



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**“INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A MULTIDROGAS EN  
LA LÍNEA DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA HL60.”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**BAUTISTA SEBASTIÁN EDUARDO**

**DIRECTORA DE TESIS**

**Vo. Bo.**

**DRA. ITZEN AGUIÑIGA SÁNCHEZ  
FES ZARAGOZA, UNAM**

**MÉXICO, CDMX. MAYO DE 2022**



## **Apoyos Financieros**

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

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

## Agradecimientos

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo en un proyecto que me ha brindado un sinfín de experiencias, y dificultades que gracias a su guía he podido afrontar.

A la Dra. Itzen Aguiñiga Sánchez por todo el tiempo brindado, su apoyo y sus conocimientos sin los cuales la realización de este trabajo no habría sido posible, además de mostrar siempre su disposición de ayudar en todo lo que fuera necesario.

A la Dra. Guadalupe Fajardo Orduña, por el tiempo brindado, su paciencia, por su guía, su apoyo incondicional, por haber dado tanto a este proyecto a pesar de las adversidades, aún más por brindar sus enseñanzas que me han permitido ampliar aún más mi concepto sobre lo que significa vivir y tener pasión para la investigación, y que me ha dejado muy en claro que no todo lo que suceda ya sea en los resultados de un proyecto o en la vida en general, es necesariamente bueno o malo, y que lo que podemos hacer es aprender de esto y crecer como persona, “bueno, malo... no lo sé”.

A la Dra. Graciela y al Dr. David por el apoyo, técnicas y enseñanza que brindaron cuando era necesario para la continuidad de mi proyecto.

A mis amigos del Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia: Mich, Sac, Malú, Jair, Gabriela, Frida, Aramiz, Candy, Judith, Michell, Candy, Luis y Daniel, por su ayuda cada que lo necesitaba, así como su amistad.

A Lambarry y Mariana especialmente, por el apoyo brindado durante este último año, por todas las experiencias compartidas, las tardes de diversión y trabajo arduo, en donde sin importar el tiempo que llegásemos a demorar, nunca tenían problema de quedarse más tiempo para lograr los objetivos, gracias por recorrer este camino conmigo, y permitirme recorrerlo con ustedes.

A los miembros del jurado:

Dra. Aguiñiga Sánchez Itzen

Dr. Santiago Osorio Edelmiro

Dr. López Muñoz Hugo

Dr. Ledesma Martínez Edgar

Mtro. Martínez Jiménez Luis Antonio

## Dedicatorias

A mis padres, por haberme formado como la persona que actualmente soy, ya que, sin ustedes, sin sus sacrificios, sin sus esfuerzos, muchos de mis logros no se habrían realizado, se los debo a ustedes, gracias por creer en mi capacidad y brindarme su cariño, amor y educación, espero poder devolverles en algún momento al menos un poco de todo lo que me han dado.

A mi hermana Itzel, por su ayuda y comprensión, espero no decepcionarte jamás.

A Jessica con quien he compartido experiencias desde primer semestre de la carrera, que sabe todo sobre mi, y que no me ha abandonado ni un solo día, como lo has mencionado antes, tú eres y siempre serás mi persona, mi sol.

A todos los miembros del Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, por ser prácticamente como una segunda familia para mí.

A la UNAM por ser mi segunda morada.

A Lambarry por haber haberme acompañado y ayudado en todo este proceso, ya que, sin su ayuda, habría sido mucho más difícil el desarrollo de esta tesis, te considero como un hermano.

A Nayelli, quien me ha brindado su apoyo y su amistad cuando más la necesité, por siempre encontrar la forma de hacerme reír, y compartir parte de su vida conmigo, aunque fuese por llamadas, poder conocerte de una forma tan inesperada ha sido

de lo mejor que me ha pasado en los últimos años que me ha hecho tan feliz, gracias a ti, esta etapa pandémica fue más sencilla de sobrellevar, y no tengo forma de pagarte por ello. Estaré para ti siempre que lo necesites, siempre que quieras que alguien te escuche.

A mis amigos que me acompañaron durante la carrera: Andy, Aline, Kevin, Jair, Natalia, Lupita, Chelsea, Miguel, Jacqueline, Karen, Ceci, Itzel quienes hicieron más ameno toda mi estancia en la carrera.

A MN por haber creído en mí y confiar en que me convertiría en un gran biólogo, solo espero que, a pesar del distanciamiento, aún sientas orgullo de los logros que obtendré.

“Cancer thus exploits the fundamental logic of evolution unlike any other illness. If we, as a species, are the ultimate product of Darwinian selection, then so, too, is this incredible disease that lurks inside us.”

Siddhartha Mukherjee, *The Emperor of All Maladies: A Biography of Cancer*, 2010

# Índice

<b>1. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>2</b>
<b>3. Marco Teórico</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Leucemia</b>	<b>3</b>
<b>3.2 Citarabina</b>	<b>4</b>
<b>3.3 Tratamiento de la LMA</b>	<b>6</b>
<b>3.4 Resistencia a multidrogas</b>	<b>7</b>
<b>3.5 Mecanismos de resistencia a fármacos</b>	<b>7</b>
<b>3.6 Resistencia cruzada</b>	<b>9</b>
<b>3.7 Modelos de estudio a resistencia</b>	<b>11</b>
<b>4. Planteamiento del problema</b>	<b>13</b>
<b>5. Hipótesis</b>	<b>14</b>
<b>6. Objetivos</b>	<b>15</b>
<b>6.1 General</b>	<b>15</b>
<b>6.2 Particulares</b>	<b>15</b>
<b>7. Materiales y métodos</b>	<b>16</b>
<b>8. Resultados</b>	<b>20</b>
<b>8.1 Determinación de la IC<sub>50</sub> a ara-C en la línea de Leucemia Promielocítica Aguda HL60.</b>	<b>20</b>
<b>8.2 Desarrollo de la línea HL60 resistente a ara-C</b>	<b>21</b>
<b>8.3 Evaluación del efecto de ara-C en la línea HL60/ara-C resistente</b>	<b>22</b>
<b>8.4 Determinación de la expresión génica de hENT1, dCK, MRP1 y MDR1 en HL60 parental vs HL60 resistente</b>	<b>25</b>
<b>8.5 Evaluación de la IC<sub>50</sub> a citarabina en HL60/ara-C resistente</b>	<b>28</b>
<b>9. Discusión</b>	<b>33</b>
<b>10. Conclusiones</b>	<b>37</b>
<b>11. Referencias</b>	<b>38</b>

## Listado de Abreviaturas

ara-C	Citarabina
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
ADN	Ácido desoxirribonucleico
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos (Estados Unidos)
NBMPR	Nitrobenciltioinosina
hENT1	Transportador de nucleósidos equilibrante humano
dCK	Desoxicitidina quinasa
ara-CMP	Citarabina monofosfato
ara-CTP	Citarabina trifosfato
HiDAC	Tratamiento de ara-C en dosis altas
ABCB1	Transportadores del medio 1 de la subfamilia B de casete de unión a ATP
MDR1	Proteína de resistencia a múltiples fármacos
P-gp	Glicoproteína P
IMDM	Medio Dulbecco modificado por Iscove
SFB	Suero Fetal Bovino
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
µL	Microlitros
µM	Micro Molar
nM	Nano Molar

## Listado de tablas e imágenes

- Figura 1** Mecanismo de acción y resistencia a ara-c
- Figura 2** Ensayo de proliferación de HL60 parental con ara-C y daunorrubicina
- Figura 3** Metodología de desarrollo de la línea HL60/ara-C resistente
- Figura 4** Comparación de la proliferación de HL60 Parental y resistente en presencia de ara-C
- Figura 5** Fotografías de HL60 parental y resistente a 20x con y sin ara-C
- Figura 6** Tinción con hemocolorante rápido a 40x de HL60 parental y resistente con y sin ara-C después de 48 horas
- Figura 7** Expresión génica en gel de agarosa de la línea parental y resistente
- Figura 8** Evaluación de la expresión génica mediante densitometría óptica en la línea parental y resistente
- Figura 9** Ensayo de proliferación de HL60/ara-C resistente con ara-C
- Figura 10** Ensayo de proliferación de HL60 parental y HL60/ara-C resistente en presencia de daunorrubicina
- Figura 11** Propuesta de ruta de resistencia a ara-C
- 
- Tabla 1** Antimetabolitos de purinas y pirimidinas aprobados por la FDA
- Tabla 2** Factores metabólicos involucrados en resistencia a ara-C
- Tabla 3** Moléculas reportadas como causante de resistencia a multidrogas
- Tabla 4** Secuencia de Primers
- Tabla 5** Cambios observados en los genes evaluados en HL60/ara-C resistente vs HL60 Parental
- Tabla 6** IC<sub>50</sub> a citarabina y daunorrubicina en HL60 parental y resistente

## 1. Resumen

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad clonal maligna heterogénea, la cual afecta principalmente a adultos representando el 80% de casos de leucemia en este grupo, a pesar de los avances en los tratamientos de la leucemia mieloide aguda, la esperanza de vida para los pacientes mayores de 65 años no supera 1 año desde el diagnóstico, ya sea por el deterioro del paciente, la agresividad del medicamento o la resistencia a multidroga. Dado que el principal tratamiento para esta enfermedad es la citarabina (ara-C), este trabajo se centra en la generación de una línea resistente a citarabina, para esto, HL60 fue cultivada a concentraciones crecientes de ara-C hasta asegurar y mantener su correcta proliferación por más de 90 días de cultivo. Los resultados nos indican que la resistencia adquirida por la línea resistente generada es 2.3 veces mayor que la línea parental, lo cual la hace relevante clínicamente. Al realizar PCR por punto final con los genes que comúnmente reportados en la resistencia a citarabina, se observó la disminución de la expresión de dCK, lo cual concuerda con estudios realizados con anterioridad. Respecto a la posibilidad de la presencia de una resistencia cruzada dentro de la línea, se denotó que no hay cambios aparentes en la resistencia a daunorrubicina, más no se comprobó la resistencia hacia otros antineoplásicos. Esto demuestra que la línea celular HL60/ara-C resistente, puede usarse como un modelo clínicamente relevante en futuros experimentos que busquen nuevas alternativas de tratamiento para combatir la LMA.

## 2. Introducción

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel global causando alrededor de 10 millones de defunciones en el 2020, según datos de International Association of Cancer Registries y Global Initiative for Cancer Registry Development, para el 2018 se identificaron 18 millones de casos, y se espera que los casos aumenten a 29 millones de personas para los próximos 20 años (OMS, 2020; IACR, GICR, 2018).

La LMA es una enfermedad clonal maligna originada de progenitores mieloides, esta va a afectar principalmente a adultos, representando el 80% de casos de leucemia en este grupo, en una incidencia de 1.3 por cada 100 mil habitantes menores de 65 años y 12.2 casos nuevos por cada 100 mil habitantes mayores de 65 años (Zhang, *et. al.* 2019; Kouchkovsky, I., Abdul-Hay, M. 2016).

A pesar de que los avances en el tratamiento de LMA han aumentado significativamente, la esperanza de vida para el 70% de los pacientes mayores de 65 años no supera 1 año desde el diagnóstico, esto derivado del rápido deterioro del paciente, la agresividad del tratamiento, o inclusive, el que el paciente presente resistencia a multidrogas (Kouchkovsky, I., Abdul-Hay, M. 2016; Zhang, J. *et. al.* 2019; Lagadinou, E. *et. al.* 2010).

La quimioresistencia o resistencia a multidrogas se define como la capacidad de las células tumorales para evitar la acción de los agentes quimioterapéuticos, por lo que logran evadir el mecanismo de apoptosis fomentando así la progresión del cáncer (Yeldag, G. 2018). Por ende, surge la necesidad de comprender los mecanismos moleculares de la resistencia a multidrogas y la generación de líneas celulares resistentes a multidrogas ayudan a estudiar estos mecanismos y encontrar nuevas alternativas que superan la quimioresistencia y así encontrar nuevos enfoques que permitan tener una terapia más efectiva contra el cáncer.

## 3. Marco Teórico

### 3.1 Leucemia

El cáncer es la tercera causa de muerte en México con el 12% de las defunciones, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes, y según estimaciones de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, cada año se suman más de 140,000 casos de mexicanos (COPREDOC, 2016).

La Leucemia es el nombre que comparten diversos desórdenes malignos que presentan un incremento en el número de leucocitos anormales en la sangre y/o médula ósea, esta se va a clasificar en dos tipos, crónicas y agudas (Juliusson & Hough, 2016).

La LMA es la neoplasia mielóide más frecuente en adultos caracterizado por la expansión clonal de progenitores mieloides en la médula ósea y la presencia de blastos en sangre periférica, células que se transformaron por la adquisición de arreglos cromosómicos y múltiples mutaciones (Aguilar López, *et. al.*, 2010; Saultz & Garzón, 2016). Esta enfermedad presenta una combinación de leucocitosis y signos de insuficiencia de la médula ósea como anemia y trombocitopenia, donde la fatiga, la anorexia y la pérdida de peso son comunes. Si no se trata, la muerte generalmente se da a los meses siguientes (Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016).

En México, los datos sobre epidemiología de LMA son escasos, debido a que la mayoría de los estudios realizados a las poblaciones con LMA son parciales, basados en datos pertenecientes a la población que atiende el Instituto Mexicano de Seguro Social (IMSS), en donde reportan que para el 2016, la frecuencia de LMA es del 13.1 al 17.2% en todos los casos de leucemia infantil (Mejía-Aranguré, *et. al.*, 2016). En el 2018, durante una conferencia Roberta Demichelis, jefa de la clínica de leucemias del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ), aseveró que la LMA tiene una incidencia estimada de entre 5 y 6 mil casos por año en México (Demichelis, 2018).

