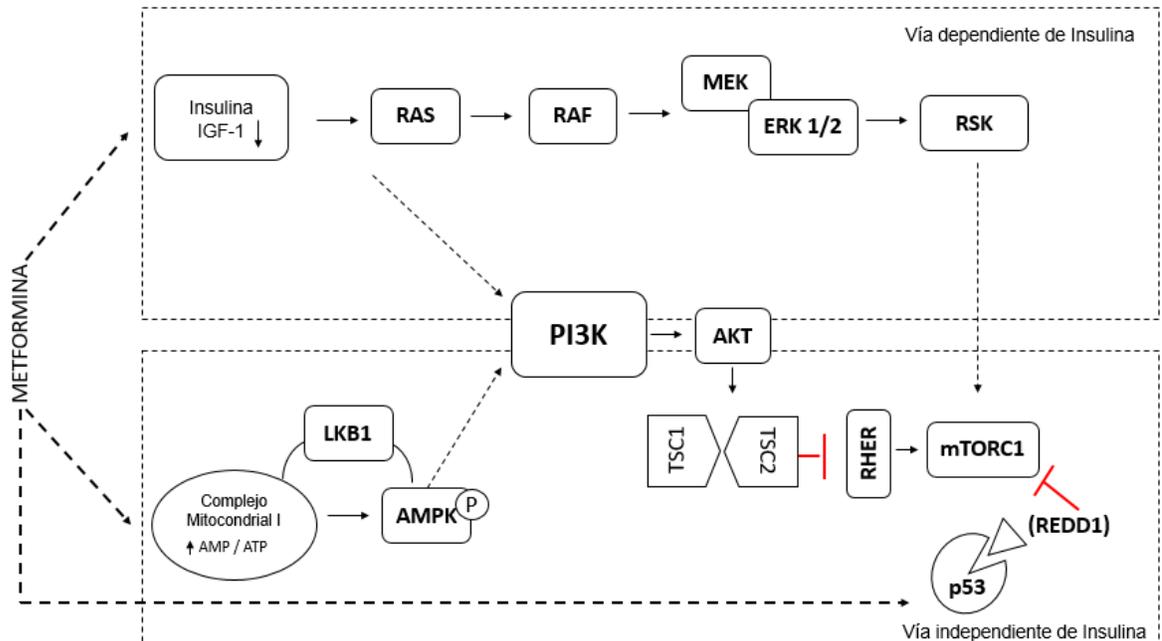


Figura 5.0. Vías implicadas con la acción de Metformina (dependientes o independientes a la insulina). Tomado de Ramos y colaboradores. Papel de la Metformina en el tratamiento del cáncer. DOI: <http://dx.doi.org/10.21840/sic/153355>

3.0 Importancia de la detección de los genes de resistencia a drogas

Una de las principales características de las células tumorales son la expresión de diversos transportadores celulares que contribuyen a la resistencia a la quimioterapia. Estos transportadores se codifican por la expresión de diversos genes de resistencia a drogas, los tumores que expresan una mayor cantidad de transportadores son los sarcomas indiferenciados, carcinoma hepatocelular, linfoma nasal de células Natural-Killer, cáncer de seno, cáncer de células germinales, y las leucemias (58-60).

Esta resistencia contribuye al fracaso terapéutico en especial cuando los pacientes son tratados con regímenes que contienen antraciclinas, alcaloides de la vinca o epipodofilotoxinas los cuales su concentración celular es regulada por la glucoproteína p170 (Pg170) el cual es producto del gen de resistencia a drogas (*del inglés* MDR-1/ ABCB1). En leucemias la resistencia al tratamiento se relaciona directamente con las supervivencias de los pacientes (61).

El papel de estos genes en el tratamiento de las Leucemias Agudas se ha explorado en especial en población pediátrica determinando que este factor se comporta de manera independiente sobre el riesgo tanto de recaída como de falla terapéutica temprana. (62). Semejante a esto su expresión se ha establecido en una serie de adultos mayores portadores de Leucemia Mieloide Aguda, en donde su sobreexpresión se relacionó con una baja tasa de remisiones completas (63).

3.1 Característica de los genes de Resistencia a Multidrogas

La familia de los Genes de Resistencia a Drogas pertenece a una familia de 49 genes humanos ABC (adenosine triphosphate (ATP) – Binding Cassette) que están clasificados en 8 subfamilias que van de ABC-A hasta ABC-G y ANSA (arsenite and antimonite transporter) esto en base al grado de homología entre sus secuencias. Estos genes están especializados en el transporte celular dependiente de energía y participan en un amplio rango de eventos como la expulsión de sustancias nocivas, secreción de toxinas, movilización de iones y péptidos y señalización celular. Los genes MDR se codifican en el brazo largo del cromosoma 7, banda 21.1 (7q21.1). El gen MDR-1 codifica una proteína de 170 kd conocida como glicoproteína P (gp-170 [P de permeabilidad]) la cual es una molécula enlazadora de ATP con características de una proteína de membrana formadora de poro, que funciona como bomba dependiente de energía, la cual exporta o expulsa la droga fuera de las células. En los últimos años, se han descrito más de 15 polimorfismos del gen MDR1, el más relevante de ellos, por su progresión clínica, es el polimorfismo C3435T del exón 26 del gen, el único que se correlaciona con un fenotipo de menor expresión de la proteína en la membrana de la Glicoproteína P. La Glicoproteína P constituye un sistema de desintoxicación natural que se expresa en varios tejidos normales, como hígado, intestino delgado, riñón, placenta, células endoteliales del sistema nervioso central y testículo (64-65). Se han reportado como sustratos antitumorales de la gp-P170 a los alcaloides de la Vinca, Vincristina y Vinblastina; Antraciclinas como Daunorrubicina y Doxorrubicina; Epipodofilotoxinas como Etopósido y Tenopósido; Inhibidores de tirosina cinasa como Imatinib (67).

La Resistencia a Drogas (MDR) esta mediada por múltiples transportadores de fármacos ABC (ATP-binding cassette). Numerosos fármacos antineoplásicos, incluyendo agentes comúnmente utilizados en leucemia aguda, como son Doxorrubicina, Vincristina,

mitoxantrona y Metotrexato han mostrado ser sustratos de esta glicoproteína-P generando la expulsión a través de proteínas de flujo. Múltiples estudios clínicos han demostrado esta asociación sobre la respuesta terapéutica (68-69).

La glucoproteína de permeabilidad (*P-gp*) fue identificada como el primer transportador ABC asociado con la resistencia a drogas, pero después se han identificado muchos más transportadores adicionales que confieren resistencia a una gran variedad de fármacos. Las tres proteínas más estudiadas de MDR son *P-gp*, codificada por el gen MDR-1, la proteína 1 asociada a Multidrogas resistencia (MRP1) y la proteína de resistencia asociada al cáncer de mama (BCRP o ABCG2), los cuales han sido demostrados en estudios de líneas celulares neoplásicas que median mecanismos primarios de MDR. Los genes responsables de codificar para estas proteínas, así como otros genes codificantes de transportadores ABC adicionales se saben involucrados en la resistencia a fármacos antineoplásicos.

Los 48 genes codificantes de los transportadores ABC están subdivididos en 7 familias, A-G, y un gran número de proteínas codificadas por la familia B y C en particular se ha demostrado que confieren resistencia a través de la expulsión del fármaco, altamente importantes en cáncer.

Numerosos estudios han demostrado que la MDR intrínseca puede incrementarse debido a la expresión de ciertos perfiles génicos. Por ejemplo, la expresión de genes MDR incrementada (MDR1 y ABCG2) fue asociada con peor supervivencia global en un estudio de perfil de expresión génica de adultos con leucemia mieloide aguda (70-72).

Transportadores de la Familia ABC (proteínas de acoplamiento a ATP) y su relación con la resistencia a la quimioterapia.			
Gen	Proteína	Papel con la Resistencia	Principales sustratos
ABCA2	ABC2	Transportador de medicamentos	Estramustina, Mitoxantrona
ABCA3	ABC3	Secuestro de drogas lisosomales	Doxorrubicina Daunorrubicina, Imatinib
ABCB1	MDR1	Transporte de medicamentos	Alcaloides de la vinca, antraciclinas, Etopósido, Imatinib, Mitoxantrona, Metotrexato
ABCB4	PGY3	Transportador de fosfodil colina	Vinblastina, Doxorrubicina
	MDR3	Secuestro de sales biliares	
ABCB5	ABC19	Transportador de medicamentos	Fluorouracil, Doxorrubicina
ABCB11	SPGP	Transporte de sales biliares	Paclitaxel
ABCB1	MRP1	Transporte de drogas	Alcaloides de la vinca, antraciclinas, Etopósido
ABCC2	MRP2	Transporte de drogas, flujo de aniones	Alcaloides de la vinca, antraciclinas, Etopósido
ABCC4	MRP4	Transportador de nucleótidos	Irinotecan, tiopurina, Metotrexato
ABCC5	MRP5	Transportador de nucleótidos	Tiopurina, cisplatino, Metotrexato
ABCC6	MRP6	Transportador de drogas	Antraciclinas, Etopósido, gemcitabina
ABCC10	MRP7	Transportador de drogas	Alcaloides de la vinca, taxanos

Cuadro 1.0. Principales transportadores de la familia de genes ABC (proteínas de acoplamiento de ATP) y su relación con los diferentes fármacos utilizados como quimioterapia.

Estudios individuales han evaluado polimorfismos específicos de MDR1 y expresión de *P-gp* en leucemias agudas, con resultados inconsistentes. En un estudio, no hubo un efecto

significativo sobre la resistencia a drogas mediada por *P-gp* en pacientes con leucemia aguda asociados con uno de los polimorfismos MDR1 C3435T, G2677T o T-129C (74); mientras en otros estudios el polimorfismo C3435T fue asociado con peor pronóstico en niños, con linfoma linfoblástico (27); sin embargo, en otro estudio, el genotipo C/C y G/G de C3435T se asoció con una alta probabilidad de remisión completa (75).

La principal técnica utilizada para el análisis de la expresión del gen MDR1 es la Reacción de Cadena de Polimerasa tanto en punto final como en tiempo real. Su sobreexpresión se ha asociado a una pobre respuesta tanto en pacientes adultos principalmente con Leucemia Mieloide Aguda (76). Otras pruebas como la prueba de hibridación fluorescente in situ se ha utilizado también para evaluar la expresión de BCRP (ABCG2) en pacientes con leucemias agudas (77). Otras técnicas utilizadas para el análisis de estos genes al igual que el comportamiento de los transportadores que codifican son tanto la expresión vesículas membranales (78,79) o mediante un inmunoensayo de electroforesis por capilaridad (80,81). Entre las nuevas estrategias de detección se encuentra el uso de micro arreglos, en cuanto a los genes de resistencia la medición de la actividad resistente se ha realizado mediante la actividad de AKT1. Otra técnica novedosa estudiada para evaluar la actividad de transporte mediada por *P-gp* incluye el uso de pruebas marcadas con galio (82) y tomografía computada por emisión de fotones individuales (SPECT) (83). En cuanto a su farmacodinamia, al analizar el comportamiento de los diferentes fármacos y la resistencia a drogas, aquellas con un flujo semejante a la Rodamina 123, se correlaciono con una elevada expresión de *P-gp*, logrando predecir la falla de respuesta terapéutica en pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (84). Finalmente, tanto el SPECT como la Tomografía por Emisión de Positrones PET son herramientas útiles para seleccionar el tratamiento óptimo para pacientes que demuestren un fenotipo particular de resistencia a drogas (85).

La técnica de detección estándar es la Reacción de Cadena de polimerasa (RT-PCR), pero a pesar de ser uno de los métodos de evaluación más convenientes para valorar la expresión del gen de resistencia a drogas la correlación de diferencias en la magnitud de expresión de miRNA de MDR con diferencias en niveles de proteínas y función de MDR. Aunque una evaluación mediante micro arreglos de una proteína ahora es capaz de realizarse muchos datos han requerido demostrar una relación entre los niveles de proteínas y su funcionalidad. Las evaluaciones de la funcionalidad, como son rodamina

123 y flujo de Doxorubicina, y el conteo celular fluorescente y la evaluación basada en vesículas membranales pueden directamente reflejar actividad MDR (86).

Muchos estudios clínicos han demostrado una asociación entre la expresión de P-gp, o la función/actividad de *P-gp*, y la respuesta al tratamiento o la sobrevida en leucemias agudas (87-90). Vendita y colaboradores demostraron que pacientes con LMA recién diagnosticados quienes expresaron Bcl-2 y *P-gp* tuvieron una significativamente baja tasa de remisión completa con terapia de inducción estándar que pacientes que expresaron solo alguna de estas proteínas (91).

P-gp no es el único transportador MDR asociado con peor respuesta a la terapia y sobrevida en leucemia aguda. En Leucemia Mieloide, la expresión del gen BCRP (ABCG2) también se ha asociado a una pobre respuesta terapéutica tanto en población adulta (92-95) como pediátrica (96,97).

La su vez la expresión de MRP1, MRP2, MRP3, MRP5 y MPR6 mostraron una asociación con una baja supervivencia libre de recaída tanto en niños como adultos portadores de LLA (98). En otros estudios la expresión de MRP3 se asoció con peor pronóstico en niños con LLA (99).

Numerosos estudios han reportado asociación positiva entre polimorfismos genéticos MDR1 específicos y respuesta y/o resultados al tratamiento (100). Por ejemplo, en LMA un estudio de 405 pacientes de los polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) del gen MDR1 – C1236T, G2677T y C3435T- demostraron que, aunque el genotipo C/C de C3435T estuvo asociado con baja expresión de MDR, fue también significativamente asociado con alta probabilidad de recaída y peor sobrevida global (101). Numerosos estudios también han reportado ausencia de asociación entre el genotipo y la respuesta o los resultados, por ejemplo, Van der Holt y colaboradores reportaron no asociaciones entre genotipos de MDR1 C1236T, G2677T o C3435T y expresión de P-gp y función en células leucémicas, expresión de MDR1, tasa de RC o sobrevida en un análisis de 150 pacientes mayores de 60 años con LMA (102). Un análisis de 53 pacientes con LLA no identificaron una asociación entre el polimorfismo MDR1 C3435T y el pronóstico en LLA (103).

Los efectos de las variantes genéticas en los transportadores de drogas asociadas con consecuencias fenotípicas son aun controversiales, ya que se han reportado resultados contradictorios.

Existen inhibidores de la *P-gp* considerados como de primera generación, entre ellos se incluyen verapamilo (104), quinina (105) y ciclosporina (106). La adición de quinina a la terapia con Citarabina y mitoxantrona en pacientes con síndrome mielodisplásico de alto riesgo resulta en mejoría en la sobrevida global en pacientes *P-gp* positivos y en pacientes con LMA de mal pronóstico ciclosporina más Daunorrubicina y Citarabina resulta en mejoría en la sobrevida global (107). Otros inhibidores considerados de segunda generación han demostrado mejores resultados entre ellos se encuentra el valsopodar, un análogo de ciclosporina, demostró solo limitada evidencia de beneficio en términos de remisión completa o sobrevida global en pacientes con LMA (108). La tercera generación ha sido designada como selectiva para la inhibición de los transportadores con alta afinidad para los transportadores y bajas interacciones farmacocinéticas (109). Zosuquidar restablece la susceptibilidad a las drogas en líneas celulares leucémicas que expresan *P-gp* e incrementan la citotoxicidad de antraciclinas en blastos de LMA con actividad primaria *P-gp* (110). Otros son tariquidar, imidazol, pero desafortunadamente los hallazgos de estudios clínicos de estos agentes no han reflejado necesariamente los datos prometedores hallados en los estudios preclínicos posiblemente debido a múltiples factores incluyendo la presencia en un paciente de múltiples mecanismos de MDR, la tolerabilidad a los inhibidores MDR y la pobre farmacocinética de estos inhibidores (111).

Múltiples agentes antineoplásicos novedosos han mostrado tener propiedades inhibitoras contra *P-gp* y otras proteínas con actividad MDR. Inhibidores de farmesiltransferasa y tirosin cinasa han demostrado la capacidad de revertir MDR. Tipifarnib, lapatinib, erlotinib, nilotinib inhiben la actividad de expulsión de *P-gp* y BCRP (112). Sildenafil ha mostrado que inhibe la función transportadora de *P-gp* y BCRP y estimula su actividad ATPasa y por lo tanto sensibiliza a las células MDR a los fármacos quimioterapéuticos (113). La sobreexpresión de MDR1 inducida por Doxorubicina en células de LMA HL-60 ha sugerido estar regulada por el sistema de la ciclooxigenasa, particularmente COX-2, lo que indica un papel potencial para inhibidores de la COX-2 en aminorar la resistencia inducida por la quimioterapia (114).

Otras alternativas con un potencial efecto benéfico sobre el bloque de los genes de resistencia a drogas es poder inhibir la expresión de genes mediante el mecanismo de silenciamiento incluyendo el uso de oligonucleótidos anti sentido, regulación transcripcional y terapia dirigida hacia los ribosomas (115-118). La regulación obtenida mediante la silenciamiento del gen ha mostrado ser eficaz en modelos in vitro, mediante oligonucleótidos

anti sentido, resultando en una disminución del nivel de expresión de P-gp, indicando la reversibilidad del fenotipo de MDR en células leucémicas (119, 120).

Existen alternativas para inhibir la actividad de *P-gp* y otras bombas de expulsión de fármacos. Algunos fármacos pueden hacerse más lipofílicos y por lo tanto son internalizados más fácilmente, del mismo modo la encapsulación de fármacos en liposomas puede ayudar a los vencer los efectos de la resistencia en la membrana como se ha reportado con la Doxorubicina liposomal (121) y con la Vincristina encapsulada por liposoma (122), estos métodos, los cuales incrementan la permeabilidad pasiva lipídica de los compuestos y resulta en mejor difusión pasiva previene el desarrollo de grandes gradientes de concentración que pueden potencialmente disminuir la resistencia debido a la expulsión por los transportadores sin importar si el compuesto es sustrato o no (123-124).

4.0 Metformina y su asociación con los genes de resistencia a Multidrogas

Los genes de resistencia a Multidrogas se encuentran asociados no solamente a la expulsión de los fármacos ya que su funcionamiento se encuentra regulado estrechamente por diferentes vías de señalización siendo en su mayoría asociadas al Factor Nuclear Kappa- β . Debido a que su función es en gran medida mediada por energía mediante el consumo de ATP, diversas hipótesis sugieren que su regulación se encuentra estrechamente ligada tanto al consumo como a la producción de energía. Glazer y colaboradores en 1994, establecieron una asociación directa en un modelo de cáncer de seno, donde la expresión de MDR1 es regulada mediante una cinasa dependiente de AMP (cAMP), su exceso se relacionó directamente a una mayor expresión de los genes MDR (125). En un modelo posterior, este grupo también estableció que al utilizar un inhibidor selectivo de la cinasa dependiente de AMP (PKA) se redujo la actividad de MDR1, sugiriendo que dichos inhibidores pueden bloquear el fenotipo de resistencia (126). Estos hallazgos también se replicaron en otras líneas celulares. Scala y colaboradores utilizaron otra estrategia basada en un análogo de la AMPc, el 8-Cl-cAMP, al utilizarse sobre líneas celulares de cáncer logro una disminución en la actividad metabólica mediada por AMPc causando una regulación negativa de MDR1 (127). Otros modelos in vitro han utilizado células tumorales resistentes a quimioterapia. Parissenti y colaboradores evaluaron un inhibidor farmacológico de AMPc en la línea células MCF-7 de cáncer de seno la cual es resistente a la doxorubicina. Dentro de los resultados y en comparación con el grupo control la densidad del crecimiento tumoral fue menor en aquellas células a las que se les adiciono el inhibidor sugiriendo que el bloqueo de MDR1 por algún inhibidor puede ser una

estrategia viable para vencer la quimio-resistencia (128). Otros inhibidores reversibles e irreversibles se han intentado para el manejo de la resistencia a drogas, pero con diversos resultados. Otros inhibidores experimentales como el XR9576 también se han utilizado para su manejo de la resistencia a drogas siendo selectivo y con una duración considerable, mejorando la sensibilidad a agentes como el paclitaxel (129).

Proteínas inhibidoras de la apoptosis y su interacción con la Metformina

Dentro de otros mecanismos implicados son la asociación a otras proteínas implicadas en diversas vías de señalización como PI3K. Una de las proteínas más complejas es la survivina (survivina de sus siglas en inglés), esta proteína se encuentra implicada principalmente dentro de mecanismos inhibidores de la apoptosis, siendo una familia completa de genes que se encuentran activos tanto en estado normal como en estados patológicos. Su papel principal es en mecanismo de mitosis (130), principalmente en la etapa G2/M inhibiendo la actividad de la caspasa 7 (131). Durante el desarrollo tumoral, la relación de la expresión de survivina se encuentra expresada de manera inversa, diversas mutaciones sobre la survivina también se han asociado al crecimiento tumoral (132). La inhibición de la apoptosis esta mediada por una porción de la proteína que se conoce como dominio de unión a las proteínas de apoptosis (BIR), la cual inhibe directamente a la actividad de las caspasas (133). A pesar de que existen pocos fármacos que inhiben a la survivina, algunos investigadores han intentado el uso de fármacos derivados de plantas. Uno de ellos es la silibinina, esta proteína derivada de los flavopirinoides disminuye de manera selectiva su expresión induciendo la activación de diversas caspasas, principalmente en neoplasias de vejiga (134). Otros autores han sugerido que el efecto inhibitorio de estos flavopirinoides es principalmente sobre el bloqueo de G1, pero la principal etapa en G2 es mediada por el bloqueo de pCdc25c (SER216), Cdc 25c, pCdc (Tyr15), Cdc2 y la ciclina B1 (135). Otros mecanismos los cuales se encuentra asociado la survivina es mediada por la vía PI3K/AKT. Yang y colaboradores evaluaron que interacciones que existe de survivina con las diferentes vías de señalización entre ellas SDF1/CXCR4 en conjunto con la vía PI3K/AKT (136). La vía PI3K/AKT interfiere también con la vía MEK/ERK mediada por la vía SDF-1. Liao y colaboradores evaluaron en células de glioblastoma dichas interacciones concluyendo que la regulación de la survivina se encuentra mediada por la vía MEK/ERK y la vía PI3K/AKT (137). Lesan y colaboradores basándose en los efectos de Metformina sobre la vía PI3K/AKT consideraron los efectos posibles sobre Metformina en la expresión de la survivina. En su modelo celular en células

de cáncer gástrico evaluaron el efecto de la adición de Metformina ya que disminuye los niveles de mRNA de survivina, mTOR, Akt, pero dentro de su modelo celular apreció de manera interesante un efecto antagónico de la Metformina sobre cisplatino sugiriendo que dicha combinación no es útil para vencer la resistencia a drogas (138). Hang y colaboradores evaluaron el bloqueo de la survivina sobre AMPK/mTOR y su interacción con la Metformina. Dentro de su modelo, la sobre expresión de la survivina disminuye la sensibilidad celular a la Metformina (139).

PARTE II. ESTRUCTURA GENERAL DEL PROYECTO



Planteamiento del problema

La Leucemia Linfoblástica Aguda es una de las principales variantes de cáncer que se atienden en los Hospitales de América Latina, pero a diferencia de los pacientes pediátricos la supervivencia en adultos es aun limitada. Este pronóstico se debe al elevado porcentaje de recaídas en especial durante el primer año de tratamiento. Hasta el momento, los mayores avances en el tratamiento de la LLA del adulto son en el campo de la inmunoterapia, ya sea específica como el anti-CD20 (Rituximab) o Bi-específica (Blinatumomab). Esta estrategia se encuentra limitada solo a ensayos clínicos o debido a su costo solo se encuentra limitado a algunos pacientes. La estructura del tratamiento de las Leucemias se basa en un primer tratamiento quimioterápico que requiere del uso de tres fármacos durante la etapa de inducción (esteroides, alcaloides de la vinca, antraciclinas) estos se administran de manera secuencial durante el primer mes de tratamiento y en general la mayor parte de los protocolos de tratamiento consiguen más de un 80% de remisiones completas. La resistencia a estos fármacos se asocia a una falla terapéutica inicial limitando las opciones terapéuticas. Muchos mecanismos se encuentran implicados en la resistencia a los fármacos quimioterápico, pero tal vez la más conocida es la expresión de los genes de resistencia a Multidrogas (MDR1). Estos genes codifican diversas bombas de flujo cuya función es mantener la homeostasis celular mediante la introducción como la expulsión de diferentes compuestos que pueden generar un daño celular considerable. Su expresión normal es en todas las células del organismo incluyendo aquellas que han mutado a alguna variante de cáncer, pero de manera normal la mayor parte de las familias de transportadores se encuentran distribuidos en la barrera hematoencefálica, placenta, riñón y los canalículos biliares. El clorhidrato de Metformina es una droga antidiabética ampliamente utilizada principalmente para el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 No Insulina dependiente y en muchos países es considerada la primera elección de tratamiento. Acorde a esto, en el Reino Unido cerca del 83.6% de los individuos con Diabetes Mellitus tipo 2 son tratados con Metformina mientras que en Estados Unidos se encuentra entre las diez drogas más prescitas. Desde hace más de 10 años diversos estudios han demostrado su eficacia en otro tipo de indicaciones como lo son la reducción de peso, el manejo del ovario poliquístico e inclusive para retardar algunas enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento. A pesar de ser una droga de uso regular en la mayor parte de los servicios médicos para el control inicial de la Diabetes o Pre-diabetes aún existen factores que pueden alterar su eficacia como son su uso en pacientes con alteración en su funcionamiento renal o incluso errores en la

dosificación. A pesar de ser uno de los fármacos más utilizados alrededor del mundo, su mecanismo antitumoral es cada vez más complejo. Posterior a los resultados de los estudios observacionales en pacientes diabéticos, partiendo de la cohorte de pacientes de la comunidad de Tayside en Escocia, se concluyó que aquellos pacientes que son tratados mediante clorhidrato de Metformina muestran una menor probabilidad de desarrollo de algún tipo de cáncer. Inclusive aquellos pacientes que desarrollaron cáncer y se encontraban bajo un tratamiento con Metformina, la posibilidad de metástasis fue mucho menor al diagnóstico. Posterior a estos hallazgos la mayor parte de las investigaciones de Metformina y Cáncer se basaron tanto en diferentes líneas celulares de cáncer como coadyuvante en pacientes en etapas avanzadas. Dentro de las principales conclusiones el clorhidrato de Metformina demostró un efecto antitumoral directo en las diferentes líneas celulares considerando que el principal mecanismo es mediante la activación de la vía AMPK, generando un desgaste energético celular y de manera secundaria bloqueando diversas vías de vías de señalización como la vía mTOR. En conjunto estos mecanismos sugieren que el clorhidrato de Metformina previene la supervivencia de la célula bloqueando los mecanismos normales de apoptosis y supervivencia causando finalmente la muerte celular por el agotamiento de las reservas energéticas celulares. En resumen, la mayoría de los ensayos *invitro* coinciden que el clorhidrato de Metformina genera un arresto en el ciclo celular principalmente de G0/G1, lo que permite considerar que si cuenta con un mecanismo antitumoral directo. El tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda requiere la combinación de drogas como lo son los esteroides, los alcaloides de la vinca y las antraciclinas. A inicios de la década Pan y colaboradores publicaron el efecto de la adición de clorhidrato de Metformina (500 Mm) en cultivos de linfoblastos de pacientes sometidos a un tratamiento mediante el esquema Hyper-CVAD como esquema de inducción, demostrando que su adición disminuye la capacidad de resistencia a fármacos como lo son las antraciclinas incrementando su eficacia. Nuestro grupo evaluó el efecto de la adición de Clorhidrato de Metformina a una dosis de 850mg PO cada 8hrs en conjunto con el tratamiento de quimioterapia en pacientes portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda, mejorando el porcentaje de Remisiones completas (81.3 % [n = 61] versus 70 % [n = 14])) y reduciendo el porcentaje de recaídas a médula ósea (47.9 % versus 25 %). Esto sugiere que el uso de Clorhidrato de Metformina puede mejorar el rendimiento de los diferentes esquemas terapéuticos para el tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda.

Justificación.

El tratamiento moderno de la Leucemia Linfoblástica Aguda combina diferentes drogas, algunas de ellas basadas principalmente en la eliminación de los mecanismos de reparación celular induciendo apoptosis acelerada. Los mecanismos de resistencia tumoral incluyen alteraciones moleculares específicas como son la activación de genes como el Cromosoma Philadelphia o la Leucemia de Linaje Mixto (MLL) o inclusive factores inherentes al huésped como lo son polimorfismos de algunas enzimas implicadas en el metabolismo de fármacos como la 6-merpactopurina o el Metotrexato, transportadores implicados en la absorción y excreción de algunos fármacos (OCT-1) o la expresión de transportadores en la membrana celular que eliminan rápidamente al fármaco expulsándolo y reduciendo su actividad. Uno de los principales genes que codifica a un transportador de flujo dependiente de ATP es ABCB1 (MDR1) el cual se encuentra asociado a la resistencia principalmente de fármacos como lo son las antraciclinas y los alcaloides de la vinca. Su sobre expresión se ha asociado a la resistencia en una gran diversidad de tumores incluyendo las leucemias agudas. En el Hospital General de México, se analizó la asociación de la expresión de los diferentes niveles de expresión del gen ABCB1 sobre la respuesta al tratamiento en pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda identificando que semejante a otro tipo de tumores, los pacientes que sobre expresaron el gen mostraron una menor respuesta al tratamiento en comparación con aquellos que lo expresaron semejante a los controles sanos (140). Al estudiar los diferentes mecanismos de acción, la mayor parte incluye la activación de AMPK o el bloqueo de vías de señalización como PI3K/AKT/ mTOR, pero son pocos los estudios que consideran una relación directa con la resistencia a medicamentos. Debido a que el agotamiento energético celular inducido por la activación de la AMPK es el principal mecanismo de acción del clorhidrato de Metformina, es posible al disminuir los niveles de ATP puedan disminuir la actividad de las diferentes bombas de resistencia a Multidrogas, las cuales dependen en su mayoría del uso de ATP. Este tipo de bombas utilizan energía para su funcionamiento por lo que diversos investigadores han evaluado los mediadores involucradas, siendo hasta hoy la vía del AMPc la más reconocida (141). Glazer y colaboradores en 1994 mediante un modelo celular de cáncer de seno establecieron una asociación positiva entre la actividad de la cinasa dependiente de AMPc (PKA) y la expresión de los MDR1(142). Este mismo grupo, pero en un modelo diferente corroboró sus datos al utilizar un inhibidor selectivo de PKA logrando una reducción en la actividad de MDR1, evitando así el fenotipo de resistencia (143). Parissenti et al obtuvo los mismos resultados al usar inhibidores de PKA

en la línea células MCF-7 de cáncer de mama resistente a la doxorrubicina (144). Recientemente Wu y colaboradores en la línea celular HepG2 de hepatocarcinoma identificaron que Metformina reduce la expresión de MDR1 mediante el bloqueo de la transcripción del factor nuclear κ B (NF- κ B) (145). Aunque otros investigadores sugieren que esta inhibición de MDR1 no es exclusiva de Metformina, sino que otras drogas antidiabéticas como la glicazida y pioglitazona cuentan con esta misma propiedad (146). Acorde a esto es posible considera que al adicionar Clorhidrato de Metformina al tratamiento quimioterápico de pacientes portadores de LLA, mejore el pronóstico de manera independiente de los niveles de expresión del gen ABCB1.