## 3.2 Citarabina

La inhibición de la replicación celular en las células tumorales ha sido una característica que se ha explotado eficazmente para el desarrollo de agentes antineoplásicos, basándose en las capacidades de las células humanas de absorción de moléculas y al aumento de demanda metabólica de las células neoplásicas para la síntesis y posterior replicación del ADN, un claro ejemplo, es la facultad de las células humanas de obtener purinas y pirimidinas, por lo que, los análogos de estos precursores de nucleótidos han demostrado tener propiedades anticancerígenas importantes, estos agentes se han denominado antimetabolitos (Luengo, Gui, & Vander Heiden, 2017; Parker, 2009).

Para el 2010 había un total de 14 antimetabolitos aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer (Tabla 1) siendo uno de los más antiguos y utilizados la citarabina (Parker, 2009; Fang, *et. al.*, 2019).

El análogo de histidina, ara-C es un nucleósido de pirimidina en el que la citosina se une a la D-arabinofuranosa mediante un enlace beta-N(1)-glicosídico y es utilizada desde los años 70 principalmente en el tratamiento de la leucemia aguda, dada su competencia con la citidina en la incorporación al ADN, además posee propiedades antivirales e inmunosupresoras (National Institute Cancer, 2020; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease, 2021; EMBL-EBI, 2018; Kantarjian, 2015; Hussein & Abdullah, 2009).

La ara-C se descubrió en los años 50's, cuando Bergmann y colaboradores aislaron 2 nucleótidos novedosos: la espongosina, y la espongouridina, de la esponja del caribe *Cryptothethya crypta* (Regalado, Laguna, & Martínez, 2010). Estos nucleósidos son pirimidínicos, los cuales tienen una arabinosa en lugar de una ribosa, y la espongosina combinaba la ribosa con metoxiadenina, posteriormente fueron sintetizados y en 1959, Walwick, Roberts y Dekker sintetizaron con ligeras modificaciones la molécula 3-β-D-arabinofuranosilcitosina, que posteriormente Pizer y Cohen utilizaron para investigar su actividad metabólica con mutantes de *E. coli*, consiguiendo la inhibición de la síntesis de ADN (Regalado, Laguna, & Martínez, 2010; Litchman, 2013). En el 1961 Evans demostró su potencial para inhibir el

crecimiento del sarcoma 180, carcinoma de Ehrlich y la línea de leucemia L-1210 y L5178Y en ratones, concluyendo que la arabinosilcitosina era uno de los agentes más efectivos en el control de leucemias trasplantadas en ratones, dada su naturaleza como nucleósido (Litchman, 2013). Para 1966, Ellison y Holland presentaron su trabajo sobre el uso de arabinosilcitosina en la inducción a la remisión de la Leucemia aguda, lo cual llevó a considerarla por la FDA (Litchman, 2013; Ellison, Carey, & Holland, 1967).

**Tabla 1.** Antimetabolitos de purina y pirimidina aprobados por la FDA (Parker, 2009)

<b>Droga</b>	<b>Fecha de aprobación</b>
5-aza-2o-desoxictidina (decitabina)	2006
O6-methylarabinofuranosyl guanine (nelarabina)	2005
2o-fluoro-2o-deoxyarabinofuranosyl-2-cloroadedenina (clofarabina)	2004
5-aza-citidina (vidaza)	2004
N4-pentyloxycarbonyl-5o-deoxy-5-fluorocytidine (capecitabina)	1998
2,2-difluoro-2o-desoxictidina (gemcitabina)	1996
2-cloro-2o-desoxialanosina (cladribina)	1992
arabinofuranosil-2-fluoroadenina (fludarabina)	1991
2o-desoxicoformycina (pentostatina)	1991
5-fluoro-2o-desoxiuridina (floxuridina)	1970
arabinofuranosilcitosina (citarabina)	1969
6-tioguanina	1966
5-fluorouracilo	1962
6-mercaptopurina	1953

Entre 1972 y 1973 inicio un estudio sobre el efecto de distintas dosis de arabinosilcitosina con daunorrubicina y mercaptopurina, obteniendo como resultado que las primeras dos moléculas permitían la mejora del paciente (Gluckman, Basch, B, & Varet, 1973). En 1973, Yates, Wallace y colaboradores estandarizaron un

tratamiento de 7 días de arabinosilcitosina acompañado de 3 días de daunorrubicina siendo reconfirmada la superioridad de estas dosis en 1981 (Yates, Wallace, Ellison, & Holland, 1973; Rai, *et. al.*, 1981).

### **3.3 Tratamiento de la LMA**

El tratamiento que se les da a los pacientes con LMA consiste en una terapia de inducción a la remisión con ara-C y una antraciclina, el cual, tiene una combinación estándar de 7+3, con una infusión continua de 7 días de ara-C a la dosis de 100 a 200 mg/m<sup>2</sup> por día por 7 días y daunorrubicina a 60 mg/m<sup>2</sup> por día durante 3 días (Dombret & Gardin, 2016).

Posteriormente inicia la quimioterapia de consolidación que comienza una vez que el hemograma o recuento de células sanguíneas vuelve a sus cifras normales después de la terapia de inducción, esto con la finalidad de reducir la posibilidad de leucemia recidivante, para esto se suele usar también la citarabina y se realiza en 5 días, repitiéndose cada tres o cuatro meses ( ESMO/ACF Patient Guide Series, 2011).

La forma en que actúa ara-C inicia cuando entra a la célula mediante sitios de unión a nitrobeniltioinosina (NBMPR), siendo principalmente en humanos el transportador de nucleósidos equilibrante humano (hENT1 o SLC29A1) y CNT3. El ara-C, se fosforila 3 veces debido a una enzima llamada desoxicitidina quinasa (dCK), obteniendo como producto citarabina trifosfato (ara-CTP), que va a ser el metabolito citotóxico, que se va a incorporar a la cadena de ADN replicante, además de inhibir a las ADN polimerasas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , lo que conducirá a la inhibición del inicio y alargamiento de la cadena y la terminación prematura de la cadena (Catalá, *et al.* 2016; Clarke, *et al.*, 2002; Gerson, *et al.*, 2018; Levin *et al.*, 2019; Nishi *et al.*, 2013) (Figura 1a).

La eficacia de este tratamiento es limitada, ya que a pesar de proporcionar una tasa de remisión de poco más del 70%, de este porcentaje, solo el 40% de los pacientes son sobrevivientes a largo plazo (más de 5 años), mientras que el 90% de los mayores de 65 años fallecen; lo anterior se debe a que sufren recaída debido a la resistencia a los medicamentos, el cual es el principal obstáculo para un tratamiento

exitoso contra la LMA y el cáncer en general (Negoro, *et al.*, 2011; Nishi, *et al.*, 2013; Clemente, 2018; Oncology, 2019; Shaffer, *et al.*, 2012).

### **3.4 Resistencia a multidrogas**

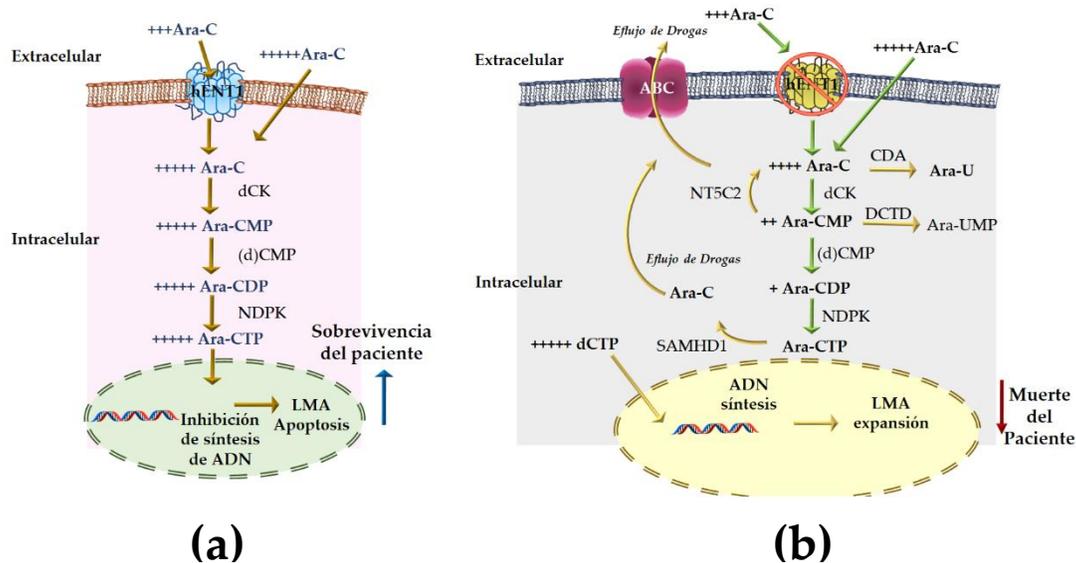
A pesar de todos los avances en el campo, la eficacia de este tratamiento es limitada, ya que, si bien se obtiene una tasa de remisión de poco más del 70%, de este porcentaje, solo el 40% de los pacientes son sobrevivientes a largo plazo (5 años), mientras que el 90% de los mayores de 65 años fallecen; lo anterior se debe a que sufren recaída debido a la resistencia a los medicamentos, el cual es el principal obstáculo para un tratamiento exitoso contra la LMA y el cáncer en general (Negoro, *et al.*, 2011; Nishi, *et al.*, 2013; Clemente, 2018; Oncology, 2019; Shaffer, *et al.*, 2012).

La resistencia a multidrogas sucede cuando las células tumorales que inicialmente son sensibles a los medicamentos de quimioterapia, después de un tiempo, ya no se ven afectadas, debido a la disminución gradual del efecto citotóxico de los medicamentos, lo cual ocurre después de la terapia de inducción (Zhang, Gu, & Chen, 2019).

### **3.5 Mecanismos de resistencia a fármacos**

Los factores que llevan al desarrollo de la resistencia a drogas y en particular a la citarabina, se debe a la absorción ineficiente del fármaco a la célula, niveles reducidos de enzimas activadoras, así como una degradación acelerada del metabolito activo de la droga (Figura 1b/Tabla 2) (Rein & Rizzieri, 2014; Luwenberg, *et al.*, 2011; Wu, Duan, Chen, & Chen, 2017; Cros *et al.*, 2004). Particularmente, se conoce la baja producción y pérdida de función del transportador hENT1 y de la enzima dCK, así como el incremento de las enzimas cN-II y CDA, todas estas variaciones son dadas por alteraciones propias de las células leucémicas debido a mutaciones genéticas o cromosomales (crossovers mitóticos o amplificaciones genéticas específicas), sin embargo, no se tiene más información de cómo se originan estas mutaciones dentro de las células leucémicas. Estas alteraciones son de gran importancia debido al papel que juegan cada una de estas moléculas para que actúe ara-C, ya que el transportador hENT1 es el responsable del 80% del flujo

de la citarabina al interior de las células y la enzima dCK se encarga de la fosforilación de la citarabina, mientras que las enzimas cN-II (NT5C2) y CDA desfosforilan y eliminan aminoácidos a la citarabina respectivamente. Así mismo, se han reportado otros mecanismos de resistencia, incluido la activación de NF- $\kappa$  $\beta$ , la activación de actividad telomerasa y expresión de Fas, así como nuevos estudios que demuestran el papel de miRNA como el miR-181a como generador de resistencia a la citarabina (Bai, *et al.*, 2012; Jokobsen, 2018; Levin, Stark, Berman, & Assaraf, 2019; Negoro, *et al.*, 2011; Rein & Rizzieri, 2014; Clemente, 2018). También algunos autores reportan que la resistencia a las antraciclinas, mediadas por los transportadores del miembro 1 de la subfamilia B de casete de unión a ATP (ABCB1), en específico a la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MDR1) y glicoproteína P (P-gp), estarían implicados en una posible resistencia a fármacos en la LMA (Shaffer, *et al.*, 2012; N'rgaard, *et al.*, 2002).