Hipótesis

Debido a que el clorhidrato de Metformina ha demostrado diversos mecanismos que contribuyen tanto al bloqueo de vías de señalización implicadas en la proliferación celular como en la apoptosis su uso se ha extendido no a solo el tratamiento de la Diabetes Mellitus no Insulina dependiente sino como tratamiento coadyuvante de las diferentes situaciones relacionadas al cáncer (primera línea, refractariedad, radioterapia, inmunoterapia). El tratamiento de los pacientes portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda se basa en la combinación de diferentes fármacos como lo son las antraciclinas, los alcaloides de la vinca y las epipodofilotoxinas los cuales son sustratos del gen ABCB1 por lo que el uso de medicamentos como lo son el clorhidrato de Metformina pueden mejorar el rendimiento de las diferentes quimioterapias al mostrar un efecto sobre la expresión o función de las diferentes bombas de flujo. Ya dentro de los mecanismos antitumorales de la Metformina se encuentra la regulación de la expresión de los genes de Resistencia a Drogas se plantea la siguiente hipótesis.

Si el clorhidrato de Metformina ha demostrado invitro una asociación sobre el funcionamiento de las bombas de flujo dependiente de ATP debido a la depleción secundaria a la activación de AMPK al igual que in vivo ha mejorado el rendimiento del tratamiento de pacientes adultos con Leucemia Linfoide Aguda reduciendo el porcentaje de recaídas tempranas de manera independiente a los factores biológicos adversos al diagnóstico entonces su adición al esquema de tratamiento mejorara el pronóstico de aquellos pacientes de mal pronóstico que sobre expresan el gen de resistencia a drogas ABCB1

Metodología

Objetivo	
Establecer el efecto de la adición de clorhidrato de Metformina 850mg PO tres veces al día a un régimen de quimioterapia estándar sobre la supervivencia acorde al fenotipo de expresión del gen ABCB1 (bajo, ausente o sobre expresado) determinada mediante tiempo real en pacientes portadores de Leucemia Linfoblástica de Novo	
Criterio de Inclusión	
Clínicos	<ul style="list-style-type: none">• Pacientes mayores de 18 años portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda de novo• Candidatos a iniciar esquema de quimioterapia mediante un protocolo Institucional que combine una terapia de inducción, consolidación y mantenimiento• Candidatos a iniciar la pre-inducción con esteroides durante 7 días y que no cuenten con alguna urgencia hematológica que requiera una cito reducción rápida con quimioterapia o leucocito-aféresis• Ambos géneros• Consentimiento informado para inicio de quimioterapia.
Moleculares	<ul style="list-style-type: none">• Consentimiento informado para la separación de células, la extracción de RNA y su almacenamiento
Criterios de Exclusión	
Clínicos	<ul style="list-style-type: none">• Pacientes portadores de Leucemia mieloide aguda o Leucemia con expresión de marcadores Mieloides• Diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2• Uso previo de Metformina por alguna otra circunstancia médica• Leucemias agudas en recaída tardía que requieran reiniciar el protocolo de tratamiento• Intolerancia a la vía oral que impida el uso de Prednisona• Esperanza de vida de más de 48 horas
Moleculares	<ul style="list-style-type: none">• No exista suficiente material genético que permita la amplificación del gen o de cualquiera de los genes constitutivos que se utilizaran
Criterios de Eliminación	
	<ul style="list-style-type: none">• Ausencia de registros médicos que evalúen la respuesta favorable a esteroide.• No se encuentre disponible material genético para su análisis al final del periodo de pre inducción• Deceso del paciente durante el periodo de pretratamiento por cualquier complicación asociada o no asociada al tratamiento

Variables.

Variable dependiente		
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Supervivencia Pacientes los cuales se mantuvieron vivos al final del seguimiento	Cualitativa dicotómica	0) Vivo 1) Muerto
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Leucemia refractaria	Cualitativa dicotómica	0) Remisión 1) Leucemia refractaria
Operacionalización de la variable: Se define como leucemia refractaria a aquella que persiste con la presencia de > 20% a las 4 semanas de haber finalizado el tratamiento de inducción a la remisión.		

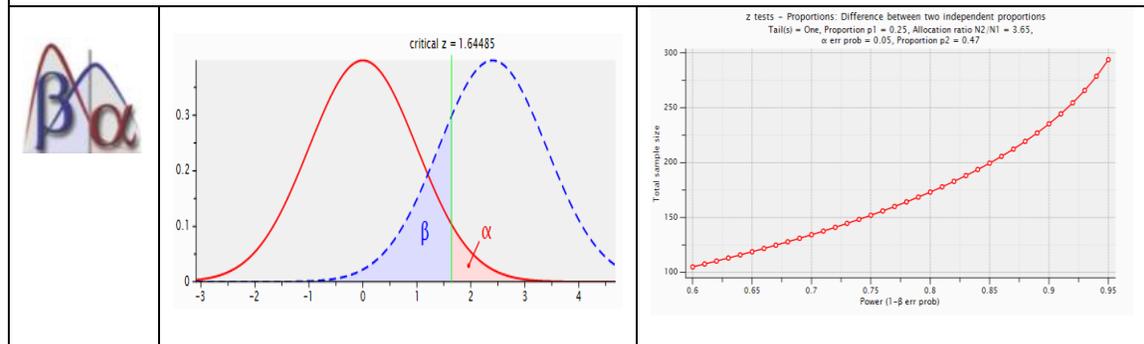
Variable independiente		
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Tratamiento con clorhidrato de Metformina	Cualitativa dicotómica	0. Sin tratamiento 1) con tratamiento
Operacionalización de la variable: Administración de dosis de Metformina 850mg cada hora		
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Tipo de riesgo	Cualitativa dicotómica	0. Riesgo habitual 1. Riesgo Alto
Operacionalización de la variable: Riesgo Alto: > 35 años, > 30,000 leucocitos /mL, Infiltración a Sistema nervioso central al diagnóstico, expresión del oncogén BCR-ABL1, ausencia de respuesta a las 4 semanas de tratamiento.		
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Medición de los genes de MDR-1 mediante Reacción de cadena de polimerasa mediante tiempo real	Cuantitativa continua	Número de transcritos cuantificables en número de copias
Operacionalización de la variable: Número de copias del gen MDR-1 medida mediante RT-PCR al final del esquema de pre-inducción con esteroides		
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Medición de los genes de MDR-1 mediante Reacción de cadena de polimerasa mediante tiempo real	Cualitativa ordinal	Estratificación de los pacientes acorde al nivel de expresión <ul style="list-style-type: none"> • Expresión ausente o baja • Expresión alta
Operacionalización de la variable: Número de copias del gen MDR-1 medida mediante RT-PCR al final del esquema de pre-inducción con esteroides		

Diseño del Estudio

Cronología	Prospectivo	El estudio se realizará posterior a la autorización por parte del comité de ética e investigación, ingresando los casos acordes a los criterios de inclusión y realizando un seguimiento prospectivo hasta la última fecha de seguimiento o muerte del caso
Maniobra	Experimental	Aleatorización 2:1 a favor del grupo control sin quimioterapia con la finalidad de identificar el poder del efecto de la adición de clorhidrato de Metformina sobre el tratamiento El método de aleatorización se realizará mediante bloques.
Temporalidad	Longitudinal	Se realizarán múltiples mediciones para poder analizar la supervivencia de los casos a través del tiempo, la identificación del nivel de expresión de los genes se realizará al momento del diagnóstico
Finalidad	Descriptivo	Se describirán los datos para identificar la supervivencia del grupo de pacientes que recibieron Clorhidrato de Metformina en conjunto con quimioterapia versus aquellos que recibieron solamente Metformina.

Cálculo de tamaño de la muestra

Se realizó un cálculo de tamaño de la muestra acorde al Programa G-Power basándose en el artículo de referencia: Effect of metformin addition to an acute lymphoblastic leukemia chemotherapy treatment publicado en la Revista Mexicana del Seguro Social (147). El cálculo de la proporción de cada uno de los brazos se basó en el porcentaje de recaídas entre el grupo de quimioterapia (47.9%) y el grupo que se le adicióno Metformina al tratamiento (25%).



Diferencia entre dos proporciones independientes

Análisis inicial	Proporción p2	0.47
	Proporción p1	0.25
	Error α	0.05
	Poder del efecto (1 - β)	0.8
	Relación entre los grupos N2/N1	3.65
Resultados	Z crítica	1.6448
	Grupo 1	37
	Grupo 2	137
	Tamaño de la muestra total	174
	Poder estimado	0.7986

Tratamiento clínico

Todos los pacientes se les inicio el protocolo Institucional HGMLAL07, basado en un esquema de quimioterapia el cual cuenta con una etapa de inducción de la remisión, seguido de una etapa de consolidación y finalizando en una etapa de mantenimiento. El protocolo de tratamiento de describe a continuación (148).

Protocolo Institucional para el tratamiento de la leucemia linfoide del adulto

	Dosis (m ² /SC)	Ruta	Días de administración
Inducción a la remisión (Fase I)			
Daunorrubicina	60mg	IV	+1, +8, +15
Vincristina	1.5mg	IV	+1, +8, +15
Prednisona	60mg	VO	+1 al +28
Inducción a la remisión (Fase II)			
Ciclofosfamida	650mg	IV	+1, +8
Citarabina	65mg	IV	1-4, 8-11
6 -mercaptopurina	50mg	VO	+1 - +15
Consolidación I			
Metotrexato	1.5gramos	IV	+1, +15, +45
Intensificación			
Doxorrubicina	30mg	IV	+1, +8, +15
Vincristina	1.5mg	IV	+1, +8, +15, +22
Prednisona	60mg	VO	+1 al +28
Consolidación II			
Etopósido	100mg	IV	+1 al +15, +28 al 32
Citarabina	75mg	IV	+1 al +15, +28 al 32
Mantenimiento (2 años)			
6-mercaptopurina	50mg	VO	Diariamente
Metotrexato	30mg	IM	Una vez por semana

SC: Superficie corporal, IM: intramuscular, IV: Intravenosa, VO: Vía oral. Al final de cada bloque de tratamiento se administra quimioterapia intratecal con Metotrexato 15mg Intratecal, durante el mantenimiento la quimioterapia intratecal se administra bimensual

Metodología Experimental

Toma de muestras.

Para la extracción de RNA, se realizará la toma de muestra de sangre periférica 2 tubos de EDTA, la toma se realizará tanto previo al pretratamiento con esteroides como al final de pretratamiento. La firma del consentimiento informado el cual autoriza el uso del material genético del paciente con la finalidad de analizar genes de resistencia a drogas, se realizará previo al inicio del pretratamiento con esteroide.

Ensayo celular

Línea Celular (control positivo)

Se llevará a cabo el cultivo de la línea celular K562 en medio RPMI1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY), L-glutamina 2mM, piruvato de sodio 1mM (Hyclone Laboratorios, Logan, UT), penicilina/estreptomina 1% y 2mercaptoetanol 50uM (Gibco BRL, Grand Island, NY). Estas células se utilizarán como controles durante los análisis de expresión de los genes ABC-B1 y ABC-G2.

Separación de mononucleares por Ficoll-Hypaque

Se analizarán muestras de médula ósea de pacientes quienes morfológicamente resultaron con diagnóstico de leucemia Linfoblástica aguda, usando una jeringa previamente heparinizada para evitar la coagulación de la sangre. Las muestras se mezclarán en una proporción 1:1 suavemente con solución de fosfatos PBS 1X o bien con solución salina 0.14 M de NaCl (0.9%). Una vez homogenizadas las muestras se empleará Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nycomed Pharma AS, densidad 1.077 g/l) utilizando aproximadamente 1/3 del volumen total de sangre. Los gradientes se centrifugarán a 1500 rpm por 30 minutos a una temperatura de 18 a 20°C. Al término del tiempo se separará la interfase de mononucleares con pipeta Pasteur y se transferirá a tubos limpios. Los mononucleares se deberán lavar con PBS 1X y se centrifugarán a 2500rpm durante 10 minutos. Al término del tiempo se decantará el sobrenadante y los mononucleares se suspenderán en PBS 1X y posteriormente se almacenarán a -70°C hasta su uso.

Aislamiento del RNAm y transcripción Reversa (RT).

Se realizará de las muestras crio preservadas a partir de 2 µg de RNA total. El volumen final de cDNA será de 20 µl. El RNA se va a mezclar con 1 µl oligo dT 12-18 (INVITROGEN, Carlsbad, CA) y 1 µl de dNTPs 10mM (Applied Biosystems, Roche) la mezcla se incubará a 65°C por 5 minutos y posteriormente se colocará en hielo. Se adicionará 4 µl de Buffer 5X (Tris- HCl 250mM, KCl 375 mM MgCl₂ 15mM), 2 µl de DTT (0.1M) y el volumen correspondiente de H₂O y la mezcla se incubará a 37°C por 2 minutos, posteriormente se adiciona 1 µl de M-MLV RT (200u) (INVITROGEN, Carlsbad, CA) y se incubará a 37°C por 50 minutos, la enzima se inactivará incubando a 70°C por 15 minutos. El cDNA se almacenará a menos veinte grados hasta su uso.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de los genes ABC se realizará con los primers previamente reportados (90) con un volumen final de 10 µL en una mezcla que debe tener 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 100 µM dNTPs, 0.2U Taq DNA polimerasa, (INVITROGEN, Carlsbad, CA) 0.5 µM primer sentido, 0.5 µM primer antisentido, y 1 µL de cDNA. En la siguiente tabla se detalla el gen, la secuencia de los primers (oligonucleótidos), los exones y las condiciones T_m de cada gen:

Genes detectados por PCR

GEN	SECUENCIA	AMPLICON	UNION	TM
GAPDH	5'-CGGGAGCTTGTCATCAATGG-3' 3'-GCAGTACCCACACTTGGTAC-5'	221pb	Exón 5 Exón 6	60°C
ABC-B1	5'-GCTCCTGACTCTGCCAAAGC-3' 3'-TCTTACCTCCAGGCTCAGT-5'	202pb	Exón 24 Exón 25	60°C
ABC-G2	5'-CACCTTATTGGCCTCAGGAA-3' 3'-CCTGCTTGAAGGCTCTATG-5'	206pb	Exón 7 Exón 9	60°C

Los perfiles térmicos que se llevarán a cabo son: 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 serán visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Se colocará 10 µl del producto y 2 µl 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 se observará en transiluminador UV (High Performance, UV Transilluminator UVP).

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Para la cuantificación de los genes ABC, se utilizará el cDNA a una concentración de 2 µg/µl, 10 µl de SYBR Green PCR Máster Mix, (Applied Biosystems, Life Technologies) 0.2 µl de primer forward (10 pM/µL) y 0.2 µl primer reverse (10 pM/µL) en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de amplificación son las utilizadas en PCR en punto final. Las muestras se realizarán por triplicado. Se realizará la cuantificación relativa por medio de $\Delta\Delta C_t$ en el equipo StepOne™, (Applied Biosystems® Life Technologies).

Secuenciación de los fragmentos amplificados de los genes ABC-B1 y G2

Algunos de los fragmentos amplificados por RT PCR serán secuenciados con el kit de secuencia (ABI Prism Dye Terminator Cycle sequencing). La secuencia será alineada en el programa BLAST del Gene-Bank para corroborar que el fragmento amplificado corresponda a los genes ABC B1 y G2.

Análisis estadístico.

Se utilizará el Software estadístico SPSS versión 20.0. Inicialmente se realizará estadística descriptiva para la identificación de las proporciones de las diferentes características de la población descrito mediante porcentaje (%). Se analizará la distribución tanto del género como la media de la edad y la cuenta de leucocitos entre los dos grupos. Se utilizará una prueba T student para la diferencia de medias de las variables cualitativas entre los dos grupos para identificar la homogeneidad entre los dos grupos.