**Figura 1. Mecanismo de acción del ara-C y vías de resistencia.** a. En condiciones normales el metabolito ara-C va a entrar a la célula principalmente mediante el transportador hENT1. El ara-C, se fosforila 3 veces debido a la enzima dCK, obteniendo como producto ara-CTP, que se va a incorporar a la cadena de ADN replicante, además de inhibir a las ADN polimerasas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , lo que conducirá a la inhibición de síntesis de ADN y por ende a la apoptosis. b. Los mecanismos de resistencia van a estar caracterizados por el aumento de las enzimas CDA (va a desaminar al metabolito ara-C) y CN-II (va a desfosforilar a ara-CMP), así como de la disminución de dCK, por lo que no se va a fosforilar ara-C y el transportador hENT1, por lo que, disminuirá la entrada de ara-C a la célula, estas mutaciones se deben a distintas causas como lo son mutaciones génicas o cromosomales, crossover mitóticos o amplificaciones genéticas específicas. Imagen tomada de Fajardo-Orduña, *et al.*, 2021

**Tabla 2.** Factores metabólicos involucrados en la resistencia a citarabina en leucemias mieloides agudas. Tomado de: Cros, *et al.*, 2004

				Implicación en la resistencia a citarabina	
Nombre	Función	Localización cromosomal	Tamaño de proteína	In vitro	In Vivo
<b>hENT1</b>	Transportador de nucleósidos	6p21.1-p21.2	50 kDa 456 aa	Si	Si
<b>dCK</b>	Nucleósido cinasa	4q13.3-q21.1	30.5 kDa 260 aa	SI	Si No
<b>cN-II</b>	5-nucleotidasa citoplasmático	10q24.32	65 kDa 561 aa	SI No	SI
<b>dNT-1</b>	5-nucleotidasa citoplasmático	17q25.3	23.9 kDa 201 aa	No	Sin datos
<b>dNT-2</b>	5-nucleotidasa mitocondrial	17p11.2	25.9 kDa 228 aa	No	Sin datos
<b>CDA</b>	Citidina desaminasa	1p36.2-p35	16.2 kDa 146 aa	Si	Si No
<b>DNA pol <math>\alpha</math></b>	DNA polimerasa	11q13.1	70 kDa 598aa	Si	Si

### 3.6 Resistencia cruzada

Se sabe que la pérdida de actividad de las moléculas que activan a la citarabina en pacientes con LMA y líneas celulares, conduce a la obtención de resistencia a esta droga, sin embargo, se ha visto que, también conduce a la pérdida de efectividad a varios profármacos análogos de nucleósidos, que son activados mediante fosforilación, como lo son gemcitabina, cladribina, fludara, didesoxicitidina, 6-thioguanina, 6-mercaptoguanosina, vincristina, taxotere, 2-cloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxiadenosina, Fara-A, difluorodeoxiguanosina, difluorodeoxicitidina y decitabina. Esta resistencia cruzada, puede ser derivada de la pérdida de función de dCK, aunque también se reporta la presencia de la sobreexpresión de la proteína bcl-2 o P-gp y MRP, entre otras (Tabla 3), lo cual puede proporcionar resistencia a distintas antraciclinas, como lo son la adriamicina, vincristina, daunorrubicina, mitoxantrona, pirarubicina y homoharringtonina (Ka-Na, *et al.*, 2020; Shaffer, *et al.*, 2012; Baran, Gunduz, & Ural, 2006; Levin, Stark, Berman, & Assaraf, 2019; Cai, y otros, 2008; Martin-Aragon, *et al.*, 2000; Mansson, Spasokoukotskaja, Sallstrom,

Eriksson, & Albertioni, 1999; Stegmann, Honders, Kester, Landegent, & Willemze, 1993, Zhang, Gu, & Chen, 2019).

**Tabla 3.** Moléculas reportadas como causantes de la resistencia a multidrogas en LMA. Tomado de: Zhang, J. Gu, Y. Chen, B. 2019.

Moléculas	Mecanismo
P-gp	Puede extraer la droga de las células, reduciendo la concentración intracelular, haciendo a las células resistentes
MRP1	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Puede identificar y transportar el sustrato de acoplamiento con glutatión incluyendo drogas antineoplásicas</li> <li>2. Puede afectar la distribución de la droga en las células, haciendo que sean delimitadas por vesículas perinucleares previniendo que estas entren al núcleo y cumplan su función citotóxica</li> </ol>
LRP	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Puede bloquear los poros nucleares y prevenir que la droga entre al núcleo</li> <li>2. Puede transportar la droga del núcleo hacia vesículas para ser extraída fuera de la célula por exocitosis</li> </ol>
GST	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cataliza la síntesis de drogas anticancerígenas con glutatión para inactivar la actividad de la droga directamente</li> <li>2. Inhibe el efecto de las drogas anticancerígenas atacando el DNA intracelular</li> <li>3. Puede catalizar glutatión para unirse al platino, haciendo que no se una al DNA reduciendo así el efecto anticancerígeno de las preparaciones de platino</li> </ol>
Topo II	Topo II es el objetivo de muchas drogas antitumorales cuando el número y la actividad de Topo II disminuye el objetivo de las drogas anticancerígenas se pueden reducir o perder resultando en la resistencia a multidrogas
PKC	Aumenta la actividad de P-gp aumentando la fosforilación de P-gp conduciéndola a MDR
FLT3	Una mutación en esta molécula puede activar receptores que causen la proliferación incontrolable de células en leucemia mieloide aguda haciéndola resistente hacia quimioterapéuticos de rutina
WTI	La sobreexpresión de WTI puede sobre expresar QPRT dándole resistencia parcial a drogas antileucémicas
miRNA	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Las alteraciones en miRNA pueden sobre regular la resistencia a multidrogas mediante la reparación del ADN dañado por las drogas antineoplásicas</li> <li>2. Los miRNA pueden producir una baja regulación de proteínas, causando la detención del ciclo celular y produciendo resistencia a multidrogas</li> <li>3. La baja expresión de algunos miRNA puede reducir las vías de activación de apoptosis extrínseca dando como resultado resistencia a multidrogas</li> </ol>
P13/AKT	La excesiva activación de la ruta P13K/AKT puede regular la ruta de JNK-p38 MAPK, lo que lleva a la resistencia a drogas en células tumorales
Autofagia	Las células tumorales pueden reducir la concentración de la droga y prevenir la apoptosis mediante autofagia, llevando a resistencia a multidrogas.

### 3.7 Modelos de estudio a resistencia

En la actualidad se están buscando nuevas estrategias para superar la resistencia a ara-C utilizando modelos de resistencia a multidrogas, los cuales se desarrollan basándose en distintas líneas celulares, lamentablemente muchas de estas líneas no se encuentran en el mercado, por lo que cada grupo de investigación desarrolla sus líneas según sus necesidades de investigación, esto ha permitido la prueba de nuevos fármacos, uno de ellos se basa en el uso del fármaco elacitarabina (CP-4055), el cual es un análogo de ara-C, que no necesita del transportador hENT1, por lo que, al entrar a la célula, podría ser insensible a los mecanismos de resistencia a la citarabina, sin embargo, en estudios preclínicos no se logró demostrar superioridad de este fármaco sobre la terapia convencional en pacientes con AML (Rein & Rizzieri, 2014). Además del uso de inhibidores de Bcl-2, el cual, se ha demostrado que, aunado al uso de citarabina, se puede superar la resistencia a citarabina; también se ha hecho uso de hidroxurea y azidotimidina, que son medicamentos utilizados para controlar trastornos mieloproliferativos para aumentar la toxicidad de ara-C, sin embargo, la desventaja de este inhibidor es que produce un aumento en la toxicidad de hasta 17 veces en estudios in vitro. De manera interesante, también se han probado extractos de origen natural como es el caso de la proantocianina, proveniente de la semilla de uva, la cual revierte la resistencia a distintas drogas y este efecto está asociado con la inhibición de MDR1 (Ka-Na, *et al.*, 2020; Rein & Rizzieri, 2014; Nishi, *et al.*, 2013; Levin, Stark, Berman, & Assaraf, 2019).

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados hasta ahora para el desarrollo de estrategias para superar la resistencia a ara-C, en la actualidad no se tiene aún una solución a este problema, debido a la aparición de inconvenientes como en el caso de la elacitarabina mencionada previamente, en donde en estudios preclínicos no se ha encontrado mejoría significativa en el tratamiento a los pacientes o el uso de inhibidores con alta citotoxicidad que pueden resultar contraproducentes. Por otro lado, la mayoría de las investigaciones que sugieren el uso de nuevas moléculas se encuentran en la etapa de estudios in vitro, por lo que los mismos investigadores indican que lo que continúa son estudios en modelos de resistencia a multidrogas

en líneas celulares y modelos animales para determinar las dosis de las moléculas estudiadas, su efectividad y sus alcances tóxicos in vivo, y más adelante estudios preclínicos antes de poder usarlos como tratamientos establecidos en pacientes.

## **4. Planteamiento del problema**

Los pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) poseen alta prevalencia de enfermedad refractaria y recidivante, debido principalmente a la resistencia a la citarabina. Esto puede causar que el paciente no solo genere resistencia al fármaco aplicado, sino además la generación de resistencia cruzada, debido a ello se limita las opciones de tratamiento para el paciente. Por lo anterior, el desarrollar modelos de estudio que permitan evaluar la quimioresistencia en leucemia aún sigue vigente. En este sentido este estudio se generó una línea resistente a ara-C con la finalidad de realizar experimentos futuros para el estudio de moléculas que sensibilicen a células tumorales resistentes.

## **5. Hipótesis**

Se ha reportado que la línea celular de leucemia promielocítica aguda HL60 tiene la capacidad de desarrollar resistencia a ara-C regulando negativamente hENT1, la enzima dCK y sobre expresando P-gp, por lo que la exposición a concentraciones crecientes de ara-C al cultivo de la línea leucémica humana HL60, desarrollará resistencia.

## 6. Objetivos

### 6.1 General

Inducir resistencia a citarabina en la línea de células de leucemia mieloide aguda HL60

### 6.2 Particulares

- Determinar la IC<sub>50</sub> de citarabina para HL60 parental.
- Inducir la resistencia a citarabina en la línea de células HL60.
- Confirmar la resistencia a ara-C sobre la proliferación de HL60/ara-C resistente
- Determinar la expresión de moléculas características del desarrollo de resistencia a ara-C (hENT1 y dCK) y de resistencia a multidrogas (MDR1, MRP1).
- Evaluar si la línea HL60/ara-C resistente presenta resistencia cruzada con la antraciclina daunorrubicina

## 7. Materiales y métodos

**Cultivo celular.** La línea de leucemia promielocítica humana HL60, obtenida del ATCC, se cultivó en medio de cultivo IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco BRL, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL, USA), a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/mL, 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> con resiembra cada 48 h.

### **Proliferación y viabilidad celular.**

**Proliferación celular (MTS).** Las células HL60 se cultivaron en placas de 96 pocillos a la densidad de  $2 \times 10^4$ , con o sin la adición de diferentes concentraciones de citarabina (1nM a 1  $\mu$ M). Para evaluar la proliferación celular después del crecimiento, se le agregó CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS) y se dejó durante 4 horas. Se leyó a una densidad óptica a 490 nm y se determinó utilizando un lector de placas (Multiskan go). Este proceso se repitió con las células HL60/ara-C resistentes.

**Determinación de IC<sub>50</sub>.** Los datos se trazaron, y el IC<sub>50</sub> valor se determinó por regresión lineal mediante el uso del software Microsoft Office Excel donde los resultados se mostraron como porcentajes, se obtuvo la desviación estándar mediante experimentos triplicados individuales.

**Viabilidad celular (azul tripano).** Los ensayos de exclusión de azul tripano (Sigma, St. Louis, MO) se utilizaron para determinar el número de células viables en cada cultivo tratado, así como la IC<sub>50</sub>. La viabilidad celular se determinó mediante el conteo directo en una cámara Neubauer, y las células no teñidas se consideraron viables.

**Inducción de resistencia a ara-C en células HL60 parentales.** Las células parentales de la línea celular HL60 se cultivaron con concentraciones crecientes de ara-C (1 nM - 1  $\mu$ M) hasta que la duplicación en presencia de ara-C a 1  $\mu$ M fue casi el mismo que el de las líneas celulares parentales en ausencia de ara-C (Negoro, *et al.*, 2011), para tener la línea resistente a citarabina HL-60/ara-C resistentes.

**Diseño de Primers.** Para poder diseñar el primer fue necesario acceder al sitio de NCBI en la sección de expresión de genes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/genes-expression>) y se buscó el gen en el apartado “RefSeq transcripts” en el subapartado “FASTA”, se copió la secuencia del gen obtenida en un documento de texto en blanco, seguido del código del gen que empieza con “NM-XXXX”. En la sección del NCBI “Primer Blast” se pegó el código del gen y se ajustan los valores que se buscan en cada gen. En el documento de texto se pegó la secuencia Forward y Reverse, y se buscó el Forward en la secuencia del gen obtenida de “FASTA”, al Reverse se le obtuvo la secuencia complementaria y se busca dentro de la secuencia del gen, se cuenta el número de caracteres desde el inicio del Forward hasta el final de la cadena complementaria del Reverse en la cadena del gen y si el número de pares de bases coincide con la descripción del Primer se sabe que este es confiable

**Tabla 4.** Secuencia de Primers

Gen	Secuencia de Primer
hENT1	for: TCT CCA ACT CTC AGC CCA CCA A rev: CCT GCG ATG CTG GAC TTG ACC T
dCK	for: GGA CTC TGA AAA CCA GCT TTG ATT rev: CCA GGG TTT CGT GTT TGT CTT TA
MDR1	for: AGA CAT GAC CAG GTA TGC CTA T rev: AGC CTA TCT CCT GTC GCA TTA
MRP1	for: CAT TCA GCT CGT CTT GTC CTG rev: GCA TTA GGG TCG TGG ATG GTT
B-actina	for: CTT GTA CGC CAA CAC AGT GC rev: ATA CTC CTG CTT GCT GAT CC

**Detección de la expresión de hENT1, dCK, MDR1 y MRP1.** Primeramente, se realizó la extracción de RNA mediante la técnica de TRI (SIGMA No. De Cat. T9424-100mL), en donde se lisó con 500  $\mu$ L de TRI por cada  $1 \times 10^6$  células, al cual posteriormente se le agregó 200  $\mu$ L de cloroformo para ser centrifugados a 12500 rpm durante 15 minutos, la fase acuosa resultante se llevó a un tubo nuevo al cual se le adicionó 300  $\mu$ L de isopropanol para ser centrifugado nuevamente a 12000 rpm por 10 minutos, a lo obtenido se le adicionó 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó nuevamente a 7500rpm por 5 minutos, el pellet obtenido se hidrató con agua inyectable. Se cuantificó el RNA y se determinó su integridad en un gel de agarosa. La obtención de cDNA se obtuvo a partir de 500ng/mL de RNA con el kit High Capacity to cDNA Reverse Transcription Kit de Applied Biosystems No. De Cat. 4368814 en donde se agregó 2  $\mu$ L de 10x RT Buffer, 0.9  $\mu$ L de 2x dNTPs Mix, 2  $\mu$ L de random primers y 1  $\mu$ L de Multiscribe RT, se adiciona el RNA (500  $\mu$ g) y H<sub>2</sub>O hasta obtener 20  $\mu$ L de reacción, se agregó al termociclador Techne Genius durante 25°C por 10 minutos, 37°C 120 minutos, 85°C por 5 minutos y manteniéndose por 4°C. La PCR en punto final se realizó en con el kit de tiempo real Applied Biosystems SYBER GREEN PCR Master Mix No. De Cat. 4309155, donde se añadió 2  $\mu$ L de cDNA, posteriormente, se agregó 5  $\mu$ L de PCR Master MIX, 1  $\mu$ L de los Primers (F/R) previamente reconstituidos (Tabla 4), y 2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, esto se llevó al termociclador primero a 95°C por 10 minutos, posteriormente se llevó a 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto. El gel de agarosa se preparó con TBE 0.5X y 1.05 g de agarosa, el cual fue llevado a ebullición para la correcta disolución de este, posteriormente se le agregó 1.5  $\mu$ L de bromuro de etidio Sigma Aldrich No. Cat. E1385-5mL, la disolución se vertió en el molde añadiéndole TBE 0.5X cargando el marcador de peso molecular CSL-MDNA-100 BP Cleaver (1.5  $\mu$ L) y los genes (1.5  $\mu$ L), se dejó correr el gel a 90 volts por 40 minutos

**Análisis densitométrico de bandas.** Para el análisis de las bandas en el gel de agarosa se utilizó el programa Image Lab V. 6.0.1 de BIO-RAD Laboratories, en donde fue necesario convertir los archivos .jpg que entregaba el fotodocumentador

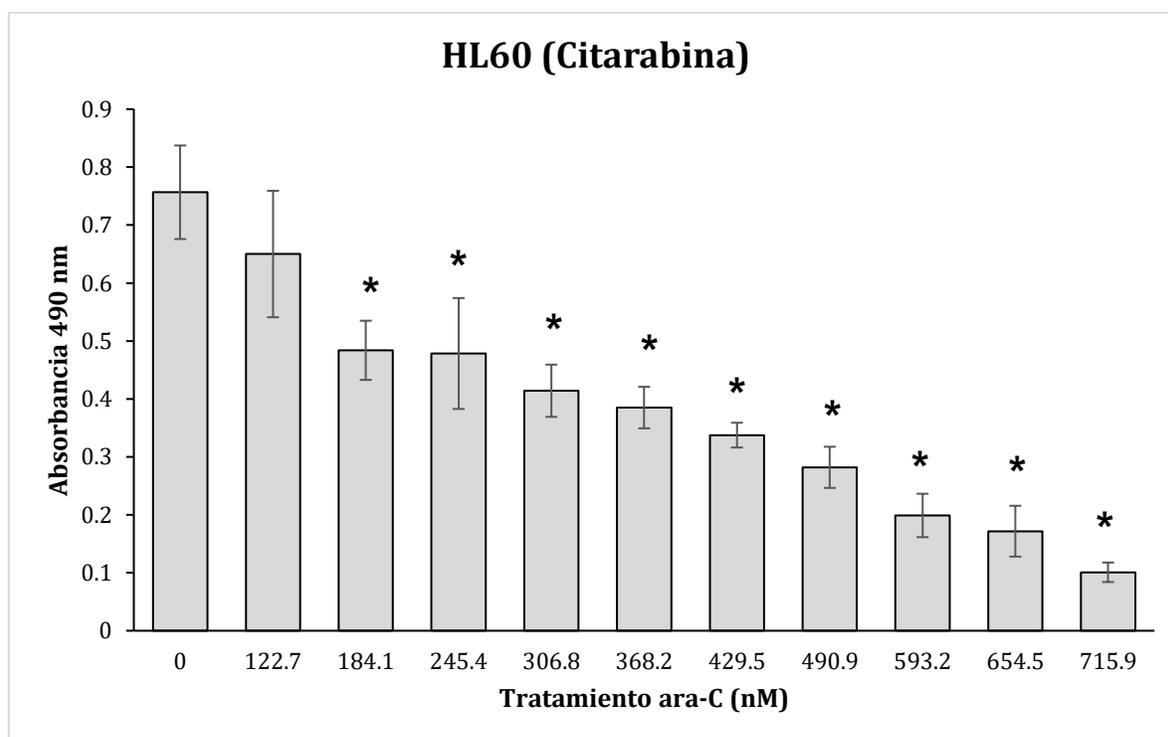
Ebox VX5 a un formato .tiff para ser reconocidas por el software. El análisis lo hace el programa y entrega un reporte que se pega en Excel para iniciar con el análisis.

**Análisis estadístico:** En Excel se separó y analizó los datos obtenidos de cada experimento tanto de HL60 parental como resistente, de estos datos se obtuvo el promedio, la desviación y error estándar, se graficaron los valores y se realizó la prueba T de Student.

## 8. Resultados

### 8.1 Determinación de la IC<sub>50</sub> a ara-C en la línea de Leucemia Promielocítica Aguda HL60.

Con la finalidad de iniciar con el desarrollo de resistencia a ara-C en la línea de leucemia promielocítica aguda humana HL60, fue necesario obtener una curva de proliferación celular, por lo cual, se realizaron ensayos independientes con concentraciones crecientes de ara-C, que se mantuvieron durante 48 horas para ser evaluados posteriormente mediante ensayos por MTS (CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay).

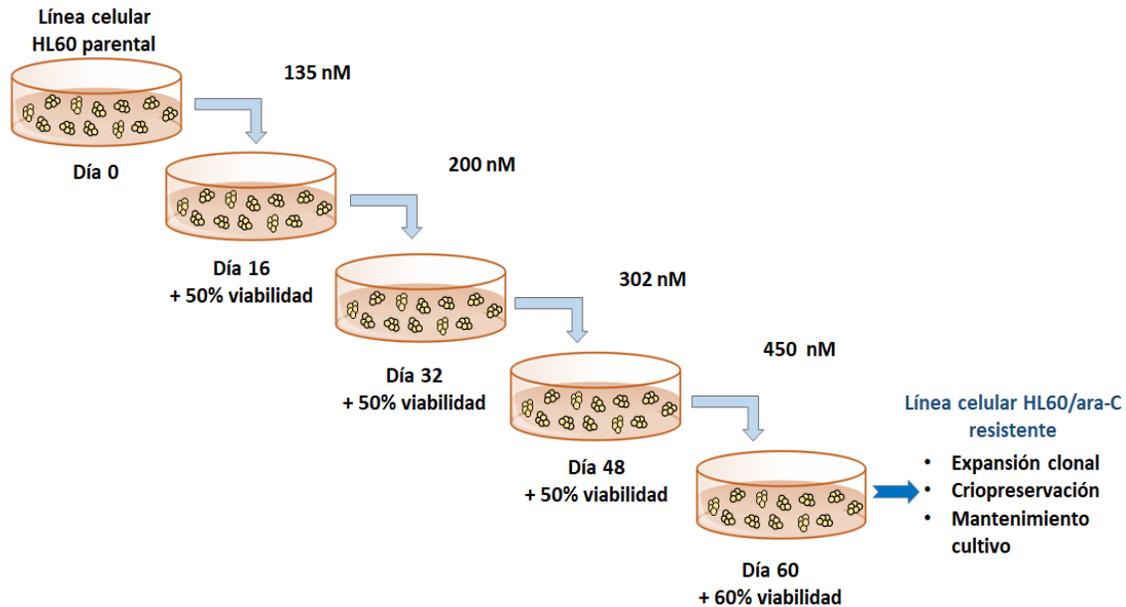


**Figura 2.** Reducción de la proliferación de la línea celular HL60 en forma de dependiente de la concentración inducida por ara-C, evaluado por MTS después de 48 horas de cultivo. Control con vehículo (0), ara-C (122.7, 184.1, 245.4, 306.8, 368.2, 429.5, 490.9, 593.2, 654.5, 715.9 nM).

Ara-C induce una disminución significativa de la proliferación desde la concentración de 184.1 nM respecto al control sin estímulo, esta inhibición va aumentando conforme aumenta la concentración a una inhibición aproximada del 90% para la concentración de 715.9 nM (Figura2). Usando estos datos, se calculó la IC<sub>50</sub> para ara-C la cual fue de 389 nM (Tabla 5).

## 8.2 Desarrollo de la línea HL60 resistente a ara-C

Para iniciar con el proceso de inducción de resistencia, se estableció un protocolo en el que cada cierto tiempo, se aumentó la concentración de ara-C en las células, siempre que estas mantuvieran una viabilidad encima del 50%, dada esta premisa, la concentración se incrementó cada 16 días de 135 nM, 200nM, 302 nM y 450 nM respectivamente (Figura 3).

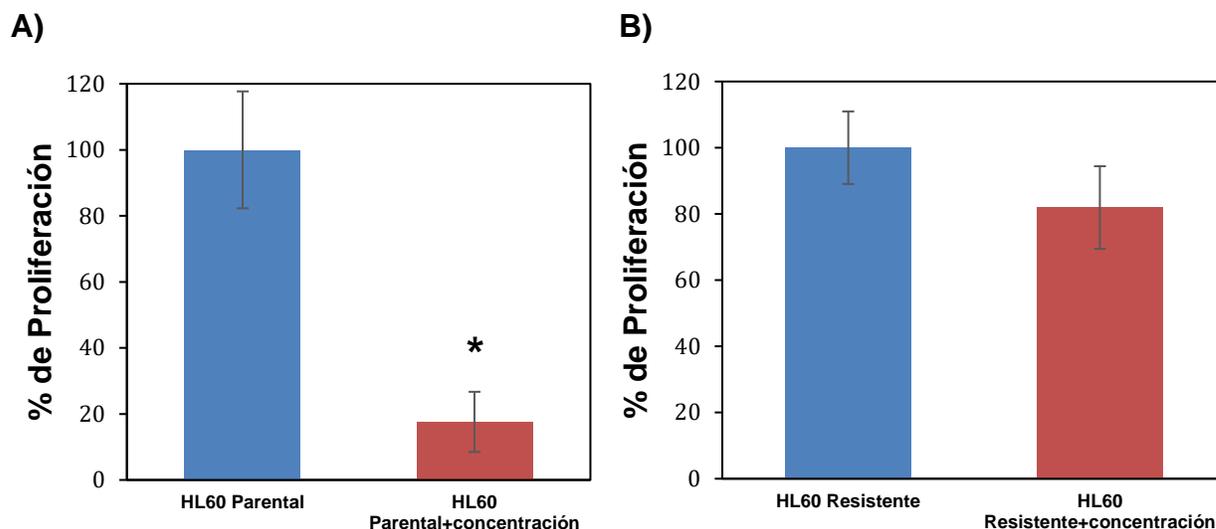


**Figura 3.** Metodología empleada para el desarrollo de la línea resistente HL60/ara-C

Al iniciar con el proceso de inducción a resistencia, se observa un rápido descenso en la proliferación celular, posteriormente la proliferación para el día 14, se encontraba cercana al de la línea parental. Al aumentar nuevamente la concentración, se obtuvieron resultados similares, la proliferación baja hasta casi el 60% y al llegar al día 14 se asemeja al de la parental. Este comportamiento empezó a variar al aumentar por tercera vez la concentración debido a que la proliferación se mantuvo alrededor del 60% durante todo el periodo. Esto mismo se observó en el último incremento, donde la proliferación de la línea no aumento si no hasta pasados casi 90 días con esta concentración.

### 8.3 Evaluación del efecto de ara-C en la línea HL60/ara-C resistente

Con la finalidad de poder observar los cambios en el comportamiento de la línea resistente, se realizó un ensayo en donde se cultivó la línea parental con concentración 450 nM de ara-C, posteriormente se evaluó mediante la obtención del número celular.