Prueba de contraste de hipótesis

<p>Ji-cuadrado</p> $\chi^2 = \sum \frac{(fo - fe)^2}{fe}$	<p>Se utilizará la prueba de Ji-cuadrada para la prueba de contraste de hipótesis entre las variables cualitativas dicotómicas sobre la muerte y la refractariedad. Las variables analizadas son</p> <ul style="list-style-type: none"> • Edad (35 años como límite) • Leucocitos (cifra límite de riesgo 30 x 10³/mcl) • Tipo de riesgo (Riesgo Alto vs Habitual) • Nivel de Expresión del Gen (Sobre expresión vs expresión baja)
<p>Supervivencia</p> $\frac{(O_2 - E_2)^2}{Var(O_2 - E_2)} \sim \chi_1^2$	<p>Para el análisis de supervivencia se utilizará el método Kaplan-Meier, para identificar la supervivencia global, la supervivencia entre cada uno de los grupos y acorde al nivel de expresión del gen ABCB1</p> <ul style="list-style-type: none"> • Supervivencia global • Supervivencia acorde al tipo de tratamiento • Supervivencia acorde al nivel de expresión del gen ABCB1 <p>La diferencia entre los dos grupos se estimó mediante el test de log Rank</p>
$\lambda(t, \underline{x}_i) = \lambda_0(t) e^{\beta' \underline{x}_i}$	<p>Para evaluar la asociación de las diferentes variables sobre el pronóstico se realizó un análisis multivariado mediante el análisis de regresión de Cox</p>

Consideraciones éticas.

Todos los pacientes contaron con consentimiento informado de la institución previo al inicio del estudio. El número de registro dentro de la Institución es D1/15/103/03/57. El registro establecido en Clinical Trials es NCT03118128.

NIH U.S. National Library of Medicine
ClinicalTrials.gov

Find Studies ▾ About Studies ▾ Submit Studies ▾ Resources ▾ About Site ▾

Home > Search Results > Study Record Detail Save this study

Trial record **1 of 5** for: metformin | Lymphoblastic Leukemia

[Previous Study](#) | [Return to List](#) | [Next Study](#)

Metformin Reduce the Relapse Rate on Patients With B-cell Precursor (Ph+ Negative) Acute Lymphoblastic Leukemia

The safety and scientific validity of this study is the responsibility of the study sponsor and investigators. Listing a study does not mean it has been evaluated by the U.S. Federal Government. Read our [disclaimer](#) for details.

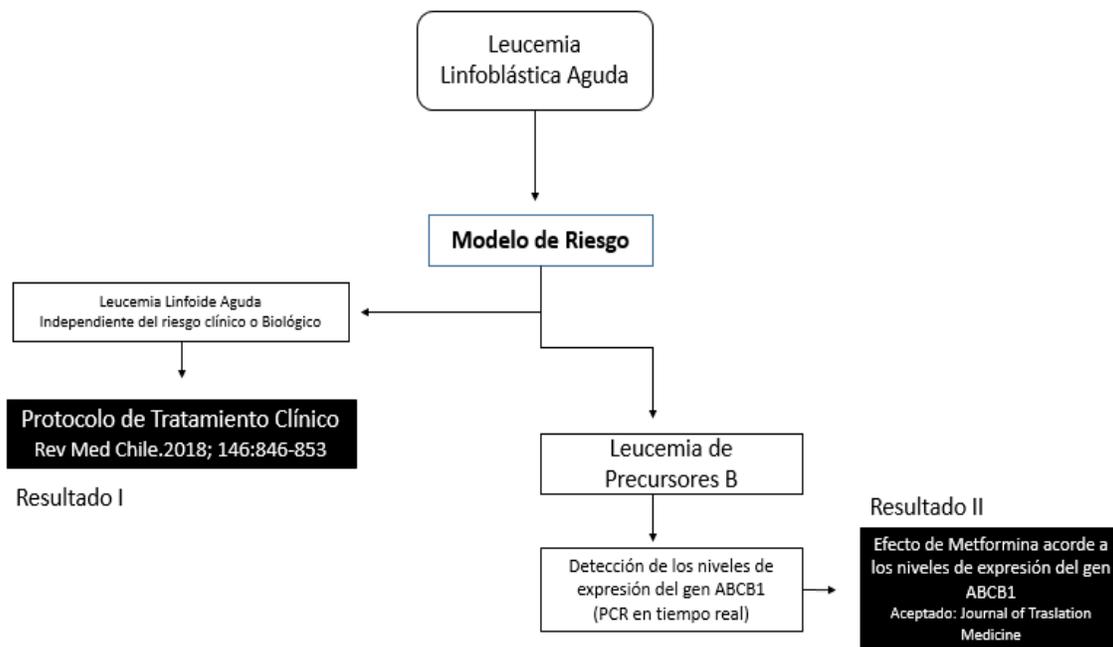
ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03118128

Recruitment Status: Completed
First Posted: April 18, 2017
Last Update Posted: July 6, 2017

Sponsor:
Hospital General de Mexico

Information provided by (Responsible Party):
Christian Ramos Penafiel, Hospital General de Mexico

III. RESULTADOS



¹Servicio de Hematología,
Hospital General de México
"Dr. Eduardo Liceaga" Ciudad de
México, México.

²Laboratorio de Biología
Molecular, Servicio de
Hematología, Hospital General de
México, "Dr. Eduardo Liceaga"
Ciudad de México, México.

³Laboratorio de Inmunogenómica
y Enfermedades Metabólicas,
Instituto Nacional de Medicina
Genómica, Secretaría de Salud,
Ciudad de México, México.

Fuente de Apoyo: Proyecto
apoyado por la Dirección de
Investigación Hospital General
México HGM/DI/08/204/04/17,
D1/15/103/03/57.

Recibido el 29 de agosto de
2017, aceptado el 5 de julio de
2018.

Correspondencia a:
Adolfo Martínez Tovar
Laboratorio de Biología Molecular
del Servicio de Hematología,
Hospital General de México
"Dr. Eduardo Liceaga" Ciudad de
México, 06726, México.
mtadolfo73@hotmail.com

Efecto de la metformina en la etapa de inducción en pacientes con leucemia aguda linfoblástica y su impacto clínico en la supervivencia

CHRISTIAN RAMOS PEÑAFIEL¹, IRMA OLARTE CARRILLO²,
RAFAEL CERON MALDONADO², ENRIQUE MIRANDA PERALTA²,
ETTA ROZEN FULLER¹, JUAN JULIO KASSACK IPIÑA¹,
FEDERICO CENTENO CRUZ¹, JUAN COLLAZO JALOMA¹,
ADOLFO MARTÍNEZ TOVAR²

Effect of metformin added to chemotherapy on the survival of patients with acute lymphoblastic leukemia

Background: Metformin has antineoplastic and cancer protective effects *in vitro*, sensitizing leukemia cells to chemotherapeutic agents, inducing apoptosis and cell cycle arrest. **Aim:** To assess the effect of metformin on the induction stage in patients with ALL and its impact on overall survival and relapse. **Material and Methods.** We included 123 patients treated with metformin and without metformin. The dose used was 850 mg PO at 8 h intervals. The survival analysis was used by Kaplan-Meier method, the difference between the distinct groups was performed using the log Rank test. **Results.** The overall survival at a median follow up of 700 days of follow-up was 43%, with a disease-free survival of 47%. Regarding the treatment groups, patients with metformin had a lower rate of relapse compared to the group receiving only chemotherapy (6.5% vs 17.1%, $p = 0.006$). **Conclusions.** The addition of metformin to the conventional treatment of ALL was associated with an improvement in survival, this association being independent of the type of biological risk at diagnosis.

(Rev Med Chile 2018; 146: 846-853)

Key words: Metformin; Precursor Cell Lymphoblastic Leukemia-Lymphoma; Therapeutics.

Descripción General de la población analizada en el estudio clínico.

Resultados del estudio Clínico

Se estudiaron un total de 123 pacientes con el diagnóstico de LLA de *novo* atendidos en el Departamento de Hematología del Hospital General de México, en la Ciudad de México. El diagnóstico se confirmó mediante citometría de flujo, excluyendo aquellos casos con estirpe T o la expresión de algún marcador mielóide (LLA My+). La media de edad fue de 33 años (17-79), sin mostrarse diferencias entre los dos grupos ($p= 0.702, 95\%$ IC). Al estratificar en cuanto a la edad, solo un 39% ($n=48$) correspondió al grupo de mayores de 30 años, sin mostrarse diferencias en la distribución acorde al tipo de tratamiento. En cuanto a la cuenta de leucocitos (media de 41.2, rango: 0.2- 443) un 33% ($n=41$) se consideró como de riesgo alto debido a una cuenta mayor de $30 \times 10^3/\text{mcl}$. A pesar de no existir una diferencia significativa en cuanto a la cuenta de leucocitos entre los grupos (36.3vs $46.1 \times 10^3/\text{mcl}$), el brazo de Metformina contó con un mayor número de pacientes que iniciaron su tratamiento con conteos superiores a $30 \times 10^3/\text{mcl}$ [25 (41%) vs 16 (25.8%)]. Tampoco se registraron diferencias entre el valor de hemoglobina, al igual que en el conteo de plaquetas. Al combinar las variables de riesgo, un 61.8% de los pacientes fueron considerados como riesgo elevado de recaída ($n=76$). De estos, la mayoría se encontraron el brazo con Metformina [41 (67.2%) vs 35 (46.1%)]. Todos los pacientes estudiados contaron con fenotipo B y sin infiltración a sistema nervioso central al diagnóstico. Se excluyeron también a pacientes que pudieran contar con situaciones de riesgo para desarrollar complicaciones metabólicas, como síndrome de lisis tumoral, fracaso renal agudo o falla hepática aguda, Tabla 2.

Tabla 2.0 Parámetros clínicos de los pacientes con LLA tratados con y sin Metformina

Parámetros clínicos de los pacientes con LLA tratados con y sin Metformina				
	Total n= 123	Sin Metformina n= 62	Con Metformina n= 61	Valor de p
Genero (%)				
Masculino (%)	71 (57.7)	37 (52.1)	34(47.9)	
Femenino (%)	52 (42.3)	25 (48.1)	27 (51.9)	
Edad (años)	33 (17-79)	34 (17-68)	33 (17-79)	0.702
Edad < 30 años (%)	75 (61)	37 (59.7)	38 (62.3)	
Edad > 30 años (%)	48 (39)	25 (40.3)	23 (37.7)	
Cuenta de leucocitos (x 103/mcl)	41.2 (0.2 -443)	36.3 (0.2-443)	46.1 (1-300)	0.440
< 30 x 103/mcl	82 (66.7)	46 (74.2)	36 (59)	
>30 x 103/mcl	41 (33.3)	16 (25.8)	25 (41)	
Hemoglobina (g/dl)	11.6 (1.7-14.5)	8.3 (2.3-14.1)	8.2 (1.7-14.5)	0.764
Plaquetas (x 103/mcl)	40.1 (2-241)	35.6 (3 -195)	44.6 (2 -241)	0.263
Tipo de Riesgo				
Riesgo Alto	76 (61.8)	35 (46.1)	41 (67.2)	
Riesgo Habitual	47 (38.2)	27 (43.5)	20 (32.8)	
Respuesta al Tratamiento				
Remisión Completa (%)	89 (72.4)	41 (66.1)	48 (78.7)	
Muerte en Inducción (%)	13 (10.6)	07 (11.3)	06 (9.8)	
Refractariedad (%)	21 (17.0)	14 (22.6)	07 (11.5)	
Respuesta General en Inducción				
Respuesta	86 (71.7)	40 (65.6)	46 (78)	
Falla terapéutica a las 4 sem	34 (28.3)	21 (34.4)	13 (22)	
Recaídas	29 (23.6)	21 (17.1)	08 (6.5)	
Recaída Temprana	17 (13.8)	14 (22.6)	03 (4.9)	
Recaída Tardía	12 (09.8)	07 (11.3)	05 (8.2)	
Remisión Completa	94 (76.4)	41 (66.1)	53 (86.9)	

Resultados del Tratamiento

Los 123 pacientes iniciaron inducción a la remisión, 61 recibieron en conjunto con su esquema de quimioterapia con Metformina (850mg PO cada 8hrs), la evaluación de la respuesta se realizó en el día +28 de tratamiento considerándose RC si contaba con menos de 5% de blastos en médula ósea y recuperación de los valores de plaquetas y hemoglobina. En caso de contar solo con la ausencia de blastos, pero sin recuperación de los valores de neutrófilos y plaquetas, se consideró como una Respuesta Parcial (RP). Posterior a las 4 semanas de tratamiento, el 72.4 % (n=89) integraron RC, un 10.6% (n=13) fallecieron durante la etapa de inducción y

un 17% (n=21) se consideraron como leucemias refractarias. El porcentaje de fallas terapéuticas a las 4 semanas fue de 28.3 % (n=34), siendo mayor en el grupo de quimioterapia en comparación con el grupo al que se le adicionó MET (34.4% vs 22%). La principal causa de muerte fue secundaria a procesos infecciosos durante el periodo de neutropenia, reportándose solo dos casos de hemorragia en sistema nervioso central. En el grupo de Metformina, la mayor parte de los eventos adversos fueron grado I/II, siendo las alteraciones gastrointestinales (nausea, diarrea) las principales. En 20% de los casos se registró elevación transitoria de las enzimas hepáticas, pero no rebasando 2 veces el valor límite. No se registró ningún caso de acidosis láctica asociada a Metformina.

Supervivencia Global y Recaída

La media de seguimiento fue de 469 días (periodo máximo de 778 días), la supervivencia global a 700 días de seguimiento fue del 43%, con una supervivencia libre de enfermedad del 47%. Durante la inducción a la remisión la mayoría de las muertes ocurrieron en las primeras dos semanas, pero durante el seguimiento estas fueron asociadas principalmente a las recaídas. Durante el seguimiento, la frecuencia de recaídas fue de un 26.3% (n=29), siendo en su mayoría tempranas (n=17,13.8%). En cuanto a los grupos de tratamiento, los pacientes que se encontraban bajo tratamiento con Metformina registraron una tasa menor de recaídas en comparación con el grupo que recibió solamente quimioterapia (6.5% vs 17.1%, $p=0.006$). Semejante a esto, la supervivencia global también fue mayor en los pacientes que recibieron tratamiento con Metformina ($p=0.009$, 95% IC).

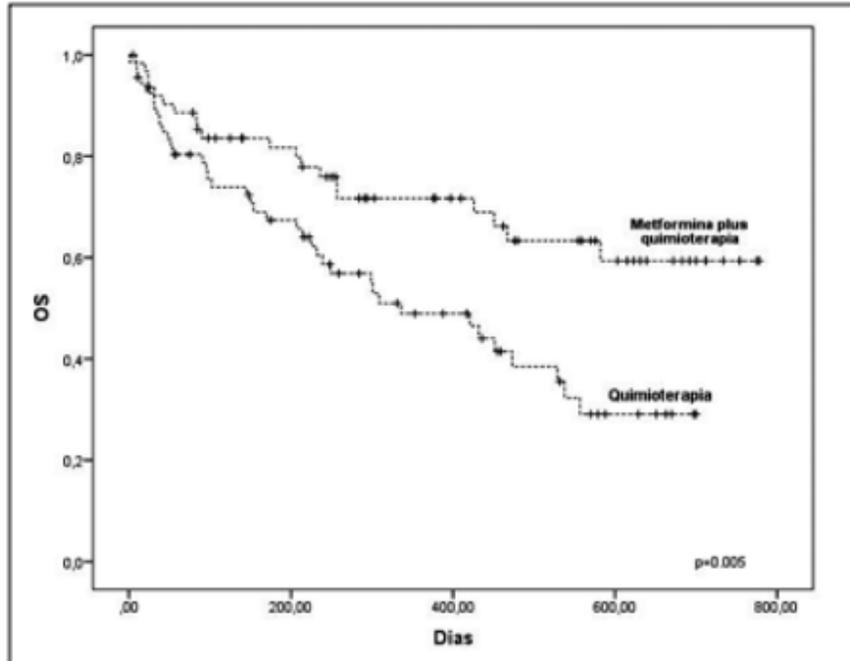


Figura 6.0 Supervivencia global acorde a la adición de Metformina al tratamiento de quimioterapia

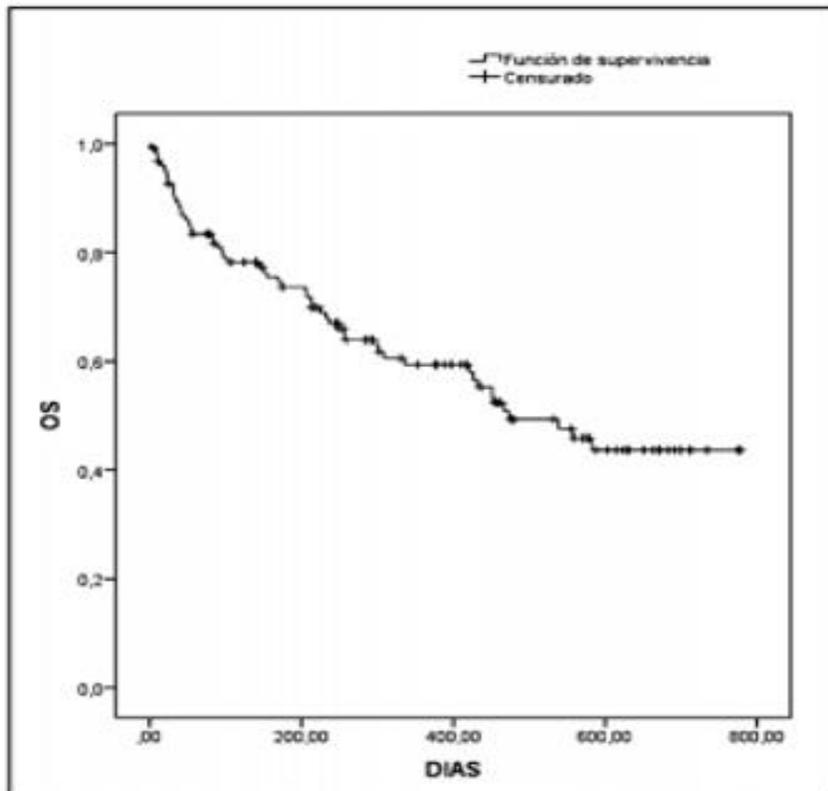


Figura 7.0 Supervivencia global de los pacientes

Factores pronósticos asociados.

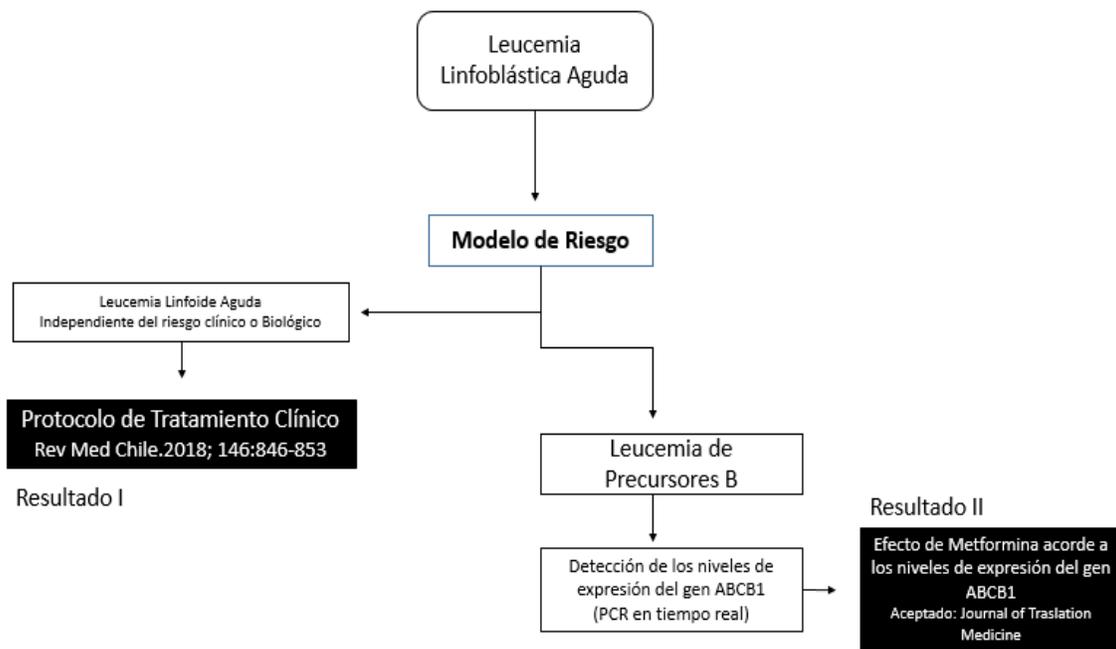
Tanto la edad como la cifra de leucocitos al diagnóstico son los principales factores pronósticos clínicos. Estos al combinarse permiten identificar a los casos con un riesgo elevado de recaída. Al analizar los diferentes factores, aquellos pacientes los cuales solo recibieron quimioterapia mostraron un mayor riesgo de recaída en comparación con los que

En cuanto al tipo de tratamiento aquellos pacientes a los que solo se les administro únicamente quimioterapia mostraron un mayor riesgo de recaída (RR: 2.582 (1.240-5.378), $p=0.006$) en comparación con aquellos que recibieron en conjunto Metformina (RR: 0.387 (0.185-0.806), 95% IC). La asociación de los diferentes factores de riesgo sobre la refractariedad o las recaídas se describe en la Tabla

Tabla 3. Estimación de riesgo de las diferentes variables de estudio

Variable de estudio	Falla Terapéutica			Recaída		
	RR (95%IC)	Rango	Valor de p	RR (95% IC)	Rango	Valor de p
Edad > 35 años	1.553	0.884-2.728	0.094	0.822	0.418- 1.614	0.569
Leucocitos > 30 x 10 ³ /mcl	1.090	0.603-1.972	0.467	0.761	0.369-1.569	0.303
Riesgo Alto	1.299	0.701-2.409	0.263	0.876	0.460- 1.667	0.424
Género Masculino	0.831	0.471-1.467	0.332	1.198	0.619- 2.317	0.374
Metformina	0.640	0.351-1.156	0.096	0.387	0.185-0.806	0.006*
Quimioterapia sola	1.562	0.864-2.824	0.096	2.582	1.240-5.378	0.006

III. RESULTADOS



RESEARCH

Open Access



Effect of metformin on the survival of patients with ALL who express high levels of the ABCB1 drug resistance gene

Christian Ramos-Peñafiel¹, Irma Olarte-Carrillo², Rafael Cerón-Maldonado², Etta Rozen-Fuller³, Juan Julio Kassack-Ipiña¹, Guillermo Meléndez-Mier³, Juan Collazo-Jaloma¹ and Adolfo Martínez-Tovar^{1,2*}

Abstract

Background: In acute lymphoblastic leukemia (ALL), high ABCB1 gene expression has been associated with treatment resistance, which affects patient prognosis. Many preclinical reports and retrospective population studies have shown an anti-cancer effect of metformin. Therefore, the objective of this study was to assess the effect of metformin on the treatment regimen in patients with ALL who exhibited high levels of ABCB1 gene expression and to determine its impact on overall survival.

Methods: A total of 102 patients with ALL were recruited; one group (n = 26) received metformin, and the other received chemotherapy (n = 76). Measurement of ABCB1 transcript expression was performed using qRT-PCR prior to treatment initiation. Survival analysis was performed using Kaplan-Meier curves. The impact of both the type of treatment and the level of expression on the response (remission or relapse) was analyzed by calculating the odds ratio.

Results: The survival of patients with high ABCB1 expression was lower than those with low or absent ABCB1 gene expression (p = 0.030). In the individual analysis, we identified a benefit to adding metformin in the group of patients with high ABCB1 gene expression (p = 0.025). In the metformin user group, the drug acted as a protective factor against both therapeutic failure (odds ratio [OR] 0.07, 95% confidence interval [CI] 0.0037–1.53) and early relapse (OR 0.05, 95% CI 0.0028–1.153).

Conclusion: The combined use of metformin with chemotherapy is effective in patients with elevated levels of ABCB1 gene expression. *Trial registration* NCT 03118128: NCT

Keywords: ATP binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1), Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), Acute lymphoblastic leukemia (ALL)

Resultados del Estudio Básico

Diseño del estudio

Estudio clínico prospectivo con pacientes adultos de LLA diagnosticados acorde a la clasificación Franco-Américo-británica y confirmada mediante citometría de flujo. Después del consentimiento informado, se incluyeron en el estudio 102 pacientes; 26 pacientes recibieron Metformina (Metformin User) en la etapa de pre-inducción a dosis de 850mg PO cada 8hrs en conjunto con quimioterapia (LALHGM07) y 76 pacientes exclusivamente quimioterapia.

Todos los pacientes presentaron un fenotipo de Leucemia B, se excluyeron aquellos casos con expresión del cromosoma Philadelphia o con alguna alteración citogenética de mal pronóstico. Los niveles de expresión del gen ABCB1 se midieron previos al inicio del tratamiento. Este ensayo clínico fue aprobado por los comités de Ética, Investigación y de Bioseguridad del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" D1/15/103/03/57. El estudio se apegó a los principios de la reciente revisión de Helsinki. Conto con la firma previo consentimiento informado de los participantes.

Características clínicas de los pacientes

De los 102 pacientes reclutados en el estudio, la media para el grupo de los pacientes con Metformina fue de 31 años (rango de 18-61). La media de leucocitos fue de $93 \times 10^3/\text{mcl}$ (rango de $1.2-870 \times 10^3/\text{mcl}$). En cuanto al grupo de pacientes que recibieron solamente quimioterapia, la edad media fue similar de 35 años (rango de 18-78) en su mayoría mujeres 52.6% (n=40) y con un menor número en la media de leucocitos $45.1 \times 10^3/\text{mcl}$ (rango $0.4-251 \times 10^3/\text{mcl}$). En cuanto al tipo de riesgo los pacientes con Metformina presentaban en su mayoría riesgo habitual 69.2% (n=18) en comparación con los que no recibieron Metformina, 43%(n=33) y del 30.8%(n=08) vs 56.6% (n=43) con riesgo altos respectivamente. Tabla

Tabla 4. Características de los pacientes acorde al grupo de tratamiento (Metformina vs Quimioterapia) y la frecuencia de expresión del Gen ABCB1

Características Generales		
	Solo quimioterapia n = 76 (75%)	Quimioterapia plus Metformina n= 26 (25%)
Edad (rango)	35 (18-78)	31 (18-61)
Género		
Masculino	36 (47.4)	13 (50)
Femenino	40 (52.6)	13 (50)
Leucocitos (x 103/mcl)	45.1 (0.4-251)	93 (1.2-870)
Tipo de Riesgo		
Riesgo Habitual	33 (43.4)	18 (69.2)
Riesgo Elevado	43 (56.6)	08 (30.8)
Expresión del Gen ABCB1 (%)		
Ausencia de Expresión	28 (36.8)	8 (30.8)
Expresión Baja	14 (18.4)	6 (23.1)
Expresión elevada	34 (44.7)	12(46.2)
Combinación de la expresión (%)		
Expresión baja y ausente	42 (55.3)	14 (53.8)
Expresión elevada	34 (44.7)	12 (46.2)
Falla de Tratamiento		
Remisiones Completas	47 (61.8)	18 (69.2)
Muerte por Refractoriedad	29 (38.2)	08 (30.8)

Respuesta al Tratamiento

La respuesta al tratamiento se evaluó en el día +28 mediante la toma de médula ósea; considerándose favorable (*Remisión completa*) si contaba con menos de 5% de blastos al final de la terapia de inducción y permanecía con actividad leucémica se consideraba como *Refractario* y si fallecía durante la terapia se consideraba como *falla terapéutica*. A los pacientes que integraron remisión completa y que durante el tratamiento presentaran en cualquier momento un incremento en el número de blastos (>5%) se consideraron en Recaída. La etapa de consolidación consistió en la administración de bloques secuenciales de quimioterapia en donde se incluía la administración de dosis altas de Metotrexato. Al término los pacientes iniciaron la etapa de mantenimiento mediante la administración Mercaptopurina y Metotrexato semanal por una duración de 2 años. En caso de presentar una recaída a medula ósea los pacientes recibieron una terapia de rescate.

Resultados Acorde a la expresión del Gen ABCB1

Se analizaron los niveles de expresión del gen ABCB1 en los 102 pacientes previo al tratamiento, los resultados demostraron un patrón de expresión alta del 45% (n=46), baja del 19.2% (n=20) o ausente del 35% (n=36). Al analizar solo el porcentaje de pacientes con niveles altos de expresión en los dos grupos, con MET, en la etapa de pre-inducción o solo quimioterapia, los resultados fueron muy semejantes en cuanto a los porcentajes (46.2% vs 44.7% respectivamente).

De los 102 casos analizados, el 43.2% (n=44) falleció durante el seguimiento. Al analizar la supervivencia acorde a los subgrupos de expresión del transportador ABCB1 (baja, alta o ausente), aquellos pacientes los cuales expresaron un nivel alto del transcrito ABCB1, mostraron una menor supervivencia en comparación con aquellos que contaban con niveles bajos o ausentes del gen ABCB1 ($p=0.030$, 95%IC).

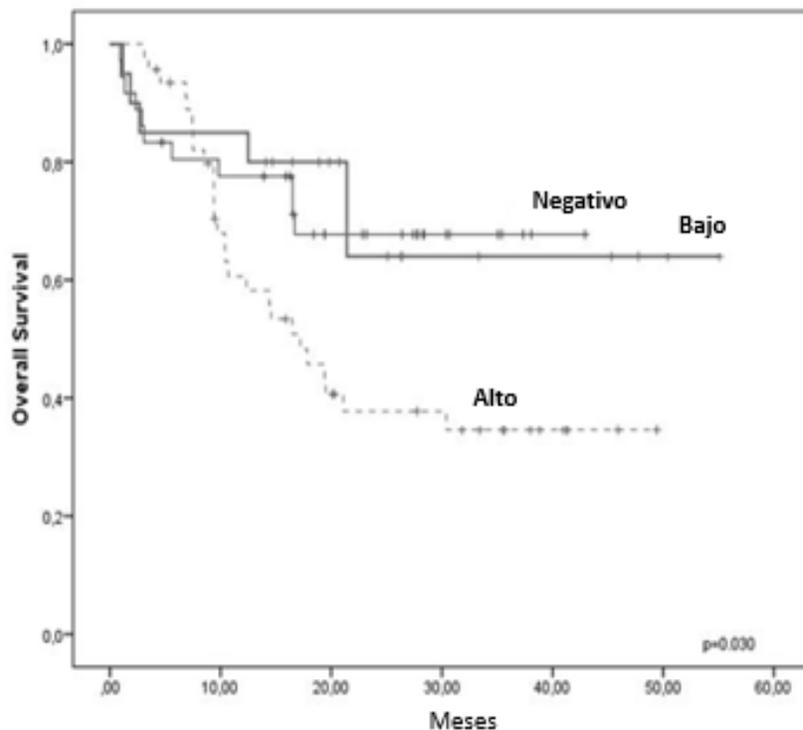


Figura 8.0 Supervivencia global en pacientes con LLA acorde al nivel de expresión del gen ABCB1

Al analizar la supervivencia global en cuanto a los dos grupos, con o sin la adición de Metformina en la etapa de pre-inducción, no se encontró diferencias significativas entre los dos grupos ($p=0.251$, 95% IC). Pero al analizar los subgrupos acordes a los niveles de expresión, aquellos que mostraron niveles elevados de ABCB1 presentaban un beneficio protector en cuanto a la supervivencia al adicionarse Metformina al tratamiento ($p=0.025$, 95%IC), disminuyendo el riesgo de falla terapéutica (RR 0.23, 0.09-0.58) (Figura 9 y Figura 10).