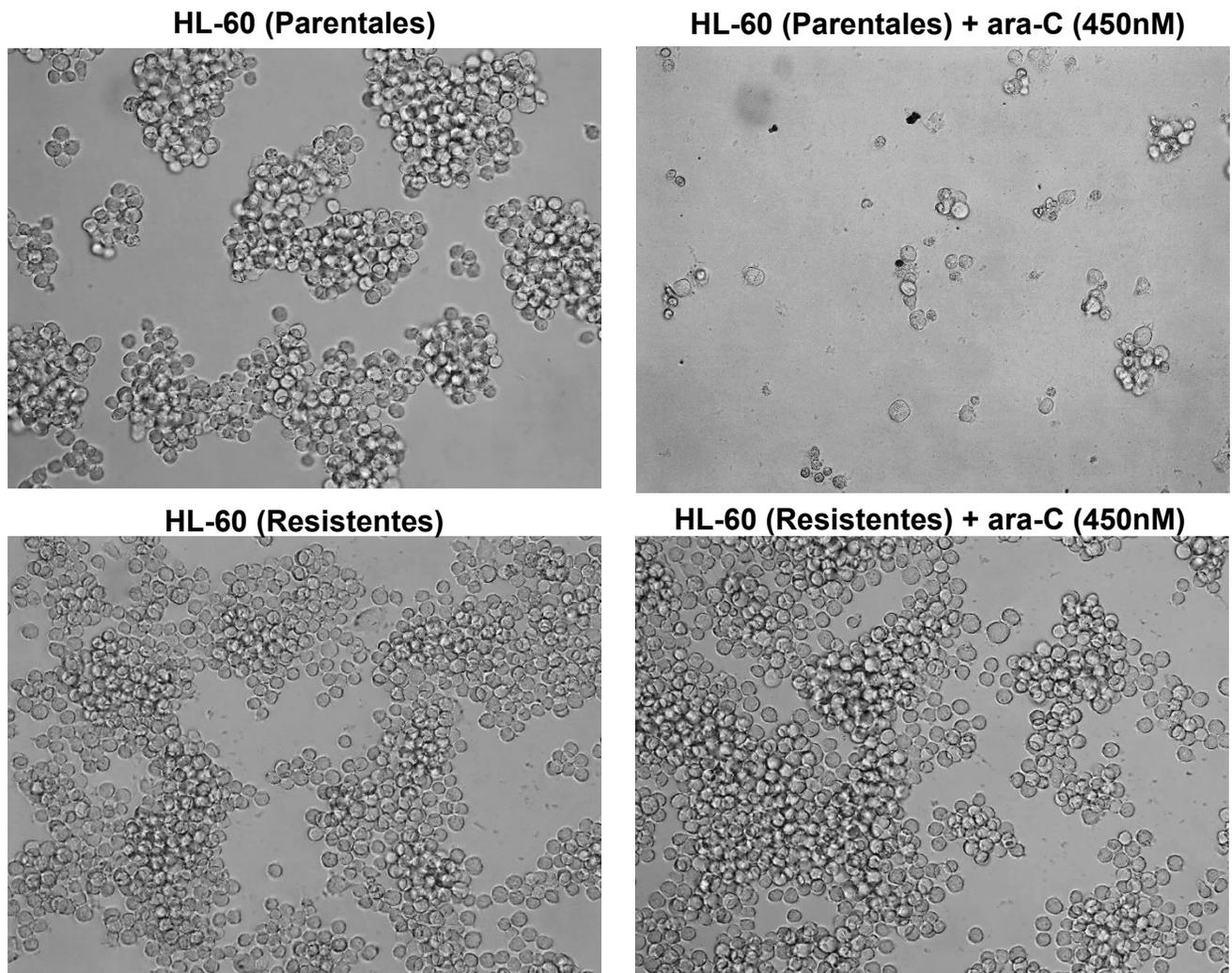


**Figura 4.** Número celular de HL60 parental (A) y resistente (B) en presencia/ausencia de 450 nM de ara-C. Promedio de tres experimentos independientes +/- error estándar. \*P<0.05. en la prueba T de Student.

Los resultados de la figura 4, indican que 450 nM de ara-C inhibe en forma significativa en más del 80% la proliferación de HL-60 parental respecto al control sin ara-C, mientras que en la línea resistente solo se observa una disminución de alrededor del 20% respecto a la línea resistente sin ara-C, lo cual sugiere que la línea HL60/ara-C adquirió resistencia a la citarabina.

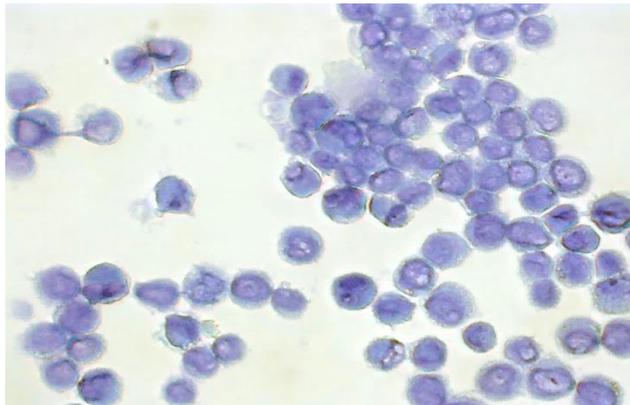
En la siguiente imagen (figura 5) se puede observar fotografías tomadas a las líneas en las concentraciones anteriormente mencionadas, en las cuales se denota el comportamiento de estas en ausencia y presencia de 450 nM de ara-C tanto en la línea parental como en la línea HL60/ara-C resistente destacando una marcada disminución en la proliferación en la línea parental con la concentración de ara-C y

un efecto bajo en la línea resistente, estas fotografías corresponden con lo observado en la figura 4:

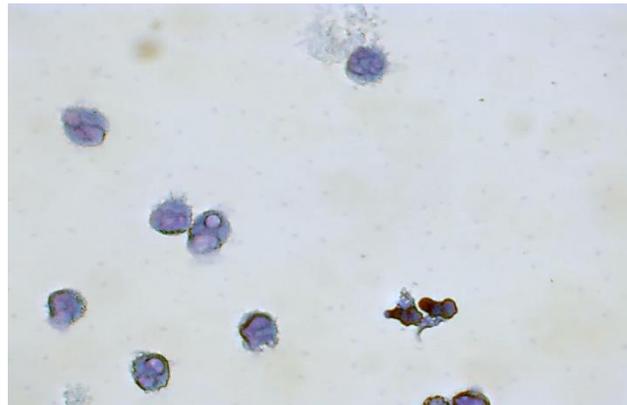


**Figura 5.** Fotografías tomadas a las líneas HL60 parental y resistente sin y con 450 nM de ara-C a 20X

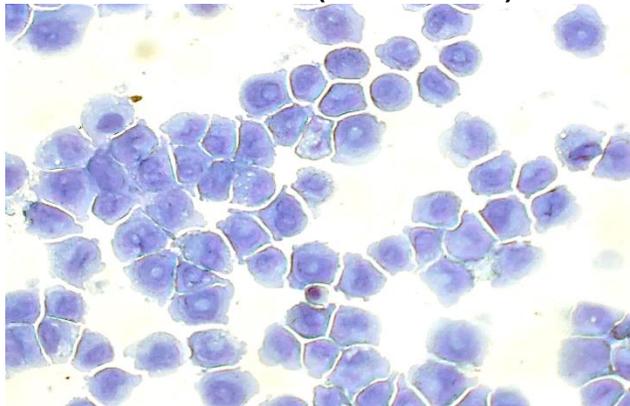
**HL-60 (Parentales)**



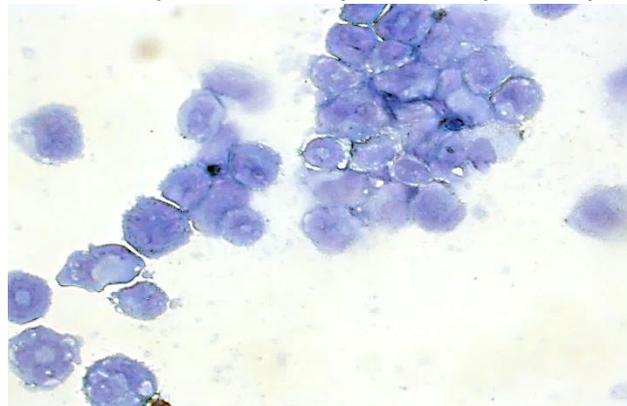
**HL-60 (Parentales) + ara-C (450nM)**



**HL-60 (Resistentes)**



**HL-60 (Resistentes) + ara-C (450nM)**



**Figura 6.** Tinción de células HL60 parental y HL60/ara-C resistente con hemocolorante rápido después de 48 horas de cultivo con y sin concentración de ara-C (450 nM) a 40X.

En las figura 6 se pueden observar cambios notables en HL60 parental con ara-C denotando el aumento del estrés celular y una marcada disminución del número celular, así como la posible falta de integridad celular respecto a la línea parental sin concentración de ara-C, o la línea resistente, que aparenta tener cambios cuando están con y sin la concentración de ara-C.

A su vez, se puede observar que a 40x se denotan posibles diferencias morfológicas entre las células parentales y resistentes quienes aparentemente incrementan tamaño lo que indicaría cierta probabilidad de inducción de diferenciación.

#### 8.4 Determinación de la expresión génica de hENT1, dCK, MRP1 y MDR1 en HL60 parental vs HL60/ara-C resistente

Con la finalidad de observar los cambios en la expresión de genes reportados para resistencia a ara-C se realizó PCR punto final, los resultados mostrados en la figura 7, en donde se observa un ligero aumento en la expresión del gen hENT1, y una disminución en dCK, MRP1 y MDR1:

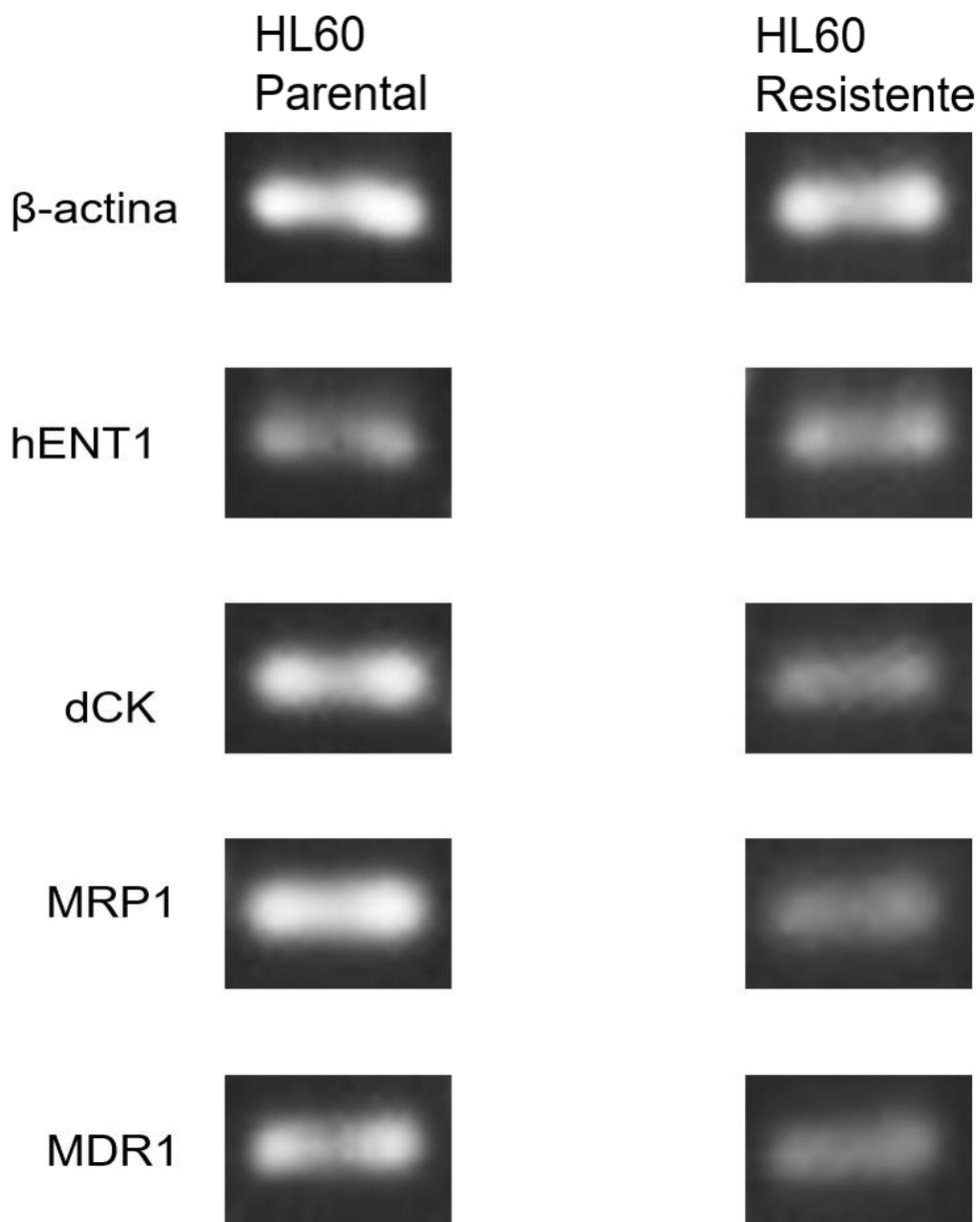
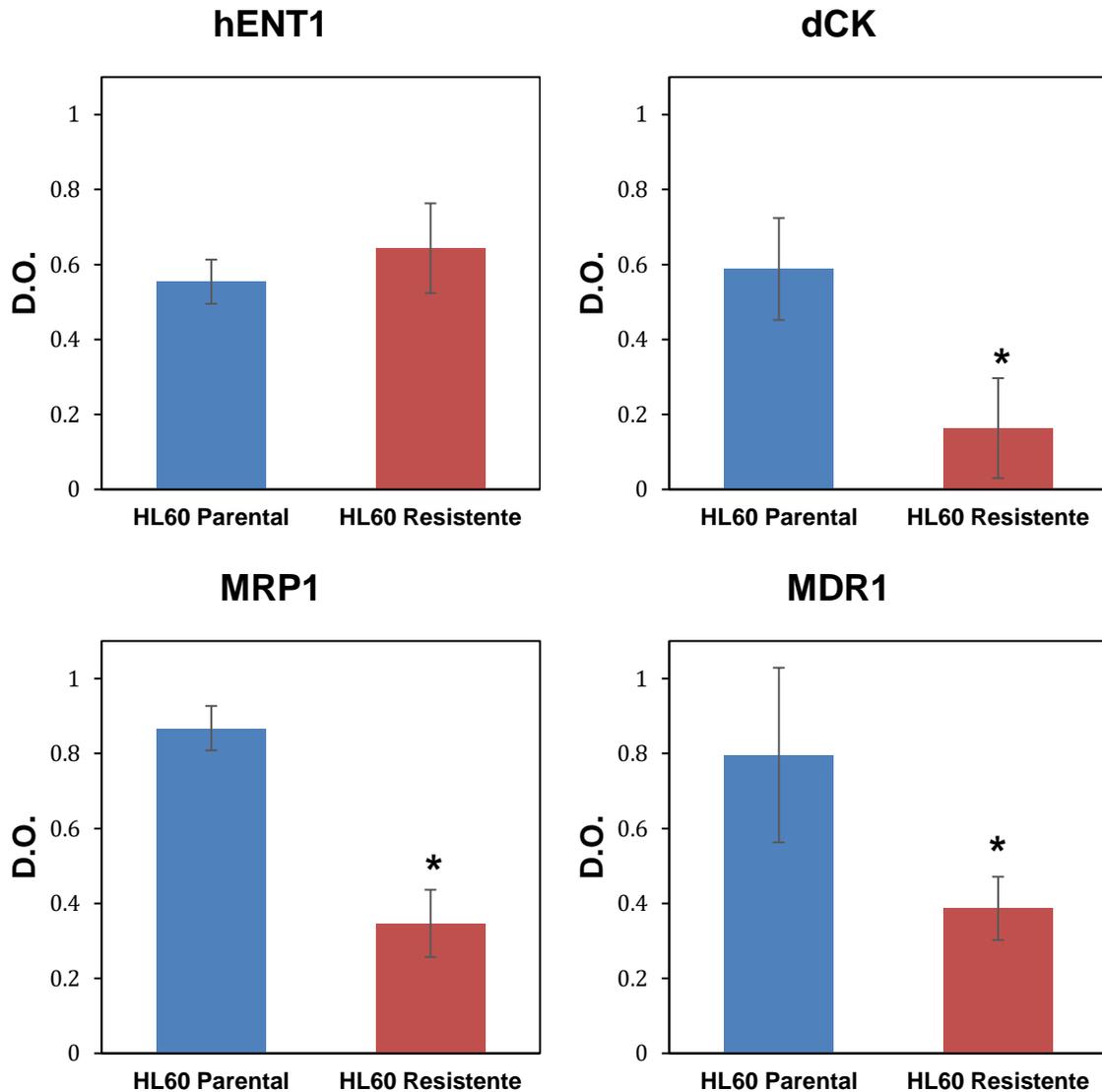