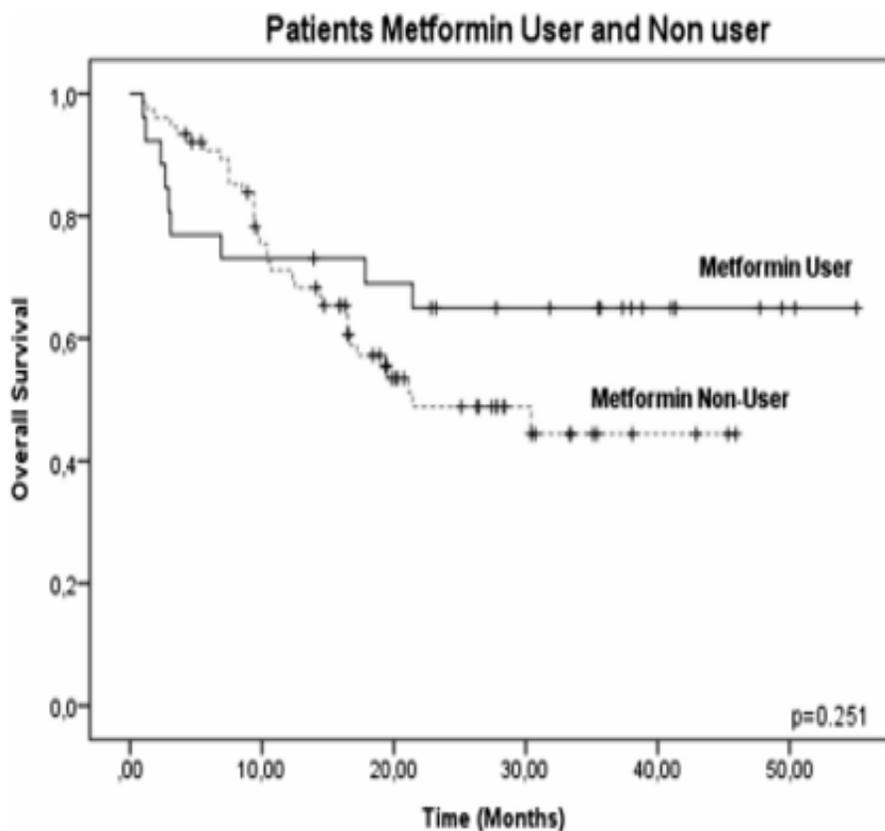


Figura 9.0 Supervivencia global acorde a la adición de Metformina (*Metformin user*), en comparación con aquellos que recibieron solamente quimioterapia, su adición no demostró una diferencia significativa en la supervivencia ($p=0.251$)

Para evaluar la falla al tratamiento se consideró si los pacientes no respondían a las 4 semanas de inicio del tratamiento o si fallecía durante la inducción a la remisión. La tasa de remisiones completas fue ligeramente mayor en el grupo de Metformina (69.2 vs 61.8%) pero sin diferencia estadística ($p=0.333$, 95% IC). Al analizar la respuesta a las 4 semanas de tratamiento acorde a los niveles de expresión, aquellos los cuales expresaron los niveles más elevados de ABCB1 fueron los que mostraron una mayor frecuencia de falla terapéutica (43.2%, $n= 16$).

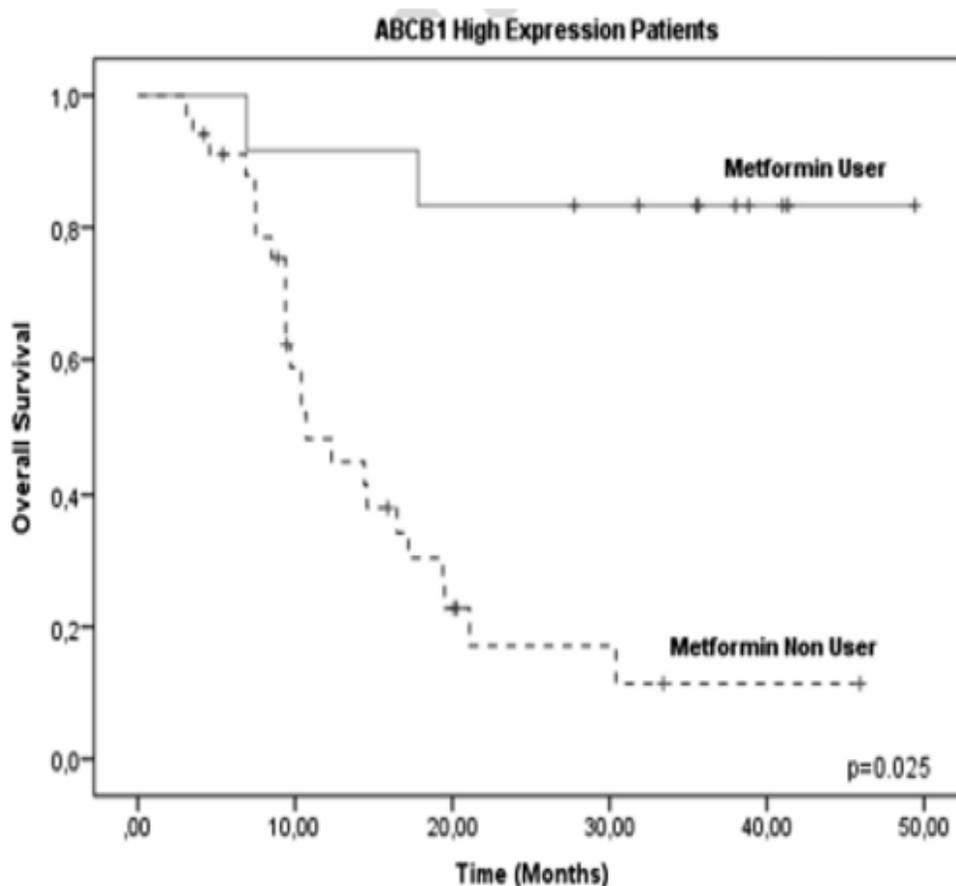


Figura 10.0 Supervivencia global acorde a la adición de Metformina (*Metformin user*), en pacientes que muestran una sobre expresión del gen de resistencia ABCB1, su adición mejoró significativamente el pronóstico adverso de estos pacientes ($p=0.025$)

Al analizar por grupos de tratamiento y a diferencia del grupo de quimioterapia, aquellos pacientes que sobre expresaron el gen ABCB1 y se encontraban bajo tratamiento con Met (n= 2 /12, 16.7%) mostraron una menor tasa de falla terapéutica en comparación con el grupo que solamente contaba con quimioterapia (14/34, 48.3%). Al evaluar el efecto de Met sobre las 4 semanas de tratamiento este se comportó como un factor protector de falla terapéutica (OR 0.7203, 0.2778-1.8677, 95% IC). Al evaluar el tipo de riesgo, aquellos pacientes con expresión elevada de ABCB1 son los que contaron con un mayor riesgo de falla terapéutica (OR 7.48 [0.3638- 153.79]) en comparación con otras variables clínicas como la edad mayor de 35 años (OR 2.25 [0.3044- 16.632]) y la cuenta de leucocitos (OR 6.00 [0.5626- 63.987]).

En cuanto a la refractariedad, la sobreexpresión de ABCB1 también se asoció con un mayor riesgo de recaída (OR 2,92 [0.2808 – 30.299]. Al analizar el uso de Metformina, esta se comportó como un factor protector tanto para la falla terapéutica como para la recaída temprana (OR 0.07 [0.0037- 1.538 y 0.05 [0.0028- 1.153] respectivamente].

Tabla 5.0 Modelo de riesgo de Falla o Recaída acorde al nivel de expresión

Variable	Odds Ratio					
	Refractariedad			Recaída		
	OR	Rango	Valor de p	OR	Rango	Valor de p
Edad>35 años	2.25	0.3044-16.632	0.426	3.42	0.4944-23.775	0.214
Leucocitos s>30x 10 ³ /mcl	6.00	0.5626-63.987	0.137	8.57	0.8251-89.043	0.072
Metformina	0.07	0.0037-1.538	0.091	0.05	0.0028-1.153	0.061
Expresión del gen ABCB1 Negativa o Alta	7.48	0.3638- 153.79	0.192	2.91	0.2808-30.299	0.896

PARTE IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES



4.0 Discusión y conclusiones

Actualmente el tratamiento del cáncer tiene un enfoque más personalizado que permite la combinación tanto de quimioterapia como de diferentes blancos moleculares. A pesar de estos avances la estructura principal del tratamiento continúa siendo la quimioterapia ya que solo pocos casos muestran un beneficio al adicionar alguna estrategia novedosa (menos del 25% de los casos expresan BCRABI1 y un 10% expresan CD20 en su superficie celular). Esto obliga a que la quimioterapia sea la estructura principal del tratamiento de los pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda. Debido a esto la resistencia a la quimioterapia es una de las principales causas de falla terapéutica, en Leucemias, la principal resistencia es a fármacos como las antraciclinas o los alcaloides de la vinca, por lo que su detección es de suma importancia para la mejoría del tratamiento. Dentro de las estrategias que se han implementado para la reducción de la resistencia a las quimioterapias se encuentran fármacos como el Verapamilo o la Ciclosporina, pero debido tanto a su toxicidad como a sus interacciones quedaron en desuso desde finales del siglo pasado. Semejante a fármacos como el ácido acetil salicílico uno de los fármacos a los que se les ha descrito efectos pleiotropicos es el clorhidrato de Metformina. La mayor parte de la evidencia clínica es obtenida de estudios observacionales o en pacientes con etapas avanzadas de tratamiento coincidiendo que existe un efecto benéfico de su adición tanto para la prevención de aparición de nuevos cánceres como coadyuvante a las diferentes modalidades de tratamiento. Acorde a esto su capacidad de combinación con diferentes estrategias es muy amplia siendo más relevante en aquellos tumores que sobre expresan la actividad de AMPK/mTOR (hígado, páncreas, colon) o con fármacos implicados en el metabolismo celular y la síntesis de colesterol logrando incluso que nuevas estrategias como la inmunoterapia mejoren su eficacia. Recientemente el uso de Metformina se ha explorado en combinación con otro tipo de drogas denominadas inhibidores de cinasa de tirosina (Imatinib, sorafenib), siendo eficaces para mejorar las respuestas no solo en la Leucemia Mieloide Crónica sino también en la Leucemia Mieloide Aguda, en donde la mutación sobre el receptor FLT3/ITD es de

gran relevancia. Considerando la resistencia mediada por bombas de flujo dependientes de ATP, la depleción energética es una estrategia atractiva para vencer la resistencia a los diferentes fármacos entre los que se incluyen drogas citotóxicas (Daunorrubicina, doxorubicina, Etopósido, Vincristina o Vinblastina, mitoxantrona) o inclusive antibióticos. La mayor parte de los ensayos coincide que la presencia de diversos genes de resistencia a drogas (ABCB1, BRCA) se asocian a una pobre respuesta al tratamiento quimioterápico inicial lo que compromete la respuesta terapéutica obligando a el uso de esquemas en segunda o tercera línea. En nuestro grupo la presencia de una sobreexpresión del gen de resistencia ABCB1 se asoció directamente a una pobre respuesta al tratamiento debido a una mayor posibilidad de recaída a médula ósea. Hasta el momento actual, existen pocos ensayos que expliquen el efecto del clorhidrato de Metformina sobre la expresión de genes de resistencia a drogas, sobre esto, recientemente Wu y colaboradores (145), en un modelo celular de células de hepatocarcinoma (HepG2, HepG2/ADM, LO2) identificaron que la adición de Metformina (1 $\mu\text{mol/L}$ durante 24hrs y posteriormente durante 48hrs con 1.5 $\mu\text{mol/L}$) disminuye la expresión de P-gp170 mediante el bloqueo de la expresión del factor nuclear NF-kB induciendo apoptosis de los hepatocitos. Semejante al modelo de Kim y colaboradores en la línea celular MCF-7/Dox resistente a doxorubicina, Xue y colaboradores lograron demostrar también el efecto sobre la disminución de la resistencia a drogas de la Metformina, pero en asociación con la 2-deoxyglucosa, mediante la disminución de la captación de glucosa, lactato y finalmente la producción de ATP incrementando el efecto tóxico de la Doxorubicina comprometiendo la función del gen supresor de tumor p53. Al ser el clorhidrato de Metformina una droga barata y con un perfil tolerable de seguridad (casos raros de acidosis láctica) puede incluirse para la mayoría de las estrategias terapéuticas del cáncer en países en vías de desarrollo. La evidencia es sólida en ensayos in vitro, pero aún es limitada en la clínica ya que existen escasos ensayos clínicos que destaquen el efecto protector del clorhidrato de Metformina. El objetivo principal de este estudio fue identificar el factor protector el clorhidrato de Metformina en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda no solo en el aspecto general, sino en un subtipo específico de pacientes. En el estudio

inicial, se evaluó el efecto de adicionar la dosis de Clorhidrato de Metformina 850mg PO cada 8hrs al tratamiento convencional de pacientes adultos portadores de Leucemia. Al analizar las respuestas el porcentaje de Remisiones completas fue mayor en el brazo de tratamiento de Metformina (78.7 vs 66.1%), a su vez el porcentaje de recaída también fueron menores lo que incremento la supervivencia global de los pacientes. Como conclusión inicial la adición de Clorhidrato de Metformina mejoro los resultados del esquema convencional de quimioterapia utilizado en nuestra institución, reduciendo significativamente el porcentaje de recaídas tempranas permitiendo un mayor acceso a los pacientes a otras estrategias como lo son el trasplante de progenitores hematopoyéticos. En cuanto a la seguridad, la adición del Clorhidrato de Metformina no mostró un incremento significativo de los eventos adversos asociados a la quimioterapia e inclusive no se identificó algún evento grave como lo es la acidosis láctica, por lo que se concluye que es un fármaco seguro como coadyuvante al tratamiento de quimioterapia. El objetivo principal del segundo estudio fue evaluar el efecto del clorhidrato de Metformina en un genotipo específico de pacientes, los cuales sobre expresan el gen de resistencia a drogas ABCB1, como se mencionó previamente la sobre expresión del gen ABCB1 se asoció directamente a una pobre respuesta en nuestros pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica, por lo que su adición podría mostrar algún beneficio en este subgrupo específico de pacientes. Con la finalidad identificar el efecto protector del Clorhidrato de Metformina se realizó un método de aleatorización 2:1 con la finalidad de que a pesar de tratarse de una muestra no balanceada los efectos pudiesen ser significativos. Al analizar la respuesta al tratamiento aquellos casos los cuales sobre expresaron el gen ABCB1 y que eran considerados como un genotipo de resistencia fueron los que mostraron un mayor beneficio mejorando su curva de supervivencia y empalmándose con aquellos con un nivel de expresión baja. Estos datos finalmente nos sugieren que el grupo de pacientes que muestran un mayor beneficio son aquellos que sobre expresan el gen pudiendo revertir el genotipo de resistencia y mejorando el rendimiento de la quimioterapia semejante a un paciente con Leucemia Linfoblástica de riesgo estándar.