Figura 7. Expresión de los genes sobre gel de agarosa mediante PCR en punto final.

Un análisis densitométrico de las bandas con el programa Image Lab 6, revela que existe una tendencia de aumento en la expresión de hENT1, pero no es significativa, mientras se puede observar una disminución significativa en la expresión tanto de dCK, MRP1 y MDR1 (Figura 8).



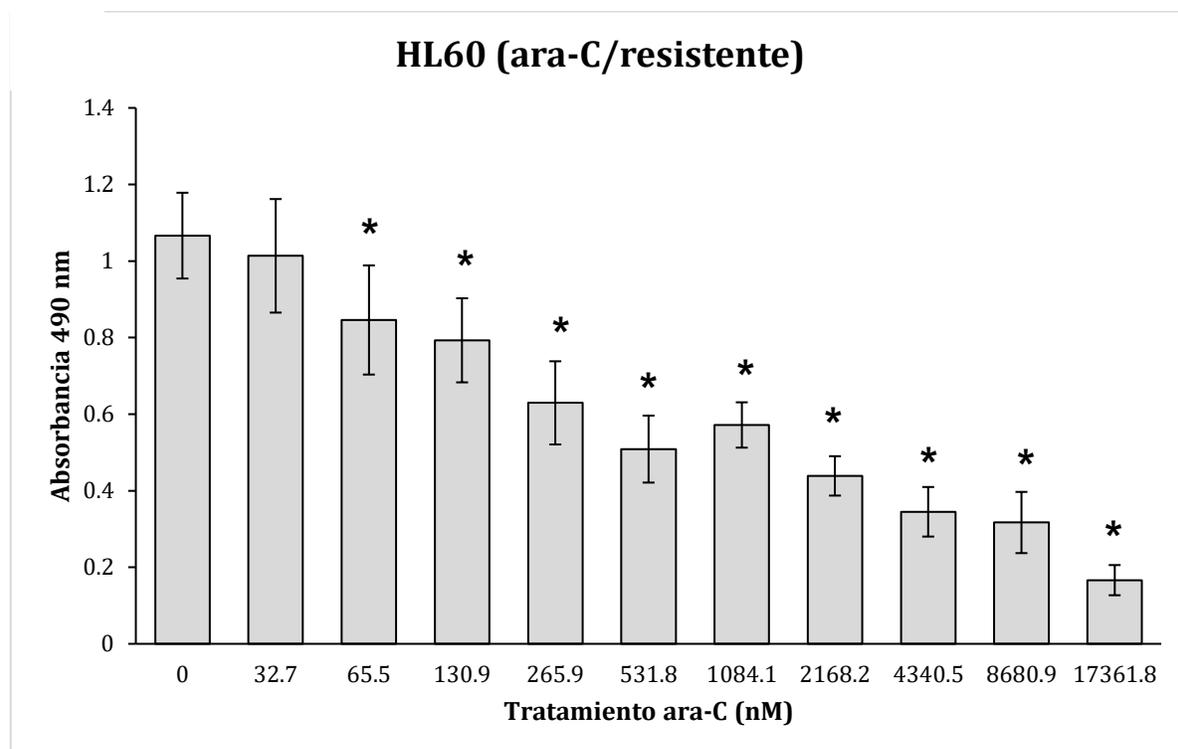
**Figura 8.** Evaluación de la expresión génica de HL60 parental vs HL60/ara-C resistente mediante la comparación de la densidad óptica (DO) respecto a  $\beta$ -actina en los genes hENT1, dCK, MRP1 y MDR1. Promedio de tres experimentos independientes +/- error estándar. \* $P < 0.05$  en la prueba T de Student.

**Tabla 5.** Cambios observados en los genes evaluados en HL60/ara-C resistente vs HL60 Parental

<b>Molécula</b>	<b>Función</b>	<b>Presenta algún cambio en la expresión</b>	<b>Aumenta o disminuye la expresión respecto a la parental</b>	<b>El cambio es significativo</b>
<b>hENT1</b>	Transportador de nucleósidos	Si	Ligero aumento	No
<b>dCK</b>	Nucleósido cinasa	Si	Disminuye	Si
<b>MRP1</b>	Transporte	Si	Disminuye	Si
<b>MDR1</b>	Transporte	Si	Disminuye	Si

### 8.5 Evaluación de la IC<sub>50</sub> a citarabina en HL60/ara-C resistente

Para poder evaluar el efecto que tuvo el desarrollo de resistencia a ara-C en HL60, se realizaron nuevamente ensayos de inhibición a la proliferación celular a concentraciones crecientes de ara-C en la línea resistente recién establecida, que se mantuvieron durante 48 horas para ser evaluados posteriormente mediante ensayo de MTS.



**Figura 9.** Reducción de la proliferación de la línea celular HL60/ara-C resistente en forma de concentración-respuesta inducida por ara-C, evaluado por MTS después de 48 horas de cultivo. Control con vehículo (0), ara-C (32.7, 65.5, 130.9, 265.9, 531.8, 1084.1, 2160.2, 4340.5, 8680.9, 17361.8 nM).

Como se logra observar en la figura 9, ara-C induce una disminución significativa desde 65 nM, que a pesar de ser una concentración menor que en la línea parental, se puede observar que HL60/ara-C resistente no tiene una disminución drástica en la proliferación, al aumentar aún más su concentración respecto a la línea parental.

Con los datos anteriores, se calculó la  $IC_{50}$  de ara-C para la línea HL60/ara-C resistente, la cual fue de 891 nM siendo 2.3 veces mayor que la línea parental (Tabla 5).

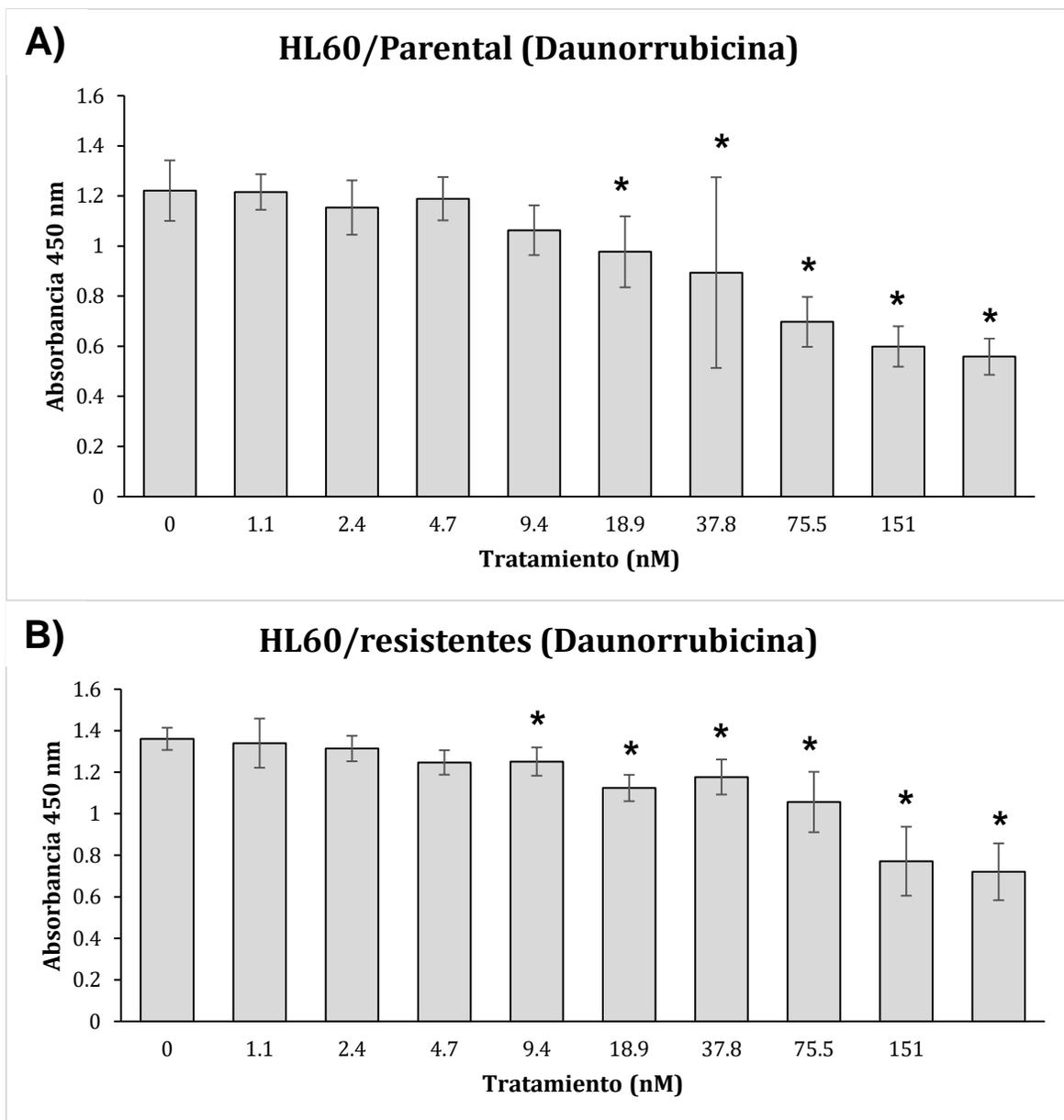
## **8.6 Determinación de una posible resistencia cruzada a daunorrubicina.**

Distintos autores han reportado la pérdida de actividad de distintas moléculas quimioterapéuticas cuando se presenta resistencia a ara-C, esto debido a las mutaciones que se obtuvieron durante la generación de resistencia, algunas de estas se presentan en moléculas como dCK, MDR1, MRP, o Bcl-2, entre otros (Ka-Na, Yue-Lian, Shun-Guo, Shi-Ying, & Hao, 2020; Shaffer, y otros, 2012; Baran, Gunduz, & Ural, 2006; Levin, Stark, Berman, & Assaraf, 2019; Cai, y otros, 2008; Martin-Aragon, y otros, 2000; Stegmann, Honders, Kester, Landegent, & Willemze, 1993; Mansson, Spasokoukotskaja, Sallstrom, Eriksson, & Albertioni, 1999).

Para poder evaluar la posible resistencia cruzada a una antraciclina (daunorrubicina) en HL60/ara-C resistente, se realizó una vez más ensayos de inhibición a la proliferación celular a concentraciones crecientes de ara-C en la línea resistente recién establecida y en la línea parental, que se mantuvieron durante 48 horas para ser evaluados posteriormente mediante ensayo de MTS.

Daunorrubicina induce una disminución de la proliferación significativa en la línea parental desde 9.4 nM hasta alcanzar un 50% de reducción respecto al control con más de 300 nM (Figura 10 A)

Al comparar el comportamiento de la línea resistente con la parental se puede observar que son prácticamente idénticas (Figura 10 A y B), sin observar cambios significativos entre ambos gráficos.