En conclusión, a pesar de ser un fármaco que se ha utilizado por más de cincuenta años en la clínica desconocemos en su totalidad los diferentes efectos antitumorales. La mayoría de los ensayos in vitro coinciden que los dos mecanismos principales son la activación de AMPK o el bloqueo de la vía m TOR. De estos dos mecanismos se derivan la mayor parte de los efectos anti tumorales como lo son el bloqueo de los genes de resistencia a drogas. Debido a que el clorhidrato de Metformina es una droga de fácil acceso con un perfil de seguridad aceptable consideramos que es una opción accesible para el tratamiento de la Leucemia Linfocítica Aguda en especial en países en vías de desarrollo y cuyo acceso a drogas específicas es limitado. La detección de los casos que sobre expresan los genes de resistencia a drogas permite identificar a pacientes que cuentan con un pronóstico adverso y que pueden ser beneficiados con el tratamiento en base del clorhidrato de Metformina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Campo E, Swerdlow S, Harris N, Pileri S, Stein H, Jaffe E. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*.2011; 117: 5019-32
2. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet*.2013;381 (9881): 1943-1935
3. Vasekar M, Allen JE, Joudeh J, Claxton D. Emerging molecular therapies for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Ad Exp Med Biol*.2013; 779:341-358
4. McGregor S, McNeer J, Gurbuxani S. Beyond the 2008 World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and Management of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Diagn Pathol*.2012; 29(1): 2-11
5. Faderl S, O'Brien S, Pui CH, Stock W, Wetzler M, Hoelzer D , et al. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer*.2010;116 (5): 1165-76
6. Dores GM, Devesa SS, Curtis RE, Linet MS, Morton LM. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007.*Blood*.2012;119 (1): 34 – 43
7. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Matehrs C, Parkin DM. Estimates of Worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*.2010;127 (12) : 2893-917
8. Tirado-Gómez L, Mohar-Netancourt A. Epidemiología de las Neoplasias Hemato-Oncológicas. *Cancerología*.2007;2: 109-20. Artículo en español
9. González-Salas WM, Olarte-Carrillo I, Gutiérrez-Romero M, Montaña-Figueroa EH, Martínez-Murillo C, Ramos-Peñañiel CO. Acute leukemia frequency observed in a reference hospital. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*.2013; 50(2): 167-171
10. Jeha S. New therapeutic strategies in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Seminars in Hematology*.2009: 46 (1): 76 -88
11. Curado MP, Pontes T, Guerra-YI ME, Cancela Mide C. Leukemia mortality among children, adolescents, and young adults in Latin America. *Rev Panam Salud Publica*. 2011; 29 (2): 96 -102
12. Onciu M. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am*.2009; 23: 655-674
13. Arteaga-Ortiz L, Buitrón-Santiago N, Rosas-López A, Rosas-Arzate G, Armengolt-Jiménez A, Aguayo A, et al. Acute lymphoblastic leukemia: experience in adult patients treated with hyperCVAD and 0195 Protocol, at the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Cohort 2003-2007. *Rev Invest Clin*. 2008; 60 (8): 450-69
14. Ramos C, Rozen E, León M, Martínez T A, Olarte I, Castellanos et al. Results of treatment of acute lymphoblastic leukemia in two cohorts of Mexican patients. *Rev Med Chil*.2011; 139 (9): 1135 – 42
15. Rabin KR, Poplack DG. Management strategies in acute lymphoblastic leukemia. *Oncology*.2011; 25 (4): 328-35

16. Hoelzer D, Gökbuget N, Ottmann O, Pui CH, Relling MV, Appelbaum FR, et al. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*.2002:162-92
17. Fielding AK. Current therapeutic strategies in adult acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*.2011; 25 (6): 1255 -79
18. Annino L, Vegna ML, Camera A, Specchia G, Visani G, Fioritoni G, Ferrara F, et al. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): long-term follow-up of the GIMEMA ALL 0288 randomized study. *Blood*. 2002;99(3):863-871
19. Rowe JM, Buck G, Burnett AK, et al. Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the International ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood*.2006;106: 3760-67
20. Kantarjian H, Thomas D, O'Brien S, et al. Long term follow-up results of hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (Hyper-CVAD), a dose-intensive regimen. In adult acute lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2004;101:2788-2801
21. Gokbuget N, Hoelzer D, Arnold R, et al. Treatment of adult ALL according to protocols of the German Multicenter Study Group for Adult ALL (GMALL). *Hematol Oncol Clin North Am*.2000;14:1307-25
22. Larson RA, Dodge RK, Burns CP, et al. A five-drug remission induction regimen with intensive consolidation for adults with acute lymphoblastic leukemia. Cancer and leukemia grupo B study 8811. *Blood*.1995;85: 2025- 37
23. Faderl S, Jeha S, Kantarjian HM. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*.2003;98(7): 1337-54
24. Mancini M, Scappaticci D, Comino G, et al. A comprehensive genetic classification of adult lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of the GIMEMA 0496 protocol. *Blood*.2005; 105 (9): 3434-41
25. Fielding AK, Richards SM, Chopra R, Lazarus HM, Litzow MR, Buck G, et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood*.2007;109 (3): 944-50
26. Oriol A, Vives S, Hernández-Rivas JM, Tormo M, Heras I, Rivas C, et al. Outcome after relapse of acute lymphoblastic leukemia in adult patients included in four consecutive risk-adapted trials by the PETHEMA Study Group. *Haematologica*.2010;95 (4): 589-96
27. Ramos-Peñafiel CO, Martínez-Tovar A, Olarte- Carrillo I, Castellanos-Sinco H, Martínez-Murillo C, León-González G, et al. Experiencia del tratamiento de la leucemia linfocítica aguda en recaída en el Hospital General de México. *Rev Med Hosp Gen Mex*.2010;73:263-7. Artículo en español
28. Thulé PM. Mechanism of current therapies for diabetes mellitus type 2. *Adv Physiol Educ*. 2012; 36 (4): 275-283

29. Shenfield G. Metformin: myths, misunderstandings and lessons from history. *Aust Prescr.* 2013;36: 38-39
30. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*;122 (6): 253-270
31. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet.* 2011; 50 (2): 81- 98
32. Sun L, Kwok E, Gopaluni B, Vahidi O. Pharmacokinetic-pharmacodynamic Modeling of Metformin for the treatment of Type II Diabetes. *Open Biomed Eng J.* 2011;5: 1-7
33. Stumvoll M, Häring HU, Matthaei S. Metformin. *Endocr Res.* 2007; 32 (1-2): 39-57
34. Renda F, Mura P, Finco G, Ferrazin F, Pani L, Landoni G. Metformin-associated lactic acidosis requiring hospitalization. A national 10-year survey and a systematic literature review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013 ;17 (S1):45-49
35. Russo GL, RUusso M, Ungaro P. AMP-activated protein kinase: a target for old drugs against diabetes and cancer. *Biochem Pharmacol.* 2013; 86 (3): 339 -350
36. Monami M, Colombi C, Balzi D, Dicembrini I, Giannini S, Melani C, et al. Metformin and cancer occurrence in insulin-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2011 Jan;34(1):129-31
37. Liao KF, Lai SW, Li CI. The impact of anti-diabetic drug son colorrectal cancer risk in a large cohorte of women with diabetes. *Libyan J Med.* 2012;7.17532
38. Bodmer M, Becker C, Meier C, Jick SS, Meier CR. Use of antidiabetic agents and the risk of pancreatic cancer: a case-control analysis. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(4):620-6
39. Bodmer M, Becker C, Meier C, Jick SS, Meier CR. Use of metformin and the risk of ovarian cancer: a case-control analysis. *Gynecol Oncol.* 2011;123(2):200-4
40. Bowker SL, Majumdar SR, Veugelers P, Johnson JA. Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. *Diabetes Care.* 2006;29(2):254-8
41. Bowker SL, Yasui Y, Veugelers P, Johnson JA. Glucose-lowering agents and cancer mortality rates in type 2 diabetes: assessing effects of time-varying exposure. *Diabetologia.* 2010;53(8):1631-7
42. Gallagher EJ, Leroith D. Diabetes, antihyperglycemic medications and cancer risk: smoke or fire? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2013; 20(5): 485- 494
43. Tankova T. Current indications for metformin therapy. *Ro J Intern Med.* 2003; 41(3): 215 - 225
44. Serrano M. Metformin and reprogramming into iPSCs. *Cell Cycle.* 2012;11(6):1058-1059
45. Feng YH, Wu CL, Shiau AL, Lee JC, Chang JG, Lu PJ, et al. microRNA-21-mediated regulation of Sprouty2 protein expression enhances the cytotoxic effect of 5-fluorouracil and metformin in colon cancer cells. *Int J Mol Med.* 2012;29(5):920-6.

46. Dowling RJ, Niraula S, Stambolic V, Goodwin PJ. Metformin in cancer: translational challenger. *J Mol Endocrinol.* 2012;48(3): R31-43
47. Jalving M, Gietema JA, Lefrandt JD, de Jong S, Reyners AK, Gans RO, de Vries EG. Metformin: taking away the candy for cancer? *Eur J Cancer.* 2010;46(13):2369-80.
48. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraro C, Cufi S, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin and energy metabolism in breast cancer: from insulin physiology to tumour-initiating stem cells. *Curr Mol Med.* 2010;10(7):674-91
49. Memmott RM, Mercado JR, Maier CR, Kawabata S, Fox SD, Dennis PA. Metformin prevents tobacco carcinogen--induced lung tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila).* 2010;3(9):1066-76
50. Xie Y, Wang YL, Yu L, Hu Q, Ji L, Zhang Y, Liao QP. Metformin promotes progesterone receptor expression via inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) in endometrial cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;126(3-5):113-20
51. Engelman J, Cantley L. Chemoprevention meets glucose control. *Cancer Prev Res.* 2010;3: 1049-52
52. Micic D, Cvijovic G, Trajkovic V, Duntas LH, Polovina S. Metformin: its emerging role in oncology. *Hormones (Athens).* 2011;10(1):5-15
53. Rozengurt E, Sinnott-Smith J, Kisfalvi K. Crosstalk between insulin/insulin-like growth factor-1 receptors and G protein-coupled receptor signaling systems: a novel target for the antidiabetic drug metformin in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(9):2505-11
54. Petrushev B, Tomuleasa C, Soritau O, Aldea M, Pop T, Susman S, et al. Metformin plus pif combination chemotherapy for hepatocellular carcinoma. *Exp Oncol.* 2012;34(1):17-24
55. Soritau O, Tomuleasa C, Aldea M, Petrushev B, Susman S, Gheban D et al. Metformin plus temozolomide-based chemotherapy as adjuvant treatment for WHO grade III and IV malignant gliomas. *J BUON.* 2011;16(2):282-9
56. Ramos-Peñafiel C, Castellanos-Sinco H, Martínez-Murillo C, Martínez- Tovar A, Olarte-Carrillo I, Zamora -Domínguez J. Favorable steroid response in patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. Frequency and prognostic significance. *Rev Med Hosp Gen Mex.* 2010;73 (4): 231-36
57. McCubrey JA, Steelman LS, ChappellWH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1773 (8): 1263-1284
58. Tawa A, Inoue M, Ishihara S, et al. Increased expression of the multidrug-resistance gene in undifferentiated sarcoma. *Cancer* 1990; 66:1980-1983.
59. Wu L, Xu X, Shen J, et al. MDR1 gene polymorphisms and risk of recurrence in patients with hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *J. Surg. Oncol.* 2007; 96:62-68.

60. Yamaguchi M, Kita K, Miwa H, et al. Frequent expression of P-Glycoprotein/MDR1 by nasal T-cell lymphoma cells. *Cancer* 1995; 76:2351-2356.
61. Illmer T, Schuler US, Thiede C, et al. MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Research* 2002; 62:4955-4962.
62. Dhooge C, De Moerloose B, Laureys G, et al. Pglycoprotein is an independent prognostic factor predicting relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of a 6-year prospective study. *Br J Haematol.* 1999; 105:676-683.
63. Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, et al. 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; 94:1086-1099.
64. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Res* 2001; 11:1156-1166.
65. Szakacs G, Paterson J K, Ludwig J A, et al. Targeting Multidrug Resistance in Cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:219-234.
66. Szakacs G, Annereau J P, Lababidi S, et al. Predicting Drug Sensitivity and Resistance: Profiling ABC Transporter Genes in Cancer Cells. *Cancer Cell* 2004; 6:129-137.
67. Moitra K, Lou H and Dean M. Multidrug Efflux Pumps and Cancer Stem Cells: Insights into Multidrug Resistance and Therapeutic Development. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 89:491-502.
68. Gerrard G., Payne E., Baker R., et al. Clinical effects and P-glycoprotein inhibition in patients with acute myeloid leukemia treated with zosuquidar trihydrochloride, daunorubicin and cytarabine. *Haematologica* 2004;89(7):782-790.
69. Xia CQ, Smith PG. Drug efflux transporters and multidrug resistance in acute leukemia: therapeutic impact and novel approaches to mediation. *Molecular Pharmacology Fast Forward* 2012; 1110:1124.
70. Wilson CS, Davidson G S, Martin S B, et al. Gene Expression Profiling of Adult Acute Myeloid Leukemia Identifies Novel Biologic Clusters for Risk Classification and Outcome Prediction. *Blood* 2006; 108:685-696.
71. Erba HP. Prognostic Factors in Elderly Patients with AML and the Implications for Treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007:420-428.
72. Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson M R. ABCB1 Genotype and PGP Expression, Function and Therapeutic Drug Response: A Critical Review and Recommendations for Future Research. *Pharmacogenomics* 2007; 7:154-179.

73. Kaya P, Gunduz U, Arpacı F, et al. Identification of Polymorphisms on the MDR1 Gene Among Turkish Population and Their Effects on Multidrug Resistance in Acute Leukemia Patients. *Am J Hematol* 2005; 80:26-34.
74. Jamroziak K, Balcerczak E, Cebula B, et al. No Influence of 3435C>T ABCB1 (MDR1) Gene Polymorphism on Risk of Adult Acute Myeloid Leukemia and P-Glycoprotein Expression in Blast Cells. *Ther Drug Monit* 2006; 28:707-711.
75. Kim DH, Park J Y, Sohn S K, et al. Multidrug Resistance-1 Gene Polymorphisms Associated with Treatment Outcomes in De Novo Acute Myeloid Leukemia. *Int J Cancer* 2006; 118:2195-2201.
76. Trnkova Z, Bedřikova R, Markova J, et al. Semiquantitative RT-PCR Evaluation of the MDR1 Gene Expression in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Neoplasma* 2007; 54:383-390.
77. Nakanishi T, Karp J E, Tan M, et al. Quantitative Analysis of Breast Cancer Resistance Protein and Cellular Resistance to Flavopiridol in Acute Leukemia Patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9:3320-3328.
78. Robey RW, Lin B, Qiu J, et al. Rapid Detection of ABC Transporter Interaction: Potential Utility in Pharmacology. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2011; 63:217-222.
79. Elsby R, Smith V, Fox L, Stresser D, et al. Validation of Membrane Vesicle-Based Breast Cancer Resistance Protein and Multidrug Resistance Protein 2 Assays to Assess Drug Transport and the Potential for Drug-Drug Interaction to Support Regulatory Submissions. *Xenobiotica* 2011; 41:764-783.
80. Mbuna J, Kaneta T, Imasaka T. Rapid Determination of Multidrug Resistance-Associated Protein in Cancer Cells by Capillary Electrophoresis. *Immunoassay. J Chromatogr A* 2011; 1218:3923-3927.
81. Maraldi T, Bertacchini J, Benincasa M, et al. Reverse-Phase Protein Microarrays (RPPA) As a Diagnostic and Therapeutic Guide in Multidrug Resistant Leukemia. *Int J Oncol* 2011; 38:427-435.
82. Sivapackiam J, Harpstrite S E, Prior J L, et al. Synthesis, Molecular Structure, and Validation of Metalloprobes for Assessment of MDR1 P-Glycoprotein-Mediated Functional Transport. *Dalton Trans* 2010; 39:5842-5850.
83. Piwnica-WD, Sharma V. Probing Multidrug Resistance P-Glycoprotein Transporter Activity with SPECT Radiopharmaceuticals. *Curr Top Med Chem* 2012; 10:1834-1845.
84. Lamy T, Drenou B, Grulois I, et al. Multi-Drug Resistance (MDR) Activity in Acute Leukemia Determined by Rhodamine 123 Efflux Assay. *Leukemia* 1995; 9:1549-1555.
85. Dizdarevic S, Peters AM. Imaging of Multidrug Resistance in Cancer. *Cancer Imaging* 2011; 11:1-8.
86. Guenova ML, Balatzenko G N, Nikolova V R, et al. An Anti-Apoptotic Pattern Correlates with Multidrug Resistance in Acute Myeloid Leukemia Patients: a Comparative Study of Active Caspase-3, Cleaved PARPs, Bcl-2, Survivin and MDR1 Gene. *Hematology* 2010; 15:135-143.
87. Kourti M, Vavatsi N, Gombakis N, et al. Expression of Multidrug Resistance 1 (MDR1), Multidrug Resistance-Related Protein 1 (MRP1), Lung Resistance Protein (LRP), and Breast Cancer Resistance