**Figura 10** Reducción de la proliferación de la línea celular HL60 en forma de dependiente de la concentración inducida por daunorubicina, evaluado por MTS después de 48 horas de cultivo. Control con vehículo (0), daunorubicina (1.1, 2.4, 4.7, 9.4, 18.9, 37.8, 75.5, 151, 303.2). Promedio de tres experimentos independientes +/- desviación estándar. \*P<0.05. en la prueba de Tukey A) HL60 parental B) HL60/ara-C resistente

Con los datos anteriores se calculó la IC<sub>50</sub> de daunorrubicina para HL60 parental y HL60/ara-C resistente (Tabla 5).

**Tabla 6.** Dosis media de inhibición a citarabina y daunorrubicina en células HL60 parental y HL60/ara-C resistente

	<b>HL60/ara-C resistente</b>	<b>HL60 parental</b>
<b>ara-C IC<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>891</b>	<b>389</b>
<b>daunorrubicina IC<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>66.05</b>	<b>64.86</b>

Como se puede observar en la tabla 5, la IC<sub>50</sub> para daunorrubicina, al igual que los gráficos de la figura 10 se mantiene prácticamente sin cambios.

## 9. Discusión

La LMA es un tipo de cáncer que se presenta en la sangre y en la médula ósea, siendo el tipo de leucemia aguda más común en adultos, la cual empeora rápidamente si no se trata, por lo que desde el diagnóstico, se inicia con el tratamiento que consiste en dos fases; Terapia de inducción a la remisión, donde es utilizado comúnmente citarabina y una antraciclina en su combinación 7+3, y la Terapia de post remisión o consolidación, que inicia después de la leucemia está en remisión el cual de igual forma se administra citarabina en dosis altas (HiDac), acompañado de trasplantes de médula ósea en pacientes menores a 60 años (NHI, NCI, 2021; American Cancer Society, 2021). A pesar de haberse estandarizado su uso desde 1973, sus mejoras no han sido suficientes para mejorar la tasa de supervivencia a más de 5 años, ya que esta se sigue manteniendo en alrededor del 25% (Percival & Estey, 2017).

En este estudio, se realizó el desarrollo de resistencia a ara-C en la línea de Leucemia promielocítica aguda HL60, con la finalidad de que permita el desarrollo de terapias menos tóxicas, o en su defecto, que aumenten la sobrevivencia de los pacientes al utilizarse como coadyuvante en la terapia convencional.

Con la finalidad de iniciar con el desarrollo de resistencia a citarabina, se realizaron curvas de proliferación y se obtuvo la  $IC_{50}$  a citarabina, en donde esta fue de 389 nM. El valor referente a la citarabina concuerda con el valor reportado por distintos autores (Crisp, *et. al.*, 1996; Qin, *et. al.*, 2007; Jagan, *et. al.*, 2012).

Con base a la  $IC_{50}$ , se inició la inducción a la resistencia con 135 nM y se aumentó progresivamente la concentración de ara-C, hasta llegar a una concentración en la cual no se vieran afectadas aún pasados 90 días con la misma concentración, durante el desarrollo de estas se observaron cambios en el comportamiento de las células donde se observó una disminución marcada en la proliferación, un aparente aumento en el tamaño celular, disminución en la densidad de las colonias, cambios en el consumo del medio de cultivo, aumento de células en desintegración que no mejora hasta después de varios meses, esto concuerda con lo observado por distintos autores durante el desarrollo de distintas líneas de leucemia resistentes

(Chen, Wei, & Cheng, 2018; Ohnoshi, Ohnuma, & Takahashi, 1982; Han, Zhu, & Wang, 2014).

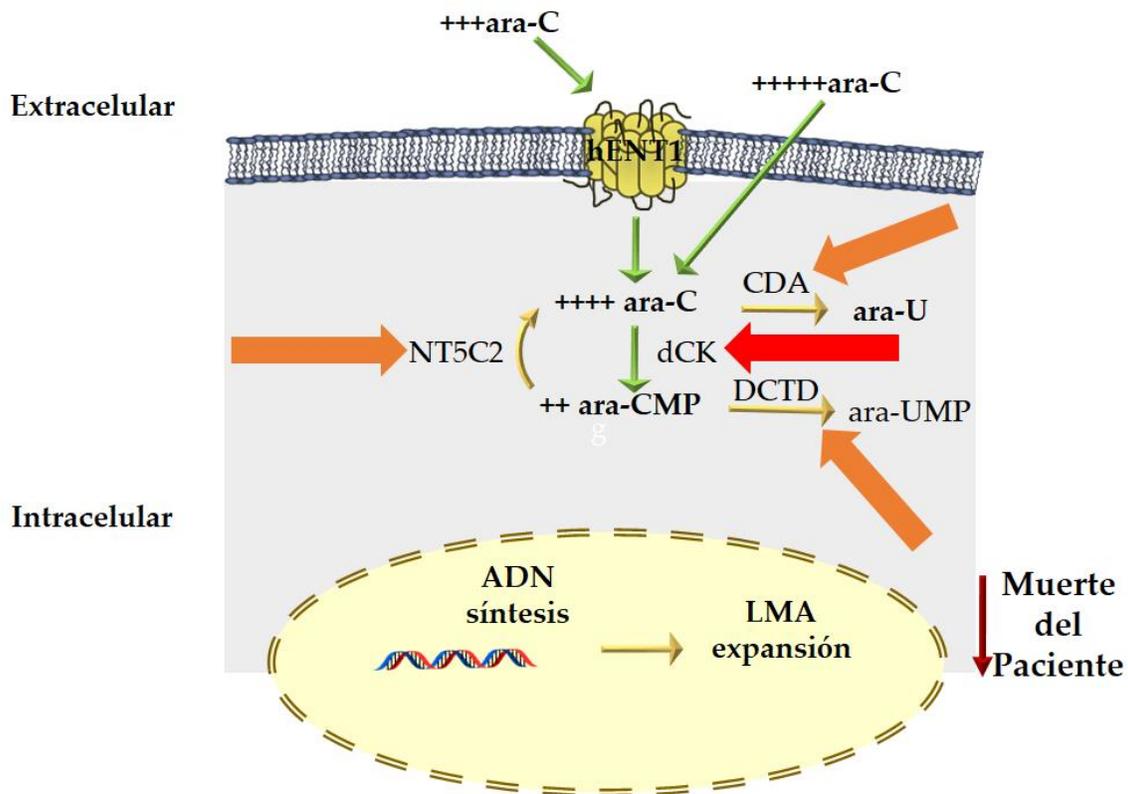
Una vez mostrado que se tenía una célula HL60 resistente a ara-C con una concentración de 450 nM y que es similar a la reportada en la literatura (Crisp, *et. al.*, 1996; Qin, *et. al.*, 2007; Jagan, y *et. al.*, 2012) se estableció una curva concentración-respuesta de proliferación de la línea resistente y se encontró que es 2.3 veces mayor que la parental.

La resistencia a ara-C reportada para HL60 varía según cada autor, llevándola desde 6 veces la IC<sub>50</sub> parental hasta 50 veces y hasta 2500 veces mayor en otros tipos de neoplasias (He, Hajj, Knapp, & Whitehead, 2019; McDermott, *et. al.*, 2014), sin embargo, otros autores concuerdan que el grado de resistencia a fármacos solo es clínicamente relevante si esta es de dos a diez veces mayor la IC<sub>50</sub> de la línea resistente sobre la línea parental, debido a que los pacientes posteriores a la quimioterapia presentan resistencia de dos a cinco veces mayor (Su, Davey, Davey, & Kidman, 1994; Negoro, *et. al.*, 2011; Yamauchi, *et. al.*, 2013; McDermott, *et. al.*, 2014; He, Hajj, Knapp, & Whitehead, 2019).

Respecto a la evaluación de la expresión génica, se observaron resultados similares a los reportados por distintos autores en líneas resistentes, donde se observa que hENT1 no presenta cambios en la expresión, mientras que dCK presenta una disminución en la expresión, a su vez MRP1 y MDR1 tienen una disminución en su expresión, lo que no concuerda con lo observado por Takemura y colaboradores, donde menciona que la resistencia específica a citarabina no aumenta la expresión de MDR1 ni MRP1 (Levin, Stark, Ofran Yishai, & Assaraf, 2021; Shigemi, Yamahuchi, Tanaka, & Ueda, 2013; Negoro, *et. al.*, 2011; Tang, *et. al.*, 2012; Kojima, *et. al.*, 2002; Nishi, *et. al.*, 2020; Takemura, Urasaki, Yoshida, Fukushima, & Ueda, 2001). Esta diferencia se puede explicar con base a las posibles diferencias intrínsecas de respuesta de la línea celular o tiempo de evolución de la inducción de resistencia para fijar una expresión alterada de un gen (Mansoori, Mohammadi, Davudian, Shirjang, & Baradaran, 2017)

La disminución marcada de dCK, es muy influyente en la resistencia ara-C, debido a que la ausencia de esta molécula provocaría que el metabolito ara-C no pueda continuar su ruta metabólica dentro de la célula, impidiendo acción sobre las células neoplásicas (Rein & Rizzieri, 2014; Luwenberg, *et. al.*, 2011; Wu, Duan, Chen, & Chen, 2017; Cros, *et. al.*, 2004, Takemura, Urasaki, Yoshida, Fukushima & Ueda, 2001).

Basado en estos datos, se sugiere que la causa de la resistencia a ara-C es la disminución de la expresión de dCK (figura 10), a las cuales se les necesitaría realizar evaluación de la expresión génica para ver su papel dentro de la resistencia a ara-C.



**Figura 11.** Posible ruta de resistencia a ara-C basado en los resultados obtenidos mediante PCR en punto final, la línea en rojo señala el gen con mayor causante en resistencia a ara-C y en naranja dos moléculas posiblemente implicadas. Editado de Fajardo-Orduña, *et. al.*, 2021.

Referente a la posibilidad de una resistencia cruzada a daunorrubicina, al realizar una curva concentración respuesta tanto en la línea parental como resistente se

observó que la  $IC_{50}$  en ambas líneas se mantiene sin cambios, más debería corroborarse con otros antineoplásicos para evaluar si es resistente a otras antraciclinas o arabinósidos, lo que concuerda con lo reportado por Levin y colaboradores y Nishi y colaboradores, que mencionan que el eflujo inducido por MDR1 no es un mecanismo establecido de resistencia a ara-C en la resistencia específica a ara-C, y que por ende no genera resistencia cruzada a las antraciclinas (Levin, Stark, Ofran Yishai, & Assaraf, 2021; Takemura, Urasaki, Yoshida, Fukushima & Ueda, 2001).

Dada la importancia de ara-C como el tratamiento principal para casos de LMA, la obtención de una línea resistente nos puede ofrecer encontrar nuevas vías y estrategias para superar la resistencia a multidrogas, y mejorar la supervivencia de los pacientes a largo plazo.

## **10. Conclusiones**

Se obtuvo el desarrollo de resistencia clínicamente relevante a citarabina en la línea de leucemia promielocítica HL60 (En el párrafo 6 de la discusión se describe que se considera clínicamente relevante).

Se logró obtener la IC<sub>50</sub> de citarabina y daunorrubicina en HL60 parental y HL60/ara-C resistentes.

Se sugiere que la disminución de la expresión de dCK es la causante de la resistencia en HL60/ara-C resistente es la disminución de la expresión de dCK.

## 11. Referencias

- ESMO/ACF Patient Guide Series. (2011). LMA: una guía para pacientes. *ESMO*.
- Adebayo Babatunde, K., Wang, X., Hopke, A., Lannes, N., Mantel, P.-Y., & Irima, D. (2021). Chemotaxis and swarming in differentiated HL-60 neutrophil-like cells. *Scientific Reports*.
- Aguilar López, L. B., Elva de León Cantú, R., Pérez Lozano, U., Montañó Figueroa, E. H., Terreros Muñoz, E., & Martínez Murillo, C. (2010). Diagnóstico y Tratamiento de Leucemia Mieloide Aguda. *Guía de Práctica Clínica. Secretaría de Salud*.
- American Cancer Society. (29 de 11 de 2021). *Acute Myeloid Leukemia in Adults*. Obtenido de Typical Treatment of Acute Myeloid Leukemia: <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/treating/typical-treatment-of-aml.html>
- Bai, H., Cao, Z., Deng, C., Zhou, L., & Wang, C. (2012). miR-181a sensitizes resistant leukaemia HL-60/Ara-C cells to Ara-C by inducing apoptosis. *Journal Cancer Research Clinical Oncology*, 595-602.
- Baran, Y., Gunduz, U., & Ural, A. (2006). Cross-resistance to cytosine arabinoside in human acute myeloid leukemia cells selected for resistance to vincristine. *Experimental Oncology*.
- Bárbara Hauert, A., Martinelli, S., Marone, C., & Niggli, V. (2002). Differentiated HL-60 cells are a valid model system for the analysis of human neutrophil migration and chemotaxis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 838-854.
- Cai, J., Damaraju, V. L., Groulx, N., Mowles, D., Peng, Y., Robins, M. J., . . . Gros, P. (2008). Two Distinct Molecular Mechanisms Underlying Cytarabine Resistance in Human Leukemic Cells. *Experimental Therapeutics, Molecular Targets, and Chemical Biology*.