- Protein (BCRP) Genes and Clinical Outcome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Hematol* 2007; 86:166-173.
88. Leith CP, Kopecky K J, Godwin J, et al. Acute Myeloid Leukemia in the Elderly: Assessment of Multidrug Resistance (MDR1) and Cytogenetics Distinguishes Biologic Subgroups with Remarkably Distinct Responses to Standard Chemotherapy. A Southwest Oncology Group Study. *Blood* 1997; 89:3323-3329.
 89. TafuriWuchter C, Leonid K, Ruppert V, et al. Clinical Significance of PGlycoprotein Expression and Function for Response to Induction Chemotherapy, Relapse Rate and Overall Survival in Acute Leukemia. *Haematologica* 2000; 85:711-721.
 90. Tafuri A, Gregorj C, Petrucci M T, et al. MDR1 Protein Expression Is an Independent Predictor of Complete Remission in Newly Diagnosed Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 2002; 100:974-981.
 91. Venditti A, Del P G, Maurillo L, et al. Combined Analysis of Bcl-2 and MDR1 Proteins in 256 Cases of Acute Myeloid Leukemia. *Haematologica* 2004; 89:934-939.
 92. Benderra Z, Faussat A M, Sayada L, et al. Breast Cancer Resistance Protein and P-Glycoprotein in 149 Adult Acute Myeloid Leukemias. *Clin Cancer Res* 2004; 10:7896-7902.
 93. Benderra Z, Faussat A M, Sayada L, et al. MRP3, BCRP, and P-Glycoprotein Activities Are Prognostic Factors in Adult Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 2005; 11:7764-7772.
 94. Damiani D, Tiribelli M, Calistri E, Geromin A, et al. The Prognostic Value of P-Glycoprotein (ABCB) and Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) in Adults With De Novo Acute Myeloid Leukemia With Normal Karyotype. *Haematologica* 2006; 91:825-828.
 95. Uggl B, Stahl E, Wagsater D, et al. BCRP mRNA Expression V. Clinical Outcome in 40 Adult AML Patients. *Leuk Res* 2005; 29:141-146.
 96. Steinbach D, Sell W, Voigt A, Hermann J, et al. BCRP Gene Expression Is Associated with a Poor Response to Remission Induction Therapy in Childhood Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia* 2002; 16:1443-1447.
 97. Plasschaert SL, de Bont E S, Boezen M, et al. Expression of Multidrug Resistance-Associated Proteins Predicts Prognosis in Childhood and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Cancer Res* 2005; 11:8661-8668.
 98. Steinbach D, Lengemann J, Voigt A, et al. Response to Chemotherapy and Expression of the Genes Encoding the Multidrug Resistance-Associated Proteins MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, and SMRP in Childhood Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 2003; 9:1083-1086.
 99. Monzo M, Brunet S, Urbano-Ispizua A, et al. Genomic Polymorphisms Provide Prognostic Information in Intermediate-Risk Acute Myeloblastic Leukemia. *Blood* 2006; 107:4871-4879.

100. Illmer T, Schuler U S, Thiede C, et al. MDR1 Gene Polymorphisms Affect Therapy Outcome in Acute Myeloid Leukemia Patients. *Cancer Res* 2002; 62:4955-4962.
101. Jamrozak K, Mlynarski W, Balcerzak E, et al. Functional C3435T Polymorphism of MDR1 Gene: an Impact on Genetic Susceptibility and Clinical Outcome of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Eur J Haematol* 2004; 72:314-321.
102. Van der Holt B, Van den Heuvel-Eibrink M, Van Schaik R H, et al. ABCB1 Gene Polymorphisms Are Not Associated With Treatment Outcome in Elderly Acute Myeloid Leukemia Patients. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80:427-439.
103. Efferth T, Sauerbrey A, Steinbach D, et al. Analysis of Single Nucleotide Polymorphism C3435T of the Multidrug Resistance Gene MDR1 in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Oncol* 2003; 23:509-517.
104. Belpomme D, Gauthier S, Pujade-Lauraine E, et al. Verapamil Increases the Survival of Patients with Anthracycline-Resistant Metastatic Breast Carcinoma. *Ann Oncol* 2000; 11:1471-1476.
105. Solary E, Drenou B, Campos L, et al. Quinine As a Multidrug Resistance Inhibitor: a Phase 3 Multicentric Randomized Study in Adult De Novo Acute Myelogenous Leukemia. *Blood* 2003; 102:1202-1210.
106. Becton D, Dahl G V, Ravindranath Y, et al. Randomized Use of Cyclosporin A (CsA) to Modulate P-Glycoprotein in Children with AML in Remission: Pediatric Oncology Group Study 9421. *Blood* 2006; 107:1315-1324.
107. Li GY, Liu J Z, Zhang B, et al. Cyclosporine Diminishes Multidrug Resistance in K562/ADM Cells and Improves Complete Remission in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Biomed Pharmacother* 2009; 63:566-570.
108. Kolitz JE, George S L, Marcucci G, et al. P-Glycoprotein Inhibition Using Valspodar (PSC-833) Does Not Improve Outcomes for Patients Younger Than Age 60 Years with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 19808. *Blood* 2010; 116:1413-1421.
109. Yang K, Wu J, Li X. Recent Advances in the Research of P-Glycoprotein Inhibitors. *Biosci Trends* 2008; 2:137-146.
110. Tang R, Faussat A M, Perrot J Y, et al. Zosuquidar Restores Drug Sensitivity in P-Glycoprotein Expressing Acute Myeloid Leukemia (AML). *BMC Cancer* 2008; 8:51.
111. Medeiros BC, Landau H J, Morrow M, et al. The Farnesyl Transferase Inhibitor, Tipifarnib, is a Potent Inhibitor of the MDR1 Gene Product, P-Glycoprotein, and Demonstrates Significant Cytotoxic Synergism Against Human Leukemia Cell Lines. *Leukemia* 2007; 21:739-746.
112. Dohse M, Scharenberg C, Shukla S, Robey R W, Volkmann T, Deeken J F, Brendel C, Ambudkar S V, Neubauer A and Bates S E (2010) Comparison of ATP-Binding Cassette Transporter Interactions with

- the Tyrosine Kinase Inhibitors Imatinib, Nilotinib, and Dasatinib. *Drug Metab Dispos* 2010; 38:1371-1380.
113. Shi Z, Tiwari A K, Patel A S, et al. Roles of Sildenafil in Enhancing Drug Sensitivity in Cancer. *Cancer Res* 2011; 71:3735-3738.
114. Puhmann U, Ziemann C, Ruedell G, et al. Impact of the Cyclooxygenase System on Doxorubicin-Induced Functional Multidrug Resistance 1 Overexpression and Doxorubicin Sensitivity in Acute Myeloid Leukemia HL-60 Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312:346-354.
115. Zhang H, Jiang H, Sun F, Wang H, et al. Rapid Diagnosis of Multidrug Resistance in Cancer by Electrochemical Sensor Based on Carbon Nanotubes-Drug Supramolecular Nanocomposites. *Biosens Bioelectron* 2011; 26:3361-3366.
116. Kang H, Fisher M H, Xu D, et al. Inhibition of MDR1 Gene Expression by Chimeric HNA Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 2004; 32:4411-4419.
117. Xu D, Ye D, Fisher M and Juliano RL. Selective Inhibition of P-Glycoprotein Expression in Multidrug-Resistant Tumor Cells by a Designed Transcriptional Regulator. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302:963-971.
118. Kowalski P, Stein U, Scheffer GL and Lage H. Modulation of the Atypical Multidrug-Resistant Phenotype by a Hammerhead Ribozyme Directed Against the ABC Transporter BCRP/MXR/ABCG2. *Cancer Gene Ther* 2002; 9:579-586.
119. Abbasi M, Aliabadi H M, Moase E H, et al. SiRNA-Mediated Down-Regulation of P-Glycoprotein in a Xenograft Tumor Model in NOD-SCID Mice. *Pharm Res* 2011; 28:2516-2529.
120. Nadali F, Pourfathollah A A, Alimoghaddam K, et al. Multidrug Resistance Inhibition by Antisense Oligonucleotide Against MDR1/MRNA in P-Glycoprotein Expressing Leukemic Cells. *Hematology* 2007; 12:393-401.
121. Riganti C, Voena C, Kopecka J, et al. Liposome-Encapsulated Doxorubicin Reverses Drug Resistance by Inhibiting P-Glycoprotein in Human Cancer Cells. *Mol Pharm* 2011; 8:683-700.
122. Liang GW, Lu W L, Wu J W, et al. Enhanced Therapeutic Effects on the Multi-Drug Resistant Human Leukemia Cells in Vitro and Xenograft in Mice Using the Stealthy Liposomal Vincristine Plus Quinacrine. *Fundam Clin Pharmacol* 2008; 22:429-437.
123. Raub T.J. P-Glycoprotein Recognition of Substrates and Circumvention Through Rational Drug Design. *Mol Pharm* 2006; 3:3-25.
124. Styczyński J, Wysocki M. Differences in significance of drug resistance mechanisms between adult and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologia* 2002;32(4):313-25.
125. Glazer R, Rohiff C. Transcriptional regulation of multidrug resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1994; 31(2-3): 263-271

126. Rohiff C, Glazer R. Regulation of the MDR1 promoter by cyclic AMP-dependent protein kinase and transcription factor SP1. *Int J Oncol.* 1998; 12 (2): 383-386
127. Scala S, Budililil A, Zhan Z, Cho-Chung YS, Jefferson J, Tsokos M, Bates SE. Downregulation of *mdr-1* expression by 8-Cl-cAMP in multidrug resistance MCF-7 human breast cancer cells. *J Clin Invest.* 1995; 96 (2): 1026-34
128. Parissenti AM, Gannon BR, Villeneuve DJ, Kirwan R, Hude AF, Chadderton A et al. Lack modulation of MDR-1 gene expression by dominant inhibition of cAMP-dependent protein kinase doxorubicin-resistance MCF-7 breast cancer cells. *Int J Cancer.* 1999; 82 (6): 893-900
129. Mistry P, Stewart AJ, Dangerfield X, Okiji S, Liddle C, Bootle D, Plumb JA, Templeton D, Chariton P. In vitro and in vivo reversal of
130. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene.* 2003;22(53):8581-8589.
131. Yang J, Liu FX, Yan XC. [Research advances on inhibitor of apoptosis, survivin]. *Ai Zheng.* 2003;22(7):771-4.
132. Yamamoto T, Tanigawa N. The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer. *Med Electron Microsc.* 2001;34(4):207-212.
133. Chiou SK, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin - an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond. *Med Sci Monit.* 2003;9(4):PI25-9.
134. Tyagi AK, Agarwal C, Singh RP, Shroyer KR, Glode LM, Agarwal R. Silibinin down-regulates survivin protein and mRNA expression and causes caspases activation and apoptosis in human bladder transitional-cell papilloma RT4 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Dec 26; 312(4):1178-84.
135. Tyagi A, Agarwal C, Harrison G, Glode LM, Agarwal R. Silibinin causes cell cycle arrest and apoptosis in human bladder transitional cell carcinoma cells by regulating CDK1-CDK-cyclin cascade, and caspase 3 and PARP cleavages. *Carcinogenesis.* 2004;25(9):1711-1720
136. Yang P, Wang G, Huo H, Li Q, Zhao Y, Liu Y. SDF-1/CXCR4 signaling up-regulates survivin to regulate human sacral chondrosarcoma cell cycle and epithelial-mesenchymal transition via ERK and PI3K/AKT pathway. *Med Oncol.* 2015;32(1):377. doi: 10.1007/s12032-014-0377-x
137. Liao A, Shi R, Jiang Y, Tian S, Li P, Song F, Qu Y, Li J, Yun H, Yang X. SDF-1/CXCR4 Axis Regulates Cell Cycle Progression and Epithelial-Mesenchymal Transition via Up-regulation of Survivin in Glioblastoma. *Mol Neurobiol.* 2014. [Epub ahead of print
138. Lesan V, Ghaffari SH, Salaramoli J, Heidari M, Rostami M, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Evaluation of antagonistic effects of metformin with Cisplatin in gastric cancer cells. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2014;8(3):12-19.

139. Han G, Gong H, Wang Y, Guo S, Liu K. AMPK/mTOR-mediated inhibition of survivin partly contributes to metformin-induced apoptosis in human gastric cancer cell. *Cancer Biol Ther.* 2015;16(1):77-87
140. Olarte-Carrillo, Ramos-Peñañiel, Miranda-Peralta, Rozen-Fuller, Kassack-Ipiña et al. Clinical significance of the ABCB1 and ABCG2 gene expression levels in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology.* 2017; 22 (5): 286-291
141. Choi YH, Yu A-M. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. *Curr Pharm Des.* 2014;20:793–807.
142. Glazer RI, Rohlff C. Transcriptional regulation of multidrug resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1994;31:263–71.
143. Rohlff C, Glazer RI. Regulation of the MDR1 promoter by cyclic AMP-dependent protein kinase and transcription factor Sp1. *Int J Oncol.* 1998;12:383–6.
144. Parissenti AM, Gannon BR, Villeneuve DJ, Kirwan-rhude AF, Chadderton A, Glück S. Lack of modulation of MDR1 gene expression by dominant inhibition of cAMP-dependent protein kinase in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Int J Cancer.* 1999;82:893–900.
145. Wu W, Yang J-L, Wang Y-L, Wang H, Yao M, Wang L, et al. Reversal of multidrug resistance of hepatocellular carcinoma cells by metformin through inhibiting NF-κB gene transcription. *World J Hepatol.* 2016;8:985–93.
146. Abbasi MM, Valizadeh H, Hamishehkar H, Zakeri-Milani P. Inhibition of P-glycoprotein expression and function by anti-diabetic drugs gliclazide, metformin, and pioglitazone in vitro and in situ. *Res Pharm Sci.* 2016;11:177–86.
147. Ramos-Peñañiel CO¹, Martínez-Murillo C, Santoyo-Sánchez A, Jiménez-Ponce F, Rozen-Fuller E, Collazo-Jaloma J, Olarte-Carrillo I, Martínez-Tovar A. Effect of metformin addition to an acute lymphoblastic leukemia chemotherapy treatment. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2014;52(3):270-275.
148. Ramos-Peñañiel C, Castellanos-Sinco H, Olarte-Carrillo I, Santoyo-Sánchez A, Rozen-Fuller E, León-González G, Kassack-Ipiña JJ, et al. Efficacy of a dynamic and “adult inspired” treatment for the reduction of early relapse in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. Efficacy of a dynamic and “adult inspired” treatment for the reduction of early relapse in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Hematol Mex.* 2018;19(1):5-16

PARTE V

Participación en Reuniones científicas



2017- Presentación oral de avances del Proyecto Básico-Clinico
Congreso Mexicano de la Agrupación Mexicana para el estudio de la Hematología



2016- Presentación poster de avances del Proyecto Clínico
Congreso Mexicano de la Agrupación Mexicana para el estudio de la Hematología



2017- Presentación poster de avances del Proyecto Final
Congreso Americano de Hematología, Atlanta Georgia

EPILOGO

EN MEMORIA DEL DR. MARIO GUTIERREZ ROMERO† y LILIE MARISOL† YA QUE SIN SU IMPULSO Y FÉ NO SE HUBIERA PUDIDO CONCLUIR NINGUNO DE LOS PROYECTOS