- Catalá, A., Pastor-Anglada, M., Caviedes-Cárdenas, L., Malatesta, R., Rives, S., Vega-García, N., . . . Fernández-Calotti, P. (2016). FLT3 is implicated in cytarabine transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 in pediatric acute leukemia. *Oncotarget*.
- Chen, J., Wei, J., & Cheng, J. (2018). Characteristics of doxorubicin-selected multidrug-resistant human leukemia HL-60 cells with tolerance to arsenic trioxide and contribution of leukemia stem cells. *Oncology Letters*.
- Clarke, M., Mackey, J., Baldwin, S., Young, J., & Cass, C. (2002). Chapter 2 The role of membrane transporters in cellular resistance to anticancer nucleoside drugs. En S. Rosen, & R. Lurie, *Clinically Relevant Resistance in Cancer Chemotherapy* (pág. 29). USA: Springer Science+Business Media.
- Clemente, R. (2018). *Citarabina e inhibidores de FLT3 en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda*. Madrid : Facultad de Farmacia.
- COPREDOC. (2016). Prevención y Diagnóstico oportuno en Cáncer. *Sociedad Mexicana de Oncología*.
- Crisp, L., Smith, S., Mathers, Young, G., Lyons, S., & Christopherson, R. (1996). Effects of cytosine arabinoside on human leukemia cells. *Elsevier*.
- Cros, E., Jordheim, L., Dumontet, C., & Galmarini, C. M. (2004). Problems Related to Resistance to Cytarabine in Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 1123-1132.
- Demichelis, R. (25 de Octubre de 2018). La realidad de la Leucemia Mieloide Aguda en México. (L. Ríos, Entrevistador)
- Dombret, H., & Gardin, C. (2016). An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood*.
- Ellison, R., Carey, R., & Holland, J. (1967). Continuous infusions of arabinosyl cytosine in patients with neoplastic disease. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*.

- EMBL-EBI. (20 de 06 de 2018). *ChEBI*. Obtenido de CHEBI:28680 - cytarabine: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:28680>
- Fajardo-Orduña, G. R., Ledesma-Martínez, E., Aguiñiga-Sánchez, I., Mora-García, M., Weiss-Steider, B., & Santiago-Osorio, E. (2021). Inhibitors of Chemoresistance Pathways in Combination with Ara-C to Overcome Multidrug Resistance in AML. A Mini Review. *International Journal of Molecular Science*.
- Fang, Z., Wang, X., Sun, Y., Fan, R., Liu, Z., Guo, R., & Xie, D. (2019). Sgc8 aptamer targeted glutathione-responsive nanoassemblies containing Ara-C prodrug for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Royal Society of Chemistry*, 2300-23012.
- Gerson, S., Caimi, P., William, B., & Creger, R. (2018). Chapter 57 - Pharmacology and Molecular Mechanisms of Antineoplastic Agents for Hematologic Malignancies. En R. Hoffman, E. Benz, L. Silberstein, H. Heslop, J. Weitz, J. Anastasi, . . . S. Abutalib, *Hematology. Basic Principles and Practice* (págs. 849-912). US: Elsevier.
- Gluckman, A., Basch, B., & Varet, B. (1973). Combination chemotherapy with cytosine arabinoside and rubidomicina in 30 cases of acute granulocytic leukemia. *Cancer* 31, 487-491.
- Han, T., Zhu, X., & Wang, J. (2014). Establishment and characterization of a cisplatin-resistant human osteosarcoma cell line. *Oncology reports*.
- He, J., Hajj, K. A., Knapp, C. M., & Whitehead, K. A. (2019). Feature article: Development of a clinically relevant chemoresistant mantle cell lymphoma cell culture model. *Experimental Biology and Medicine*.
- Hussein, E.-S., & Abdullah, A.-B. (2009). Perfiles de Sustancias de Droga, Excipientes y Metodología Conexa. *ScienceDirect*.
- IACR, GIRC. (2015). Planificación y desarrollo de registros de cáncer de base poblacional en los países de ingresos bajos y medios. *Publicaciones Técnicas*.

- Jagan, S., Paganessi, L., Frank, R., Venugopal, P., Larson, M., & Christopherson, K. (2012). Bone Marrow and Peripheral Blood AML Cells Are Highly Sensitive to CNDAC, the Active Form of Sapacitabine. *Advances in Hematology*.
- Jokobsen, I. (2018). CDA, DCK and cN-II SNPs. En I. Jokobsen, *Prognostic Markers in Acute Myeloid Leukemia A Candidate Gene Approach* (págs. 20-22). Sweden: Linköping University.
- Juliusson, G., & Hough, R. (2016). Leukemia. *Karger*, 87-100.
- Ka-Na, L., Yue-Lian, J., Shun-Guo, Z., Shi-Ying, H., & Hao, L. (2020). Grape seed proanthocyanidin extract reverses multidrug resistance in HL-60/ADR cells via inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*.
- Kantarjian, H. (2015). Acute myeloid leukemia—Major progress over four decades and glimpses into the future. *American Journal of Hematology*, 131-145.
- Kojima, H., Lida, M., Miyazaki, H., Koga, T., Moriyama, H., & Manome, Y. (2002). Enhancement of Cytarabine Sensitivity in Squamous Cell Carcinoma Cell Line Transfected With Deoxycytidine Kinase. *American Medical Association*, 708-713.
- Kouchkovsky, I., & Abdul-Hay, M. (2016). Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer Journal*.
- Langadinou, E., Zoumbos, N., & Spyridonidis, A. (2010). Challenges in Treating Older Patients with Acute Myeloid Leukemia . *Journal of Oncology*.
- Levin, M., Stark, M., Berman, B., & Assaraf, Y. (2019). Surmounting Cytarabine-resistance in acute myeloblastic leukemia cells and specimens with a synergistic combination of hydroxyurea and azidothymidine. *Cell Death&Disease*.
- Levin, M., Stark, M., Ofran Yishai, & Assaraf, Y. (2021). Deciphering molecular mechanisms underlying chemoresistance in relapsed AML patients: towards precision medicine overcoming drug resistance. *Cancer Cell International*.

- Litchman, M. (2013). A historical perspective on the development of the cytarabine (7 days) and daunorubicin (3 days) treatment regimen for acute myelogenous leukemia: 2013 the 40th anniversary of 7+3. *Blood Cells*, 119-130.
- Luengo, A., Gui, D., & Vander Heiden, M. (2017). Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chemical Biology*, 1161-1180.
- Luwenberg, B., Pabst, T., Vellenga, E., Van Putten, W., Schouten, H., Graux, C., . . . Sonneveld, P. (2011). Cytarabine Dose for Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*.
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., & Baradaran, B. (2017). The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 339-348.
- Mansson, E., Spasokoukotskaja, T., Sallstrom, J., Eriksson, S., & Albertioni, F. (1999). Molecular and biochemical mechanism of fludarabine and cladribine resistance in human promyelocytic cell line. *Cancer Research*.
- Martin, S. J., Bradley, J. G., & Cotter, T. G. (1990). HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. *Clinical and experimental immunology*.
- Martin-Aragon, S., Mukherjee, S. K., Taylor, B. J., Ivy, P. S., Fu, C. H., Ardi, V., & Avramis, V. I. (2000). Cytosine arabinoside (ara-C) resistance confers cross-resistance or collateral sensitivity to other classes of anti-leukemic drugs. *Anticancer Research*.
- McDermott, M., Eustace, A. J., Busschots, S., Breen, L., Crown, J., Clynes, M., . . . Stordal, B. (2014). In vitro development of chemotherapy and targeted therapy drug-resistant cancer cell lines: a practical guide with case studies. *Frontiers in Oncology*.
- Mejía-Aranguré, J. M., Núñez-Enríquez, J. C., Fajardo-Gutiérrez, A., Rodríguez-Zepeda, M. d., Martín-Trejo, J. A., Duarte-Rodríguez, D. A., . . . Rangel-López, A. (2016). Epidemiología descriptiva de la mieloide aguda (LMA) en niños residentes de la Ciudad de México: reporte del Grupo Mexicano

Interinstitucional para la Identificación de las Causas de la MenteCinen en Niños . *Gaceta Médica de México*.

National Institute Cancer. (28 de 12 de 2020). *NCLthesaurus-NCI Term Browser*. Obtenido de Citarabina (Código C408): [https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI\\_Thesaurus&ns=NCI\\_Thesaurus&code=C408](https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C408)

National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease. (22 de 01 de 2021). *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548291/>

Negoro, E., Yamauchi, T., Urasaki, Y., Nishi, R., Hori, H., & Ueda, T. (2011). Characterization of cytarabine-resistant leukemic cell lines established from five different blood cell lineages using gene expression and proteomic analyses. *International Journal of Oncology*, 911-919.

NHI, NCI. (29 de 11 de 2021). *National Cancer Institute* . Obtenido de Acute Myeloid Leukemia Treatment (PDQ®)–Patient Version: <https://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/adult-aml-treatment-pdq>

Nishi, R., Shigemi, H., Negoro, E., Okura, M., Hosono, N., & Yamauchi, T. (2020). Venetoclax and alvocidib are both cytotoxic to acute myeloid leukemia cells resistant to cytarabine and clofarabine. *BMC Cancer*.

Nishi, R., Yamauchi, T., Negoro, E., Takemura, H., & Ueda, T. (2013). Combination of guanine arabinoside and Bcl-2 inhibitor YC137 overcomes the cytarabine resistance HL-60 leukemia cell line. *The official Journal of the Japanese Cancer Association*, 502-507.

N'rgaard, J. M., Bukh, A., Langkjer, S. T., Clausen, N., Palshof, T., & Hokland, P. (2002). MDR1 gene expression and drug resistance of AML cells. *British Journal of Haematology*.

Ohnoshi, T., Ohnuma, T., & Takahashi, I. (1982). Establishment of methotrexate-resistant Human Acute Lymphoblastic Leukemia Cells in Culture and Effects of Folate Antagonist. *Cancer Research*.

- OMS. (04 de 02 de 21). *Cancer Tomorrow*. Obtenido de Cancer Mañana: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>
- Oncology, A. S. (1 de 2019). *Cancer.net*. Obtenido de ASCO.ORG: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/leucemia-mieloide-aguda-aml-en-adultos/estadisticas>
- Parker, W. (2009). Enzymology of Purine and Pyrimidine Antimetabolites Used in the Treatment of Cancer. *Chemical Reviews*, 2880-2893.
- Percival, M., & Estey, E. (2017). Emerging Treatments in Acute Myeloid Leukemia: Current Standards and Unmet Challenges. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*.
- Qin, T., Youssef, E. M., Jelinek, J., Chen, R., Yang, A. S., Garcia-Manero, G., & Issa, J.-P. J. (2007). Effect of Cytarabine and Decitabine in Combination in Human Leukemic Cell Lines. *Cancer Therapy: Preclinical*, Clinical Cancer Research
- Rai, K., Holland, J., Glidewell, O., Weinberg, V., Brunner, K, Obrecht, J., . . . Kaan, S. (1981). Treatment of acute myelocytic leukemia: a study by cancer and leukemia group B. *Blood*, 1203-1212.
- Regalado, E., Laguna, A., & Martínez, J. (2010). Las esponjas marinas como fuente de nuevas sustancias bioactivas. . *Revista electrónica de la Agencia del Medio Ambiente*.
- Rein, L., & Rizzieri, D. (2014). Clinical potential of elacytarabine in patients with acute myeloid leukemia. *Therapeutic Advances in Hematology*, 211-220.
- Saultz, J., & Garzón, R. (2016). Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *Journal of Clinical Medicine*.
- Shaffer, B., Gillet, J. P., Patel, C., Baer, M., Bates, S., & Gottesman, M. (2012). Drug resistance: Still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug Resistant Update*, 62-69.

- Shigemi, H., Yamahuchi, T., Tanaka, Y., & Ueda, T. (2013). Novel leukemic cell lines resistant to clofarabine by mechanisms of decreased active metabolite and increased antiapoptosis. *Cancer Science*.
- Stegmann, A. P., Honders, M. W., Kester, M. G., Landegent, J. E., & Willemze, R. (1993). Role of deoxycytidine kinase in an in vitro model for AraC- and DAC-resistance: substrate-enzyme interactions with deoxycytidine, 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Leukemia*.
- Su, G., Davey, M., Davey, R., & Kidman, A. (1994). Development of extended multidrug resistance in HL60 promyelocytic leukaemia cells. *British Journal of Haematology*, 566-574.
- Takemura, H., Urasaki, Y., Yoshida, A., Fukushima, T., & Ueda, T. (2001). Simultaneous Treatment with 1-β-d-Arabinofuranosylcytosine and Daunorubicin Induces Cross-Resistance to Both Drugs due to a Combination-specific Mechanism in HL60 Cells. *Cancer Research*, 172-177.
- Tang, J., Xie, X., Zhang, X., Qiao, X., Jiang, S., Shi, W., . . . Zhou, X. (2012). Long term cultured HL-60 cells are intrinsically resistant to ara-C through high CDA activity. *Frontiers in Bioscience*, 569-574.
- Wu, D., Duan, C., Chen, L., & Chen, S. (2017). Efficacy and safety of different doses of cytarabine in consolidation therapy for adult acute myeloid leukemia patients: a network meta-analysis. *Scientific Reports*.
- Yamauchi, T., Uzui, K., Shigemi, H., Negoro, E., Yoshida, A., & Ueda, T. (2013). Aurora B inhibitor barasertib and cytarabine exert a greater-than-additive cytotoxicity in acute myeloid leukemia cells. *Cancer Science*.
- Yates, J., Wallace, J., Ellison, R., & Holland, J. (1973). Cytosine arabinoside and daunorubicin therapy in acute non-lymphocytic leukemia. *Cancer Chemotherapy*.
- Yeldag, G., Rice, A., & Del Río Hernández, A. (2018). Chemoresistance and the Self-Maintaining Tumor Microenvironment. *Cancers*.

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